



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA UNAM

EL PAPEL DE *GacA* SOBRE EL SISTEMA DE REGULACIÓN *PTS^{Ntr}* EN *AZOTOBACTER VINELANDII*.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

ING. RICARDO JAVIER FARRERA MURO

DIRECTOR DE TESIS

DRA. ELDA GUADALUPE ESPÍN OCAMPO

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

CUERNAVACA, MORELOS. Noviembre 2020.



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.

JURADO DE EXAMEN

Dr. Edmundo Calva Mercado
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. José Adelfo Escalante Lozada
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dra. Gloria Soberón Chávez
Instituto de Ciencias Biomédicas, UNAM

Dra. Susana Brom Klanner
Centro de Ciencias Genómicas, UNAM

Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán
Instituto de Biotecnología, UNAM

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la dirección de la Dra. Eida Guadalupe Espín Ocampo.

AGRADECIMIENTOS

A **CONACYT** y al **Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP)** por la beca otorgada con número 854805.

A la **Universidad Nacional Autónoma de México** por proporcionarme la oportunidad de continuar mi formación académica. La UNAM es, sin lugar a dudas, la mayor casa de estudios en el país.

A la **Dra. Elda Guadalupe Espin Ocampo** por brindarme la oportunidad de trabajar en su grupo. Le agradezco la enorme paciencia y su inquebrantable compromiso con el proyecto y con mi formación académica. No fue nada fácil pero llegamos a la meta.

A los miembros del comité tutorial, el **Dr. Otto Geiger** y el **Dr. Mario Soberón**. Sus comentarios siempre aportaron claridad a este tesista en apuros.

A **Holjes Salgado** por salir de su camino para ofrecerme ayuda y consejo en los momentos más difíciles. Me diste la fuerza para seguir adelante.

A **Cristian Ortiz** y **Leonel Ahumada** por su amistad y ejemplo de excelencia.

A **Soledad Moreno** y **Josefina Guzmán** por su absoluta disposición a apoyarme y asesorarme. Imposible lograrlo sin ustedes.

A todos los miembros del **grupo Espin-Nuñez-Segura** por la amistad y camaradería cultivadas durante estos años.

A **Emiliano, Daniel, Elsa y Arlen** por el cariño y amistad que nos llevaron a ser inseparables durante nuestros años de maestría.

A **María del Carmen Sánchez** por compartir el camino conmigo durante estos años.

A mi familia, **Francisco Farrera, Marcela Muro y Rafael Farrera**, por apoyarme y motivarme a siempre ser mejor. Mi eterna gratitud.

DEDICATORIA

Para Francisco y Marcela, por supuesto.

Índice General

Resumen	7
Abstract	8
Introducción	9
<i>Azotobacter vinelandii</i> y PHB	9
Regulación génica en la producción de PHB en <i>A. vinelandii</i>	11
Operón <i>phbBAC</i> y reguladores transcripcionales	11
Sistema GacSA-RsmZY-RsmA	13
Sistema PTS ^{Ntr}	15
Modelo integrado: PTS ^{Ntr} y GacSA-RsmZY-RsmA	18
Antecedentes	20
El papel de GacA sobre el sistema PTS ^{Ntr}	20
Cociente [PEP]/[Pyr] y efecto en PTS ^{Ntr}	22
Perfil proteómico comparativo <i>AEIV Wt-AEIV gacA</i> ⁻	23
Hipótesis	26
Objetivos	26
Objetivo general	26
Objetivos específicos	26
Estrategia experimental	27
Material y métodos	28
Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos	28
Condiciones de cultivo	30
Procedimientos con ácidos nucleicos	31
Construcción de mutante <i>ppsA::Km^R</i>	31
Construcción de plásmido pSAEIIA-1 y conjugación en <i>A. vinelandii</i>	32
Extracción y cuantificación de PHB en <i>A. vinelandii</i>	32
Detección del estado de fosforilación de EIIA ^{Ntr} a través de western blot en condiciones nativas	33
Resultados	34
La inactivación del gen <i>ppsA</i> afecta negativamente la producción de PHB en <i>A. vinelandii</i>	34
El fenotipo de baja producción de PHB en la mutante UW <i>ppsA::Km^R</i> es dependiente de EIIA ^{Ntr}	35
PpsA no afecta el estado de fosforilación de EIIA ^{Ntr} en <i>A. vinelandii</i> UW136	36
Discusión	38
Conclusiones	43
Perspectivas	43
Referencias	44

RESUMEN

Azotobacter vinelandii es una bacteria Gram-negativa con un gran potencial en el campo de la biotecnología principalmente por su capacidad de producir polihidroxibutirato (PHB), un poliéster biocompatible y biodegradable. El estudio del proceso de biosíntesis de PHB en esta bacteria ha conducido a la identificación de una gran variedad de genes involucrados y a la generación de complejos modelos de regulación génica en constante cambio. La regulación de dicho proceso se lleva a cabo por dos vías independientes: la vía de regulación global GacSA-RsmZY-RsmA y el sistema de regulación global PTS^{Ntr}. El sistema PTS^{Ntr} consiste en una cascada de fosforilación en donde el último aceptor, la proteína EIIA^{Ntr}, en su forma no fosforilada, promueve la degradación por medio del complejo ClpPA del factor sigma RpoS, el cual es esencial para la activación de los genes de la síntesis de PHB. Resultados preliminares de un proteoma comparativo han apuntado al gen *Avin_23280*, que codifica para la enzima fosfoenolpiruvato sintasa (PpsA), como un interesante objeto de estudio al ser una enzima productora de fosfoenolpiruvato, metabolito que permite la fosforilación inicial en el sistema PTS^{Ntr}. En este estudio identificamos que una inactivación en el gen *ppsA* disminuye considerablemente la producción de PHB en *A. vinelandii*. Contrario a lo esperado, encontramos que dicha inactivación en el gen *ppsA* no afectó el estado de fosforilación de EIIA^{Ntr}, lo que sugiere que el fenotipo de reducción de la síntesis de PHB en la mutante *ppsA* no es causado por la presencia de una EIIA^{Ntr} no fosforilada. Sorprendentemente la inactivación del gen *ptsN*, que codifica para EIIA^{Ntr}, restauró la producción de PHB en el fondo de la mutante *ppsA*. En conjunto, estos resultados sugieren que *ppsA* es un regulador positivo de la biosíntesis de PHB cuya regulación ocurre a través de un mecanismo desconocido hasta el momento.

ABSTRACT

Azotobacter vinelandii is a Gram-negative bacteria known for its enormous potential in the field of biotechnology due to its ability to produce polyhydroxybutyrate (PHB), a biodegradable and biocompatible polyester. The study of the PHB biosynthesis process in this model has led to the identification of a variety of genes involved, and the development of complex ever-changing genetic regulation models. This process is regulated by two global regulation systems: the GacSA-RsmZY-RsmA and the PTS^{Ntr}. Preliminary results of a comparative proteome have highlighted the gene Avin_23280, a phosphoenolpyruvate synthase (PpsA) encoding gene, as a potential regulator of PHB biosynthesis due to its involvement in phosphoenolpyruvate production, the metabolite used for the initial phosphorylation of PTS^{Ntr}. In this study, we have identified that *ppsA* inactivation decreases PHB production importantly. Unexpectedly, such inactivation does not change the phosphorylation state of EIIA^{Ntr}, the last enzyme in the PTS^{Ntr} phosphorelay, therefore the repression observed does not seem to be caused by the presence of a non-phosphorylated EIIA^{Ntr}. Surprisingly *ptsN* inactivation, EIIA^{Ntr} encoding gene, suppresses the low PHB-producing phenotype observed in the *ppsA* mutant. Overall, these results suggest that *ppsA* is a PHB-biosynthesis positive regulator employing currently unknown mechanism.

INTRODUCCIÓN

***Azotobacter vinelandii* y PHB**

Azotobacter vinelandii es una bacteria Gram-negativa ampliamente distribuida de vida libre en suelo, perteneciente a la Clase Gamma Proteobacteria. Miembro de la Familia *Pseudomonadacea*, *A. vinelandii* es una bacteria grande, pleomórfica, mótil a través de flagelos peritricos y capaz de desarrollar quistes resistentes a la desecación.

Este microorganismo es capaz de fijar nitrógeno atmosférico, además de producir alginato y polihidroxicanoatos (PHAs), haciendo de *A. vinelandii* un modelo de estudio sumamente interesante. Además, esta bacteria puede hacer uso de sustratos complejos para su crecimiento, debido a la capacidad de metabolizar una gran variedad de fuentes de carbono, permitiendo la disminución de costos de producción en procesos biotecnológicos (Page, 1999).

Los polihidroxicanoatos son polímeros producidos por algunos microorganismos como reservas de carbono que pueden ser usados como bioplásticos. Se conocen al menos 90 géneros de bacterias capaces de producir este material (Zinn et al., 2001). De naturaleza polimérica, los polihidroxicanoatos son poliésteres lineales que parten de un esqueleto estructural como el mostrado en la figura 1. Se conocen alrededor de 150 diferentes polihidroxicanoatos (Zhang et al., 2006), clasificados en tres grupos en función de la longitud de la cadena lateral: polihidroxicanoatos de cadena corta (scl-PHAs) correspondientes a ramificaciones menores a 5 carbonos, polihidroxicanoatos de cadena media (mcl-PHAs) con grupos de 5 a 14 carbonos y, por último, PHAs de cadena larga (lcl-PHAs) con más de 14 carbonos. Esta familia de polímeros son biodegradables, biocompatibles, insolubles en agua y resistentes a luz UV (Bugnicourt et al., 2014). En cuanto a sus propiedades mecánicas, éstas varían en función de la composición química del material.

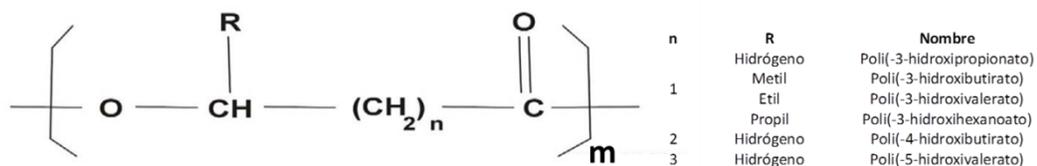


Figura 1: Estructura general de los polihidroxicanoatos y algunos ejemplos. Modificado de Raza et al., 2018.

Diferentes bacterias producen diferentes polihidroxicanoatos, los cuales, a su vez, muestran una amplia variedad en su composición dependiendo de la fuente de carbono disponible y demás factores ambientales en el medio de cultivo (Volova, 2004 y Savenkova et al., 2000). *A. vinelandii* produce principalmente poli(-3-hidroxi-butirato) (PHB), un polihidroxicanoato de cadena corta con propiedades mecánicas similares a las encontradas en el polipropileno (figura 2).

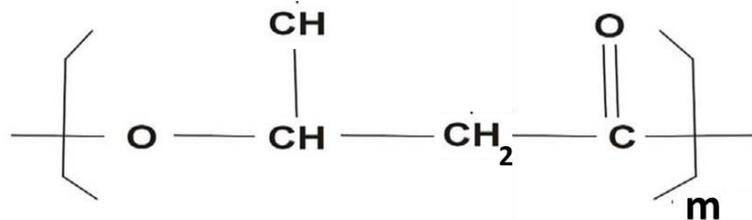


Figura 2: Estructura del poli(-3-hidroxi-butirato). Modificado de Raza et al., 2018.

La producción de PHB en *A. vinelandii* comienza durante la fase exponencial tardía, llegando a representar alrededor del 75% del peso seco de la célula (Page, 1992). Este material es almacenado en forma de gránulos en el interior de la célula (ver figura 3A).

Generalmente, la producción de PHB ocurre en condiciones de privación de nutrientes esenciales para su crecimiento (nitrógeno, oxígeno, fósforo y magnesio), así como en exceso de fuentes de carbono (Burns et al., 2007). La producción de PHAs en *A. vinelandii* ocurre tanto en células vegetativas como durante el enquistamiento (Reusch et al., 1981) dado que mutantes negativas en *phbB* y *phbC*, genes esenciales en la biosíntesis de PHB, presentan un claro fenotipo de enquistamiento (figura 3C y 3B, respectivamente), permitiendo inferir que la producción de PHB no es esencial para la formación de quistes resistentes a la desecación (Segura et al., 2003). El estudio de la producción de PHB en *A. vinelandii*, se ha llevado a cabo en la cepa no enquistante UW136, una cepa no mucoide incapaz de producir alginato debido a una inserción natural en el gene *algU* que codifica para el factor sigma alternativo σ^6 , esencial para la producción de dicho polisacárido (Martínez-Salazar et al., 1996). Debido al enfoque del proyecto en la biosíntesis de PHB y las ventajas técnicas que representa el uso de una cepa no mucoide, se ha hecho uso de la cepa UW136 de *A. vinelandii* en este trabajo.

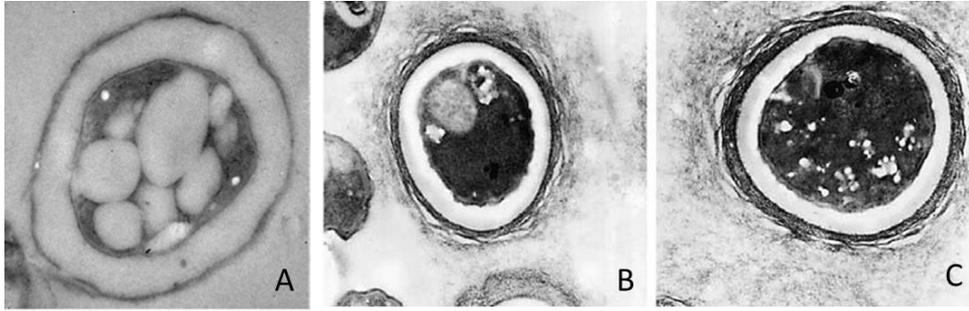


Figura 3: Gránulos de PHB en quistes de *A. vinelandii*. Micrografías electrónicas de quistes de *A. vinelandii* A) Quiste de cepa silvestre de *A. vinelandii* ATCC 9046, B) Quiste de mutante *phbC*, C) Quiste de mutante *phbB*.

Regulación génica en la producción de PHB en *A. vinelandii*.

Operón phbBAC y reguladores transcripcionales

La producción de PHB en *A. vinelandii* depende directamente de la expresión del operón biosintético *phbBAC* codificante para las tres enzimas que participan en la síntesis de este polímero: PhbB, PhbA y PhbC (Segura et al., 2000; Petinari et al., 2001).

Bioquímicamente, la biosíntesis de PHB en *A. vinelandii* comienza con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA mediante la enzima β -cetotilasa PhbA resultando en una molécula de acetoacetyl-CoA, reducida posteriormente por la enzima acetoacetyl-CoA reductasa PhbB a 3-hidroxiacetyl-CoA para, finalmente, ser polimerizada mediante por la enzima PHB sintasa PhbC (Figura 4A).

