



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**REGULACIÓN GENÉTICA DE LA SÍNTESIS DE ÁCIDOS GRASOS
INSATURADOS POR LA PROTEÍNA PsrA EN *Azotobacter vinelandii***

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

CLAUDIA VELÁZQUEZ SÁNCHEZ

TUTOR PRINCIPAL

DR. DANIEL GENARO SEGURA GONZÁLEZ

Instituto de Biotecnología

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

DR. ALFREDO MARTÍNEZ JIMÉNEZ

Instituto de Biotecnología

DRA. ISABEL MARÍA LÓPEZ LARA

Centro de Ciencias Genómicas

Cuernavaca, Morelos. Marzo de 2022.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la dirección del Dr. Daniel G. Segura González.

Se contó con el apoyo de una beca para estudios de doctorado, con número 332593, otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, sin la cual no hubiera sido posible el desarrollo de este proyecto.

Adicionalmente, este trabajo recibió financiamiento mediante el proyecto 255158 del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología y del proyecto IT200415 del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica-UNAM.

Un reconocimiento especial a la Biol. María Soledad Moreno León, por el invaluable apoyo técnico que brindó para la culminación de este trabajo.

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Dr. Daniel G. Segura González, por abrirme un espacio para trabajar de manera conjunta durante estos años, por brindarme su apoyo dentro y fuera del Instituto, por permitirme aprender de él y, sobre todo, por su paciencia.

Gracias a la Dra. Isabel M. López Lara y al Dr. Alfredo Martínez Jiménez, que formaron parte del comité tutorial que le dio seguimiento a este proyecto y cuyas observaciones fueron muy valiosas.

Gracias a los doctores Adrián Ochoa Leyva, Carlos F. Peña Malacara, Gloria Soberón Chávez, José Luis Puente García y Juan Miranda Ríos, por el tiempo invertido en la revisión de este escrito, que contribuyó a realizar un documento de mejor calidad.

Gracias a los doctores Elva Y. Quiroz Rocha y Miguel Cocótl Yáñez, por sus valiosas aportaciones a la parte técnica y analítica, así como a Josefina Guzmán Aparicio, Raunel Tinoco Valencia y Celia Flores Ocampo, por su apoyo técnico.

Gracias a los rocksitos, porque nunca han soltado mi mano.

Gracias a Elva y a Luis Alfredo, mi pequeña familia disfuncional.

Y gracias a ti, Julio, porque cada vez que estuve a punto de bajar los brazos, tú volvías a levantarlos. Tengo mucha suerte.

CONTENIDO

LISTADO DE FIGURAS	i
LISTADO DE TABLAS	iii
LISTADO DE ABREVIATURAS	iv
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUCCIÓN	1
1. Metabolismo de ácidos grasos y su regulación genética	1
1.1. Degradación de ácidos grasos: β -oxidación (beta-oxidación)	1
1.2. Síntesis de ácidos grasos	2
1.2.1. Síntesis de ácidos grasos insaturados (UFAs)	4
1.2.2. Relevancia de los ácidos grasos insaturados y sus derivados modificados	6
1.3. Regulación transcripcional del metabolismo de ácidos grasos	7
1.3.1. Regulador FadR de <i>Escherichia coli</i>	8
1.3.2. Regulador FabR de <i>E. coli</i>	9
1.3.3. Regulación genética en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10
2. Polihidroxicanoatos (PHAs)	11
2.1. Aspectos generales	11
2.2. Estructura, tipos y propiedades físicas de los PHAs	12
2.3. Vías de síntesis de PHAs y su relación con el metabolismo de ácidos grasos	16
2.3.1. Síntesis de scl-PHAs a partir de la condensación de acetil-CoA	18
2.3.2. Síntesis de PHAs a partir de intermediarios del metabolismo de ácidos grasos	18
3. <i>Azotobacter vinelandii</i>	19
3.1. Ciclo de vida de <i>A. vinelandii</i>	20
3.2. Biosíntesis de P3HB y PHBV en <i>A. vinelandii</i>	21
3.3. Lípidos y ácidos grasos en <i>A. vinelandii</i>	22

ANTECEDENTES	24
HIPÓTESIS	29
OBJETIVOS	29
MATERIALES Y MÉTODOS	30
1. Material biológico y secuencias de oligonucleótidos	30
2. Medios y condiciones de cultivo, antibióticos y cálculo de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cerulenina	34
3. Manipulación de ácidos nucleicos, reacciones de PCR y retrotranscripción	35
4. RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR)	36
5. Métodos analíticos	37
6. Construcción de las cepas mutantes en <i>psrA</i> y <i>rpoS</i> de <i>A. vinelandii</i>	38
7. Construcción de la fusión transcripcional <i>fabA-gusA</i>	39
8. Construcción de la fusión transcripcional <i>fabD-gusA</i> e identificación del sitio de inserción del transposón <i>HimarI</i>	40
9. Construcción de las cepas DGF3 y Y2	41
10. Purificación de His ₆ -PsrA	42
11. Ensayos de cambio en la movilidad electroforética en gel de DNA	42
12. Análisis de extensión del iniciador	43
13. Extracción de lípidos totales y análisis por cromatografía en capa fina (TLC) de una y dos dimensiones	44
14. Análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS)	45
15. Análisis estadístico	46
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	47
PARTE I: PAPEL DE PsrA EN LA REGULACIÓN DEL METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS EN <i>A. vinelandii</i>	47
1. Análisis bioinformático de genes del metabolismo de ácidos grasos en <i>A. vinelandii</i>	47
1.1 Genes relacionados con la degradación de ácidos grasos	48

1.2	Genes de la síntesis de ácidos grasos	50
2.	Construcción y mutagénesis al azar de la cepa OP <i>pfabDG-gusA</i>	50
3.	Expresión de los genes de la β -oxidación <i>fadA</i> y <i>fadB2</i> en una mutante en <i>psrA</i>	53
4.	Efecto de la mutación en <i>psrA</i> en la expresión de genes de la síntesis de ácidos grasos	55
5.	Caracterización de la región reguladora de los genes <i>fabA</i> y <i>fabB</i>	58
6.	Análisis de la producción de lípidos totales y ácidos grasos en la mutante en <i>psrA</i>	62
7.	Análisis mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas de los ácidos grasos totales en la mutante en <i>psrA</i>	65
8.	Efecto de la mutación en <i>psrA</i> sobre el crecimiento y la viabilidad celular	68
PARTE II. ESTRATEGIAS PARA SOBREPDUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN <i>A. vinelandii</i>		71
1.	Sobreexpresión de genes estructurales de la síntesis de ácidos grasos de <i>A. vinelandii</i>	71
2.	Obtención de aislados resistentes a cerulenina	74
CONCLUSIONES		78
PERSPECTIVAS		79
REFERENCIAS		80
ANEXO 1: TABLAS SUPLEMENTARIAS		88
ANEXO 2: ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN		90

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1: Degradación de ácidos grasos (β -oxidación) en <i>Escherichia coli</i> .	2
Figura 2: Síntesis de ácidos grasos en <i>E. coli</i> .	4
Figura 3: Síntesis de UFAs y CFAs en <i>Azotobacter vinelandii</i> , basado en el modelo de <i>E. coli</i> .	5
Figura 4: Estructura general de monómeros de PHA.	13
Figura 5: Metabolismo de ácidos grasos y síntesis de PHAs.	17
Figura 6: Ciclo de vida de <i>A. vinelandii</i> .	20
Figura 7: Contexto genómico de genes del metabolismo de ácidos grasos en <i>A. vinelandii</i> .	49
Figura 8: Actividad de β -glucuronidasa medida en la cepa silvestre OP <i>pfabDG-gusA</i> y en tres mutantes obtenidas mediante mutagénesis al azar.	51
Figura 9: Ubicación y sentido de la inserción del transposón en la mutante C526.	52
Figura 10: Expresión relativa de los genes <i>fadA</i> y <i>fadB2</i> en la cepa silvestre OP y en la mutante PA6psrA.	54
Figura 11: Expresión relativa de los genes <i>fabA</i> , <i>fabY</i> y <i>fabD</i> en la cepa silvestre OP y en la mutante PA6psrA en fase estacionaria de crecimiento.	56
Figura 12: Actividad de β -glucuronidasa de la fusión <i>fabA-gusA</i> en la cepa OP7gusA, PA626gusA y S66gusA.	57
Figura 13: Identificación del sitio de inicio de la transcripción del operón <i>fabAB</i> .	59
Figura 14: Análisis tipo EMSA de la región promotora de <i>fabAB</i> y <i>PsrA</i> .	61
Figura 15: Perfil de lípidos totales de la cepa silvestre OP y mutante PA6psrA.	63
Figura 16: Análisis cromatográfico de lípidos totales polares y no polares de las cepas silvestre OP, mutante PA6psrA y cepa complementada PA1psrA-sil.	64
Figura 17: Perfil de ácidos grasos determinado por GC/MS a partir de extractos lipídicos de la cepa silvestre OP, mutante PA6psrA y cepa complementada PA1psrA-sil.	66
Figura 18: La interrupción de <i>psrA</i> reduce la supervivencia en la fase de crecimiento estacionario de <i>A. vinelandii</i> .	69

Figura 19: Curva de crecimiento de la cepa silvestre OP y de las cepas DGF3 y Y2 en medio BS líquido durante 72 horas.	72
Figura 20: Crecimiento en medio BS líquido de la cepa silvestre OP y de seis mutantes resistentes en presencia y ausencia de cerulenina.	76
Figura 21: Ilustración que muestra los blancos directos de regulación de PsrA identificados hasta ahora en <i>A. vinelandii</i> , así como su posible participación en la regulación de la fluidez membranal.	78

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1: Propiedades físicas de algunos PHAs comparadas con polipropileno.	14
Tabla 2. Material biológico.	30
Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos.	32
Tabla 4. Análisis del sitio de inserción del transposón <i>Himar1</i> en las mutantes C239, C526 y C549.	52
Tabla 5. Porcentaje de ácidos grasos totales (saturados, insaturados y ciclopropano) en extractos lipídicos de cepas OP, mutante PA6psrA y complementada PA1psrA-sil.	67
Tabla 6. Niveles relativos de mRNA de diferentes genes de la síntesis de ácidos grasos en las cepas DGF3 y Y2 respecto a la cepa silvestre OP.	73

LISTADO DE ABREVIATURAS

°C	Grados Celsius
3-HA	3-hidroxiacanoato
3HB	3-hidroxi butirato
3HD	3-hidroxi decanoato
3HDD	3-hidroxi dodecanoato
3HHx	3-hidroxi hexanoato
3HO	3-hidroxi octanoato
3HV	3-hidroxi valerato
ACP	Proteína transportadora de acilo
ANS	Ácido 8-anilino-1-naftalenosulfónico
AP	Alquilpirona
AR	Alquilresorcinol
BS	Burk sacarosa (medio de cultivo)
BSA	Albúmina de suero bovino
CFA	Ácido graso ciclopropano
CoA	Coenzima A
Da	Dalton
DO	Densidad óptica
EMSA	Análisis de cambio en la movilidad electroforética
FAME	Éster de metilo de ácido graso
FAS	Sintasa de ácidos grasos
GC	Cromatografía de gases
HTH	Hélice-vuelta-hélice
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
Km	Kanamicina

LB	Luria Bertani (medio de cultivo)
M	Molar
mcl-PHA	Poli(hidro)alcanoato de cadena media
MIC	Concentración mínima inhibitoria
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MS	Espectrometría de masas
NADH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
NADPH	Dinucleótido de nicotinamida y adenina fosfato reducido
ng	Nanogramo
nm	Nanómetro
nM	Nanomolar
P(3HB-3HHx)	Poli(3-hidroxi)butirato-co-3-hidroxi(h)exanoato
pb	Pares de bases
PHA	Poli(3-hidro)alcanoatos
P3HB	Poli β-hidroxi)butirato o poli 3-hidroxi)butirato
PHBV	Poli(3-hidroxi)butirato-co-3-hidroxi)valerato
PHOU	Poli(3-hidroxi)octanoato-co-3-hidroxi-10-undecenoato
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pmol	Picomol
PUFA	Ácido graso poliinsaturado
rpm	Revoluciones por minuto
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
RT-qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
scl-PHA	Poli(hidro)alcanoato de cadena corta
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil-sulfato de sodio
SFA	Ácido graso saturado

Sp	Espectinomicina
Tc	Tetraciclina
TLC	Cromatografía en capa fina
UFA	Ácido graso insaturado
UFC	Unidades formadoras de colonia
μg	Microgramo
μL	Microlitro
μM	Micromolar

RESUMEN

Los poli(3-hidroxicanoatos) (PHAs) son poliésteres lineales de origen bacteriano cuya estructura química les permite ser termoplásticos naturales, con características similares a los plásticos derivados del petróleo, pero con la ventaja de ser biodegradables, biocompatibles y poder sintetizarse a partir de recursos naturales renovables. El tipo y composición de los PHAs que una bacteria puede sintetizar depende de factores como la fuente de carbono disponible y las vías metabólicas involucradas en la síntesis. En algunas bacterias productoras de PHAs, los precursores necesarios para su biosíntesis provienen del metabolismo de ácidos grasos, tanto de la vía de síntesis como la de degradación.

Considerando la relación entre la síntesis de los monómeros precursores de los PHAs y el metabolismo de ácidos grasos, entender la regulación de este último proceso es fundamental, sobre todo para el diseño y mejoramiento de cepas productoras de copolímeros de PHAs. En la bacteria modelo *Escherichia coli*, los reguladores del metabolismo de ácidos grasos FadR y FabR están ampliamente caracterizados; sin embargo, no son ubicuos. En *Pseudomonas* spp., por ejemplo, estos reguladores están ausentes, y PsrA, un activador transcripcional del gen *rpoS*, regula el catabolismo de ácidos grasos, reprimiendo el operón de la β -oxidación *fadBA5*. En *Azotobacter vinelandii*, bacteria filogenéticamente relacionada al género *Pseudomonas*, PsrA también es un activador de la expresión de *rpoS*, aunque se desconoce su participación en la regulación del metabolismo de ácidos grasos, motivo por el que en este proyecto se investigó la función de PsrA en la regulación del metabolismo de ácidos grasos en *A. vinelandii*.

En este trabajo, se encontró que la inactivación del gen *psrA* no tuvo efecto sobre la expresión de genes de β -oxidación en *A. vinelandii*; sin embargo, disminuyó la expresión del operón biosintético de ácidos grasos insaturados *fabAB* (3-hidroxicodecanoil-ACP deshidratasa/isomerasa y β -cetoacil-ACP sintasa I). Esta inactivación también redujo el contenido de ácidos grasos insaturados, así como de sus derivados, los ácidos grasos ciclopropanos. Aunque la ausencia de PsrA no tuvo un efecto sobre el crecimiento, sí repercutió en una pérdida de viabilidad celular después de periodos prolongados de crecimiento, lo cual concuerda con la función que estos ácidos grasos insaturados y ciclopropanos desempeñan en la protección de membranas. Finalmente, se demostró que PsrA se une de manera específica a la región promotora del gen *fabA*, donde se localizó un posible sitio de unión para este regulador. Estos datos muestran que PsrA juega un papel importante en la regulación de la síntesis de ácidos grasos insaturados en *A. vinelandii* regulando positivamente *fabAB*.