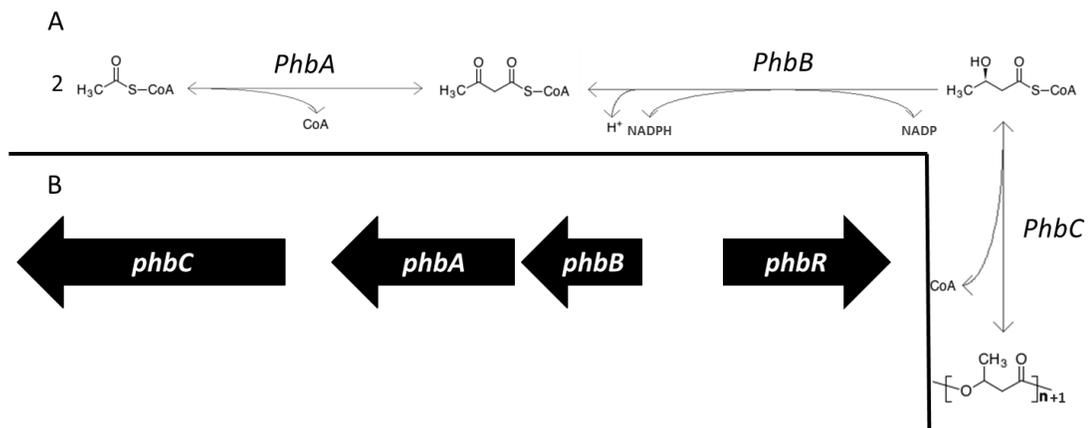


Figura 4: Biosíntesis de PHB y operón *phbBAC* en *A. vinelandii*. A) Biosíntesis de PHB a partir de acetil-CoA mediante las enzimas PhbA, PhbB y PhbC en *A. vinelandii*. B) Contexto génico del operón *phbBAC* y el regulador transcripcional *phbR*.

Transcripcionalmente, el operón *phbBAC* es regulado de manera positiva por el regulador PhbR, un activador directo perteneciente a la familia AraC, y por el factor sigma de fase estacionaria RpoS, esencial para la expresión de los genes de biosíntesis de PHB y, a su vez, de *phbR*.

Se han identificado experimentalmente dos promotores para la transcripción de *phbBAC*: pB1 y pB2; ambos contribuyen a la expresión del operón en fase estacionaria. El regulador transcripcional PhbR posee dos sitios de pegado, denominados R1 y R2, que coinciden con la región -35 de pB1. La unión de PhbR a dichos sitios activa directamente la expresión del operón *phbBAC* a través de pB1. Por otro lado, la expresión de PhbR ocurre a través de dos promotores activos en fase estacionaria denominados pR1 y pR2. RpoS, factor sigma de fase estacionaria, regula indirectamente la transcripción de *phbR* de forma positiva. En conjunto, PhbR y RpoS son esenciales para la producción de PHB y su inactivación abate por completo la producción de este polímero (Peralta-Gil et al., 2002; Hernández-Eligio et al., 2011) (ver figura 5).

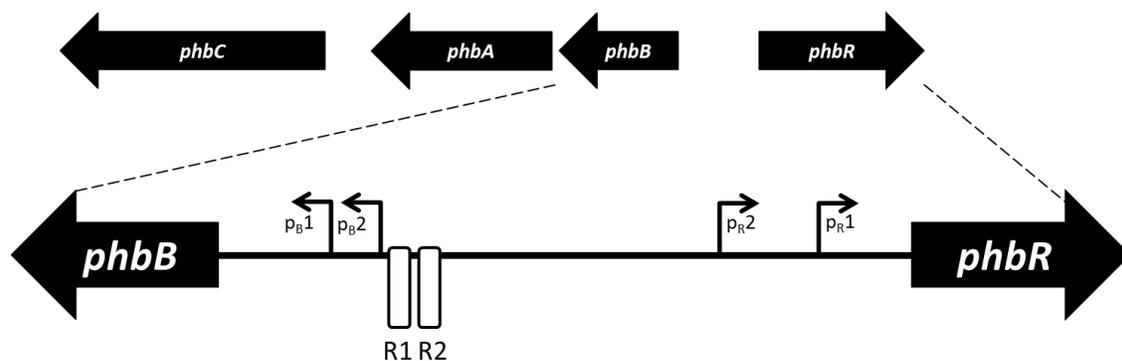


Figura 5: Región intergénica *phbB-phbR*. Modificado de Peralta-Gil (2002).

La intrincada regulación que se lleva a cabo en *A. vinelandii* para la biosíntesis de PHB que concluye en la expresión del operón biosintético va más allá de la expresión y activación transcripcional de PhbR y RpoS. A continuación, se presentan los dos sistemas de regulación globales que rigen el proceso de producción de PHB en *A. vinelandii*, el sistema GacSA-RsmA y PTS^{Ntr}.

Sistema GacSA- RsmZY-RsmA

El sistema GacS-GacA-RsmYZ-RsmA está ampliamente conservado en un gran número de bacterias y es homólogo al sistema BarA-UvrY-CsrBC-CsrA de *Escherichia coli*. En este sistema, CsrA (RsmA) es una proteína homodimérica capaz de modular la traducción de mRNAs al unirse directamente al sitio de unión del ribosoma (Babitzke & Romeo, 2007). El regulón de CsrA en *E. coli* regula funciones como metabolismo de carbono, motilidad y formación de biopelícula (Liu et al., 1997).

El estudio y caracterización de CsrA en *E. coli* develó su interacción con CsrB y CsrC, dos RNAs pequeños capaces de secuestrar a la proteína en cuestión mediante la titulación de su dominio de unión a RNA. (Liu et al., 1997 & Weibacher et al., 2003). La expresión de tales sRNAs está a cargo del sistema de dos componentes BarA-UvrY (GacS-GacA), conformado por la histidina quinasa transmembranal BarA y su regulador de respuesta UvrY. Estos circuitos de regulación están ampliamente distribuidos en bacterias con la finalidad de promover la rápida adaptación de la célula al ambiente mediante el reconocimiento de señales específicas extracelulares a través de la histidina quinasa para, posteriormente, expresar un arsenal de genes a través de su respectivo regulador de respuesta (Suzuki et al., 2002).

En el caso de *A. vinelandii*, se han identificado y caracterizado todos los genes del circuito GacS-GacA-RsmYZ-RsmA (Castañeda et al., 2000; Castañeda et al., 2001; Hernández-Eligio et al., 2011; Manzo et al., 2011, Hernández-Eligio et al., 2012). Los genes *phbR* y *phbB* forman parte del regulón de RsmA, a cuyos transcritos se une directamente en la región 5' inhibiendo su traducción por impedimento estérico debido a la proximidad al sitio de unión del ribosoma y afectando su estabilidad (Hernández-Eligio, 2012).

La titulación de RsmA y, por lo tanto, la liberación de su efecto negativo sobre la biosíntesis de PHB ocurre cuando la histidina quinasa GacS activa a su respectivo regulador de respuesta, GacA, mediante su fosforilación. GacA en su forma fosforilada activa la expresión de 8 sRNAs denominados RsmZ1-7 y RsmY mediante la unión directa a la secuencia conservada THTAAG-N⁶-CTTACA en el respectivo promotor (Hernández-Eligio, 2012). Estos sRNAs presentan en su estructura secundaria motivos -GGA- expuestos en bucles capaces de formar interacciones con residuos ubicados en las láminas $\beta 1$ y $\beta 5$ de cada unidad del dímero RsmA, titulándolo y, en el

caso de *A. vinelandii*, permitiendo la traducción de PhbR y PhbB (ver figura 6) (Babitzke & Romeo, 2007).

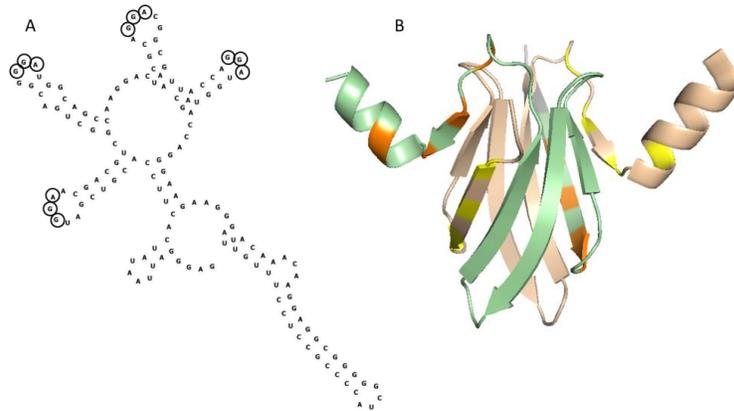


Figura 6: Estructuras de RsmZ1 y RsmA. A) Predicción de estructura secundaria por el método de minimización de energía (Lorenz et al., 2011). Se destacan en círculos los motivos -GGA- expuestos en bucles. B) Estructura homodimérica de CsrA (RsmA) de *Pseudomonas aeruginosa* (PDB ID: 1VPZ). Se presentan en color verde y rosa los monómeros. En color naranja y amarillo se destacan los residuos esenciales para la interacción RNA-proteína en las láminas $\beta 1$ y $\beta 5$ de cada unidad.

A continuación se presenta un esquema general del modelo de regulación génica en *A. vinelandii* GacSA-RsmZY-RsmA para la biosíntesis de PHB.

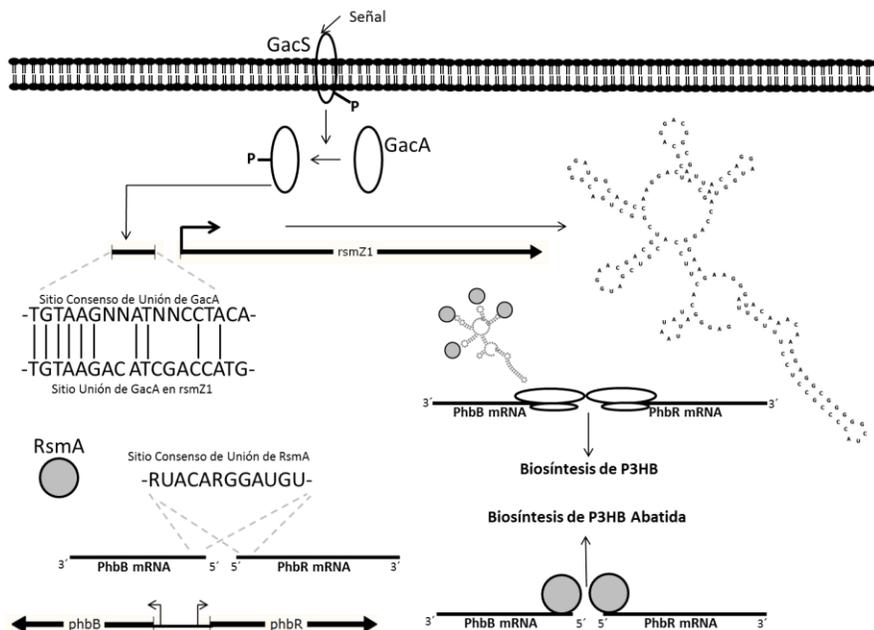


Figura 7: Modelo de regulación GacSA-RsmZY-RsmA en *A. vinelandii*. Se muestran todos los componentes del circuito regulatorio, así como las secuencias de unión a RNA y DNA involucradas. La biosíntesis de P3HB es regulada por el sistema de dos componentes GacSA mediante la expresión de 8 sRNA, capaces de secuestrar al regulador postranscripcional RsmA, permitiendo así la biosíntesis de PHB a través de la liberación de la expresión de *phbB* y *phbR*.

Sistema PTS^{Ntr}

Los sistemas de fosfotransferencia (PTS) están distribuidos tanto en bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, permitiendo la rápida adaptación a cambios en la disponibilidad de fuentes de carbono en el ambiente. Este mecanismo brinda al organismo dicha versatilidad metabólica a través de la regulación del transporte y fosforilación de una variedad de carbohidratos en la célula (Postma et al. 1993).

Canónicamente, los sistemas de fosfotransferasas están compuestos por una serie de proteínas capaces de hacer el relevo de un grupo fosfato proveniente del intermediario de la glucólisis, fosfoenolpiruvato (PEP), transfiriéndolo, a un carbohidrato en específico para su translocación y metabolismo. A pesar de ligeras diferencias en cuanto a sus componentes, todos estos sistemas presentan un funcionamiento similar, el cual se describe a continuación y se muestra en la figura 8.

El primer componente del sistema, denominado enzima I (EI), es capaz de autofosforilarse a partir de una molécula de PEP para, a continuación, transferir este fosfato a la proteína HPr. El fosforrelevo continúa a la enzima IIA (EIIA). Estos 3 primeros elementos (EI, HPr, EIIA) se encuentran típicamente en el citoplasma de la célula. Posteriormente, EIIA transfiere el fosfato a EIIAB y este último fosforila el azúcar que ha sido internalizado desde el espacio periplásmico por EIIC. El fosforrelevo concluye con la internalización y formación de un carbohidrato fosforilado que entra al metabolismo central de carbono. (Saier & Reizer, 1994; Carmona et al., 2015).

Las enzimas II (EIIA, EIIB, EIIC y EIID) son específicas a un tipo de fuente de carbono, por lo que la asimilación de diversas fuentes de carbono, como azúcares y derivados de azúcares, ocurre a través de una variedad de EIIs. Hasta la fecha se han identificado un gran número de PTS en bacterias, cada uno de ellos específico para la internalización y activación de un solo tipo de fuente de carbono (ver más en Jeckelman & Erni, 2019). Como ejemplo de lo anterior, se muestran en la figura 8 esquemas del sistema de fosfotransferasas para la internalización y fosforilación de glucosa (PTS^{Glc}) y fructosa (PTS^{Fru}) de *E. coli*.

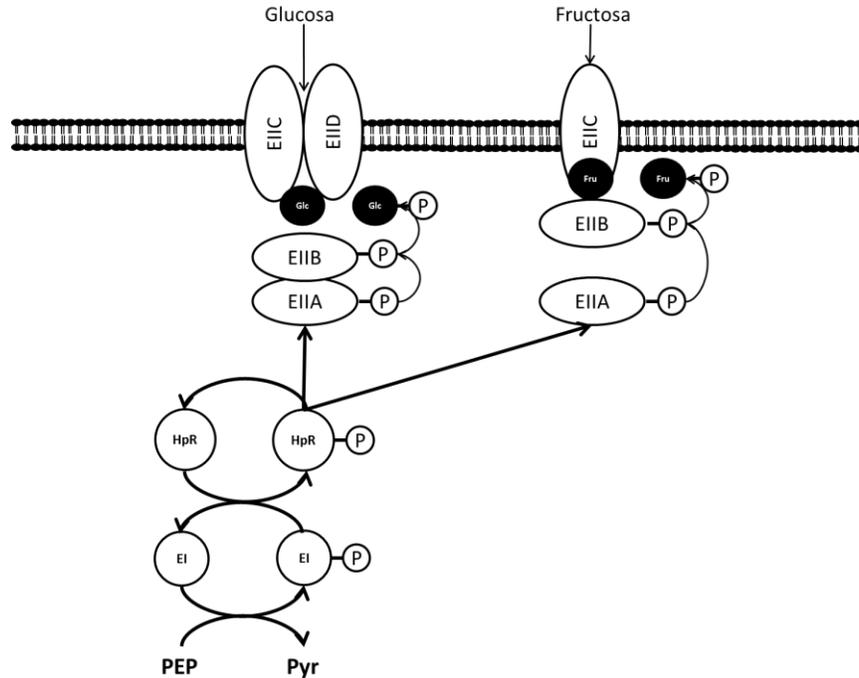


Figura 8: Esquema de los sistemas de fosfotransferasas para la asimilación de glucosa (Glc) y fructosa (Fru) en *E. coli* (Jeckelman & Erni, 2019).

Adicionalmente a los PTS para la fosforilación y entrada de azúcares, existe un sistema similar con funciones reguladoras diferentes a las anteriormente descritas. Powell y colaboradores reportaron en 1995 un nuevo sistema de fosfotransferasas en *E. coli*. Este mecanismo denominado sistema de fosfotransferasa relacionado a nitrógeno (PTS^{Ntr}) a diferencia de los sistemas involucrados con el metabolismo de carbohidratos, fue propuesto en un inicio como un supuesto enlace entre el metabolismo de carbono y nitrógeno en la célula (Reizer et al., 1992).

El PTS^{Ntr} está compuesto por tres elementos: la enzima I (EI^{Ntr}), el intermediario en el fosforrelevo, NPr y, por último, la enzima EIIA^{Ntr}. El flujo del grupo fosfato ocurre de la misma manera que en el resto de sistemas de fosfotransferencia, es decir, a través de la secuencia EI^{Ntr}-NPr-EIIA^{Ntr}, sin embargo, y a diferencia de los sistemas canónicos, no se conoce el paradero del grupo fosfato más allá de EIIA^{Ntr}.

Aún se conoce poco de las funciones de este sistema, sin embargo éstas son reguladoras y varían de modelo a modelo. Por ejemplo, en *Klebsiella pneumoniae*, EIIA^{Ntr} parece guardar estrecha relación con la expresión de algunos miembros del regulón σ^{54} (RpoN), involucrado en la regulación del metabolismo de nitrógeno (Merick et al., 1995). Mecanismos de virulencia han sido ligados a EI^{Ntr} en *Legionella pneumophila* (Edelstein et al., 1999) y *Pseudomonas aeruginosa* (Tan

et al., 1991A & B). En *E. coli*, la homeostasis de potasio es regulada a través de la unión directa del transportador de K⁺ de baja afinidad Trk con la isoforma fosforilada de EIIA^{Ntr} (EIIA^{Ntr}-P) disminuyendo su actividad (Lee et al., 2007), y a través de la activación de la expresión del transportador iónico ATP dependiente KdpFABC por EIIA^{Ntr} no fosforilado (Lüttmann et al., 2009). Más casos han sido reportados, exhibiendo una enorme variedad de funciones regulatorias y mecanismos de acción (para información a mayor profundidad ver Pflüger-Grau & Görke, 2010).

A. vinelandii posee dos sistemas funcionales de fosfotransferasas, uno de ellos específico para fructosa (PTS^{Fru}) y el vinculado a nitrógeno (PTS^{Ntr}). Este último juega un papel importante en la regulación de la biosíntesis de PHAs no sólo en este modelo de estudio sino también en *Pseudomonas putida*, bacteria filogenéticamente cercana a *A. vinelandii* (Velázquez et al., 2007).

La primera asociación entre la producción de PHB y PTS^{Ntr} fue observada por medio de EI^{Ntr}, producto génico de *ptsP* cuya ausencia disminuía considerablemente la biosíntesis de PHB (Segura & Espin, 1998). Posteriormente, Noguez et al. (2008) identificaron los genes *ptsO* y *ptsN*, codificantes para NPr y EIIA^{Ntr} respectivamente, y sugirieron el fosforrelevo funcional EI^{Ntr}-NPr-EIIA^{Ntr}, en el que la isoforma no fosforilada de EIIA^{Ntr} es un regulador negativo en la biosíntesis de PHB al disminuir la tasa de transcripción de *phbR* y el operón *phbBAC*.

Muriel-Millán et al. (2015) presentaron resultados para explicar la relación entre la actividad de PTS^{Ntr} y la disminución de la expresión de *phbR* y *phbBAC* a través de RpoS. Más tarde, se demostró que esto ocurre a través de la actividad del complejo chaperon-proteasa ClpAP, capaz de afectar la estabilidad de RpoS en función del estado de fosforilación de EIIA^{Ntr}: en presencia de EIIA^{Ntr} no fosforilado la degradación de RpoS tiene lugar y, por lo tanto, la biosíntesis de PHB es abatida, caso contrario a lo observado con EIIA^{Ntr}-P en donde la producción de PHB ocurre sin obstáculos (Muriel-Millán et al., 2017). A continuación se presenta un esquema del PTS^{Ntr} y su regulación en la producción de PHB en *A. vinelandii*.

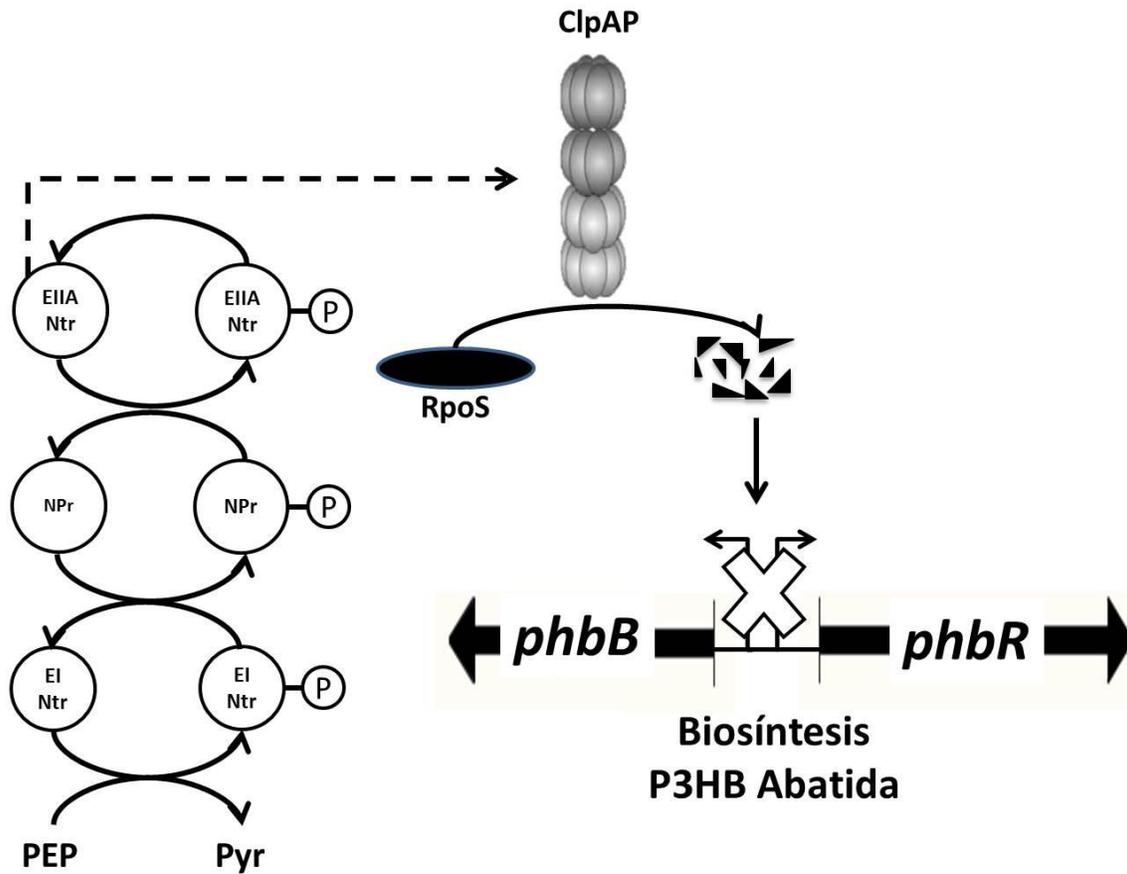


Figura 9: Regulación de la biosíntesis de P3HB en *A. vinelandii* por el Sistema de Fosfotransferasas vinculado a Nitrógeno PTS^{Ntr}.

Modelo integrado: *PTS^{Ntr}* y *GacSA-RsmZY-RsmA*

La biosíntesis de PHB es un fenómeno fuertemente regulado en *A. vinelandii*, traduciéndose en un desafiante y complejo objeto de estudio. Como se ha explicado, la producción de PHB es mediada por dos sistemas independientes: el sistema de regulación global *GacSA-RsmYZ-RsmA* y el PTS^{Ntr}. Ambos sistemas convergen en la regulación de la expresión del operón *phbBAC*, elemento codificante para las enzimas necesarias para la biosíntesis de PHB. A continuación se presenta un esquema gráfico de la regulación de la biosíntesis de PHB, integrando ambos sistemas.

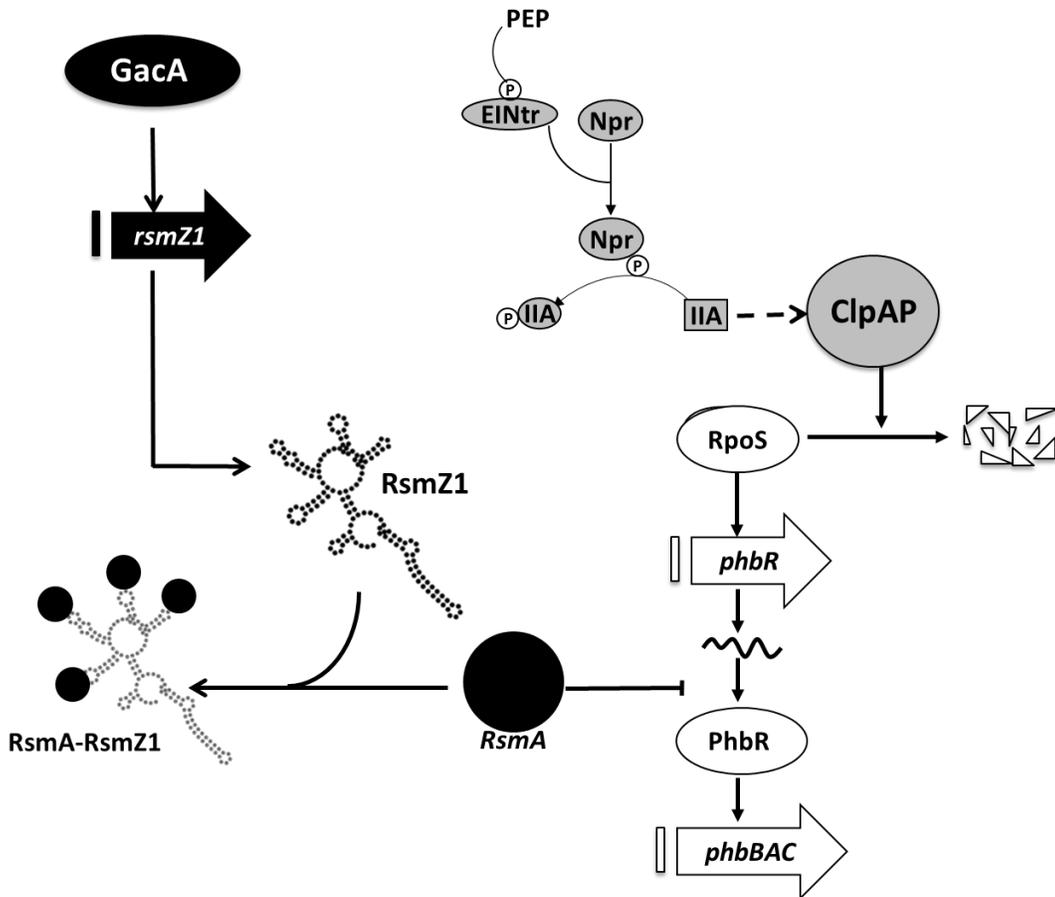


Figura 10: Esquema general de la regulación de PHB en *A. vinelandii*. El intrincado mecanismo de regulación de la biosíntesis de PHB está a cargo de dos sistemas: GacSA-RsmYZ-RsmA (elementos en negro) y PTS^{Ntr} (elementos en gris). Ambos sistemas afectan la expresión del operón biosintético *phbBAC*.

ANTECEDENTES

El papel de GacA sobre el sistema PTS^{Ntr}.

Los ensayos de western blot en condiciones nativas se han convertido en una técnica rutinaria para detectar el estado de fosforilación de EIIA^{Ntr} desde su reporte inicial por Powell y colaboradores (1995). En estas pruebas, se observa una migración diferencial entre la forma no fosforilada EIIA^{Ntr} y la forma fosforilada EIIA^{Ntr}-P (ver figura 11).

Ensayos de western blot nativos *in vivo* en *Pseudomonas putida* sugieren que la cantidad fisiológica de EIIA^{Ntr} se encuentra por debajo del límite de detección de la técnica, precisando su sobreexpresión. Con este fin en mente, Pflüger y de Lorenzo (2007) clonaron *ptsN*, gen codificante a EIIA^{Ntr}, en un vector de expresión aumentando la cantidad de proteína lo suficiente para su clara visualización.

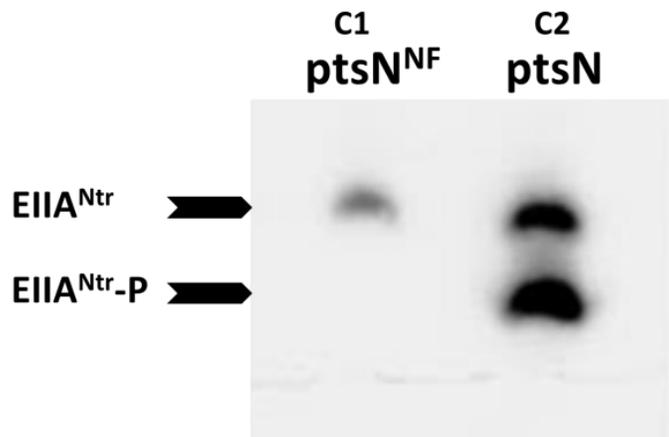


Figura 11: Estado de fosforilación *in vivo* de EIIA^{Ntr} a través de western blot en condiciones nativas. Se presenta la migración diferencial entre EIIA^{Ntr} y EIIA^{Ntr}-P en *P. putida* a través de la sobreexpresión de *ptsN* y *ptsN^{NF}*. C1) *ptsN^{NF}* corresponde al alelo no fosforilable H68A, objeto de una mutación puntual en el residuo fosforilable histidina 68 por alanina. C2) Alelo silvestre *ptsN*. Modificada de Pflüger y De Lorenzo (2007).

Recientemente, estas mismas estrategias fueron utilizadas por Trejo et al. (2017), quienes reportaron indicios de algún tipo de regulación ejercida por el regulador de respuesta GacA, sobre la actividad de PTS^{Ntr} al observarse que en una mutante negativa en *gacA* (*gacA*⁻) la isoforma fosforilada de EIIA^{Ntr} no era detectada. Dicho estado de fosforilación de EIIA^{Ntr} fue analizado en cepas que sobreexpresan de *ptsN* sobre el fondo de una variedad de mutantes mediante western blot anti-PtsN en condiciones nativas (figura 12).