El hallazgo de la regulación transcripcional de la síntesis de ácidos grasos insaturados en *A. vinelandii*, puede proveer herramientas valiosas para la generación de cepas productoras de copolímeros de PHAs con propiedades físicas y materiales interesantes, desde una perspectiva biotecnológica, como se discute en esta tesis.

ABSTRACT

Poly (3-hydroxyalkanoates) (PHAs) are linear polyesters that are synthesized by a wide number of bacterial species. The chemical structure of these polymers allows them to be natural thermoplastics, having similar characteristics to petroleum-derived plastics; nevertheless, PHAs are naturally occurring biodegradable, biocompatible and can be synthesized from renewable natural resources. PHA biosynthesis depends on the metabolic pathways operating in a particular microorganism and the carbon source provided. PHA biosynthesis involves fatty acid metabolism via the fatty acid degradation or synthesis in many PHA producers.

Considering the relationship between the synthesis of PHAs precursor monomers and fatty acid metabolism, understanding the regulation of the latter process is essential, especially for engineering and improvement of copolymer-producing strains. In the model bacterium *Escherichia coli*, the fatty acid metabolism regulators FadR and FabR are widely characterized; however, they are not ubiquitous. For example, in *Pseudomonas* spp. these regulators are absent, and PsrA, a transcriptional activator of the *rpoS* gene, regulates fatty acid catabolism by repressing the *fadBA5* β -oxidation operon. In *Azotobacter vinelandii*, a bacterium closely related to *Pseudomonas* spp, PsrA is also an activator of *rpoS* expression; however, its participation in regulating lipid metabolism has not been analyzed. The aim of this study was to investigate the role of PsrA in the regulation of fatty acid metabolism in *A. vinelandii*.

In this work, it was found that inactivation of the *psrA* gene had no effect on the expression of β -oxidation genes in *A. vinelandii*; instead, it decreased expression of the unsaturated fatty acid biosynthetic operon *fabAB* (3-hydroxycodecanoyl-ACP dehydratase/isomerase and β -ketoacyl-ACP synthase I). This inactivation also reduced the content of unsaturated fatty acids, as well as their biosynthetic derivatives, cyclopropane fatty acids. Although the absence of PsrA did not affect the growth rate, it showed a loss of cell viability during long-term growth, which is consistent with the role of these unsaturated and cyclopropane fatty acids in membrane protection. Finally, PsrA was shown to bind specifically to the promoter region of the *fabA* gene, where a putative binding site for

this regulator was located. Taken together, these data indicate that PsrA plays an important role in the regulation of unsaturated fatty acid metabolism in *A. vinelandii* by positively regulating *fabAB*.

The finding of the transcriptional regulation of the unsaturated fatty acid synthesis in *A. vinelandii* may provide useful tools for generating PHA copolymers with interesting physical and material properties.

INTRODUCCIÓN

1. Metabolismo de ácidos grasos y su regulación genética

Los lípidos constituyen un grupo químicamente heterogéneo de moléculas, tanto a nivel estructural como por las funciones biológicas que desempeñan. Los lípidos están presentes en muchos aspectos de la fisiología celular, mayoritariamente como depósito de energía metabólica y como uno de los principales componentes estructurales de las membranas biológicas. Casi todos los lípidos de membrana contienen ácidos grasos en su estructura, por lo que el metabolismo de ácidos grasos es una ruta metabólica central de muchos organismos vivos, incluidas las bacterias.

1.1 Degradación de ácidos grasos: β -oxidación (beta-oxidación)

Para ser asimilados como fuente de energía, la mayoría de los ácidos grasos se degradan por la separación secuencial de fragmentos de dos carbonos desde el extremo carboxilo. Durante este proceso, conocido generalmente como β -oxidación, se oxida el carbono β de la cadena hidrocarbonada y se libera acetil-Coenzima A (acetil-CoA), en un proceso cíclico que se repite hasta que se ha catabolizado toda la cadena del ácido graso, y que se ilustra en la figura 1. (Fujita *et al.*, 2007).

Escherichia coli, el modelo bacteriano más estudiado, puede utilizar ácidos grasos con varias longitudes de cadena como única fuente de carbono y energía. Después de su transporte, los ácidos grasos pueden degradarse mediante β -oxidación o usarse como precursores para la biosíntesis de fosfolípidos de membrana. Para poder catabolizarlos, el genoma de *E. coli* codifica una serie de enzimas cuyos genes, en conjunto, constituyen el regulón *fad*, las cuales son las responsables de llevar a cabo toda la vía de degradación, desde

el transporte, activación y β -oxidación de ácidos grasos. Los ácidos grasos de cadena larga son transportados a través de la membrana celular mediante un sistema acoplado de transporte/activación, que involucra a una proteína de membrana externa, FadL y una acil-CoA sintasa, FadD, que activa el ácido graso con una molécula de CoA y que se encuentra asociada a la membrana interna. El primer paso en la β -oxidación implica la conversión de acil-CoA en enoil-CoA a través de la acil-CoA deshidrogenasa FadE. Los pasos restantes de hidratación, oxidación y tiólisis, los realiza un complejo tetramérico compuesto por dos subunidades de enoil-CoA hidratasa/3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa (FadB) y dos de 3-cetoacil-CoA tiolasa (FadA). Cada ciclo de β -oxidación produce una molécula de acetil-CoA, que es el resultado del acortamiento del acil-CoA inicial en dos átomos de carbono (Fujita *et al.*, 2007).

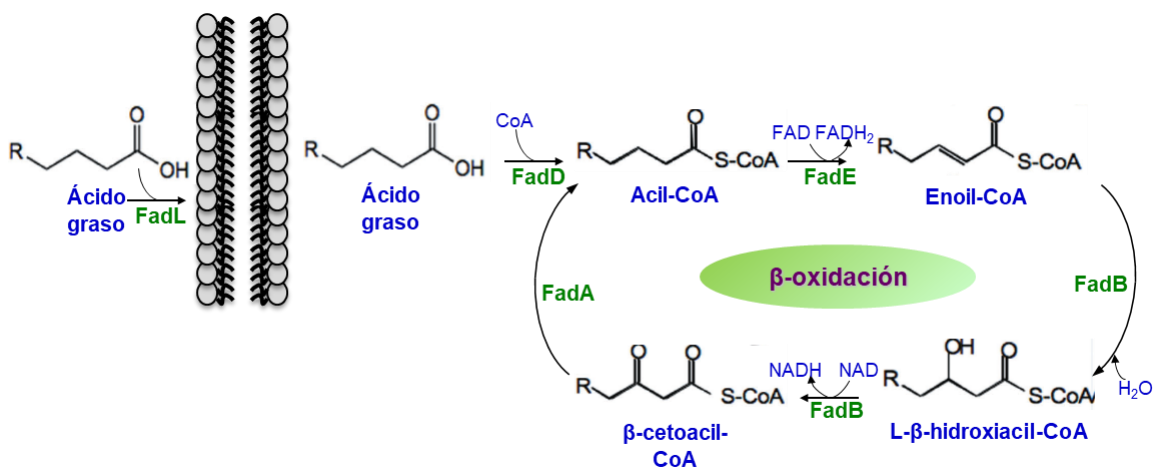


Figura 1: Degradación de ácidos grasos (β -oxidación) en *Escherichia coli*.

1.2 Síntesis de ácidos grasos

La síntesis *de novo* de ácidos grasos representa una vía metabólica crucial en todos los organismos vivos. Sus productos son usados principalmente en la biosíntesis de membranas,

pero también están involucrados en otros procesos, como el *quorum sensing* y modificaciones post-traduccionales de proteínas (Chan y Vogel, 2010).

Las enzimas que participan en la biosíntesis de ácidos grasos (conocidas como sintasas de ácidos grasos o FAS, por sus siglas en inglés) se agrupan en dos clases principales: tipo I y tipo II. La FAS I típica consta de uno o dos genes que codifican para un complejo multienzimático, el cual contiene todas las actividades catalíticas necesarias para la producción de ácidos grasos y se encuentra en casi todos los eucariotas, así como en algunas bacterias. Por otra parte, la FAS tipo II se encuentra en bacterias, plantas y protozoarios y es un sistema disociado, en el que cada componente enzimático es codificado por un gen individual, que produce una proteína única que cataliza un solo paso en la vía (White *et al.*, 2005).

La FAS II, cuyo conocimiento actual deriva principalmente de *E. coli* (figura 2), comienza con una molécula iniciadora de acetil-CoA y una unidad extensora de malonil-proteína transportadora de acilo (malonil-ACP). La molécula de malonil-ACP se produce específicamente en esta ruta a partir de acetil-CoA a través de dos pasos secuenciales, que son catalizados por las enzimas acetil-CoA carboxilasa (Acc) y malonil-CoA-ACP transacilasa (FabD). La condensación inicial de acetil-CoA y malonil-ACP se lleva a cabo por la 3-cetoacil-ACP sintasa III (FabH), lo que da como resultado butiril-ACP. A partir de este punto, comenzará un proceso de elongación de la cadena carbonada de los ácidos grasos, que consiste en la condensación de grupos malonil-ACP, mediante las 3-cetoacil sintasa I (FabB) o II (FabF). Entre una condensación y la siguiente, habrá un ciclo de reducción-deshidratación-reducción de enlaces carbono-carbono, catalizado por 3-cetoacil-ACP reductasa dependiente de NADPH (FabG), 3-hidroxiacil-ACP deshidratasa (FabA o FabZ) y

enoil-ACP reductasa dependiente de NADH (FabI) (López-Lara y Soto, 2019). En bacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, la sintasa FabH que inicia la síntesis de ácidos grasos está ausente; en su lugar, la ruta biosintética es iniciada mediante FabY, una clase diferente de 3-cetoacil sintasa III (figura 2) (Yuan *et al.*, 2012).

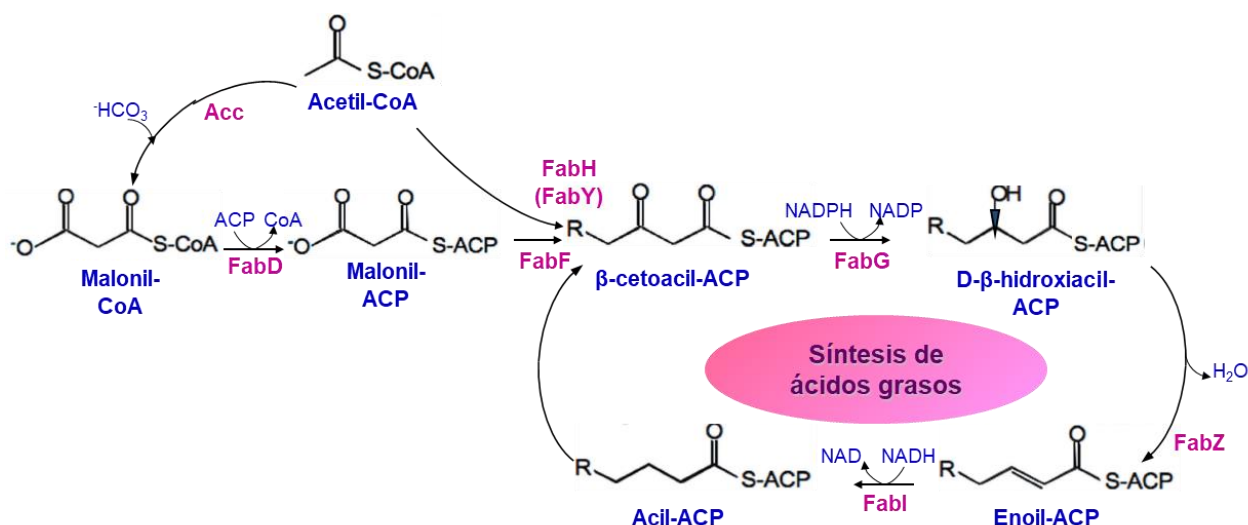


Figura 2: Síntesis de ácidos grasos en *E. coli*. Se indica también la presencia de FabY, la 3-cetoacil sintasa III que inicia la síntesis de ácidos grasos en *Pseudomonas aeruginosa*.

1.2.1 Síntesis de ácidos grasos insaturados (UFAs)

La ruta para la síntesis de todos los ácidos grasos es la misma hasta llegar al intermediario de 10 carbonos (C-10) 3-hidroxi-decanoil-ACP, el cual puede formar un ácido graso saturado (SFA) más largo o bien, formar un ácido graso insaturado (UFA) (figura 3). En *E. coli*, la síntesis de UFAs inicia con la enzima FabA, que cataliza la deshidratación de dicho intermediario introduciendo el doble enlace en la cadena en crecimiento, tal como ocurriría en el caso de un SFA; sin embargo, en lugar de la reducción del enoilo, ocurre una isomerización, catalizada también por FabA, que produce *cis*-3-decenoil-ACP, el cual

conserva el doble enlace; posteriormente, FabB alarga el cis-3-decenoil-ACP a cis-5-dodecenoil-ACP, que ingresa al ciclo estándar de síntesis de ácidos grasos y se alarga hasta formar UFAs de 16 y 18 carbonos (Parsons y Rock, 2013).

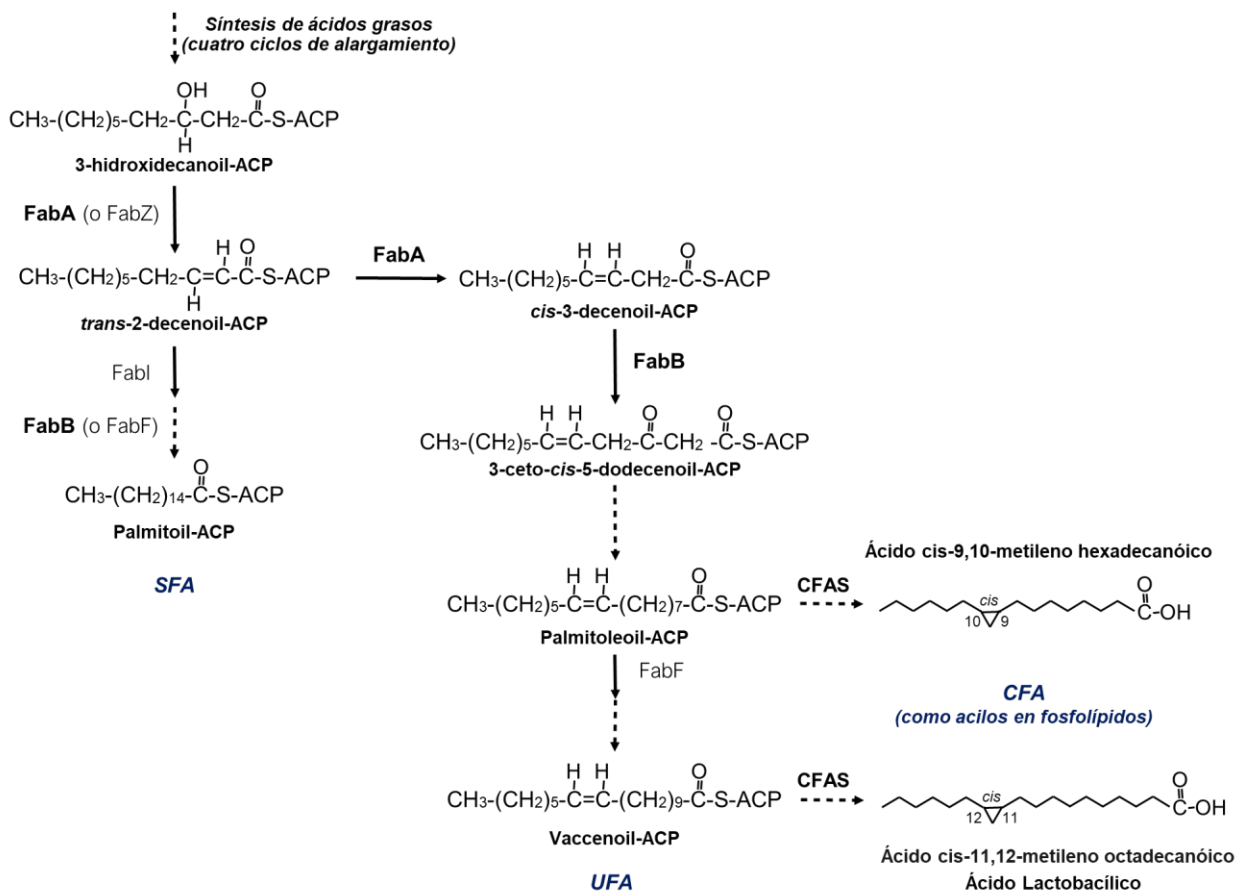


Figura 3: Síntesis de UFAs y CFA en *Azotobacter vinelandii*, basado en el modelo de *E. coli*.