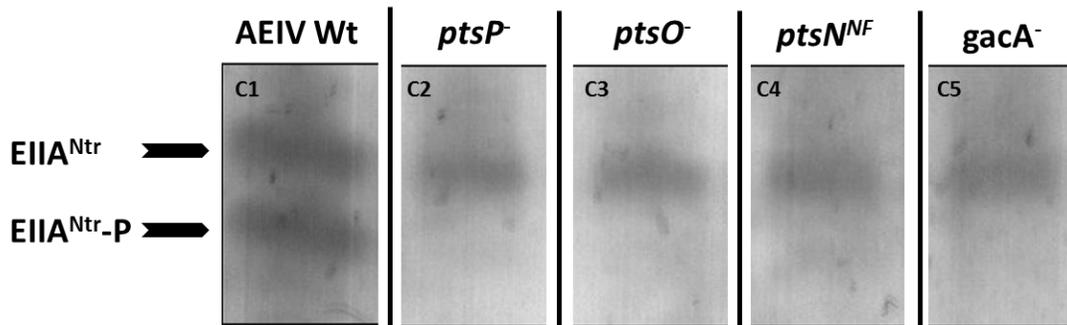


Figura 12: Estado de fosforilación *in vivo* de EIIA^{Ntr} en una variedad de cepas AEIV de *A. vinelandii*. Western blot en condiciones nativas anti-PtsN de cepas que sobreexpresan de ptsN/ptsN^{NF}. (C1) Cepa silvestre AEIV. (C2) Mutante AEIV *ptsP*⁻. (C3) Mutante AEIV *ptsO*⁻. Como es de esperarse, C2 y C3 presentan un fosforrelevo trunco en EII^{Ntr} y NPR, respectivamente, sirviendo como controles negativos de la fosforilación de EIIA^{Ntr}. (C4) Cepa silvestre AEIV sobreexpresante del alelo no fosforilable *ptsN*^{NF} H68A. Control negativo de la fosforilación de EIIA^{Ntr}. (C5) Mutante AEIV *gacA*⁻. EIIA^{Ntr}-P no es observada. Modificada de Trejo et al. (2017).

Con base en la evidencia encontrada, Trejo et al. concluyeron que el regulador global GacA es requerido para la fosforilación de EIIA^{Ntr} a través de un mecanismo desconocido hasta el momento que vincula el sistema de regulación global GacSA-RsmYZ-RsmA y PTS^{Ntr}. Ambos sistemas no pueden seguir siendo descritos como vías regulatorias independientes, sino que es menester tratarlos como vías de regulación dependientes del regulador global GacA.

En la figura 13 se presenta el modelo de regulación metabólica propuesto por Trejo et al., culminando, por supuesto, en la biosíntesis de PHB en *A. vinelandii*.

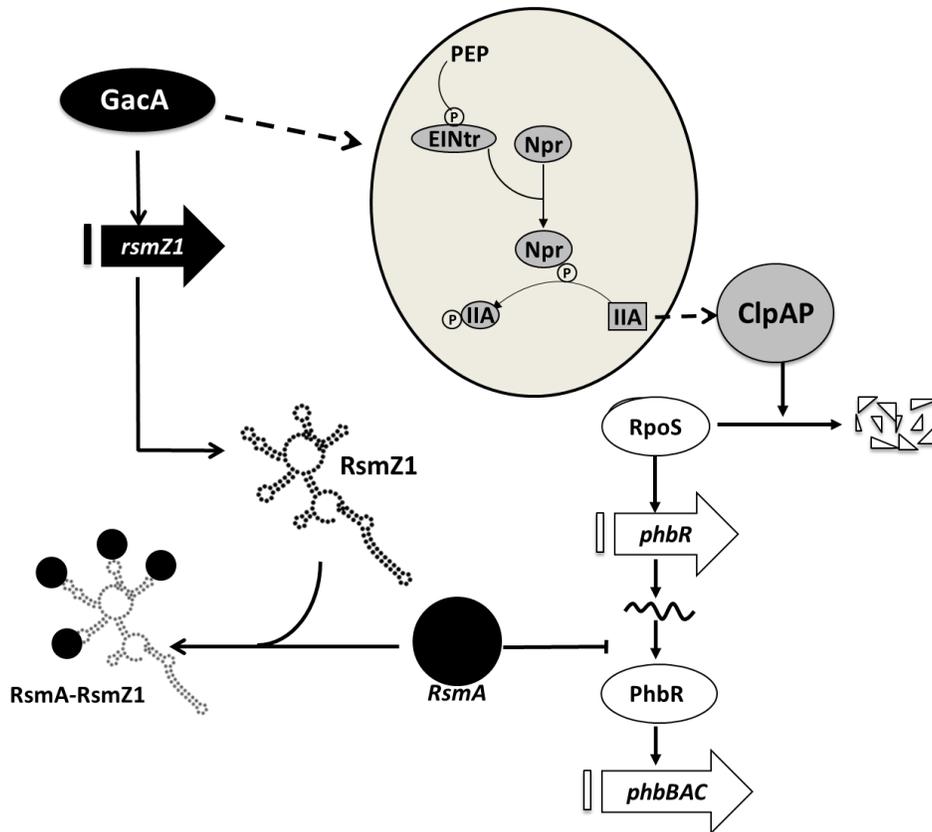


Figura 13: Modelo de regulación actual para la biosíntesis de PHB en *A. vinelandii*. Este modelo está compuesto por las vías de regulación global PTS^{Ntr} y GacSA- RsmZY-RsmA. Se muestra en una línea punteada el vínculo propuesto por Trejo et al. entre ambas vías.

Cociente $[PEP]/[Pyr]$ y efecto en PTS^{Ntr} .

PEP, intermediario de la glucólisis, es la molécula donadora de fosfato para la activación de los PTS. En ausencia de fuentes de carbono metabolizadas mediante PTS (e.g. glucosa-6-fosfato, lactosa, gluconato), Hogema et al. (1998) sugieren que estos sistemas están inactivos y, por lo tanto, entran en equilibrio en cuanto a su fosforilación. Como consecuencia de esto último, el estado de fosforilación de cada uno de los componentes del PTS depende exclusivamente del cociente $[PEP]/[Pyr]$ y las constantes de equilibrio de cada una de las reacciones de fosfotransferencia. (Hogema et al., 1998). Esta relación exponencial entre dicho cociente y el estado de fosforilación de $EIIA^{Glc}$ en *E. coli* se muestra en la figura 14 y su correspondiente ecuación:

$$\frac{[EIIA - P]}{[EIIA]} = k_{eq} \times \frac{[PEP]}{[Pyr]}$$

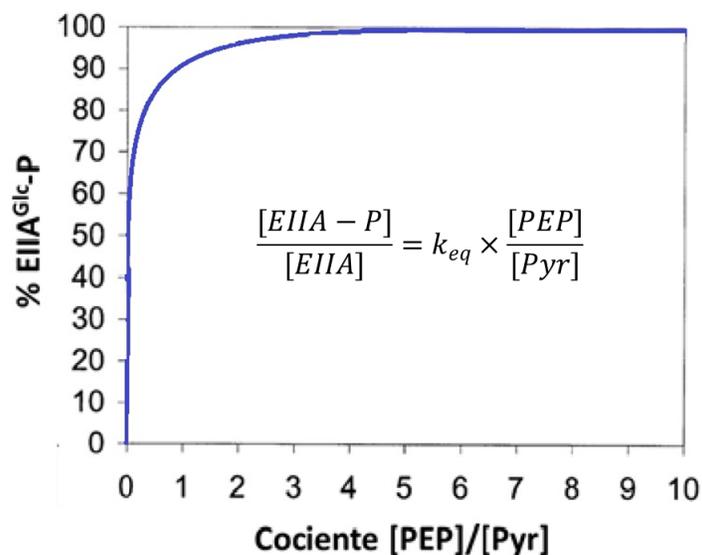


Figura 14: La actividad de PTS^{Glc} y su relación con el cociente [PEP]/[Pyr] en *E. coli*. (Modificada de Hogema et al., (1998).

Cambios en el cociente [PEP]/[Pyr] ocurren en respuesta al estado metabólico de la célula. Se ha identificado que células en condiciones de déficit de carbono muestran un cociente [PEP]/[Pyr] alto (>1) y, por tanto, una tasa alta de EIIA^{Glc}-P; caso contrario a lo reportado en células en medios ricos, donde el cociente [PEP]/[Pyr] es bajo, la fosforilación de EIIA^{Glc} no ocurre (Mason et al., 1981 & Deutscher et al., 2014).

Estos antecedentes pueden ser extrapolados con la finalidad de encontrar una explicación metabólica lógica al proceso de biosíntesis de PHB en *A. vinelandii*. Como ya se ha mencionado, la producción de PHAs responde a la necesidad celular de almacenar energía y carbono en condiciones ambientales desfavorables, mismas condiciones que, en teoría, podrían incrementar el cociente [PEP]/[Pyr] intracelular y, con éste, la fosforilación de EIIA^{Ntr}, habilitando la biosíntesis de PHB.

Perfil proteómico comparativo AEIV Wt – AEIV *gacA*⁻.

¿De qué manera podría afectar GacA el estado de fosforilación de EIIA^{Ntr}? Para contestar esa pregunta, se analizaron los resultados de un proteoma comparativo por espectrometría de masas de la cepa silvestre AEIV contra la cepa mutante AEIV *gacA*⁻ en las siguientes condiciones: medio BS líquido (ver Material y Métodos), incubación a 30°C por 36 horas. Los resultados de este proteoma estaban disponibles al momento de iniciar este proyecto (datos no publicados). El

análisis de dicho perfil diferencial ha ofrecido indicios para proponer un mecanismo mediante el cual GacA es capaz de regular la operación de PTS^{Ntr} y la consecuente biosíntesis de PHB.

Resultados preliminares del proteoma comparativo han arrojado 215 proteínas expresadas diferencialmente entre la mutante *gacA*⁻ y la cepa silvestre. De estas, 126 muestran una disminución en su expresión y 89 una sobreexpresión.

Estos elementos se han clasificado con base en su papel metabólico en los siguientes grupos:

- Proteínas ribosomales
- Metabolismo de lípidos
- División celular
- Biogénesis componentes membrana
- Producción de energía
- Metabolismo de aminoácidos
- Motilidad celular
- Metabolismo y transporte de carbohidratos
- Metabolismo de carbono

Dentro de este último grupo encontramos dos enzimas que llaman especialmente la atención debido su actividad catalítica sobre la molécula donadora del grupo fosfato en el fosforrelevo llevado a cabo por PTS^{Ntr}, el fosfoenolpiruvato. Éstas son:

- Piruvato cinasa A (PykA)
 - Avin_22190
- Fosfoenolpiruvato sintasa (PpsA)
 - Avin_23280

Se ha encontrado una subexpresión en la enzima fosfoenolpiruvato sintasa (PpsA) en la cepa mutante *gacA*⁻ a un 40% con referencia a la cepa silvestre AEIV. Por otro lado, se halló una sobreexpresión de 780% en la enzima piruvato cinasa (PykA) en la mutante AEIV *gacA*⁻ con referencia a la cepa silvestre AEIV Wt.

La enzima fosfoenolpiruvato sintasa es una enzima gluconeogénica encargada de catalizar la reacción de fosforilación ATP dependiente del piruvato para formar fosfoenolpiruvato. La enzima piruvato cinasa pertenece a la vía de glucólisis Entner-Doudoroff en *A. vinelandii*, catalizando la transferencia del grupo fosfato del fosfoenolpiruvato a una molécula de ADP, resultando en ATP y piruvato (figura 15).

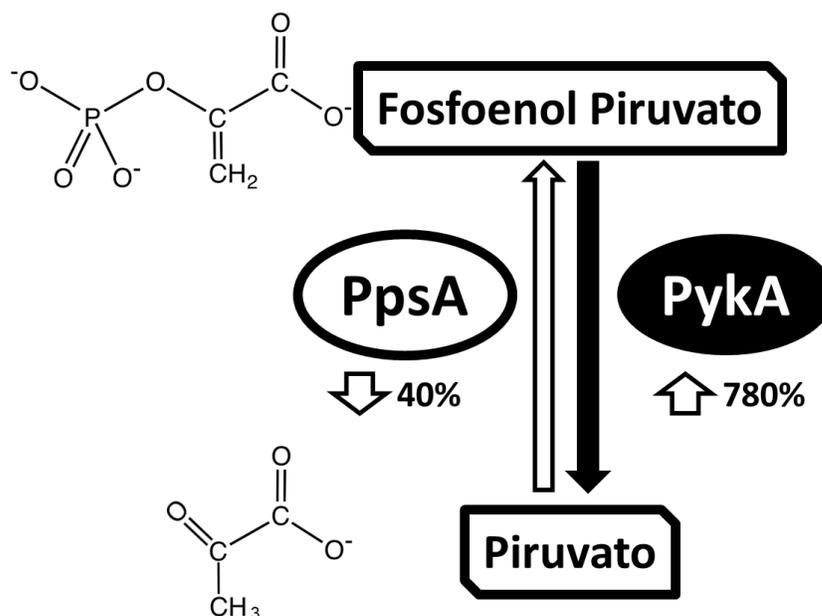


Figura 15: Diferencias de expresión de las enzimas fosfoenolpiruvato sintasa (PpsA) y piruvato cinasa (PykA) en mutante *gacA*⁻.

Estos cambios observados en el proteoma comparativo en la expresión de enzimas involucradas en el metabolismo de fosfoenolpiruvato, específicamente PykA y PpsA, en conjunto con lo reportado por Trejo (2016) y Hogema (1998) nos permiten proponer que GacA posee un efecto sobre PTS^{Ntr} a través de la disminución de la poza de PEP en ausencia de GacA, provocando la reducción en la fosforilación de EIA^{Ntr} y, por lo tanto la degradación de los transcritos de RpoS por medio de ClpAP.

HIPÓTESIS

Una mutante negativa en *ppsA* ve disminuida su producción de PHB a través de la reducción en la proporción de $[EIIA^{Ntr-P}]/[EIIA^{Ntr}]$ en *A. vinelandii* UW136 en medio BS.

OBJETIVOS

Objetivo general:

- Conocer el efecto del gen *ppsA* en la producción de PHB y su relación con el estado de fosforilación de $EIIA^{Ntr}$ en *A. vinelandii*.

Objetivos específicos

- Construir y caracterizar la mutante UW $ppsA^-$.
- Determinar los fenotipos de producción de PHB de la cepa UW $ppsA^-$ y de una cepa derivada de la cepa silvestre UW136, que sobreexpresa el gene *ppsA*.
- Construir una cepa derivada de la cepa UW $ppsA^-$ que sobreexpresa $EIIA^{Ntr}$.
- Determinar el efecto de la mutación negativa *ppsA* sobre el estado de fosforilación de $EIIA^{Ntr}$ mediante ensayos western blot nativos anti-PtsN.

Estrategia experimental

1. Construcción de cepas UW ppsA⁻, UW ppsA⁻ ptsN⁻.
2. Cuantificar la producción de PHB en las siguientes cepas: UW Wt, UW ptsP⁻, UW ptsN⁻, UW gacA⁻, UW ppsA⁻, UW ppsA⁻ ptsN⁻, UW ppsA⁺, UW ptsN⁻ ppsA⁺.
3. Construcción de cepas que sobreexpresan EIIA^{Ntr} sobre el fondo de las siguientes cepas: UW Wt, UW ptsP⁻, UW ppsA⁻.
4. Analizar estado de fosforilación de EIIA^{Ntr} en las cepas construidas en el punto 3 mediante western blots anti-PtsN a partir de geles de acrilamida en condiciones nativas.

MATERIAL Y MÉTODOS

Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos

Las cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo se reportan en la siguiente tabla:

Cepa, plásmido, oligonucleótido.	Descripción	Referencia
Cepa		
<i>A. vinelandii</i>		
UW136	Mutación natural en <i>algU</i> ; NaI ^R , Rif ^R	(Bishop and Brill, 1977; Martínez-Salazar et al., 1996)
UW ptsN::Km ^R	UW136 con una mutación <i>ptsN</i> ::Km; Km ^R	(Noguez et al., 2008)
UW ptsP::Tc ^R	UW136 con una mutación <i>ptsP</i> ::Tc; Tc ^R	(Muriel-Millán et al., 2015)
UW gacA::Gm ^R	UW136 con una mutación <i>gacA</i> ::Gm; Gm ^R	(Manzo et al., 2012)
UW ppsA::Km ^R	UW136 con una mutación <i>ppsA</i> ::Km; Km ^R	Este trabajo
UW ppsA::Km ^R ptsN::Tc ^R	UW136 con las mutaciones <i>ppsA</i> ::Km y <i>ptsN</i> ::Tc; Km ^R , Tc ^R	Este trabajo
UW pgyA-ppsA	UW136 con un gen <i>ppsA</i> con el promotor de <i>gyrA</i> , que está integrado en el cromosoma dentro del gen <i>meIA</i> ; Tc ^R	Este trabajo
UW ptsN::Km ^R pgyA-ppsA	UW ptsN ⁻ con un gen <i>ppsA</i> con el promotor de <i>gyrA</i> , integrado en el cromosoma dentro del gen <i>meIA</i> ; Km ^R , Tc ^R	Este trabajo
UW136 pSAEIIA-1	UW136 conjugado con pSAEIIA-1 por DH5α-pSAEIIA-1; Gm ^R	Este trabajo
UW ptsP::Tc ^R pSAEIIA-1	UW ptsP ⁻ conjugado con pSAEIIA-1 por DH5α-pSAEIIA-1; Tc ^R , Gm ^R	Este trabajo
UW ppsA::Km ^R pSAEIIA-1	UW ppsA ⁻ conjugado con pSAEIIA-1 por DH5α-pSAEIIA-1, Km ^R , Gm ^R	Este trabajo

E. coli

DH5 α	<i>supE44, ΔlacU169, hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, relA1</i>	Hanahan, 1983
DH5 α -pSAEIIA-1	DH5 α con pSAEIIA-1; Gm ^R	Trejo et al., 2017
ATCC [®] 37159 [™]	HB101 con pRK2013, Km ^R	pRK2013 (ATCC [®] 37159 [™])
DH5 α -pUMA-gyrA-ppsA	DH5 α con pUMA-gyrA-ppsA, Tc ^R	Este trabajo
Plásmido		
pJET1.2/blunt	Vector de clonación comercial; Amp ^R	ThermoScientific
pJET1-ppsA::Km ^R	<i>ppsA::Km^R</i> clonado en pJET1.2; Amp ^R Km ^R	Este trabajo
pBBR1MCS-5	Vector de clonación; Gm ^R	Kovach et al., 1995
pSAEIIA-1	pBBR1MCS-5 con el gen <i>ptsN</i> bajo el promotor <i>gyrA</i> ; Gm ^R	Trejo et al., 2017
pJET- <i>pgyrA</i>	pJET1.2/blunt clonado con promotor y Shine-Dalgarno de <i>gyrA</i> de <i>A. vinelandii</i> ; Amp ^R	
pJET- <i>pgyrA-ppsA</i>	Secuencia codificante de <i>ppsA</i> de <i>A. vinelandii</i> clonado en pJET- <i>pgyrA</i> ; Amp ^R	Este trabajo
pUMA	Vector de clonación con sitio múltiple de clonación flanqueado por secuencia parcial del gen de <i>A. vinelandii mela</i> ; Tc ^R	Hernández-Eligio et al., 2011
pUMA- <i>gyrA-ppsA</i>	<i>pgyrA</i> de pJET- <i>pgyrA</i> subclonado en pUMA; Tc ^R	Este trabajo
Oligonucleótido		
(5'-3')		
FwppsA1	CCGTCGGAGATGAAGAAAGC	Este trabajo
RvppsA1	CCGACACGGAACGACATAC	Este trabajo
FwptsNTH	ATCGAGCTCATGATCAGACTCGAAGACATT	Trejo et al., 2017
RvptsNTH	ATCGGTACCTTACAGGCTCTTCTGTGCG	Trejo et al., 2017
FwdgyrA	CGGAGCTCCCATCGAAGAGCGTGAC	Muriel-Millán et al., 2015
pgyrAupSacI	TAATGGATCCGTAGAGTACGTAGTTCCCTTGA	Este trabajo

	CAAG	
RvppsA2	ATTATCTAGAGAATCAGTTGCCCAACCCTTC	Este trabajo
FwmelA	GGCCTTCTACCTGTCCTTC	
DwmelA	TGGCGCTTGATGAACCAGG	

Tabla 11: Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados.

Condiciones de cultivo.

A menos que se mencione lo contrario, todos los cultivos de *A. vinelandii* se realizaron en medio mínimo Burk-Sacarosa 2% (g/L) (BS) de acuerdo a las especificaciones de Kennedy et al. (1986) que se presentan a continuación (en g/L): K_2HPO_4 , 0.8; KH_2PO_4 , 0.2; Na_2SO_4 , 0.183; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.16; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005; $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.0002; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.073. Para la preparación de medios sólidos, se adicionó 1.5% (g/L) de agar. El crecimiento en BS líquido se realizó en 25 mL de medio en matraces de 125 mL a partir de preinóculos de 18-20 horas, procurando una DO a 600 nm de 0.08 en el inóculo. Las condiciones de cultivo del inóculo fueron las siguientes: 30°C, 200 rpm y 36 horas. La concentración (mg/mL) de antibióticos para el crecimiento de *A. vinelandii* en medio BS sólido fueron las siguientes: Rifampicina (Rif), 10; Kanamicina (Km), 3; Gentamicina (Gm), 2; Tetraciclina (Tc), 30. La concentración de antibióticos para el crecimiento de *A. vinelandii* en medio BS líquidos fueron las siguientes: Rifampicina (Rif), 10; Kanamicina (Km), 0.25; Gentamicina (Gm), 0.2; Tetraciclina (Tc), 10.

Para experimentos que involucran la producción y cuantificación de PHB en *A. vinelandii*, se utilizó el medio líquido complejo peptona-levadura-Sacarosa (PYS, por sus siglas en inglés), cuya composición es la siguiente (g/L): peptona, 5; levadura, 3; sacarosa, 20; en agua destilada. En medios sólidos se añadió 1.5% de agar. Los cultivos se realizaron en 25 mL de medio PYS en matraces de 125 mL en los que se partió de preinóculos de 18-20 horas, procurando una DO a 600 nm de 0.08 en el inóculo. No fueron usados antibióticos en PYS. Las condiciones de cultivo del inóculo fueron las siguientes: 30°C, 200 rpm, 48 horas.

El medio sólido de competencia de *A. vinelandii* (CM, por sus siglas en inglés) se preparó con la composición que se describe a continuación (en g/L): K_2HPO_4 , 0.8; KH_2PO_4 , 0.2; Na_2SO_4 , 0.183; $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.16; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 0.073; agar, 0.15 (Page & Tigestrom, 1978). Las condiciones de cultivo fueron: 30°C, 24 horas.

Los cultivos de *E. coli* DH5 se crecieron en medio Luria-Bertani (LB), cuya composición fue la siguiente (en g/L): bacto peptona, 10; extracto de levadura, 5; NaCl, 10. Las condiciones de cultivo fueron: 37°C, 200 rpm, 18 horas. La concentración de antibióticos usados para *E. coli* fue la siguiente (en mg/ml): tetraciclina (Tc), 30; Kanamicina (Km) 30; gentamicina (Gm) 10; ampicilina (amp), 200.

Las conjugaciones *A. vinelandii* – *E.coli* se realizaron en medio de cruza sólido BSLB compuesto de la siguiente manera (g/L): K₂HPO₄, 0.625; KH₂PO₄, 0.156; Na₂SO₄, 0.143; MgCl₂-6H₂O, 0.125; FeSO₄-7H₂O, 0.004; Na₂MoO₄-2H₂O, 0.0002; CaCl₂-2H₂O, 0.057; bacto peptona, 0.22; extracto de levadura, 0.11; NaCl, 0.22; glucosa, 0.002; agár, 0,15 (Page & Von Tigerstrom, 1978). No fueron usados antibióticos en BSLB. Las condiciones de cultivo fueron las siguientes: 30°C, 24 horas.

Procedimientos con ácidos nucleicos

Los procedimientos para la manipulación de ADN se realizaron siguiendo los protocolos descritos por Green y Sambrook (2012). El ADN genómico usado como molde para las PCR's fue obtenido de la cepa silvestre UW y amplificado usando la ADN polimerasa de alta fidelidad Phusion (ThermoFisher Scientific). Los productos de amplificación fueron clonados en el vector pJET1.2/blunt con el kit de clonación de PCR CloneJET (ThermoFisher Scientific). Las secuencias de oligonucleótidos usados en este trabajo se reportan en la Tabla 1.

Construcción de mutante *ppsA::Km^R*

El contexto genómico de *ppsA* se muestra en la figura 16. Una predicción computacional a través de la herramienta BPROM (Solovyev & Salamov, 2011) disponible en línea (www.softberry.com) indica que *ppsA* posee un promotor σ^{70} y es identificado como un gen monocistrónico.

La mutante negativa en el gen *ppsA* se realizó por interrupción de la secuencia codificante por medio de un cassette de resistencia a kanamicina. Se partió de un fragmento de 2666 pb que incluye la secuencia codificante de *ppsA* amplificado con los oligonucleótidos FwppsA1 y RvppsA1, el cual fue clonado en pJET1.2 para posteriormente ser interrumpido en el sitio *SalI* por el cassette de resistencia Km^R (1388 pb) proveniente del plásmido pBSL97 (Alexeyev et al., 1995). Se comprobó que *ppsA* compartiera orientación con el cassette Km^R para evitar efectos polares sobre

genes río debajo de *ppsA*. La construcción resultante, denominada pJET1-*ppsA*::Km^R, se transformó en *A. vinelandii* UW136 y UW ptsN::Tc^R, se seleccionaron colonias candidatas resistentes a Km y se confirmó la mutación por medio de PCR con los oligos FwppsA1 y RvppsA1.



Figura 16: Contexto genómico de *ppsA* en *A. vinelandii*. Los genes *Avin_23260* y *Avin_23270* han sido anotados como proteínas hipotéticas, mientras que el gen *rraA* (*Avin_23290*) corresponde a un regulador de actividad ribonuclasa. El gen *ppsA* parece ser transcrito individualmente a través de un promotor σ^{70} .

Construcción de plásmido pSAEIIA-1 y conjugación en *A. vinelandii*.

Para la sobreexpresión de *ptsN* en *A. vinelandii* se hizo uso del plásmido de bajo número de copias pBBR1MCS al que se clonó la secuencia codificante del gen *ptsN* bajo el promotor constitutivo de *gyrA*. Esta construcción, denominada pSAEIIA-1, fue desarrollada por Trejo et al. (2017). La conjugación se llevó a cabo a través de cruce triparental entre las cepas de *E. coli* DH5 α -pSAEIIA-1, ATCC[®] 37159, portadora del plásmido pRK2013 para la asistencia en el proceso de movilización de plásmidos no auto-movilizables y cada una de las siguientes cepas de *A. vinelandii*: UW136, UW ptsP::Tc^R y UW *ppsA*::Km^R.

Se partió de cultivos de 25 mL de las cepas de *A. vinelandii* en medio BS y de *E. coli* en medio LB, el botón de células se recuperó, lavó y resuspendió en 5 y 1 mL de MgSO₄ 10mM, respectivamente. Se sembró una mezcla compuesta de 160 μ L de la respectiva cepa de *A. vinelandii*, 20 μ L de la cepa asistente ATCC[®] 37159[™] y 20 μ L de la cepa DH5 α -pSAEIIA-1 en el medio sólido de cruce BSLB y se incubó durante 24 horas a 30°C. Se recuperó el tapete celular en 1 mL de MgSO₄ 10 mM, del cual se sembraron 100 μ L en el medio de selección sólido BS Gm y se incubaron por 48-72 horas a 30°C hasta obtener candidatas. La presencia del plásmido pSAEIIA-1 en *A. vinelandii* se comprobó mediante la amplificación de un fragmento de alrededor de 750 pb usando los oligonucleótidos pgyrAupSacl y RvptsNTH.

Extracción y cuantificación de PHB en *A. vinelandii*

Se tomó 1 mL de cultivo de *A. vinelandii* por triplicado. El paquete celular se recuperó y lavó en tres ocasiones con MgSO₄ 10mM. La lisis se realizó mediante el uso de una solución 30%

(v/v) de NaClO comercial, la mezcla se incubó 30 min a 30°C para después ser lavada en tres ocasiones con 1 mL de agua, 1 mL de etanol y 1 mL de acetona, respectivamente.

La cuantificación de polihidroxibutirato se realizó por medio del método espectrofotométrico reportado por Law & Speleky (1961). Este método analítico cuantitativo tiene fundamento en la detección espectrofotométrica a 235 nm del ácido crotonico producido al calentar polihidroxibutirato en ácido sulfúrico concentrado. Como blanco se utilizó ácido sulfúrico concentrado. Todas las mediciones fueron hechas en celdas de cuarzo.

Detección del estado de fosforilación de EIIA^{Ntr} a través de western blot en condiciones nativas

Se recuperó y lavó en tres ocasiones el botón celular correspondiente a 25 mL de cultivo en medio BS incubado por 36 horas a 30°C y 200 rpm. Para la ruptura celular se utilizaron 3 mL de buffer de lisis (pH 8) con la siguiente composición: NaH₂PO₄, 50 mM; NaCl, 300 mM; lisozima, 0.066% (m/v); cOmplete™ EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail (Roche) 25X, 3.4% (v/v); en agua destilada. La incubación de la lisis se realizó en hielo durante 1 hora. La mezcla se sonicó aplicándole 3 pulsos de 12 segundos cada uno. La fase soluble se recuperó tras 30 minutos centrifugación a 13,000 rpm a 4°C. Se cargaron 100 µg de extracto total de proteína por muestra para su análisis en buffer de carga 1X.

Los geles de poliacrilamida para electroforesis en condiciones nativas se prepararon al 15% como se presenta a continuación: Buffer TBE 10X, 1 mL; solución acrilamida/bisacrilamida 29:1, 2.6 mL; (NH₄)₂S₂O₈, 80 µL; TEMED, 2.5 µL. La composición del buffer de carga 5X fue la siguiente: glicerol, 10%; glicina, 40 mM; Tris pH 8.9, 5 mM; azul de bromofenol, 0.001%; en agua destilada. El buffer de cámara se preparó conforme a lo siguiente: buffer TBE 10X, 40 mL; agua destilada, 40 mL. Las condiciones de corrida fueron las siguientes: 100 min a 19 mA a 4°C. La transferencia a membrana de PVDF se realizó en cámara semihúmeda. Como anticuerpo primario se utilizó suero de conejo α-EIIA^{Ntr} a un factor de dilución 1:75,000 en PBS. Posteriormente, la membrana se enfrentó al anticuerpo secundario acoplado a fosfatasa alcalina α-conejo producido en cabra (Sigma-Aldrich). La membrana se reveló mediante la adición de los sustratos cromogénicos BCIP/NBT (Invitrogen).