CFAS: ácido graso ciclopropano sintasa.

P. aeruginosa, por su parte, sintetiza ácidos grasos insaturados mediante tres vías diferentes, que dependen de la disponibilidad de oxígeno. En anaerobiosis, esta bacteria también emplea las enzimas FabA y FabB, tal como lo hace *E. coli*. Por el contrario, en condiciones aerobias, utiliza un mecanismo de desaturación oxidativo de ácidos grasos

existentes, mediante dos vías diferentes: DesA y DesC/DesB. Ambos sistemas introducen dobles enlaces en el carbono 9 de la cadena carbonada: DesA lo hace en ácidos grasos saturados asociados a fosfolípidos; DesC/DesB lo hace en acilos-CoA derivados de ácidos grasos exógenos (Zhu *et al.*, 2006).

1.2.2 Relevancia de los ácidos grasos insaturados y sus derivados modificados

La supervivencia de las bacterias depende de la homeostasis de los lípidos de membrana y de la capacidad de ajustar su composición lipídica para que la célula bacteriana se adapte a diferentes entornos. Las membranas bacterianas deben conservar la fluidez adecuada para mantener su estructura y funciones normales bajo diversas situaciones ambientales. Dicha fluidez está determinada en gran medida por los niveles relativos de ácidos grasos saturados e insaturados (SFA:UFA) y por la presencia de otros ácidos grasos modificados, como los ácidos grasos ciclopropanos (CFA) dentro de los fosfolípidos de sus bicapas de membrana (Kondakova *et al.*, 2015).

Los CFA están ampliamente distribuidos en una variedad de organismos, particularmente en bacterias como *E coli*, y en géneros como *Streptococcus*, *Salmonella*, *Pseudomonas*, entre otras. Estos ácidos grasos modificados son sintetizados por la enzima CFA sintasa, codificada por el gen *cfa*, que transfiere un grupo metileno, donado de S-adenosil-metionina, a dobles enlaces *cis* de UFAs, lo que forma un ciclopropano en la molécula (figura 3). Los CFA forman parte de moléculas de fosfolípidos maduros ya presentes en las bicapas membranales (Chen y Gänzle, 2016). La ciclopropanación de los *cis*-UFAs de los fosfolípidos de membrana comienza generalmente cuando las células entran en la fase exponencial tardía o estacionaria temprana de crecimiento, y continúa hasta que prácticamente todos los *cis*-UFAs se han convertido en sus derivados de ciclopropano. Es

posible que esta regulación de la composición de la membrana dependiente de la fase de crecimiento se relacione con la regulación transcripcional del gen *cfa*, ya que su transcripción está controlada por el factor sigma RpoS de fase estacionaria (Grogan y Cronan, 1997; Zhang y Rock, 2008).

La formación de UFAs o sus derivados ciclopropanados ocurre en respuesta a variaciones de temperatura, condiciones adversas o diversos tipos de estrés ambiental, como presión osmótica alta, exposición a solventes, pH bajo y ciclos repetidos de congelación-descongelación (Chen y Gänzle, 2016; Kondakova *et al.*, 2015). El enlace ciclopropano es más estable que un enlace doble y aumenta la fluidez de la membrana, lo cual tiene implicaciones fisiológicas importantes (Poger y Mark, 2015). Por ejemplo, la ciclopropanación aumenta la resistencia de *E. coli* al estrés ácido; en particular, las cepas de *E. coli* patógenas son generalmente más resistentes al estrés ácido que sus contrapartes no patógenas, lo que puede explicarse por sus niveles más altos de CFA (Zhang y Rock, 2008). Asimismo, la síntesis de UFAs o CFA en *Pseudomonas* ocurre en respuesta a estrés osmótico, presencia de etanol y adaptación a la temperatura (Kondakova *et al.*, 2015).

1.3 Regulación transcripcional del metabolismo de ácidos grasos

Al ser los ácidos grasos los principales precursores necesarios para la formación de fosfolípidos y otros lípidos de membrana, la expresión de los genes involucrados en su metabolismo está condicionada por parámetros como el crecimiento, disponibilidad de nutrientes, estímulos ambientales, entre otros (Zhang y Rock, 2008), y está sujeta a complejas redes de regulación, donde participan varios reguladores transcripcionales.

1.3.1 Regulador FadR de *Escherichia coli*

En algunas bacterias Gram negativas, como *E. coli* y otras enterobacterias, las vías de degradación y síntesis están coordinadas para aprovechar la disponibilidad de ácidos grasos en el entorno, y evitar ciclos fútiles, a través de FadR, un regulador con un papel dual represor/activador. FadR es un miembro de la familia GntR de reguladores transcripcionales y funciona como un dímero, con cada monómero compuesto en el extremo N-terminal por un dominio de unión a DNA tipo HTH y un dominio de unión a acil-CoA de cadena larga en el extremo C-terminal (Van Aalten *et al.*, 2001).

FadR se une a una secuencia de aproximadamente 17 nucleótidos, independientemente de si actúa como represor o activador. La distinción entre estas dos funciones depende de la ubicación del sitio de unión en relación con el sitio de inicio de la transcripción. Cuando actúa como activador, FadR reconoce y se une a las secuencias cercanas a la región -40, facilitando la unión de la RNA polimerasa y promoviendo un aumento de la transcripción. Cuando actúa como represor, FadR se une a las secuencias operadoras que se ubican corriente abajo de las secuencias promotoras, lo cual interfiere con la unión de la RNA polimerasa, evitando la transcripción (Cronan y Subrahmanyam, 1998).

En ausencia de ácidos grasos, FadR funciona como el represor bacteriano clásico, que se encuentra unido a un sitio operador cercano al promotor del regulón *fad*, impidiendo su transcripción y reprimiendo la β -oxidación. En presencia de acilos-CoA de cadena larga, éstos se unen al dominio efector de FadR, lo que provoca un cambio conformacional en el dímero que libera la región operadora, lo cual promueve la expresión de los genes *fad*. En cuanto a su papel como regulador positivo, FadR es un activador de *fabA* y *fabB*, los dos genes esenciales para la síntesis de ácidos grasos insaturados (Fujita *et al.*, 2007), y aunque

se creía que su función de activación se limitaba a estos dos genes, en realidad, FadR es un activador de todos los genes involucrados en la biosíntesis de ácidos grasos, excepto *fabZ*. Sin embargo, la fuerza de unión es menor para los genes de biosíntesis de ácidos grasos, debido probablemente a dos factores: la baja conservación del sitio consenso de unión y a que la expresión de genes de biosíntesis de ácidos grasos se dirige por múltiples promotores, lo que aumenta la complejidad de su control genético (My *et al.*, 2015). Por su parte, los genes *fadE*, *fadL* y *fadD* están sujetos a una regulación menos estricta por parte de FadR, lo cual se explica por la función de las enzimas que dichos genes codifican, las cuales son necesarias para generar el inductor de acil-CoA.

1.3.2 Regulador FabR de *E. coli*

El regulador de la biosíntesis de ácidos grasos de *E. coli*, FabR, es un regulador transcripcional de la familia de reguladores TetR que inhibe la síntesis de UFAs, reprimiendo la expresión de *fabA* y *fabB* y antagonizando la acción de FadR (Fujita *et al.*, 2007). FabR reprime la transcripción de *fabA* y *fabB* uniéndose a un sitio corriente abajo del sitio de unión del activador FadR en la región promotora de dichos genes (Zhang *et al.*, 2002). Estos sitios de unión son adyacentes entre sí, por lo que posiblemente ambos factores transcripcionales no puedan unirse al promotor simultáneamente. En consecuencia, estos dos genes biosintéticos clave en la síntesis de UFAs están controlados por un continuo balance que implica la interacción entre un activador transcripcional y un represor.

Resulta interesante que FabR regula la expresión dependiendo de la composición de la poza de ácidos grasos citosólicos. Todos los acil-CoA o acil-ACP de cadena larga se unen a FabR; sin embargo, sólo la unión de acilos grasos insaturados de cadena larga aumenta la afinidad de FabR por las secuencias operadoras presentes en los promotores *fabA* y *fabB*, lo

que conduce a la represión de la transcripción. Por el contrario, la unión de acil-ACP o acil-CoA saturados de cadena larga a FabR no permite la unión al DNA. *E. coli* puede usar acil-ACP sintetizados *de novo* y acil-CoA formados a partir de ácidos grasos exógenos. Por tanto, FabR puede ajustar la biosíntesis de ácidos grasos insaturados en relación con la composición de ácidos grasos obtenidos del medio ambiente (Zhu *et al.*, 2009).

1.3.3 Regulación genética en *Pseudomonas aeruginosa*

El control transcripcional del metabolismo de ácidos grasos en *E. coli*, mediado por las proteínas reguladoras FadR y FabR, está altamente conservado en enterobacterias, pero no así en otras gammaproteobacterias.

En *P. aeruginosa*, el regulador DesT es un factor transcripcional de la familia TetR, el cual coordina la expresión de las vías aerobia y anaerobia de síntesis de UFAs al reprimir la expresión de los operones *desCB* y *fabAB* (Subramanian *et al.*, 2010). De manera similar a FabR, DesT se une a acil-CoA saturados e insaturados con igual afinidad, pero la estabilidad de la unión a DNA aumenta cuando DesT se une a un acil-CoA insaturado y disminuye cuando DesT se une a un acil-CoA saturado. Esto permite que, en presencia de UFAs, *P. aeruginosa* reprima la transcripción de los genes *fabAB* y *desCB* y que esta represión sea liberada ante SFAs. De este modo, *P. aeruginosa* responde a la disponibilidad de SFAs y UFAs exógenos y ajusta la expresión génica de acuerdo con las variaciones de su ambiente (Zhang y Rock, 2009). DesT solo detecta ácidos grasos exógenos en forma de tioésteres de acil-CoA de cadena larga, ya que los acil-ACP, los acil-CoA de cadena corta y los ácidos grasos libres no modifican la unión a DNA.

En esta misma bacteria se encuentra el regulador P_{sr}A, un miembro de la familia de reguladores TetR que reprime de manera directa al operón *fadBA5*, el cual codifica para las enzimas β-oxidativas responsables de la degradación de ácidos grasos de cadena larga. En ausencia de ácidos grasos libres de cadena larga, P_{sr}A se mantiene unido a la región promotora, impidiendo la transcripción del operón *fadBA5*. Sin embargo, esta unión se interrumpe por ácidos grasos libres de cadena larga específicos (C_{18:1}^{Δ9}, C_{16:0}, C_{14:0} y, en menor medida, C_{12:0}), pero no por otros ácidos grasos de cadena media o corta. Dichas moléculas son capaces de unirse a P_{sr}A, revirtiendo su unión a DNA y promoviendo la transcripción del operón. Una mutación en *psrA* conlleva una expresión constitutiva del operón *fadBA5*, no importando el medio de cultivo ni la ausencia o presencia de oleato (C_{18:1}^{Δ9}) como fuente de carbono (Kang *et al.*, 2008). Asimismo, P_{sr}A también reprime la expresión del gen PA0506, un homólogo de FadE que es una de las muchas acil-CoA deshidrogenasas predichas en la cepa PAO1 (Wells *et al.*, 2017).

2. Polihidroxicanoatos (PHAs)

2.1 Aspectos generales

Los poli(3-hidroxicanoatos) (PHAs) constituyen una extensa familia de polímeros sintetizados por una variedad de microorganismos como reserva de carbono y energía. Los PHAs se sintetizan y almacenan como gránulos intracelulares a partir de diversas fuentes de carbono o de materias primas renovables como aceites vegetales o animales, melazas, materiales lignocelulósicos, cáscaras o fibra de fruta, entre otros (Koller *et al.*, 2010; Surendran *et al.*, 2020). La acumulación de PHAs ocurre generalmente en condiciones de

alta disponibilidad de una fuente de carbono externa, pero con limitación de nutrientes esenciales para el crecimiento, tales como nitrógeno, fósforo, oxígeno disuelto o ciertos microcomponentes. Los PHAs llevan a cabo importantes tareas biológicas: además de funcionar como almacén intracelular de carbono y energía, son cruciales para la regulación del flujo de energía, balance del estado redox y actuando como factores protectores contra las presiones ambientales como el choque osmótico, la radiación UV, la desecación, el calor y el estrés oxidativo (Koller *et al.*, 2010).

Los PHAs han atraído una gran atención porque pueden ser utilizados como materiales con propiedades termoplásticas y/o elastoméricas, similares a algunos plásticos derivados del petróleo, como el polipropileno, pero con la ventaja de ser biodegradables por su origen microbiano. Además, por su composición, son materiales biocompatibles, pues los monómeros que los conforman son metabolitos presentes en células animales (Anjum *et al.*, 2016).

2.2 Estructura, tipos y propiedades físicas de los PHAs

Los PHAs son poliésteres lineales compuestos por monómeros 3-hidroxicanoatos o 3-HAs (aunque también se conocen PHAs con 4-, 5-, y 6-HAs). En estos polímeros termoplásticos, el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace éster con el grupo hidroxilo del monómero vecino (figura 4). El peso molecular de los PHAs varía en el rango de $2 \times 10^5 - 1 \times 10^7$ Da, y depende del microorganismo en el que se sintetiza el polímero y de las condiciones de crecimiento utilizadas (Akaraonye *et al.*, 2010; Gómez-Hernández *et al.*, 2021). En todos los PHAs que se han caracterizado hasta ahora, el grupo hidroxilo del átomo de carbono β o C-3 tiene configuración D, debido a la estereoespecificidad de las PHA sintetasas, las enzimas responsables de la polimerización (Akaraonye *et al.*, 2010). Tras la

polimerización, en esa posición β o C-3, queda una cadena lateral de alquilo, cuya longitud puede variar de metilo a tridecilo, dependiendo del hidroxialcanoato polimerizado, aunque también se han descrito sustituyentes aromáticos, insaturados, halogenados, epoxidados y ramificados (Madison y Huisman, 1999).