RESULTADOS

La inactivación del gen ppsA afecta negativamente la producción de PHB en A. vinelandii

Posterior a la construcción de la mutante UW ppsA::Km^R, se cuantificó el PHB producido por esta cepa, obteniendo los siguientes resultados:

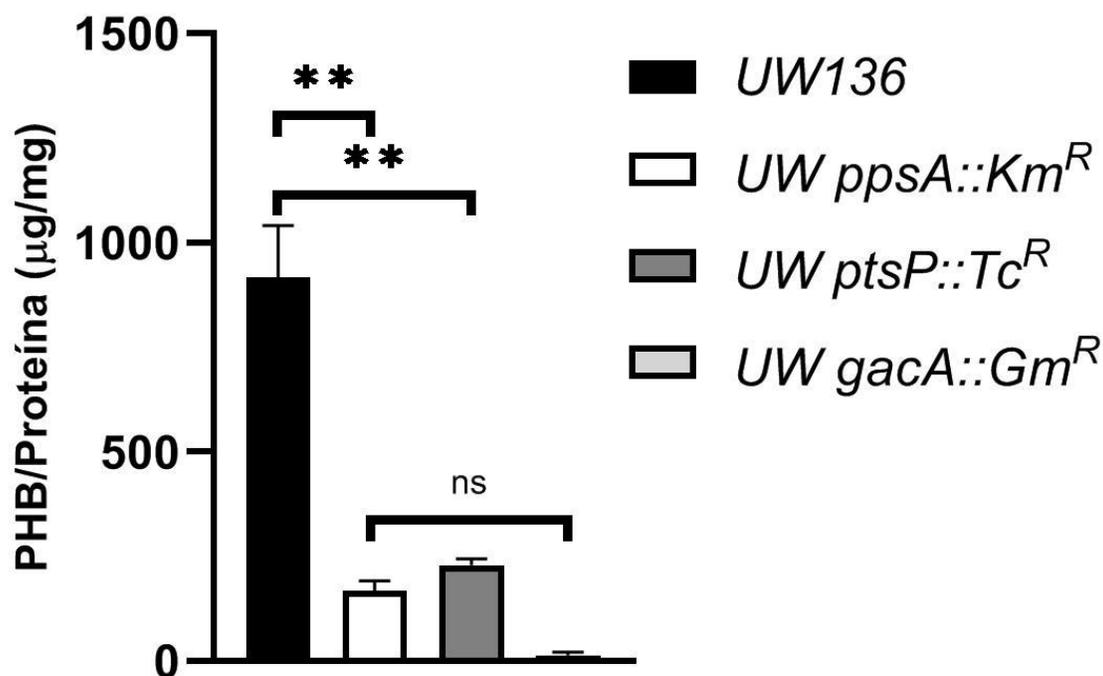


Figura 17: Producción de PHB en cepas UW136, UW gacA::Gm^R, UW ptsP::Tc^R y UW ppsA::Km^R.

En línea con lo esperado, este resultado indica que la actividad de PpsA es necesaria para la biosíntesis óptima de PHB en *A. vinelandii* UW136 en medio PYS, ya que se observó una disminución a un 18% en la cepa UW ppsA::Km^R con respecto a la cepa silvestre. Las cepas UW gacA::Gm^R y UW ptsP::Tc^R fueron utilizadas como controles negativos de la producción de PHB en *A. vinelandii*.

La inactivación del gen *ptsP* impide la fosforilación de EIIA^{Ntr} y, por lo tanto, reduce la biosíntesis de PHB (Nóñez et al., 2008). Por otro lado y, de acuerdo a nuestra hipótesis, una mutación en *ppsA* reduciría la fosforilación de EIIA^{Ntr} y, con ella, la biosíntesis de PHB. La similitud entre los niveles de producción de PHB de las cepas UW ppsA::Km^R y UW ptsP::Tc^R sugieren una relación entre PpsA y PTS^{Ntr} en crecimiento en medio PYS en *A. vinelandii*.

El fenotipo de baja producción de PHB en la mutante UW *ppsA*::Km^R es dependiente de EIIA^{Ntr}

En línea con la hipótesis planteada, la inactivación del gen *ppsA* disminuiría la proporción [EIIA^{Ntr}-P]/[EIIA^{Ntr}] y con esta la biosíntesis de PHB mediante el mecanismo descrito en la figura 9. Recordemos que la isoforma no fosforilada de EIIA^{Ntr} es un regulador negativo en la biosíntesis de PHB cuya represión es liberada mediante su fosforilación (EIIA^{Ntr}) o su inactivación génica (Muriel-Millán et al., 2017).

Con el propósito de evidenciar la relación entre *ppsA* y EIIA^{Ntr}, se inactivó el gen *ptsN* en el fondo de la cepa UW *ppsA*::Km^R esperando una restauración de la biosíntesis de PHB. A continuación se presentan los resultados de la cuantificación de PHB de la doble mutante UW *ppsA*::Km^R *ptsN*::Tc^R

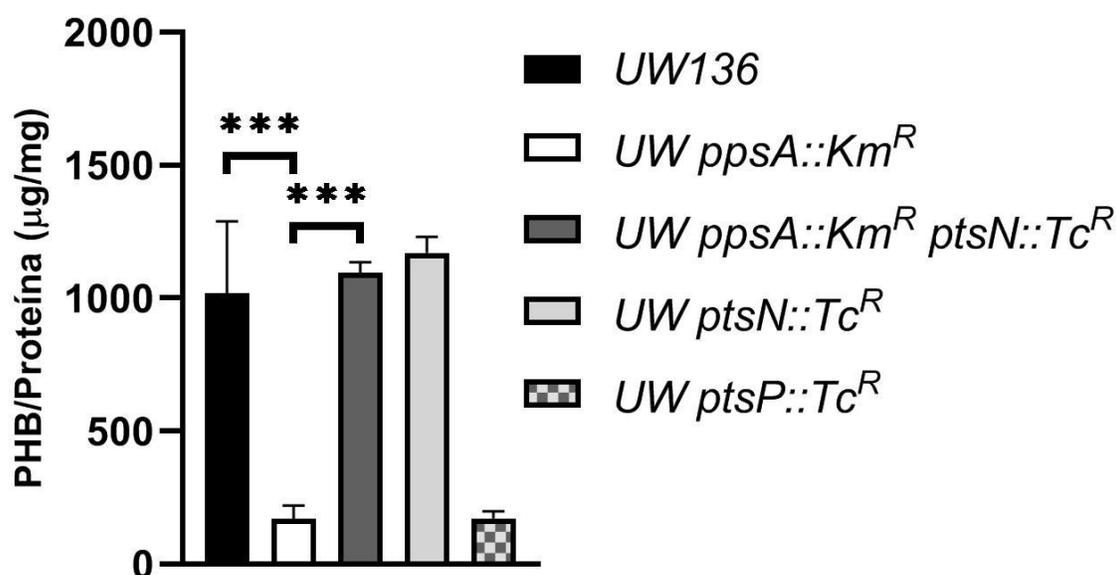


Figura 19: Producción de PHB en cepas UW136, UW *ptsP*::Tc^R, UW *ptsN*::Km^R, UW *ppsA*::Km^R y UW *ppsA*::Km^R *ptsN*::Tc^R.

El fenotipo de baja producción de PHB en la mutante UW *ppsA*::Km^R es suprimido al añadir una mutación negativa en *ptsN*. Conforme a lo esperado, el efecto del gen *ppsA* sobre la biosíntesis de PHB es dependiente de EIIA^{Ntr}, posiblemente debido a una menor fosforilación de EIIA^{Ntr} en la mutante negativa *ppsA*.

Observar el estado de fosforilación de EIIA^{Ntr} en la mutante UW *ppsA*::Km^R aportaría información valiosa para determinar cómo *ppsA* afecta la producción de PHB en *A. vinelandii*.

PpsA no afecta el estado de fosforilación de EIIA^{Ntr} en A. vinelandii UW136.

Como se ha mencionado anteriormente y con base en el modelo de regulación de la biosíntesis de PHB en *A. vinelandii*, los resultados de producción de PHB hasta ahora obtenidos sugieren que, en la cepa mutante UW *ppsA::Km^R*, la proteína EIIA^{Ntr} se encontraba principalmente en su estado no fosforilado. Con el objeto de determinar el estado de fosforilación de la EIIA^{Ntr} en esta cepa mutante, se construyó la cepa derivada UW *ppsA::Km^R pSAEIIA-1*, cepa que sobreexpresa EIIA^{Ntr} (ver métodos).

En primer lugar se corroboró la expresión de EIIA^{Ntr} en la cepa UW Wt pSAEIIA-1 derivada de la cepa silvestre que sobreexpresa *ptsN*. Para ello se realizaron análisis de western blot desnaturalizantes anti-EIIA^{Ntr}, observándose claramente una banda cercana a los 17 kDa en la cepa UW Wt pSAEIIA-1 (ver figura 20). Acorde a lo esperado, el nivel de expresión de EIIA^{Ntr} en UW136 se encuentra por debajo del límite de detección de la técnica. Como control negativo se utilizó la cepa UW *ptsN::Km^R*.

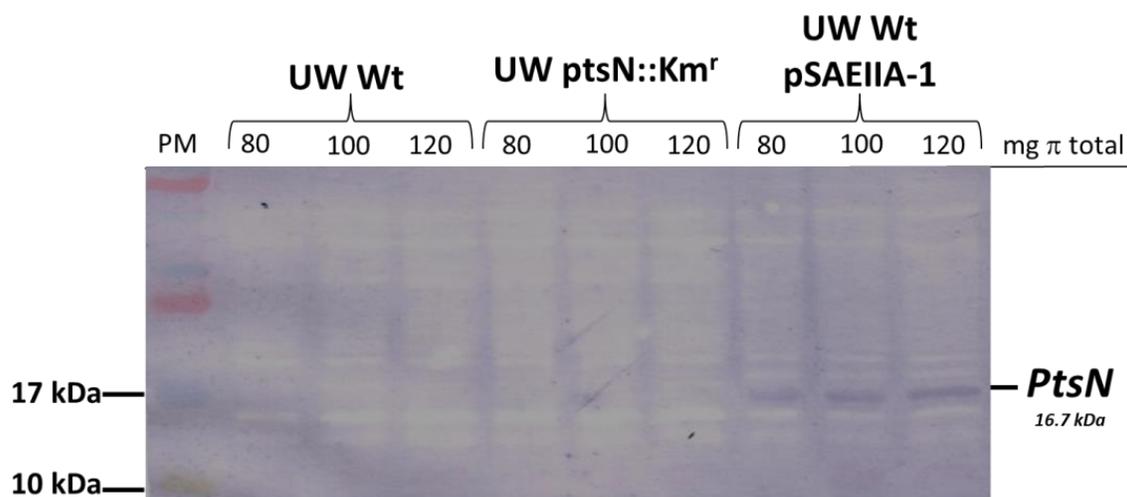


Figura 20: Western blot α -EIIA^{Ntr} en *A. vinelandii* UW136, UW *ptsN::Km^R* y UW Wt pSAEIIA-1.

Posteriormente, el estado de fosforilación de EIIA^{Ntr} fue analizado en la cepa UW136 pSAEIIA-1, UW *ptsP::Tc^R pSAEIIA-1* y UW *ppsA::Km^R pSAEIIA-1* por medio de western blot nativo anti-EIIA^{Ntr}. La fosforilación del residuo His68 confiere a la proteína una carga negativa superior respecto a su forma no fosforilada, cambio de carga que se traduce en un patrón de migración diferencial entre las dos isoformas de EIIA^{Ntr}. Los resultados se presentan a continuación:

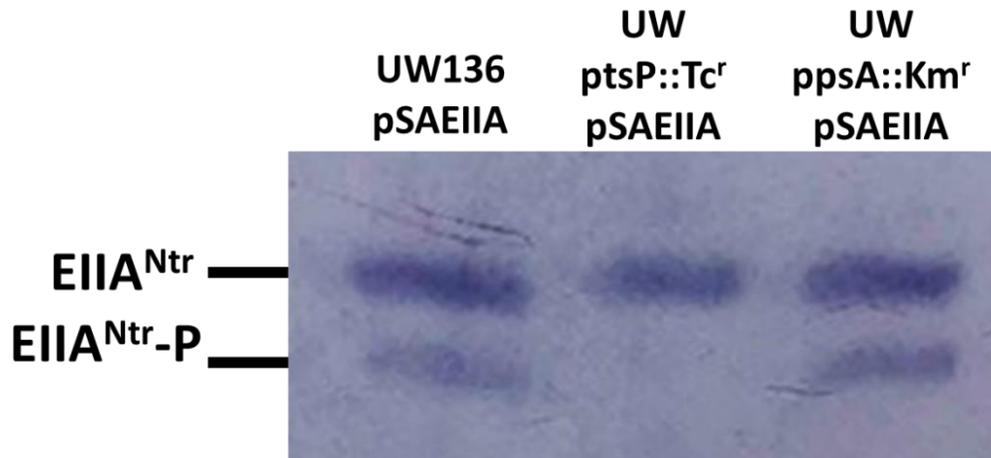


Figura 21: Western blot nativo α -EIIA^{Ntr} en *A. vinelandii* UW136 pSAEIIA-1, UW ptsP::Tc^r pSAEIIA-1 y UW ppsA::Km^r pSAEIIA-1.

Acorde a lo esperado, en el fondo de la cepa UW136, EIIA^{Ntr} se observa tanto en su isoforma fosforilada como no fosforilada. En cuanto a la cepa UW ptsP::Tc^R, conforme a lo reportado por Trejo et al. (2017) un sistema de fosfotransferasas trunco en EIA^{Ntr} presenta exclusivamente la isoforma no fosforilada de EIIA^{Ntr}, sirviendo como control negativo en el fenotipo de fosforilación de EIIA^{Ntr}. En el caso de UW ppsA::Km^R, se observó que EIIA^{Ntr} es detectada tanto en su forma fosforilada como no fosforilada, permitiendo concluir que, contrario a la hipótesis formulada, el estado de fosforilación de EIIA^{Ntr} es independiente de la proteína PpsA en *A. vinelandii* UW136. Si bien una inactivación del gen *ppsA* disminuye la producción de PHB de manera dependiente de EIIA^{Ntr}, esto no ocurre a través de su estado de fosforilación.

DISCUSIÓN

Desde su descubrimiento en 1903, *A. vinelandii* ha sido un interesantísimo modelo de estudio debido principalmente a su capacidad de fijar nitrógeno y producir biopolímeros de interés industrial, entre los que encontramos el PHB. En los más de 60 años desde el primer reporte de presencia de este poliéster en *A. vinelandii* por Forsyth et al. (1958), se han hecho hallazgos importantes de carácter bioquímico, genético y metabólico que han permitido comprender parcialmente el complicado proceso de regulación en la biosíntesis de PHB (ver figura 13).

Trejo et al. (2017) identificaron que una mutación negativa en *gacA* presenta una disminución en la presencia de EIIA^{Ntr}-P con respecto a la cepa silvestre, afectando fuertemente la producción de PHB. Este hecho ha servido como antecedente para plantear un posible vínculo entre dos vías regulatorias que hasta el momento se creían independientes: GacSA-RsmZY-RsmA y PTS^{Ntr}.

A través del análisis de datos no publicados de nuestro laboratorio, se encontró en un proteoma comparativo entre las cepas AEIV WT y una mutante negativa en *gacA* de AEIV, una disminución en la concentración de la enzima gluconeogénica fosfoenolpiruvato sintasa, codificada por el gen *ppsA* (Avin_23280), en la cepa mutante *gacA* con respecto a la cepa silvestre. Este resultado ofrecía un interesante objeto de estudio debido a su papel en el metabolismo de fosfoenolpiruvato, molécula de partida para la actividad del fosforrelevo de PTS^{Ntr}. Este resultado nos permitió proponer la hipótesis de que la disminución en la fosforilación de EIIA^{Ntr} en la cepa mutante *gacA*, podría en parte explicarse por una disminución en la poza de PEP causada por la disminución de la concentración de PpsA.