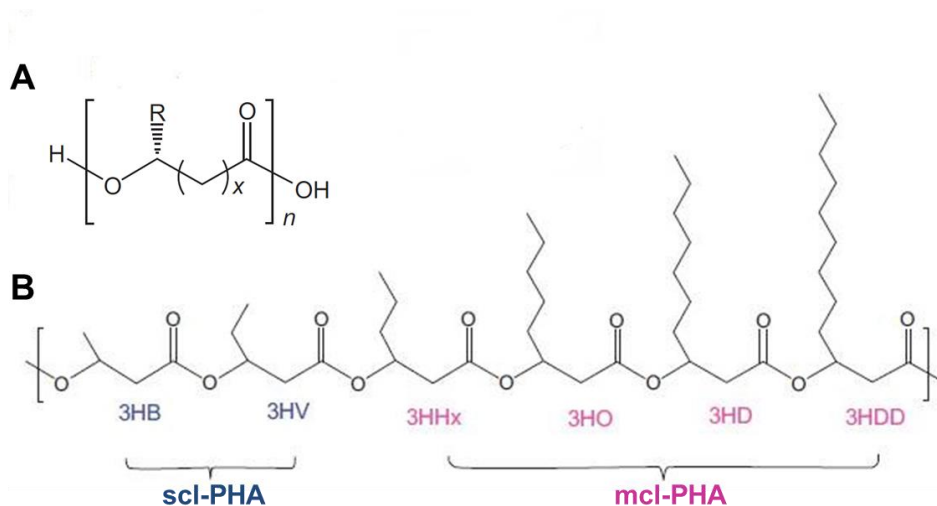


Figura 4: Estructura general de monómeros de PHA. (A): R: grupos alquilo desde C_1 hasta C_{13} ; x: 1-4; n: 100-300. (B): Algunos monómeros de PHA de cadena corta (scl-HA) y de cadena media (mcl-HA) sintetizados comúnmente. 3HB: 3-hidroxibutirato, 3HV: 3-hidroxivalerato, 3HHx: 3-hidroxihexanoato, 3HO: 3-hidroxioctanoato, 3HD: 3-hidroxidecanoato, 3HDD: 3-hidroxidodecanoato (Modificado de Li *et al.*, 2016).

La longitud de la cadena lateral y la existencia o no de un grupo funcional influyen en las propiedades termomecánicas de los polímeros, como punto de fusión, temperatura de transición vítrea y cristalinidad, que a su vez determinan su aplicación final (Madison y Huisman, 1999; Akaraonye *et al.*, 2010). Respecto a su estructura monomérica, los PHAs se clasifican en dos categorías generales, según la longitud de los monómeros hidroxialcanoatos que los constituyen: PHAs de cadena corta (scl-PHAs, por sus siglas en inglés), que contienen

monómeros de tres a cinco carbonos, y PHAs de cadena media (mcl-PHAs, por sus siglas en inglés), con monómeros de seis a 14 carbonos (Urtuvia *et al.*, 2014).

La mayoría de los microorganismos productores de PHAs sintetizan el homopolímero de 3-hidroxi-butirato (3HB), el poli-3-hidroxi-butirato (poli- β -hidroxi-butirato, P3HB), que es el PHA más común y mejor estudiado; no obstante, se han identificado más de 150 monómeros de hidroxialcanoatos diferentes que forman parte de distintos PHAs (Urtuvia *et al.*, 2014). Esta variedad de monómeros representa una ventaja sobre otros biopolímeros, ya que permite obtener materiales con diferentes características para distintas aplicaciones (Panchal *et al.*, 2013).

Propiedades	Polímero				
	P3HB	PHBV	P(3HB-3HHx)	mcl-PHAs	PP
Tm (°C)	180	145	127	30 - 80	176
Tg (°C)	4	-1	-1	-40 - 150	-10
Elasticidad (%)	5	50	400	300 - 400	400
Resistencia a la tracción (MPa)	40	20	21	20	34.5

Tabla 1: Propiedades físicas de algunos PHAs comparadas con polipropileno. Tm: temperatura de fusión; Tg: temperatura de transición vítrea; P3HB: poli-3-hidroxi-butirato; PHBV: poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-valerato); P(3HB-3HHx): poli(3-hidroxi-butirato-co-3-hidroxi-hexanoato); mcl-PHAs: PHAs de cadena media; PP: polipropileno (Modificado de Akaraonye *et al.*, 2010).

Los scl-PHAs como el P3HB, son polímeros que producen plásticos cristalinos, rígidos y quebradizos, con poca resistencia al estrés mecánico, lo que restringe sus aplicaciones. Además, su alta temperatura de fusión (180 °C) es cercana a la temperatura de degradación térmica, lo que limita su procesamiento. Por otro lado, los mcl-PHAs son menos cristalinos, pero con mayor elasticidad y con temperaturas de fusión más bajas que las de los scl-PHA (tabla 1) (Akaraonye *et al.*, 2010).

Dado que las propiedades físicas y materiales de los PHAs están significativamente influenciadas por su composición de monómeros, la modificación y el control de su composición han sido una estrategia biotecnológica ampliamente estudiada, para diseñar copolímeros de PHAs con monómeros de diferentes longitudes de cadena que permitan obtener poliésteres más elásticos y resistentes (Li *et al.*, 2016).

En cuanto al P3HB, es posible mejorar sus cualidades físicas incorporando un monómero distinto al 3HB en la cadena del polímero, tal como el 3-hidroxivalerato (3HV), para obtener el copolímero poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato) (PHBV), que contiene monómeros de cuatro y cinco carbonos, y que posee características diferentes. El PHBV es un polímero con mejores propiedades materiales, como mayor flexibilidad y elasticidad (tabla 1). Además, estas propiedades (temperatura de fusión, cristalinidad y resistencia a la tracción) pueden variar ampliamente según la cantidad de 3HV incorporado al polímero (Meléndez-Rodríguez *et al.*, 2021; Urtuvia *et al.*, 2020).

Por su parte, los copolímeros de PHAs que consisten en monómeros de longitud de cadena corta y media tienen características que varían de rígidas a flexibles, ya que la fracción molar de cada monómero scl- y mcl- influye directamente en las cualidades del PHA. El poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxihexanoato) (P(3HB-3HHx)), un tipo de copolímero scl-

mcl-PHA, es un PHA muy interesante, porque el copoliéster compuesto por al menos 10% molar de 3-hidroxihexanoato (3HHx) muestra propiedades más flexibles comparado con el P3HB. Otro ejemplo es el copolímero P(94% 3HB-co-6% 3HA) que consta de unidades 3HA desde seis hasta 12 átomos de carbono y que posee propiedades similares al polietileno de baja densidad (Matsusaki *et al.*, 2000).

Debido a la naturaleza hidrofóbica de los PHAs, son de utilidad las modificaciones que mejoren sus propiedades hidrofílicas, sobre todo para poder usarse en aplicaciones de importancia médica, que requieren solubilidad en agua. Resultan de especial interés los PHAs con cadenas laterales insaturadas y sus derivados, por ejemplo, el poli(3-hidroxi octanoato-co-3-hidroxi-10-undecenoato) (PHOU), obtenido de *Pseudomonas oleovorans* (ahora *P. aeruginosa*) mediante el uso de ácidos grasos insaturados como el ácido 10-undecenoico o los ácidos grasos de la soya. Las cadenas laterales insaturadas en el PHOU forman un grupo vinilo terminal altamente reactivo para otras reacciones de modificación. Por ejemplo, se pueden epoxidar para formar resinas epóxicas solubles, se pueden oxidar para formar polímeros hidroxilados completamente solubles en solventes polares, pueden formar compuestos halogenados, entre otras modificaciones que contribuyan a su hidrofiliidad (Hazer *et al.*, 2012; Samui y Kanai, 2019).

2.3 Vías de síntesis de PHAs y su relación con el metabolismo de ácidos grasos

El tipo y la composición de los PHAs sintetizados, tanto por organismos productores naturales como recombinantes, depende de tres factores: 1) la fuente de carbono suministrada, 2) las vías metabólicas presentes en el microorganismo y 3) la especificidad de sustrato de las enzimas que intervienen en el proceso, principalmente de la PHA sintasa. A su vez, la biosíntesis de PHAs se puede dividir en dos pasos fundamentales: a) la síntesis de

los 3-hidroxiacil-CoAs, que son los monómeros activados y b) su posterior polimerización mediante la PHA sintasa. La síntesis de los monómeros 3-hidroxiacil-CoA ocurre principalmente por dos vías diferentes: una a partir de la condensación de moléculas de acetil-CoA y una a partir del uso de intermediarios del metabolismo de ácidos grasos, tanto de la síntesis, como de la degradación (Panchal *et al.*, 2013). Estas vías se ilustran en la figura 5.

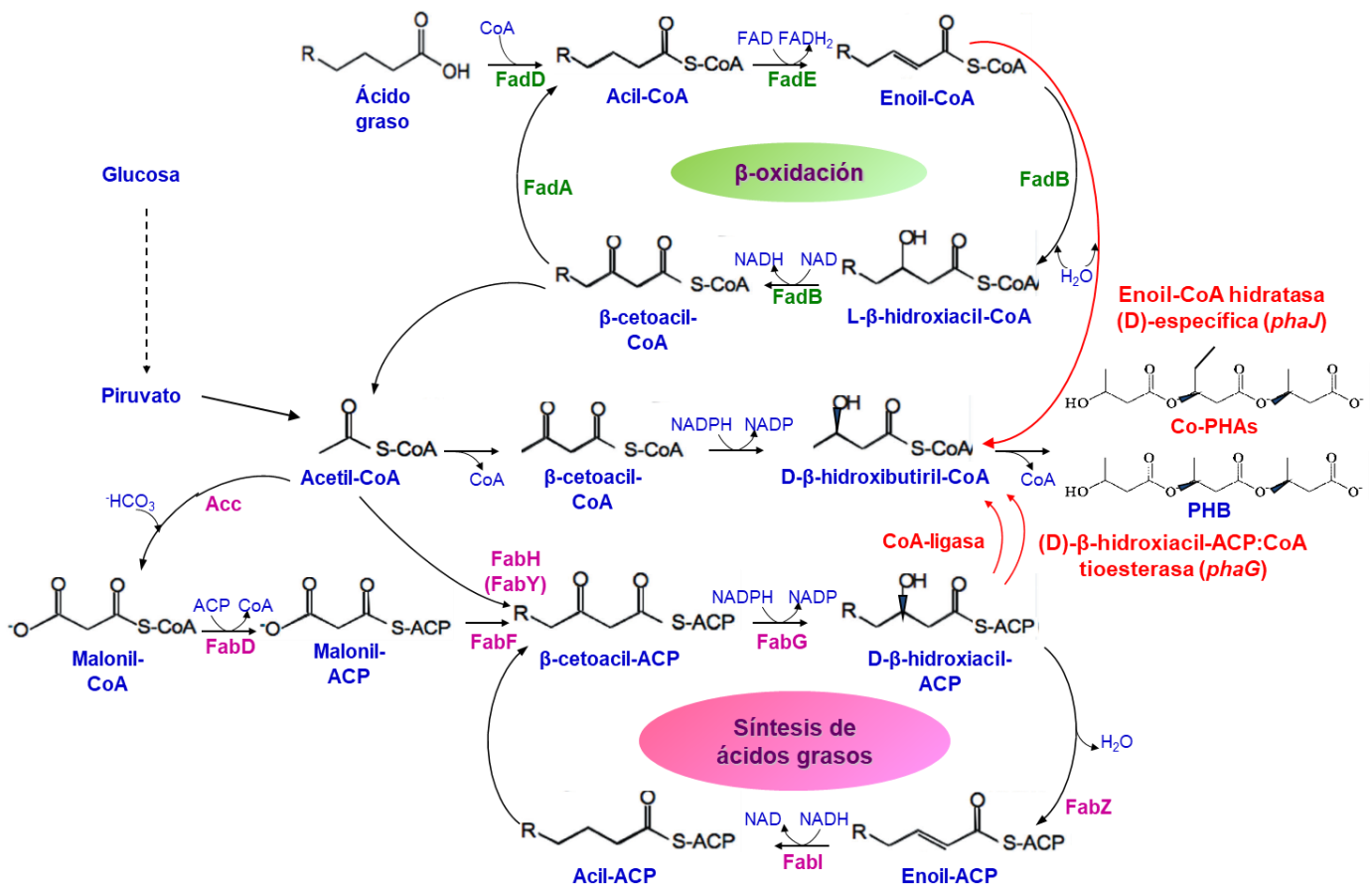


Figura 5: Metabolismo de ácidos grasos y síntesis de PHAs. Las enzimas de la β-oxidación se muestran en letras verdes. Las enzimas de la síntesis de ácidos grasos se muestran en letras magenta. Las enzimas que relacionan al metabolismo de ácidos grasos con la síntesis de PHAs se resaltan en letras y flechas rojas.

2.3.1 Síntesis de scl-PHAs a partir de la condensación de acetil-CoA. Esta vía es la más común en bacterias productoras de scl-PHAs, como el P3HB, a partir de carbohidratos u otras fuentes de carbono que se metabolizan a acetil-CoA y que no se relacionan en estructura con el monómero final. Hay tres enzimas clave implicadas: la β -cetotiolasa, que condensa dos moléculas de acetil-CoA para dar aceto-acetil-CoA, la aceto-acetil-CoA reductasa dependiente de NADPH, que reduce el aceto-acetil-CoA produciendo D- β -hidroxibutiril-CoA y la PHA sintasa, que cataliza la polimerización mediante la esterificación de estas subunidades para formar el P3HB (Velázquez-Sánchez *et al.*, 2020).

2.3.2. Síntesis de PHAs a partir de intermediarios del metabolismo de ácidos grasos.

Esta segunda vía presenta dos posibilidades:

a) Síntesis de copolímeros de PHAs mediante β -oxidación. Implica la síntesis de PHAs (generalmente copolímeros scl-mcl-PHAs) a partir de ácidos grasos, alcanos o alcoholes alquílicos como fuente de carbono, catabolizados mediante β -oxidación. En la β -oxidación se generan L-3-hidroxiacil-CoA, posibles precursores de los PHAs, pero que no pueden incorporarse directamente a la síntesis de estos polímeros, debido a la estereoespecificidad de las PHA sintasas, que requieren el isómero D. Sin embargo, diversos microorganismos productores de PHAs poseen la enzima PhaJ, una enoil-CoA-hidratasa, adicional a FadB, que cataliza la adición de una molécula de agua a través del doble enlace del enoil-CoA con estereoespecificidad D (figura 5). Esta enzima juega un papel importante al proporcionar monómeros D-3-hidroxiacil-CoA de longitud de cadena C₄-C₁₀ a través de la β -oxidación, para su posterior copolimerización en PHAs (Fukui y Doi, 1997; Panchal *et al.*, 2013). PhaJ ha sido identificada y caracterizada en diversos productores de PHAs, como *Aeromonas caviae*, *Rhodospirillum rubrum*, *Ralstonia eutropha* y diversas especies de *Pseudomonas*;

algunas hidratasas poseen especificidad para 2-enoil-CoAs de cadena corta (scl) (C₄-C₆), mientras que otras son específicas para sustratos de cadena media (mcl) (C₆-C₁₀) (Kawashima *et al.*, 2012; Tsuge *et al.*, 2003).

b) Síntesis de mcl-PHAs a través de la síntesis de ácidos grasos. Esta vía es de gran interés debido a que permite producir mcl-PHA a partir de fuentes de carbono que no están relacionadas estructuralmente con el monómero final, con la ventaja de que algunas de ellas son económicamente accesibles. En esta vía, la fuente de carbono genera acetil-CoA que entra en la síntesis *de novo* de ácidos grasos, donde se forman precursores en la conformación adecuada para la polimerización de PHAs (D-3-hidroxiacil-ACP); no obstante, los intermediarios están unidos a ACP y no a CoA. En algunas especies de *Pseudomonas* productoras de PHAs existe una 3-hidroxiacil-ACP:CoA tioesterasa (denominada PhaG) y una 3-hidroxiacil-CoA ligasa, que convierten el D-3-hidroxiacil-ACP en D-3-hidroxiacil-CoA, el sustrato de la PHA sintasa (figura 5) (Rehm *et al.*, 2001, 1998; Wang *et al.*, 2011).

3. Azotobacter vinelandii

Azotobacter vinelandii es una bacteria de suelo Gram negativa que pertenece a la familia Pseudomonadaceae. Es de vida libre, no patógena, que fija nitrógeno atmosférico en aerobiosis y es quimioorganotrófica, pudiendo utilizar azúcares, alcoholes y sales de ácidos orgánicos para su crecimiento. *A. vinelandii* sintetiza diversos metabolitos de importancia biotecnológica, como el exopolisacárido alginato, el poliéster intracelular P3HB y los lípidos fenólicos alquilresorcinoles (AR) (Garrity *et al.*, 2005). Asimismo, posee la capacidad de someterse a un proceso de diferenciación, formando quistes metabólicamente inactivos

resistentes a condiciones adversas (como desecación, estrés mecánico o radiación ultravioleta) (Segura *et al.*, 2014).

3.1 Ciclo de vida de *A. vinelandii*

En su ambiente natural, cuando las condiciones para su supervivencia son adversas, *A. vinelandii* forma quistes resistentes a la desecación (figura 6). En condiciones de laboratorio, en un medio para crecimiento vegetativo, los quistes están formados por menos del 0.01% de las células que crecen en glucosa y sólo hasta la fase estacionaria tardía de crecimiento (Segura *et al.*, 2014).

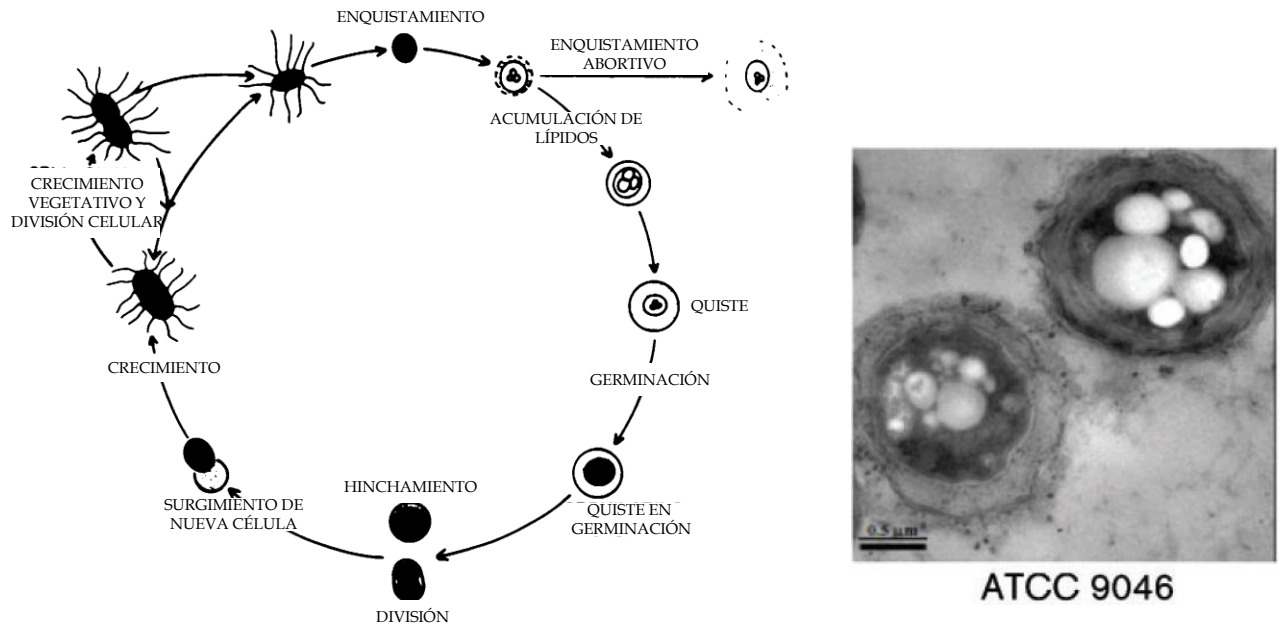


Figura 6: Ciclo de vida de *A. vinelandii*. Se muestran las diferentes etapas del proceso de diferenciación. La parte derecha de la figura muestra una imagen de microscopía electrónica de la morfología de un quiste maduro (tomado de Cocotl-Yañez *et al.*, 2011).

Los quistes consisten en una célula metabólicamente inactiva, conocida como cuerpo central, que contiene numerosos gránulos de P3HB. El cuerpo central está rodeado por una cápsula compuesta por dos capas: una externa llamada exina y una interna llamada intina, constituidas principalmente de alginato y lipoproteínas (Segura *et al.*, 2014). Por otro lado, se induce la síntesis de AR y alquilpironas (AP), que sustituyen a los fosfolípidos de las membranas del quiste (Reusch y Sadoff, 1983; Segura *et al.*, 2003). Estos lípidos se sintetizan únicamente en condiciones de enquistamiento.

3.2 Biosíntesis de P3HB y PHBV en *A. vinelandii*

Como parte de su metabolismo, *A. vinelandii* es un productor natural del homopolímero P3HB, el cual se sintetiza mediante la condensación de acetyl-CoA, como se describió en la sección 2.3.1 (Velázquez-Sánchez *et al.*, 2020).

Los genes que codifican para la β -cetotiolasa, la acetoacetyl-CoA reductasa y la PHB-sintasa se denominan *phbA*, *phbB* y *phbC*, respectivamente. Los tres genes se encuentran agrupados y forman el operón *phbBAC*, el cual se transcribe a partir de dos promotores, pB1 y pB2. PhbR, codificado por el gen *phbR*, activa la transcripción de *phbBAC* a partir del promotor pB1, mientras que la transcripción a partir de pB2 es dependiente del factor sigma de fase estacionaria, RpoS (Peralta-Gil *et al.*, 2002; Segura *et al.*, 2000).

Cuando *A. vinelandii* crece en presencia de carbohidratos, puede acumular más del 70% de su peso seco en forma de P3HB de alto peso molecular (entre $8-10 \times 10^6$ Da), lo que lo convierte en un modelo muy prometedor para su producción (Gómez-Hernández *et al.*, 2021; Peña *et al.*, 2014). Además, esta bacteria puede crecer y producir P3HB a partir de varios sustratos, incluidos ácidos orgánicos, alcoholes y azúcares, así como sustratos de bajo

costo, como melaza de caña, jarabe de maíz, extracto de malta, peptona de pescado e incluso aguas residuales de otros procesos industriales (Velázquez-Sánchez *et al.*, 2020).

A. vinelandii también sintetiza el copolímero PHBV de estructura aleatoria, que se obtiene añadiendo al medio de cultivo sustratos tales como ácidos grasos de cadena impar (como valerato, heptanoato o nonanoato) que se catabolizan mediante β -oxidación. La generación del monómero 3HV de cinco carbonos se da al canalizar intermediarios de la degradación de dichos precursores hacia la síntesis del copolímero, después de los pasos iniciales en la β -oxidación y justo antes de la tiólisis del 3-cetoacil-CoA (Page *et al.*, 1992; Urtuvia *et al.*, 2020). Si bien no está demostrado, esto sugiere una posible actividad de la enzima PhaJ, (ver apartado 2.3.2), ya que *A. vinelandii* posee una proteína de 156 aminoácidos 69% idéntica a PhaJ de *P. aeruginosa* y que presenta un residuo de ácido aspártico en el sitio activo, que está conservado en todas las proteínas PhaJ caracterizadas al momento (Morales Flores, 2019).

3.3 Lípidos y ácidos grasos en *A. vinelandii*

En la fisiología de *A. vinelandii*, la síntesis de ácidos grasos es esencial para la biogénesis de membrana, ya sea como parte del proceso de división celular, para mantener la integridad de la membrana o para adaptarse a distintas condiciones ambientales. En una célula vegetativa, aproximadamente el 10.8% del peso seco corresponde a la fracción lipídica y los principales ácidos grasos presentes en los fosfolípidos son miristato (C_{14:0}), palmitato (C_{16:0}), palmitoleato (C_{16:1}), estearato (C_{18:0}), oleato y cis-vaccinato (C_{18:1}), lo que indica que las vías de síntesis de ácidos grasos saturados e insaturados están completamente activas (Larsen *et al.*, 2005; Su *et al.*, 1979). Por el contrario, durante el enquistamiento, los componentes lipídicos aumentan y cambian considerablemente, constituyendo el 16% del peso seco y

dando paso a la síntesis de los lípidos fenólicos ARs y APs, los cuales sustituyen a la mayoría de los fosfolípidos de las membranas del quiste, como se mencionó en el apartado 3.1. Del mismo modo, se sintetizan CFA, los cuales reemplazan el 25% de los grupos acilo de los fosfolípidos restantes (Reusch y Sadoff, 1981; Su *et al.*, 1979).

ANTECEDENTES

Aunque el uso de PHAs como materiales plásticos representaría un beneficio para el medio ambiente, la utilización de estos polímeros a nivel industrial aún es limitada, principalmente debido a sus altos costos de producción, como consecuencia del alto precio de los sustratos utilizados, su procesamiento y la implementación de ciertas estrategias de cultivo (Kourmentza *et al.*, 2017). Estas estrategias son necesarias porque la acumulación de PHAs generalmente se favorece cuando hay un exceso de fuente de carbono en el medio, pero con limitación de algún nutriente esencial para el crecimiento (Koller *et al.*, 2010), lo cual obliga a implementar cultivos en dos fases: una primera fase que permita alcanzar una alta densidad de crecimiento, seguida de una fase limitante del crecimiento que favorezca la producción y acumulación de PHAs.

El potencial biotecnológico que posee *A. vinelandii* se debe, entre otras razones, a que es una bacteria no patógena que no requiere de condiciones limitantes de crecimiento para sintetizar PHAs, y para la cual existen diversos reportes sobre la implementación de estrategias de cultivo eficientes, las cuales incluyen el uso de varias fuentes de carbono en cultivos discontinuos, discontinuos alimentados o continuos. (Díaz-Barrera y Soto, 2010; Peña *et al.*, 2014). Sin embargo, la modificación de los circuitos reguladores genéticos asociados a las vías metabólicas involucradas en la síntesis de PHAs, representa una estrategia adicional a las condiciones de cultivo y un nicho de oportunidad para optimizar la biosíntesis de PHAs en *A. vinelandii*, por lo que es necesario profundizar en la regulación del metabolismo de esta bacteria.

Considerando que en *A. vinelandii* existe una conexión metabólica entre la síntesis de copolímeros de PHAs y el metabolismo de ácidos grasos (particularmente la β -oxidación en

la síntesis de PHBV), se hace evidente en primer lugar, la importancia de conocer y entender la regulación del metabolismo de ácidos grasos, para posteriormente utilizar ese conocimiento en la modificación de su regulación como enfoque para el diseño y mejoramiento de cepas productoras de copolímeros. Para ilustrar lo anterior, en *E. coli*, por ejemplo, la cepa LS5218 se emplea con frecuencia para la producción de PHAs a partir de mezclas de azúcares y ácidos orgánicos, debido a que presenta, entre otras modificaciones genéticas, una mutación en el gen *fadR601* (el cual codifica para el regulador FadR), desregulando así los genes del regulon *fad* que codifican las enzimas responsables de la β -oxidación. Las modificaciones en el genoma de *E. coli* LS5218 le permiten una mayor captación y utilización de ácidos grasos de una amplia gama de longitudes de cadena, y la hacen apta para el diseño y síntesis de copolímeros de cadena corta-cadena media scl-mcl-PHA y PHBV (Rand *et al.*, 2017).

Como se discutió en el apartado 1.3, los reguladores arquetipo de *E. coli*, FadR y FabR, han sido extensamente estudiados, más no son precisamente comunes, los esquemas de regulación cambian en otros grupos de bacterias. En *P. aeruginosa*, que es una bacteria filogenéticamente relacionada con *A. vinelandii* (ambas pertenecen a la misma familia) y que frecuentemente sirve de referencia para nuestro modelo, están presentes el regulador DesT, que coordina la expresión de las vías aerobia y anaerobia de síntesis de UFAs (Subramanian *et al.*, 2010), y el regulador PsrA, que reprime al gen *fadE* y al operón *fadBA5*, cuyos productos participan en la β -oxidación (Kang *et al.*, 2008; Wells *et al.*, 2017).

Una característica interesante de PsrA en *P. aeruginosa*, es que no sólo es un represor de genes que participan en la β -oxidación. En realidad, es un regulador global, que activa o reprime la expresión de otros genes. Se describió por primera vez como el principal activador

de la transcripción de *rpoS* que codifica para el factor sigma RpoS, del cual depende la transcripción de numerosos genes en la fase estacionaria de crecimiento. En una mutante en *psrA*, los niveles de expresión de *rpoS* disminuyen hasta en un 90%, lo que se traduce en una drástica disminución de la proteína RpoS (Kojic y Venturi, 2001). Otro de sus blancos de regulación positiva es el operón *exsCEBA*, que codifica para un sistema de secreción de exotoxinas y que es un importante factor de virulencia de *P. aeruginosa* (Shen *et al.*, 2006). *PsrA* también modula su propia expresión, de manera negativa (Kojic *et al.*, 2002).

Para comenzar con el estudio de la regulación del metabolismo de ácidos grasos en *A. vinelandii*, se realizó una búsqueda de posibles reguladores codificados en su genoma (Setubal *et al.*, 2009). No se encontraron genes homólogos a *fadR* y *fabR* de *E. coli*, ni a *desT* de *P. aeruginosa*. No obstante, *psrA* es un gen que sí se encuentra en el genoma de *A. vinelandii* y que codifica para una proteína reguladora funcional. Previamente, se reportó en nuestro grupo de trabajo que, al igual que en *P. aeruginosa*, *PsrA* controla de manera positiva la transcripción de *rpoS* de *A. vinelandii*, que a su vez regula otras funciones. En la cepa silvestre ATCC 9046, una mutante en *psrA* disminuyó la transcripción de *rpoS* hasta en un 60%, lo que impactó en procesos como la síntesis de lípidos AR o la formación de quistes resistentes a la desecación (Cocotl-Yañez *et al.*, 2011). Sin embargo, su papel como regulador del metabolismo de ácidos grasos no se había explorado con anterioridad.