En este estudio, se construyó la mutante UW *ppsA*::Km^R y, conforme a lo esperado, esta presentó una fuerte disminución en la producción de PHB en relación con la cepa silvestre.

Con la finalidad de determinar si PpsA está involucrada en los mecanismo de regulación para la producción de PHB en *A. vinelandii*, ejercidos por la vía PTS^{Ntr}, se construyó la doble mutante negativa UW *ppsA*::Km^R *ptsN*::Tc^R. Como se mostró en este estudio la inactivación de *ptsN* en la mutante *ppsA* restauró la producción de PHB a niveles silvestres. Este resultado sugería que el fenotipo de baja producción de PHB observado en la mutante UW *ppsA*::Km^R era dependiente de EIIA^{Ntr}, en concordancia con la hipótesis planteada.

En consecuencia, el estado de fosforilación de EIIA^{Ntr} fue analizado en la mutante sencilla UW ppsA::Km^R mediante análisis Western blot en condiciones nativas. Contrario a lo esperado, el estado de fosforilación de EIIA^{Ntr} no muestra diferencia alguna en relación con la cepa silvestre. Este resultado sugiere que el gen *ppsA* no afecta el estado de fosforilación de EIIA^{Ntr}. Por lo tanto, el efecto negativo sobre la biosíntesis de PHB observado en la mutante UW ppsA::Km^R, si bien es dependiente de EIIA^{Ntr}, éste no parece ocurrir a través de la vía por la que la EIIA^{Ntr} no fosforilada promueve la degradación de RpoS por el complejo chaperona-proteasa ClpAP (ver figura 9).

En conclusión, los resultados de este trabajo han demostrado que la hipótesis propuesta en donde la reducción de PpsA, disminuiría la fosforilación de la proteína EIIA^{Ntr} no se cumple.

A nuestro conocimiento, no existe reporte bibliográfico alguno sobre el papel de *ppsA* sobre la biosíntesis de PHB en *A. vinelandii* o en ningún otro modelo de estudio, por lo que este trabajo representa un primer acercamiento interesante al tema.

Segura & Espin (2004) caracterizaron el efecto de una mutación negativa en el gen *pycA* sobre la producción de PHB en *A. vinelandii*. El producto de este gen, la piruvato carboxilasa A (PycA), es una enzima productora de oxaloacetato, intermediario del ciclo de Krebs, que utiliza piruvato como sustrato. Los autores reportaron un fuerte aumento en la producción de PHB en dicha mutante con respecto a los niveles silvestres y atribuyeron este efecto a la disminución en la actividad del ciclo de Krebs, provocando un incremento en la poza de acetyl-CoA intracelular, precursor en la vía de producción de PHB (Segura & Espin, 2004).

Al igual que PycA, PpsA es una enzima utilizadora de piruvato, clave en el metabolismo central de carbono, catalizando la reacción gluconeogénica ATP-dependiente productora de fosfoenolpiruvato. En adición, como ha sido descrito a lo largo de este trabajo, PpsA afecta significativamente la producción de PHB.

El redireccionamiento de flujos de carbono para la producción de metabolitos de interés ha dado inicio al campo de la ingeniería de vías metabólicas. Este poderoso enfoque hace uso de las actuales técnicas de biología molecular para modificar e incluso introducir vías metabólicas en una célula con la finalidad de mejorar los rendimientos de producción de un metabolito (Stephanopoulos, 1999).

En *E. coli* se ha documentado extensivamente la sobreexpresión de *ppsA* para producir un aumento de la poza de PEP y, con esto, aumentar el flujo de carbonos a la ruta metabólica del ácido shikímico, produciendo metabolitos de alto interés industrial como estireno (Liu et al., 2018), ácido caféico (Lin & Yan, 2012) y dopamina (Nakagawa et al., 2011), por mencionar algunos. Para más información sobre el tema ver lo publicado por Hucetogullari et al. (2019) y Shen et al. (2020). Por otro lado, la inactivación del gen *pykF*, codificante a una de las dos piruvato cinasas presentes en *E. coli*, resulta también en la acumulación de PEP (Escalante et al., 2010).

Recientemente se publicó el primer reporte en el área de ingeniería de vías metabólicas que involucraba a la enzima PpsA para la producción de compuestos aromáticos en el género *Pseudomonas*. En tal esfuerzo se construyó una mutante sobreexpresante del gen *ppsA*, provocando un aumento en el flujo de carbonos hacia la ruta del ácido shikímico y a través de la vía de la L-tirosina para la producción de 4-hidroxibenzoato, resultando un aumento significativo en la producción del metabolito de interés (Lenzen et al., 2019).

Con base en lo anterior, planteamos que la disminución observada en la producción de PHB en la mutante UW *ppsA::Km^R* podría atribuirse a un cambio en el flujo de carbono que resultaría en un aumento del flujo de acetil-CoA hacia el ciclo de Krebs, concomitante con una disminución de este hacia la vía de síntesis de PHB.

Chavarría y colaboradores (2018) demostraron que, en *P. putida*, $EIIA^{Ntr}$ regula el flujo de carbonos en la célula en función de las necesidades fisiológicas de la misma. Este mecanismo modula el ciclo de Krebs por medio de cambios en actividad enzimática de la vía de la ampliación del piruvato (del inglés “pyruvate shunt”), compuesto por las reacciones malato → piruvato → oxaloacetato, en función del estado de fosforilación de $EIIA^{Ntr}$: la presencia de $EIIA^{Ntr}$ no fosforilada reduce la actividad de la enzima málica y piruvato carboxilasa, en cambio, la ausencia de $EIIA^{Ntr}$ o la presencia de $EIIA^{Ntr}$ -P incrementan la actividad de este par de enzimas (Chavarría et al., 2012).

Por otro lado, $EIIA^{Ntr}$ de *Pseudomonas putida* regula la actividad enzimática del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) por interacción directa con el componente E1 en función de su estado de fosforilación: la presencia de $EIIA^{Ntr}$ no fosforilada reduce considerablemente la actividad de PDH, en cambio, la ausencia de $EIIA^{Ntr}$ o la presencia de $EIIA^{Ntr}$ -P incrementan la actividad de PDH (Pflüger-Grau et al., 2011).

Es evidente que, en *P. putida*, EIIA^{Ntr} regula el flujo de carbonos en las reacciones malato→piruvato→oxaloacetato y piruvato→acetil-CoA, sin embargo no existe ningún reporte que vincule EIIA^{Ntr} con la actividad de la enzima β-cetotiolasa o el flujo de carbonos hacia la producción de PHB.

En este trabajo se ha reportado que una inactivación en el gen *ptsN* tiene un efecto supresor en el fenotipo de producción de PHB de la cepa UW ppsA::Km^r. Desafortunadamente, hasta el momento no es posible darle una explicación definitiva a este fenómeno. A partir de los pocos reportes existentes en el área, nos atrevemos a proponer que los incrementos de actividades enzimáticas provocados por la inactivación en *ptsN* favorecen el flujo de carbonos en forma de acetil-CoA a la vía metabólica para la biosíntesis de PHB y, de esta manera, restablecen el fenotipo de baja producción de PHB observada en la cepa UW ppsA::Km^R.

A. vinelandii posee un arsenal enzimático complejo capaz de modular el denominado nodo anaplerótico, compuesto por las reacciones entre los metabolitos PEP-Pyr-OAA (ver figura 22). Existe un área de oportunidad enorme en el campo de la regulación metabólica y, más adelante, en el ámbito de la ingeniería de vías metabólicas que vale la pena explotar en el modelo *A. vinelandii*. Mucho queda por conocer en cuanto a las actividades de las enzimas en este nodo, los flujos de carbono, la regulación entre sus componentes y, a su vez, con EIIA^{Ntr}. Este trabajo sienta un interesante precedente que vincula mutaciones en el metabolismo central de carbono y PTS^{Ntr} en la producción de PHB en *A. vinelandii*.

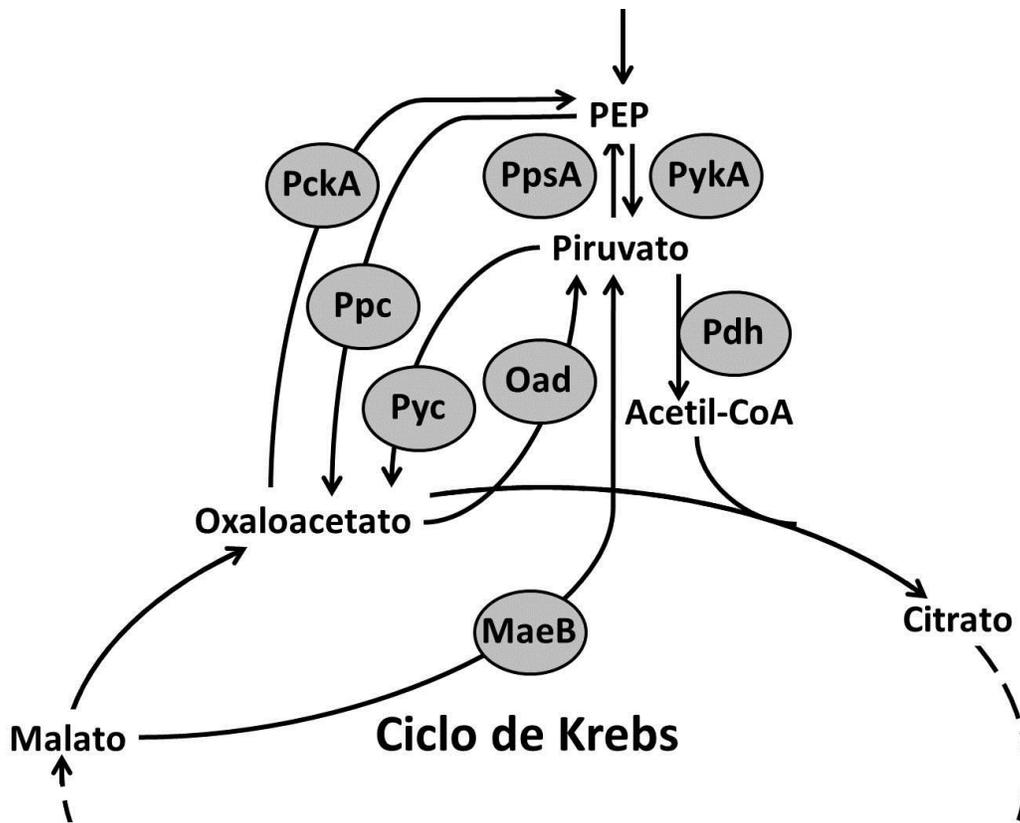


Figura 22: Esquema del nodo anaplerótico del fosfoenolpiruvato-piruvato-oxaloacetato-malato en *A. vinelandii*.
 Abreviaturas de enzimas: PykA: Piruvato cinasa, Ppsa: Fosfoenolpiruvato sintasa, Pdh: Piruvato deshidrogenasa, Pyc: Piruvato Carboxilasa, Ppc: Fosfoenolpiruvato carboxilasa, PckA: Fosfoenolpiruvato carboxicinasa, Oad: Oxaloacetato decarboxilasa, MaeB: Enzima málica.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten concluir lo siguiente:

- La inactivación del gen *ppsA* (Avin_23280), codificante para la enzima fosfoenolpiruvato sintasa, tiene un efecto negativo sobre la acumulación de PHB en *A. vinelandii* UW136.
- La inactivación del gen *ptsN*, codificante para la EIIA^{Ntr}, restaura la acumulación de PHB en una mutante negativa en el gen *ppsA* en *A. vinelandii* UW136.
- La inactivación del gen *ppsA* no afecta el estado de fosforilación de la proteína EIIA^{Ntr} en *A. vinelandii* UW136.
- Se propone que el fenotipo de producción de PHB observado en las mutantes negativas *ppsA* y *ppsA-ptsN* obedecen a redistribuciones en el flujo de carbono en el nodo anaplerótico fosfoenolpiruvato-piruvato-oxaloacetato-malato en *A. vinelandii* UW136 (ver figura 22).

PERSPECTIVAS

- Cuantificar las pozas de PEP intracelular en la cepa silvestre de *A. vinelandii* UW136, así como en las mutantes negativas en los genes *ppsA* y *gacA*.
- Construir y cuantificar la producción de PHB en una doble mutante negativa en los genes *gacA* y *ppsA* en *A. vinelandii* UW136.
- Caracterizar la actividad de la enzima PpsA de *A. vinelandii*.
- Analizar la estabilidad de RpoS por medio de ensayos Western blot en el fondo de una cepa inactivada en *ppsA* y la doble mutante inactivada en *ppsA* y *ptsN*.
- Analizar el flujo de carbono hacia TCA y biosíntesis de PHB en una mutante *gacA*⁻ y una mutante *ptsN* con respecto a la cepa silvestre en *A. vinelandii*.
- Implementar modelos metabólicos para predecir el flujo de carbono.
- Aplicar ingeniería de vías metabólicas para maximizar la producción de PHB en *A. vinelandii*.

REFERENCIAS

Alexeyev, M. F., Shokolenko, I. N., & Croughan, T. P. (1995). Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and *in vitro* deletion/insertion mutagenesis. *Gene*, 160(1), 63–67. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00108-i](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00108-i)

Babitzke, P., & Romeo, T. (2007). CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Current opinion in microbiology*, 10(2), 156–163. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2007.03.007>

Bishop, P. E., & Brill, W. J. (1977). Genetic analysis of *Azotobacter vinelandii* mutant strains unable to fix nitrogen. *Journal of bacteriology*, 130(2), 954–956. <https://doi.org/10.1128/JB.130.2.954-956.1977>

Bugnicourt, E., Cinelli, P., Lazzeri, A., & Alvarez, V. (2014). Polyhydroxyalkanoate (PHA): Review of synthesis, characteristics, processing and potential applications in packaging. *Express Polymer Letters*, 8(11), 791–808. <https://doi.org/10.3144/expresspolymlett.2014.82>

Burns, K., Oldham, C., Thompson, J., Lubarsky, M., & May, S. (2007). Analysis of the *in vitro* biocatalytic production of poly-(β)-hydroxybutyric acid. *Enzyme and Microbial Technology*, 41, 591–599. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2007.05.003>

Carmona, S. B., Moreno, F., Bolívar, F., Gosset, G., & Escalante, A. (2015). Inactivation of the PTS as a Strategy to Engineer the Production of Aromatic Metabolites in *Escherichia coli*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 25(2-3), 195–208. <https://doi.org/10.1159/000380854>

Castañeda, M., Guzmán, J., Moreno, S., & Espín, G. (2000). The GacS sensor kinase regulates alginate and poly-beta-hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of bacteriology*, 182(9), 2624–2628. <https://doi.org/10.1128/jb.182.9.2624-2628.2000>

Castañeda, M., Sánchez, J., Moreno, S., Núñez, C., & Espín, G. (2001). The global regulators GacA and sigma(S) form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of bacteriology*, 183(23), 6787–6793. <https://doi.org/10.1128>

Chavarría, M., Kleijn, R. J., Sauer, U., Pflüger-Grau, K., & de Lorenzo, V. (2012). Regulatory tasks of the phosphoenolpyruvate-phosphotransferase system of *Pseudomonas putida* in central carbon metabolism. *mBio*, 3(2), e00028-12. <https://doi.org/10.1128/mBio.00028-12>

Deutscher, J., Aké, F. M., Derkaoui, M., Zébré, A. C., Cao, T. N., Bouraoui, H., Kentache, T., Mokhtari, A., Milohanic, E., & Joyet, P. (2014). The bacterial phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase system: regulation by protein phosphorylation and phosphorylation-dependent protein-protein interactions. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 78(2), 231–256. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00001-14>