Puesto que la síntesis de PHAs y el metabolismo de ácidos grasos están estrechamente vinculados, el desarrollo de este proyecto estuvo enfocado en estudiar la regulación del metabolismo de ácidos grasos en *A. vinelandii*; en particular, si *PsrA* está involucrado en la regulación de esta ruta metabólica en nuestro modelo de estudio. Es importante destacar que, fuera de la información existente sobre la regulación genética del metabolismo de ácidos

grasos en *E. coli*, hay poco conocimiento sobre la manera en que otras bacterias controlan este proceso.

En un aspecto adicional de este proyecto, pero relacionado con el metabolismo de ácidos grasos y de PHAs en *A. vinelandii*, se desarrollaron diferentes estrategias que enriquecieran la síntesis de ácidos grasos; el interés de incrementar la síntesis de ácidos grasos surgió de la relación que hay entre esta vía anabólica y la síntesis de mcl-PHAs, como se discutió en el apartado 2.3.2. Se propone que una cepa de *A. vinelandii* modificada genéticamente con las actividades enzimáticas de PhaG y una 3-hidroxiacil-CoA ligasa, ambas provenientes de *Pseudomonas* spp., será capaz de sintetizar copolímeros scl-mcl-PHAs, y que una síntesis más activa de ácidos grasos favorecerá la acumulación de los compuestos precursores necesarios, lo que tendrá un efecto positivo en la biosíntesis de estos copolímeros.

Al respecto, existen antecedentes en nuestro grupo de trabajo que demuestran que una cepa heteróloga de *A. vinelandii* que expresa los genes *phaG* (3-hidroxiacil-ACP tioesterasa) y PA3924 (3-hidroxiacil-CoA ligasa) de *Pseudomonas* spp., es capaz de sintetizar el copolímero P(3HB-3HHx) (cuyas propiedades se enumeran en la tabla 1), con un 6.2% molar de 3-hidroxihexanoato (3HHx), a partir de sacarosa como fuente de carbono. Además de sintetizar un copolímero scl-mcl-PHA, una ventaja adicional de esta cepa es que sintetiza el P(3HB-3HHx) con la misma maquinaria genética con la que *A. vinelandii* sintetiza P3HB (es decir, el operón *phbBAC*); esto representa una herramienta de gran utilidad práctica para la producción de diferentes tipos de PHAs, pues esta bacteria se puede crecer y cultivar fácilmente (Morales Flores, 2019).

Puesto que, como se ha discutido anteriormente, los copolímeros de scl-mcl-PHAs tienen propiedades físicas diferentes al P3HB, un proyecto a futuro dentro de nuestro grupo de trabajo es probar si los modelos de sobreproducción de ácidos grasos desarrollados en este trabajo tienen un efecto positivo sobre la síntesis de copolímeros scl-mcl-PHAs, como el P(3HB-3HHx), en cepas heterólogas de *A. vinelandii* que expresan *phaG* y PA3924 de *Pseudomonas* spp.

HIPÓTESIS

De acuerdo con los antecedentes descritos, se plantea que en *A. vinelandii*, el metabolismo de ácidos grasos está controlado por PsrA, un regulador diferente a los descritos en *E. coli*.

OBJETIVOS

1. Identificar los genes codificantes de las enzimas involucradas en el metabolismo de ácidos grasos en el genoma de *A. vinelandii*.
2. Caracterizar la función de PsrA en la regulación del metabolismo de ácidos grasos en *A. vinelandii*.
 - a. Comprobar si PsrA regula negativamente la expresión de genes de degradación de ácidos grasos.
 - b. Conocer si PsrA está involucrado en la regulación transcripcional de la síntesis de ácidos grasos.
 - c. Determinar si una mutación en *psrA* afecta fenotipos como el metabolismo de ácidos grasos y el crecimiento.
3. Sobreexpresar genes estructurales de la síntesis de ácidos grasos de *A. vinelandii*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Material biológico y secuencias de oligonucleótidos

Tabla 2. Material biológico

Cepa	Descripción	Referencia/Fuente
<i>A. vinelandii</i>		
OP	Fondo silvestre, mutante natural <i>algU</i> de la cepa O	Bush y Wilson, 1959
PA6psrA	Mutante derivada de la cepa OP, con la interrupción <i>psrA::Km</i>	Este trabajo
PA1psrA-sil	Cepa PA6psrA complementada con el plásmido pBpsrA-sil cointegrado	Este trabajo
JGW-S	Mutante derivada de la cepa UW, usada como donadora de DNA y que contiene una mutación <i>rpoS::Sp</i>	Peralta-Gil <i>et al.</i> , 2002
S6rpoS	Mutante derivada de la cepa OP, con la interrupción <i>rpoS::Sp</i>	Este trabajo
OP7gusA	Cepa OP con una fusión transcripcional <i>fabA-gusA</i>	Este trabajo
PA626gusA	Cepa PA6psrA con una fusión transcripcional <i>fabA-gusA</i>	Este trabajo
S66gusA	Cepa S6rpoS con una fusión transcripcional <i>fabA-gusA</i>	Este trabajo
AvOP p <i>fabDG-gusA</i>	Cepa OP con una fusión transcripcional <i>fabD-gusA</i> , usada en los experimentos de mutagénesis al azar	Este trabajo
DGF3	Cepa OP con una copia adicional de los genes <i>fabD</i> , <i>fabG</i> , <i>acpP</i> y <i>fabF</i> integrados en el gen <i>mela</i>	Este trabajo
Y2	Cepa OP con una copia adicional del gen <i>fabY</i> integrado en el gen <i>mela</i>	Este trabajo
<i>E. coli</i>		
DH5 α	<i>supE44</i> Δ <i>lacU169</i> <i>hsdR17</i> <i>recA1</i> <i>endA1</i> <i>gyrA96</i> <i>thi-1</i> <i>relA1</i>	Hanahan, 1983

Top10	<i>F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (StrR) endA1 nupG</i>	Invitrogen
LMG194	<i>F- ΔlacX74 galE thi rpsL ΔphoA (Pvu II) Δara714 leu::Tn10</i>	Invitrogen
Plásmidos		
pJET1.2/blunt	Vector de clonación	Thermo Fisher Scientific
pBSL99	Plásmido usado para obtener un casete de Km ^R	Alexeyev <i>et al.</i> , 1995
pMP01	Plásmido derivado del pBSL97 con un casete de <i>Sp-gusA</i>	Peralta-Gil <i>et al.</i> , 2002
pMpsrAhis	pBAD-TOPO que contiene al gen <i>psrA</i> con una etiqueta de seis histidinas	Cocotl-Yañez <i>et al.</i> , 2011
pUMATc	Plásmido derivado de pUC19 que contiene un fragmento de 1 kb con el gen <i>melA</i> y un casete de Tc ^R	Cocotl-Yañez <i>et al.</i> , 2014
pUMAKm	pUMATc al cual se sustituyó el casete de Tc ^R por un casete de Km ^R	Este trabajo
pUMATcgusAT	Plásmido derivado del pUMATc con el gen <i>gusA</i> para construir fusiones transcripcionales	Cocotl-Yañez <i>et al.</i> , 2014
pUMA-DGF	pUMAKm con un fragmento de 3970 pb correspondiente a los genes <i>fabD</i> , <i>fabG</i> , <i>acpP</i> y <i>fabF</i>	Este trabajo
pUMA-Y	pUMAKm con un fragmento de 2160 pb correspondiente al gen <i>fabY</i>	Este trabajo
pJETpsrA	pJET1.2/blunt con un fragmento de 1.5 kb correspondiente al gen <i>psrA</i>	Este trabajo
pJETpsrA::Km	pJETpsrA con una interrupción <i>psrA::Km</i>	Este trabajo
pBpsrA-sil	pMpsrAhis con un casete de Sp ^R	Este trabajo
pUMAfabAB	pUMATcgusAT con una fusión transcripcional <i>fabA-gusA</i>	Este trabajo
pUMAfabDG	pUMATcgusAT con una fusión transcripcional <i>fabD-gusA</i>	Este trabajo

pJETseq1	pJET1.2/blunt con un fragmento de 1 kb correspondiente a la región reguladora y estructural del gen <i>fabA</i>	Este trabajo
----------	---	--------------

Tabla 3. Secuencias de oligonucleótidos

Nombre	Secuencia (5'-3')	Referencia/Fuente
05510-F	GCAGTTGCGAATTCAAGGTC	Este trabajo
05510-R	GGAAGCGCGAATTGTAGAGT	Este trabajo
fabA-F	CAAACAACACGCCTATACCC	Este trabajo
fabA-R	TGCGATCGACCATCAACATA	Este trabajo
fabD-F	CGATCTGGATGTCCTCAAGC	Este trabajo
fabD-R	ACTCGAGCAGATCGGTGACT	Este trabajo
fabF-F	GCGGTCTCACCAATATCGAG	Este trabajo
fabF-R	GAAGCCGGAAATCATGTTG	Este trabajo
fadA-F	CTCAAGGACCTCAAGCTGCT	Este trabajo
fadA-R	GAAATCCGCACTCCCGAAC	Este trabajo
fadB2-F	CAACACCTCGACCATCTCCA	Este trabajo
fadB2-R	TCGACCAGTTGCATCAGTTG	Este trabajo
fabDG-F	TCTAGACTTCTTGCGTCGATTGCAG	Este trabajo
fabDG-R	GAATTCCAGATCCCTGATGATCTTTC	Este trabajo
fabABret-F	CTTGCAATCATCTCGTTCCTC	Este trabajo
fabABret-R	TCGTGGTTGGCAGTACTAAGG	Este trabajo
fabDGFH-F	AAGCTTCTTCTTGCGTCGATTGCAG	Este trabajo
fabDGFE-R	GAATTCACGGCGATGGTCTCGAACA	Este trabajo
fabY-F	GAATTCACTCGCCTCAGTCGAGCATG	Este trabajo
fabY-R	AAGCTTAGCTACAATCGGCTAAGATC	Este trabajo
Primer3'fabAB	GATTCCTCAATGGTCCGTTTC	Este trabajo

InterfabAB-F	CGGCGAAGAACTCACCTAC	Este trabajo
InterfabAB-R	GATACGGTGTCTTGTTCATTG	Este trabajo
melA-R	GTTGATGTTGGTCTGCATCAG	Este trabajo
upLexA	GGCAGAATTCCTCGATGTGCTGCTGG	Cocotl-Yañez <i>et al.</i> , 2011
lwPsrA	CTGAGGATCCAGTCGCGG	Cocotl-Yañez <i>et al.</i> , 2011
psrAmiguF	GAATTCCAGACAGCGCTTGATGAAGG	Cocotl-Yañez <i>et al.</i> , 2011
dwRT-psrA	CAGATTGACATCGGCCTTG	Cocotl-Yañez <i>et al.</i> , 2011
gusArev	CTCTGCCGTTTCCAAATCG	Cocotl-Yañez <i>et al.</i> , 2014
rpoSmiguF	GAATTCCGAACTGATCATCATCAAGC	Cocotl-Yañez <i>et al.</i> , 2011
dwRT-rpoS	TCCAGCGCCCTAGTGTAGTC	Cocotl-Yañez <i>et al.</i> , 2011
Fw-gyrA	CCAGCAAGGGCAAGGTCTA	Noguez <i>et al.</i> , 2008
RvgyrA	TCGTCCAGCGGCAACAGGT	Noguez <i>et al.</i> , 2008

2. Medios y condiciones de cultivo, antibióticos y cálculo de la concentración mínima inhibitoria (MIC) de cerulenina

Las cepas bacterianas y los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la tabla 2. Los cultivos de *A. vinelandii* se realizaron en medio mínimo Burk libre de nitrógeno, suplementado con sacarosa al 2% (medio BS), cuya composición fue la siguiente (g L^{-1}): K_2HPO_4 , 8; KH_2PO_4 , 2; sacarosa, 20; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 7.3; Na_2SO_4 , 18.3; $\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$, 160; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.2 (Kennedy y Dean, 1992). El pH se ajustó a un valor de 7.2. Se agregó agar bacteriológico (15 g L^{-1}) para solidificar el medio. A menos que se indique lo contrario, *A. vinelandii* se cultivó a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y para cultivos líquidos, se usaron matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio BS líquido (volumen de llenado del 20%), en agitación constante a 200 rpm.

Las cepas de *E. coli* DH5 α (Hanahan, 1983) y TOP10 (Invitrogen) se cultivaron a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ en medio Luria-Bertani (LB), cuya composición fue la siguiente (g L^{-1}): peptona de caseína, 10; extracto de levadura, 5; NaCl, 10. En medio líquido se coloca también en agitación constante a 200 rpm.

Las concentraciones de antibiótico utilizadas para *A. vinelandii* y *E. coli*, respectivamente, fueron las siguientes ($\mu\text{g mL}^{-1}$): espectinomicina 50 y 50; kanamicina 3 y 30, tetraciclina 20 y 10; Se utilizó ácido nalidíxico 30 para *A. vinelandii* y ampicilina 200 para *E. coli*. La transformación de las células competentes de *A. vinelandii* se llevó a cabo como se describió anteriormente (Page y Von Tigerstrom, 1978).

Para determinar la MIC de cerulenina para la cepa silvestre OP de *A. vinelandii*, se realizaron cultivos líquidos en medio líquido BS, durante 48 horas de crecimiento, con

concentraciones crecientes del antibiótico, desde 0 hasta 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. En estas condiciones, el crecimiento es inhibido a una concentración de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3. Manipulación de ácidos nucleicos, reacciones de PCR y retrotranscripción

Las técnicas generales para el aislamiento y manipulación de DNA, digestión con enzimas de restricción, electroforesis en gel de agarosa para DNA y RNA, ligación de DNA y transformación de *E. coli*, se llevaron a cabo según lo descrito (Maniatis *et al.*, 1988). El DNA cromosómico utilizado como molde para las reacciones de PCR se obtuvo de la cepa silvestre de *A. vinelandii* OP (Bush y Wilson, 1959). Las secuencias de oligonucleótidos utilizadas en este trabajo se enumeran en la tabla 3.

A menos que se indique lo contrario, las condiciones para la PCR fueron: 1 ciclo inicial de desnaturalización a 95 °C/3 minutos; desnaturalización a 95 °C/20 segundos; alineamiento a 60 °C/15 segundos; extensión a 72 °C/de 15-60 segundos. En total, se programaron 30 ciclos de reacción con un último ciclo de extensión final de 72 °C/5 minutos. Para llevar a cabo estas reacciones se utilizó KAPA HiFi PCR Kit, siguiendo las instrucciones del fabricante (KAPA Biosystems, Roche).

La extracción de RNA total de la cepa OP de *A. vinelandii* se realizó según lo reportado (Barry *et al.*, 1992). La muestra de RNA se trató con DNasa I (Thermo Fisher Scientific), se analizó cualitativamente en geles de agarosa y se cuantificó espectrofotométricamente con un NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific).

La retrotranscripción se llevó a cabo con el kit de síntesis de cDNA RevertAid H Minus First Strand (Thermo Fisher Scientific), utilizando 500 ng de RNA tratado con DNasa I; los oligonucleótidos fueron usados a una concentración de 2 pmol/ μ L.

Para determinar si los genes *fabA* y *fabB* constituyen un operón, se realizó el diseño de un par de cebadores de tal manera que el oligonucleótido delantero (InterfabAB-F) hibridara hacia el extremo 3' de *fabA*, mientras que el oligonucleótido reverso (InterfabAB-R) hibridara hacia el extremo 5' de *fabB*. Posteriormente, se utilizó el oligonucleótido InterfabAB-R para la síntesis de cDNA. Este cDNA se usó como templado para una reacción de PCR convencional usando los oligonucleótidos InterfabAB-F/InterfabAB-R. Además, se incluyó un control negativo de RNA tratado con DNasa I como templado y un control positivo con DNA genómico.

4. RT-PCR cuantitativa (RT-qPCR)

Los niveles de expresión de los genes de β -oxidación *fadA* y *fadB2* y los genes biosintéticos de ácidos grasos *fabA*, *fabY* y *fabD* se midieron mediante RT-qPCR, como se reportó anteriormente (Noguez *et al.*, 2008). Los cultivos de las cepas OP y PA6psrA se cultivaron en medio BS y las células se recuperaron después de 18, 24 y 40 horas de crecimiento. La extracción y el tratamiento con DNasa I de las muestras de RNA fueron los mismos descritos en el apartado anterior. Los oligonucleótidos se utilizaron de la siguiente manera: *fadA*-F/*fadA*-R para la expresión de *fadA*, *fadB2*-F/*fadB2*-R para la expresión de *fadB2*, *fabA*-F/*fabA*-R para la expresión de *fabA*, *fabD*-F/*fabD*-R para la expresión de *fabD*, 05510-F/05510-R para la expresión de *fabY* y *fw-gyrA*/*rev-gyrA* para la expresión de *gyrA* (control

interno). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. Los datos se presentan como cambio de veces de los niveles de RNAm de las cepas mutantes, en relación con la cepa silvestre.

Para cuantificar los niveles de expresión de los genes *fabD*, *fabF* y *fabY*, las cepas OP, DGF3 y Y2 se cultivaron en medio BS líquido y las células se recuperaron después de 24 horas de crecimiento. Los oligonucleótidos se utilizaron de la siguiente manera: fabD-F/fabD-R para la expresión de *fabD*, fabF-F/fabF-R para la expresión de *fabF*, 05510-F/05510-R para la expresión de *fabY* y fw-*gyrA*/rev-*gyrA* para la expresión de *gyrA* (control interno).

5. Métodos analíticos

Para cuantificar la actividad del reportero *gusA* en las fusiones transcripcionales, la actividad de la β -glucuronidasa se midió según lo reportado anteriormente (Wilson *et al.*, 1995); 1 U corresponde a 1 nmol de p-nitrofenil- β -D-glucurónido hidrolizado por minuto por μ g de proteína. Asimismo, la proteína se midió mediante el método reportado por Lowry (Lowry *et al.*, 1951), utilizando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar.

Para la determinación de las diferentes cinéticas de crecimiento, se inoculó medio BS fresco con cultivos crecidos durante la noche a partir de una sola colonia, y se determinó el crecimiento registrando la densidad óptica (DO) de los cultivos a 600 nm (DO₆₀₀).

Para establecer la viabilidad celular, el número de células viables se determinó 5 días después de que las células alcanzaran la fase estacionaria; las diluciones se sembraron en

placas de medio BS y se contaron las unidades formadoras de colonia (UFC) después de 48 horas de incubación a 30 °C.

6. Construcción de las cepas mutantes en *psrA* y *rpoS* de *A. vinelandii*

Para generar la mutante en *psrA*, se utilizaron los oligonucleótidos upLexA/lwPsrA, que amplifican un fragmento de PCR de 1.5 kb que contiene el gen *psrA* completo de *A. vinelandii*. Este fragmento se ligó en el vector de clonación pJET1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific), según las instrucciones del fabricante, obteniendo el plásmido pJETpsrA. Para inactivar por inserción el gen *psrA*, el plásmido pJETpsrA se digirió con la enzima *XhoI*, para posteriormente ligarlo a un fragmento *XhoI* que contenía el casete de resistencia a kanamicina escindido del vector pBSL99 (Alexeyev *et al.*, 1995). Este nuevo plásmido, denominado pJETpsrA::Km, se transformó en la cepa OP. Se aisló una cepa transformante resistente a kanamicina (PA6psrA), generada por un evento de recombinación doble, y se confirmó que portaba la mutación *psrA*::Km mediante PCR, usando los oligonucleótidos psrAmiguF/dwRT-psrA.

Para complementar la mutación en *psrA*, el plásmido pMpsrAhis, que contiene el gen *psrA* de *A. vinelandii* (Cocotl-Yanez *et al.*, 2011), se digirió con la enzima *ScaI* y se ligó a un fragmento *SmaI* que contenía un casete de espectinomicina escindido del vector pMP01 (Peralta- Gil *et al.*, 2002). Este plásmido, denominado pBpsrA-sil, se transformó en la cepa PA6psrA. Se aisló una cepa transformante con doble resistencia a kanamicina/espectinomicina (PA1psrA-sil), generada por un solo evento de recombinación,

y se confirmó que portaba el gen *psrA* bajo el control de su propio promotor mediante análisis de PCR utilizando los oligonucleótidos psrAmiguF/dwRT-psrA.

Para generar una cepa mutante en *rpoS* de *A. vinelandii* OP, se transformaron células competentes con DNA total obtenido de la cepa JGW-S, que contiene un casete de resistencia a espectinomicina insertado en el gen *rpoS* (Peralta-Gil *et al.*, 2002). Se aisló una cepa transformante resistente a espectinomicina (S6rpoS), generada por un evento de recombinación doble, y se confirmó que portaba la mutación *rpoS*::Sp mediante PCR usando los oligonucleótidos rpoSmiguF/dwRT-rpoS.

7. Construcción de la fusión transcripcional *fabA-gusA*

Para comprobar el efecto de la mutación en *psrA* sobre la transcripción de *fabA*, se fusionó la región promotora de dicho gen con el gen reportero *gusA*. Se utilizaron los oligonucleótidos fabABret-F/Primer3'fabAB que amplifican un fragmento de DNA de 387 pb que contiene la región promotora del gen *fabA* de *A. vinelandii* OP. Este fragmento de PCR se clonó en el plásmido suicida pUMATcgusAT digerido con *SmaI* para obtener el plásmido pUMAfabAB. El plásmido pUMATcgusAT permite insertar fusiones transcripcionales mediante doble recombinación en el locus del gen *mela* (un gen que codifica para una α -galactosidasa) del cromosoma de *A. vinelandii*, como se reportó anteriormente (Cocotl-Yanez *et al.*, 2014). La orientación correcta del fragmento *fabA* con respecto al gen reportero de glucuronidasa *gusA*, contenido en el pUMATcgusAT, se verificó con mapeo de restricción y secuenciación. El plásmido pUMAfabAB fue linealizado con *NdeI* y usado para transformar células competentes de la cepa silvestre OP de las mutantes

PA6*psrA* y S6*rpoS*. Se seleccionó una transformante resistente a tetraciclina de cada cepa, resultando las cepas OP7*gusA*, PA626*gusA* y S66*gusA* (derivados de la cepa silvestre y mutantes *psrA* y *rpoS*, respectivamente). La integración de la fusión transcripcional *fabA-gusA* en el locus del gen *mela* de estas cepas se confirmó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos *fabABret-F/gusArev*.

8. Construcción de la fusión transcripcional *fabD-gusA* e identificación del sitio de inserción del transposón *HimarI*

Para facilitar el escrutinio de mutantes con alteraciones en la expresión genética en la síntesis de ácidos grasos, se construyó la cepa OP *pfabDG-gusA*, la cual contiene una fusión transcripcional del promotor de los genes *fabDG* al gen reportero *gusA*. Se utilizaron los oligonucleótidos *fabDG-F/fabDG-R* que amplifican un fragmento de DNA de aproximadamente 300 pb que contiene la región promotora predicha del gen *fabD* de *A. vinelandii* OP. Este amplicón se clonó en el plásmido suicida pUMAT*cgusAT* para obtener el plásmido pUM*AfabDG*, siguiendo la misma metodología de clonación y transformación que para la fusión anterior. Se seleccionó una transformante resistente a tetraciclina, resultando la cepa OP *pfabDG-gusA*. La integración de la fusión transcripcional *fabD-gusA* en el locus del gen *mela* se confirmó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos *fabDG-F/gusArev*.

Para la determinación del sitio de inserción de transposón *HimarI*, se extrajo DNA cromosomal de las tres mutantes seleccionadas (denominadas C239, C526 y C549) y se digirió con la enzima de restricción *SacII* (cuyo sitio de corte no se encuentra dentro de la

secuencia del transposón). Los diferentes fragmentos obtenidos se clonaron en el vector de clonación pJET1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific), siguiendo las instrucciones del fabricante. Por cada mutante, se obtuvo una clona resistente a ampicilina (resistencia del vector de clonación) y a kanamicina (resistencia del transposón), la cual se secuenció usando los oligonucleótidos proporcionados por el fabricante del vector de clonación.

9. Construcción de las cepas DGF3 y Y2

Para la generación de la cepa DGF3, el modelo de sobreexpresión de los genes *fabD*, *fabG*, *acpP* y *fabF*, se utilizaron los oligonucleótidos fabDGFH-F/fabDGFE-R que amplifican un fragmento de 3970 pb que contiene la región estructural y reguladora de los genes *fabD*, *fabG*, *acpP* y *fabF*. Los oligonucleótidos fueron diseñados con sitios de corte para las enzimas *HindIII* y *EcoRI* para poder orientar su clonación en el plásmido pUMAKm, cortado con las mismas enzimas de restricción. De esta manera, se obtuvo el plásmido pUMA-DFG, el cual fue linealizado con *NdeI* y usado para transformar células competentes de la cepa silvestre OP. Se seleccionó una transformante resistente a kanamicina, cuyo evento de doble recombinación homóloga en el gen *melA* se confirmó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos fabF-F/melA-R.

Para la construcción de la cepa Y2, el modelo de sobreexpresión del gen *fabY*, se utilizaron los oligonucleótidos fabY-F/fabY-R que amplifican un fragmento de 2160 pb que contiene la región estructural y reguladora del gen *fabY*. Este fragmento se clonó en el plásmido pUMAKm para obtener el plásmido pUMA-Y, siguiendo la misma metodología de clonación

y transformación anterior. El evento de doble recombinación homóloga en el gen *melA* se confirmó mediante PCR utilizando los oligonucleótidos 05510-F/*melA*-R.

10. Purificación de His₆-PsrA

Para expresar y purificar la proteína PsrA, utilizada en los ensayos de retardo electroforético, se utilizó el plásmido pMpsrAhis en la cepa LMG149 de *E. coli*, tal como se reporta en Cocotl-Yañez *et al.* (2011). Brevemente, la expresión de la proteína His₆-PsrA se indujo con un 0.2% de arabinosa. La purificación de proteínas se realizó a 4 °C en condiciones no desnaturizantes utilizando matriz de agarosa Qiagen Ni-NTA, como se describe en el protocolo del fabricante. La proteína se concentró utilizando filtros centrífugos Microcon YM-10 (Amicon), se dividieron en alícuotas y se almacenaron a 4 °C hasta su uso. La concentración de proteína se determinó mediante el ensayo de proteínas Bio-Rad, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizó BSA como estándar. La electroforesis SDS-PAGE de la proteína purificada reveló el peso molecular esperado de aproximadamente 27 kD.

11. Ensayos de cambio en la movilidad electroforética en gel de DNA

Para comprobar la unión de la proteína PsrA al posible sitio de unión ubicado en la región reguladora del gen *fabA*, se amplificó mediante PCR un fragmento de DNA de 244 pb, correspondiente a la región promotora de dicho gen, utilizando los oligonucleótidos fabABRet-F/fabABRet-R. Las reacciones de unión al DNA se llevaron a cabo en un volumen total de 20 µL. Las reacciones contenían la solución de unión al DNA (Tris-HCl 10 mM pH

7.65, KCl 100 mM, DTT 0.5 mM, EDTA 1 mM, glicerol al 5% y $10 \mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ de BSA), 100 nM de cada fragmento de DNA marcado con (α - ^{32}P)-dCTP y cantidades variables de PsrA (0-4 μM). Como control negativo, se utilizó un fragmento de DNA de 105 pb correspondiente a la región estructural del gen *fabY* (Avin05510). Este fragmento se obtuvo mediante PCR utilizando los oligonucleótidos 05510-F/05510-R. Las reacciones de unión al DNA se llevaron a cabo a temperatura ambiente durante 20 minutos y las muestras se sometieron luego a PAGE en geles nativos de poliacrilamida al 6% en una solución amortiguadora que contenía Tris 90 mM, H_3BO_3 90 mM y EDTA 2 mM. El gel se secó y las señales radiactivas se detectaron mediante autorradiografía (modificado de Cocotl-Yañez *et al.*, 2011).

12. Análisis de extensión del iniciador

Para determinar el sitio de inicio de la transcripción del gen *fabA*, se aisló el RNA total de un cultivo líquido de la cepa OP cultivada durante 40 horas en medio BS. Las reacciones de extensión del iniciador se llevaron a cabo a 42 °C utilizando el oligonucleótido Primer3' *fabAB* y la transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV) (Roche). El cDNA se marcó en los extremos con (γ - ^{32}P)-dATP usando la enzima polinucleótido quinasa (Roche). Las reacciones de secuenciación se generaron con el mismo oligonucleótido, el kit de secuenciación Thermo Sequenase Cycle Sequencing (Affymetrix USB) y el plásmido pJETSeq1 como templado. Este plásmido se construyó mediante la clonación en el vector de clonación pJET1.2/blunt (Thermo Fisher Scientific), un fragmento de DNA de 1000 pb que contiene las regiones estructurales y reguladoras de *fabA* (amplificadas usando oligonucleótidos *fabABRet-F/InterfabAB*).

13. Extracción de lípidos totales y análisis por cromatografía en capa fina (TLC) de una y dos dimensiones

El análisis cualitativo de lípidos totales se realizó mediante TLC. Para ello, las cepas OP, PA6psrA y PA1psrA-sil se cultivaron en medio BS. Después de 40 o 68 horas de crecimiento, las células se recolectaron por centrifugación, se resuspendieron en 1 mL de agua y se obtuvieron extractos de lípidos según el método de Bligh y Dyer (Bligh y Dyer, 1959). Alícuotas de los extractos de lípidos y estándares de ácidos grasos (ácido esteárico [C_{18:0}] y oleico [C_{18:1}], Sigma) utilizados como controles, se colocaron en placas de gel de sílice 60 de alto rendimiento (Merck) y se resolvieron mediante TLC de una o dos dimensiones. Para la TLC de una dimensión, la fase móvil fue acetato de etilo-hexano-ácido acético (60:40:5 [v/v/v]), un sistema solvente que permite separar lípidos polares de no polares (Pech-Canul *et al.*, 2011). Para la TLC de dos dimensiones, la fase móvil fue cloroformo-metanol-agua (140:60:10 [v/v/v]) para la primera dimensión, y cloroformo-metanol-ácido acético (130:50:20 [v/v/v]) para la segunda dimensión (Vences-Guzmán *et al.*, 2011). Una vez que las placas TLC de una y dos dimensiones se resolvieron, fueron teñidas con vapor de yodo, lo que revela principalmente compuestos insaturados y aromáticos (Zbierzak *et al.*, 2011). Las placas teñidas se escanearon inmediatamente después de manera electrónica (Epson Perfection 610 Scanner). Para distinguir entre ácidos grasos saturados e insaturados, las placas de TLC se tiñeron primero con yodo, como se describió anteriormente, y una vez escaneadas, se dejó sublimar el yodo durante una noche. Posteriormente, las placas se rociaron con reactivo ANS (ácido 8-anilino-1-naftalenosulfónico, Sigma) al 0.2% en metanol. Con este reactivo, los lípidos se visualizan como manchas fluorescentes bajo luz ultravioleta (366 nm).