Escalante, A., Calderón, R., Valdivia, A., de Anda, R., Hernández, G., Ramírez, O. T., Gosset, G., & Bolívar, F. (2010). Metabolic engineering for the production of shikimic acid in an evolved *Escherichia coli* strain lacking the phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system. *Microbial cell factories*, 9, 21. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-9-21>

Hucetogullari, D., Luo, Z. W., & Lee, S. Y. (2019). Metabolic engineering of microorganisms for production of aromatic compounds. *Microbial cell factories*, 18(1), 41. <https://doi.org/10.1186/s12934-019-1090-4>

Hernandez-Eligio, A., Castellanos, M., Moreno, S., & Espín, G. (2011). Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes *phbBAC* by PhbR and RpoS. *Microbiology (Reading, England)*, 157(Pt 11), 3014–3023. <https://doi.org/10.1099/mic.0.051649-0>

Hernandez-Eligio, A., Moreno, S., Castellanos, M., Castañeda, M., Nuñez, C., Muriel-Millan, L. F., & Espín, G. (2012). RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology (Reading, England)*, 158(Pt 8), 1953–1963. <https://doi.org/10.1099/mic.0.059329-0>

Hogema, B. M., Arents, J. C., Bader, R., Eijkemans, K., Yoshida, H., Takahashi, H., Aiba, H., & Postma, P. W. (1998). Inducer exclusion in *Escherichia coli* by non-PTS substrates: the role of the PEP to pyruvate ratio in determining the phosphorylation state of enzyme IIGlc. *Molecular microbiology*, 30(3), 487–498. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.01053.x>

Jeckelmann, J. M., & Erni, B. (2019). Carbohydrate Transport by Group Translocation: The Bacterial Phosphoenolpyruvate: Sugar Phosphotransferase System. *Sub-cellular biochemistry*, 92, 223–274. https://doi.org/10.1007/978-3-030-18768-2_8

Kennedy, C., Gamal, R., Humphrey, R., Ramos, J., Brigle, K., & Dean, D. (1986). The *nifH*, *nifM* and *nifN* genes of *Azotobacter vinelandii*: Characterisation by Tn5 mutagenesis and isolation from pLAFR1 gene banks. *Molecular and General Genetics : MGG*, 205(2), 318–325. <https://doi.org/10.1007/BF00430445>

Lee, C. R., Cho, S. H., Yoon, M. J., Peterkofsky, A., & Seok, Y. J. (2007). *Escherichia coli* enzyme IANtr regulates the K⁺ transporter TrkA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(10), 4124–4129. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609897104>

Lenzen, C., Wynands, B., Otto, M., Bolzenius, J., Mennicken, P., Blank, L. M., & Wierckx, N. (2019). High-Yield Production of 4-Hydroxybenzoate From Glucose or Glycerol by an Engineered *Pseudomonas taiwanensis* VLB120. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 7, 130. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00130>

Lin, Y., & Yan, Y. (2012). Biosynthesis of caffeic acid in *Escherichia coli* using its endogenous hydroxylase complex. *Microbial cell factories*, 11, 42. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-11-42>

Liu, M. Y., Gui, G., Wei, B., Preston, J. F., 3rd, Oakford, L., Yüksel, U., Giedroc, D. P., & Romeo, T. (1997). The RNA molecule CsrB binds to the global regulatory protein CsrA and antagonizes its activity in *Escherichia coli*. *The Journal of biological chemistry*, 272(28), 17502–17510. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.28.17502>

Liu, J., Jiang, J., Bai, Y., Fan, T. P., Zhao, Y., Zheng, X., & Cai, Y. (2018). Mimicking a New 2-Phenylethanol Production Pathway from *Proteus mirabilis* JN458 in *Escherichia coli*. *Journal of agricultural and food chemistry*, 66(13), 3498–3504. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b00627>

Lorenz, Ronny and Bernhart, Stephan H. and Höner zu Siederdisen, Christian and Tafer, Hakim and Flamm, Christoph and Stadler, Peter F. and Hofacker, Ivo L. ViennaRNA Package 2.0 Algorithms for Molecular Biology, 6:1 26, 2011, doi:10.1186/1748-7188-6-26

Lüttmann, D., Heermann, R., Zimmer, B., Hillmann, A., Rampp, I. S., Jung, K., & Görke, B. (2009). Stimulation of the potassium sensor KdpD kinase activity by interaction with the phosphotransferase protein IIA(Ntr) in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 72(4), 978–994. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06704.x>

Manzo, J., Cocotl-Yañez, M., Tzontecomani, T., Martínez, V. M., Bustillos, R., Velásquez, C., Goiz, Y., Solís, Y., López, L., Fuentes, L. E., Nuñez, C., Segura, D., Espín, G., & Castañeda, M. (2011). Post-transcriptional regulation of the alginate biosynthetic gene *algD* by the Gac/Rsm system in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 21(3-4), 147–159. <https://doi.org/10.1159/000334244>

Martínez-Salazar, J. M., Moreno, S., Nájera, R., Boucher, J. C., Espín, G., Soberón-Chávez, G., & Deretic, V. (1996). Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its regulators MucA, MucB, MucC, and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their roles in alginate biosynthesis. *Journal of bacteriology*, 178(7), 1800–1808. <https://doi.org/10.1128/jb.178.7.1800-1808.1996>

Mason, P. W., Carbone, D. P., Cushman, R. A., & Waggoner, A. S. (1981). The importance of inorganic phosphate in regulation of energy metabolism of *Streptococcus lactis*. *The Journal of biological chemistry*, 256(4), 1861–1866.

Merrick, M.J., Taylor, M., Saier, M.H., Reizer, J. (1995) The Role of Genes Downstream of The σ^N Structural Gene *rpoN* in *Klebsiella Pneumoniae*. In: Tikhonovich I.A., Provorov N.A., Romanov V.I., Newton W.E. (eds) Nitrogen Fixation: Fundamentals and Applications. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, vol 27. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0379-4_26

Muriel-Millán, L. F., Moreno, S., Romero, Y., Bedoya-Pérez, L. P., Castañeda, M., Segura, D., & Espín, G. (2015). The unphosphorylated EIIA(Ntr) protein represses the synthesis of alkylresorcinols in *Azotobacter vinelandii*. *PloS one*, 10(2), e0117184. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117184>

Muriel-Millán, L. F., Moreno, S., Gallegos-Monterrosa, R., & Espín, G. (2017). Unphosphorylated EIIA^{Ntr} induces ClpAP-mediated degradation of RpoS in *Azotobacter vinelandii*. *Molecular microbiology*, 104(2), 197–211. <https://doi.org/10.1111/mmi.13621>

Noguez, R., Segura, D., Moreno, S., Hernandez, A., Juarez, K., & Espín, G. (2008). Enzyme I NPr, NPr and IIA Ntr are involved in regulation of the poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of molecular microbiology and biotechnology*, 15(4), 244–254. <https://doi.org/10.1159/000108658>

Noar, J. D., & Bruno-Bárcena, J. M. (2018). *Azotobacter vinelandii*: the source of 100 years of discoveries and many more to come. *Microbiology (Reading, England)*, 164(4), 421–436. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000643>

Özen, A. I., & Ussery, D. W. (2012). Defining the *Pseudomonas* genus: where do we draw the line with *Azotobacter*?. *Microbial ecology*, 63(2), 239–248. <https://doi.org/10.1007/s00248-011-9914-8>

Page, W. J., & von Tigerstrom, M. (1978). Induction of transformation competence in *Azotobacter vinelandii* iron-limited cultures. *Canadian journal of microbiology*, 24(12), 1590–1594. <https://doi.org/10.1139/m78-254>

Page, W. J. (1989). Production of poly-β-hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* strain UWD during growth on molasses and other complex carbon sources. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 31(4), 329–333. <https://doi.org/10.1007/BF00257598>

Page, W. J. (1992). Production of poly-β-hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* UWD in media containing sugars and complex nitrogen sources. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38(1), 117–121. <https://doi.org/10.1007/BF00169430>

Peralta-Gil, M., Segura, D., Guzmán, J., Servín-González, L., & Espín, G. (2002). Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *Journal of bacteriology*, 184(20), 5672–5677. <https://doi.org/10.1128/jb.184.20.5672-5677.2002>

Pettinari, M. J., Vázquez, G. J., Silberschmidt, D., Rehm, B., Steinbüchel, A., & Méndez, B. S. (2001). Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis genes in *Azotobacter sp.* strain FA8. *Applied and environmental microbiology*, 67(11), 5331–5334. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.11.5331-5334.2001>

Pflüger-Grau, K., & Görke, B. (2010). Regulatory roles of the bacterial nitrogen-related phosphotransferase system. *Trends in microbiology*, 18(5), 205–214. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.02.003>

Pflüger-Grau, K., Chavarría, M., & de Lorenzo, V. (2011). The interplay of the EIIA^{Ntr} component of the nitrogen-related phosphotransferase system (PTS(Ntr)) of *Pseudomonas putida*

with pyruvate dehydrogenase. *Biochimica et biophysica acta*, 1810(10), 995–1005. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.01.002>

Postma, P. W., Lengeler, J. W., & Jacobson, G. R. (1993). Phosphoenolpyruvate:carbohydrate phosphotransferase systems of bacteria. *Microbiological reviews*, 57(3), 543–594.

Powell, B. S., Court, D. L., Inada, T., Nakamura, Y., Michotey, V., Cui, X., Reizer, A., Saier, M. H., Jr, & Reizer, J. (1995). Novel proteins of the phosphotransferase system encoded within the *rpoN* operon of *Escherichia coli*. Enzyme IIA^{Ntr} affects growth on organic nitrogen and the conditional lethality of an *era*^{ts} mutant. *The Journal of biological chemistry*, 270(9), 4822–4839. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.9.4822>

Raza, Z. A., Abid, S., & Banat, I. M. (2018). Polyhydroxyalkanoates: Characteristics, production, recent developments and applications. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 126, 45–56. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.10.001>

Reizer, J., Reizer, A., Saier, M. H., Jr, & Jacobson, G. R. (1992). A proposed link between nitrogen and carbon metabolism involving protein phosphorylation in bacteria. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 1(6), 722–726. <https://doi.org/10.1002/pro.5560010604>

Reusch, R. N., & Sadoff, H. L. (1981). Lipid metabolism during encystment of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of bacteriology*, 145(2), 889–895. <https://doi.org/10.1128/JB.145.2.889-895.1981>

Rife, C., Schwarzenbacher, R., McMullan, D., Abdubek, P., Ambing, E., Axelrod, H., Biorac, T., Canaves, J. M., Chiu, H. J., Deacon, A. M., DiDonato, M., Elsliger, M. A., Godzik, A., Grittini, C., Grzechnik, S. K., Hale, J., Hampton, E., Han, G. W., Haugen, J., Hornsby, M., ... Wilson, I. A. (2005). Crystal structure of the global regulatory protein CsrA from *Pseudomonas putida* at 2.05 Å resolution reveals a new fold. *Proteins*, 61(2), 449–453. <https://doi.org/10.1002/prot.20502>

Saier, M. H., Jr, & Reizer, J. (1994). The bacterial phosphotransferase system: new frontiers 30 years later. *Molecular microbiology*, 13(5), 755–764. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00468.x>

Sauer, U., & Eikmanns, B. J. (2005). The PEP-pyruvate-oxaloacetate node as the switch point for carbon flux distribution in bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 29(4), 765–794. <https://doi.org/10.1016/j.femsre.2004.11.002>

Savenkova, L., Gercberga, Z., Bibers, I., & Kalnin, M. (2000). Effect of 3-hydroxy valerate content on some physical and mechanical properties of polyhydroxyalkanoates produced by *Azotobacter chroococcum*. *Process Biochemistry*, 36(5), 445–450. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(00\)00235-1](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(00)00235-1)

Segura, D., & Espín, G. (1998). Mutational inactivation of a gene homologous to *Escherichia coli ptsP* affects poly-beta-hydroxybutyrate accumulation and nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of bacteriology*, 180(18), 4790–4798. <https://doi.org/10.1128>

Segura, D., Vargas, E., & Espín, G. (2000). Beta-ketothiolase genes in *Azotobacter vinelandii*. *Gene*, 260(1-2), 113–120. [https://doi.org/10.1016/s0378-1119\(00\)00462-5](https://doi.org/10.1016/s0378-1119(00)00462-5)

Segura, D., & Espín, G. (2004). Inactivation of *pycA*, encoding pyruvate carboxylase activity, increases poly-beta-hydroxybutyrate accumulation in *Azotobacter vinelandii* on solid medium. *Applied microbiology and biotechnology*, 65(4), 414–418. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1611-9>

Shen, Y. P., Niu, F. X., Yan, Z. B., Fong, L. S., Huang, Y. B., & Liu, J. Z. (2020). Recent advances in metabolically engineered microorganisms for the production of aromatic chemicals derived from aromatic amino acids. *Frontiers in bioengineering and biotechnology*, 8, 407. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00407>

Solovyev, V., & Salamov, A. (2011). Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences. In *metagenomics and its applications in agriculture, biomedicine and environmental studies* (Ed. R.W. Li), Nova Science Publishers, p.61-78.

Stephanopoulos G. (1999). Metabolic fluxes and metabolic engineering. *Metabolic engineering*, 1(1), 1–11. <https://doi.org/10.1006/mben.1998.0101>

Suzuki, K., Wang, X., Weilbacher, T., Pernestig, A. K., Melefors, O., Georgellis, D., Babitzke, P., & Romeo, T. (2002). Regulatory circuitry of the CsrA/CsrB and BarA/UvrY systems of *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 184(18), 5130–5140. <https://doi.org/10.1128/jb.184.18.5130-5140.2002>

Tan, M. W., Rahme, L. G., Sternberg, J. A., Tompkins, R. G., & Ausubel, F. M. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Caenorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(5), 2408–2413. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.5.2408>

Tan, M. W., Mahajan-Miklos, S., & Ausubel, F. M. (1999). Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(2), 715–720. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.2.715>

Trejo, A., Moreno, S., Cocotl-Yañez, M., & Espín, G. (2017). GacA regulates the PTS^{Ntr}-dependent control of cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. *FEMS microbiology letters*, 364(2), fnw278. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnw278>

Velázquez, F., Pflüger, K., Cases, I., De Eugenio, L. I., & de Lorenzo, V. (2007). The phosphotransferase system formed by PtsP, PtsO, and PtsN proteins controls production of

polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida*. *Journal of bacteriology*, 189(12), 4529–4533. <https://doi.org/10.1128/JB.00033-07>

Volova, T.G., (2004). *Polyhydroxyalkanoates-Plastic Materials of the 21st Century: Production, Properties, Applications*. Nova Publishers, New York.

Weilbacher, T., Suzuki, K., Dubey, A. K., Wang, X., Gudapaty, S., Morozov, I., Baker, C. S., Georgellis, D., Babitzke, P., & Romeo, T. (2003). A novel sRNA component of the carbon storage regulatory system of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 48(3), 657–670. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03459.x>

Zhang, B., Carlson, R., & Srienc, F. (2006). Engineering the monomer composition of polyhydroxyalkanoates synthesized in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology*, 72(1), 536–543. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.536-543.2006>

Zinn, M., Witholt, B., & Egli, T. (2001). Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Advanced drug delivery reviews*, 53(1), 5–21. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(01\)00218-6](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(01)00218-6)