14. Análisis de ácidos grasos por cromatografía de gases/espectrometría de masas (GC/MS)

El análisis cuantitativo de ácidos grasos se obtuvo mediante GC/MS. Para esto, se cultivaron las cepas OP, PA6psrA y PA1psrA-sil, en matraces Erlenmeyer de 500 mL con 100 mL de medio BS líquido, en agitación constante a 200 rpm durante 68 horas. Las células se recolectaron por centrifugación y se resuspendieron en 10 mL de agua. Los extractos de lípidos se obtuvieron como se describió anteriormente (Bligh y Dyer, 1959). Para la cuantificación de ácidos grasos, se agregaron 20 µg de ácido tridecanoico (C_{13:0}) a cada extracto lipídico como estándar interno. Después de secar cada muestra bajo una corriente de nitrógeno, se agregaron 300 µL de cloroformo-metanol (1:1 [v/v]), junto con 500 µL de reactivo de alquilación BF₃-metanol (Thermo Fisher Scientific). Después de 10 minutos de incubación a 60 °C, la reacción se detuvo con 1.5 mL de una solución 5 M de NaCl. Los ésteres metílicos resultantes se extrajeron dos veces con 1 mL de hexano cada vez, seguido de centrifugación. Las fases superiores de hexano se colectaron en un nuevo vial de vidrio y se secaron bajo una corriente de nitrógeno (Sahonero-Canavesi *et al.*, 2015).

Los ésteres metílicos de ácidos grasos secos se disolvieron en 150 µL de hexano y se utilizó 1 µL para el análisis GC/MS en un sistema de cromatografía de gases Clarus 600 acoplado a un instrumento Clarus 600T MS. La columna utilizada fue una Elite 5-MS de Perkin Elmer (longitud 30 m, ID 0.32 mm). Se utilizó hidrógeno como gas portador. El programa para la cromatografía de gases fue: 140 °C durante 6 minutos, luego un aumento de 4 °C por minuto hasta 250 °C y finalmente mantener 5 minutos a 250 °C. La temperatura del inyector fue 250 °C. Los diferentes tipos de ácidos grasos se identificaron mediante comparación con el estándar de mezcla de ésteres metílicos de ácidos bacterianos (BAME

47080-U, Sigma), utilizando tiempos de retención e información espectral de masas. Las cantidades de ésteres metílicos de ácidos grasos se calcularon comparando las áreas debajo de los picos en el cromatograma con el área debajo del pico del ácido tridecanoico utilizado como estándar interno (Sahonero-Canavesi *et al.*, 2015).

15. Análisis estadístico

Los datos se analizaron utilizando GraphPad Prism versión 8.2.0 para el software Windows. Se calcularon las medias y las desviaciones estándar. Las diferencias entre las medias se evaluaron mediante la prueba t múltiple proporcionada por el software GraphPad Prism. $p < 0.05$ se consideró estadísticamente significativo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Con la finalidad de exponer de manera clara y ordenada los resultados logrados, el presente apartado de Resultados y Discusión se ha dividido en dos partes, en concordancia con los dos aspectos de interés del presente proyecto y que tienen que ver con el metabolismo de ácidos grasos y su relación con la síntesis de PHAs: el estudio de la regulación del metabolismo de ácidos grasos y la sobreexpresión de genes estructurales de la vía de síntesis de ácidos grasos en *A. vinelandii*.

En la Parte I, se describirá la función que desempeña PsrA en la regulación del anabolismo de ácidos grasos insaturados en nuestro modelo de estudio. Por otro lado, la Parte II mostrará dos alternativas para la sobreexpresión de los genes que participan en la síntesis de ácidos grasos.

PARTE I: PAPEL DE PsrA EN LA REGULACIÓN DEL METABOLISMO DE ÁCIDOS GRASOS EN *A. vinelandii*

Debido a la relación entre la síntesis del copolímero PHBV y el metabolismo de ácidos grasos en *A. vinelandii*, y a que la regulación transcripcional de esta vía metabólica no había sido analizada, el hallazgo de la regulación de la síntesis de UFAs por PsrA se detalla a continuación.

1. Análisis bioinformático de genes del metabolismo de ácidos grasos en *A. vinelandii*

Como primer paso para comenzar el estudio del metabolismo de ácidos grasos y su regulación en *A. vinelandii*, se realizó un análisis bioinformático del genoma de la cepa DJ (una variante de la cepa OP) (Setubal *et al.*, 2009) para identificar genes que pudieran

codificar para la maquinaria enzimática encargada del metabolismo de ácidos grasos. A nivel de secuencia nucleotídica, se encontraron genes en *A. vinelandii* que comparten homología con los de *E. coli* K12 involucrados en la β -oxidación y en la síntesis de ácidos grasos (tablas suplementarias 1 y 2). No obstante, *A. vinelandii* presenta características distintivas, las que se discuten a continuación.

1.1 Genes relacionados con la degradación de ácidos grasos

El genoma de *A. vinelandii* posee los genes *fad* que codifican para la maquinaria enzimática responsable de la β -oxidación, desde el transporte, (*fadL*), activación (*fadD*) y oxidación (*fadE*, *fadB*, *fadA*) de los ácidos grasos (tabla suplementaria 1). En la figura 7A se ilustran dos de los *loci* más representativos de los genes de β -oxidación.

Un aspecto relevante es que existe reiteración génica para casi todos los genes de degradación, siendo *fadE* (acil-CoA deshidrogenasa) el que más genes parálogos presenta (se identificaron nueve parálogos). Este fenómeno es común en *A. vinelandii*, ya que su genoma presenta una alta frecuencia de genes parálogos, principalmente entre los genes que codifican para las enzimas involucradas en el metabolismo central del carbono. Al ser *A. vinelandii* una bacteria que habita en entornos de nutrientes escasos pero diversos, como el suelo, se plantea que la duplicación génica es importante para la adaptación en dichos ambientes, lo que puede conferir ventajas con respecto a la utilización de las fuentes de carbono disponibles (Mærk *et al.*, 2014). Del mismo modo, es muy posible que no todos los parálogos sean funcionales y/o se expresen al mismo tiempo, y que cada uno o en ciertas combinaciones, sean los que se expresen en una condición particular; sin embargo, se desconoce cuáles de ellos se expresan en proteínas funcionales.

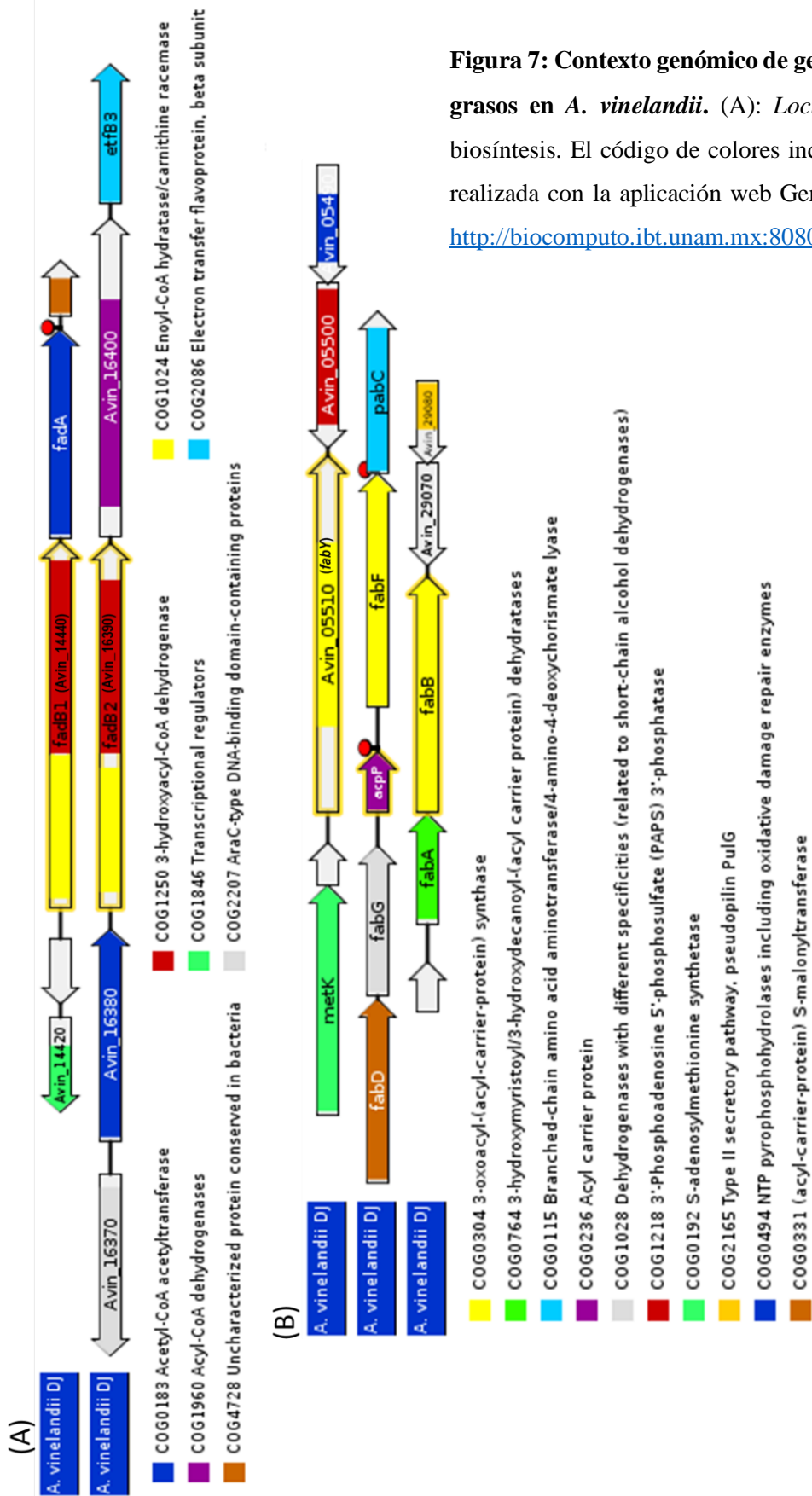


Figura 7: Contexto genómico de genes del metabolismo de ácidos grasos en *A. vinelandii*. (A): Loci de β -oxidación. (B): Loci de biosíntesis. El código de colores indica los diferentes COG. Figura realizada con la aplicación web Gene Context Tool, disponible en: <http://biocomputo.ibt.unam.mx:8080/GeConT/index.jsp>.

1.2 Genes de la síntesis de ácidos grasos

Como en el caso del catabolismo de ácidos grasos, *A. vinelandii* también posee todos los genes necesarios para llevar a cabo la síntesis de ácidos grasos, saturados e insaturados (tabla suplementaria 2). No obstante, contrario a los genes *fad*, la reiteración génica solo se presenta en uno de los genes de síntesis de ácidos grasos, *fabD* (malonil CoA-ACP transacilasa); el resto de los genes son únicos. En la figura 7B se ilustran los *loci* más representativos de los genes biosintéticos.

El aspecto más interesante en cuanto a la genética de la síntesis de ácidos grasos en *A. vinelandii*, es que carece de un homólogo de *fabH* (3-cetoacil-ACP sintasa III) de *E. coli*, que codifica para la enzima responsable de iniciar la síntesis de ácidos grasos, al catalizar la condensación de acetil-CoA con malonil-ACP; en cambio, contiene un homólogo a *fabY*, gen identificado en *P. aeruginosa* y que codifica para una sintasa tipo III alternativa (Yuan *et al.*, 2012).

Aunque hasta el momento las enzimas biosintéticas no han sido aisladas y/o caracterizadas, la identificación de los genes biosintéticos de ácidos grasos, junto con el perfil de ácidos grasos determinado previamente (Larsen *et al.*, 2005; véase el apartado 3.3), indican que las vías de síntesis de ácidos grasos saturados e insaturados, están presentes y activas en *A. vinelandii*.

2. Construcción y mutagénesis al azar de la cepa OP *pfabDG-gusA*

En la secuencia del genoma de *A. vinelandii*, los genes *fabD* y *fabG* están anotados como genes de síntesis de ácidos grasos (figura 7B). Con esta información, se realizó un análisis *in silico* usando FGENESH y BPROM, dos herramientas de predicción de operones y

promotores, respectivamente, del *software* Softberry (<http://www.softberry.com>) (Solovyev and Salamov, 2011). En dicho análisis se predijo que: a) *fabD* y *fabG* forman una sola unidad transcripcional, y b) que se transcriben a partir de un promotor dependiente de σ^{70} . Con base en estos resultados, y para facilitar el escrutinio de mutantes con alteraciones en la expresión genética de la síntesis de ácidos grasos, se construyó la cepa OP *pfabDG-gusA*, la cual contiene una fusión transcripcional del promotor de los genes *fabDG* al gen reportero *gusA*. Con esta cepa, se realizaron experimentos de mutagénesis al azar con el transposón *HimarI* contenido en el plásmido pHBurk3 (Rholl *et al.*, 2008).

Se eligieron tres mutantes que presentaron menor actividad β -glucuronidasa, con respecto a la cepa parental (figura 8) y se identificó el sitio de inserción del transposón, como se indica en Materiales y Métodos. El sitio de inserción y la orientación del transposón de las mutantes seleccionadas se resume en la tabla 4.

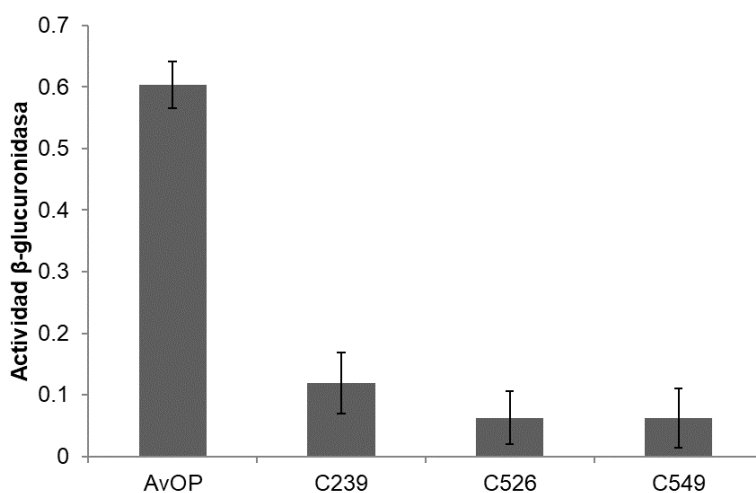


Figura 8: Actividad de β -glucuronidasa en la cepa OP *pfabDG-gusA* y en tres mutantes obtenidas mediante mutagénesis al azar. Una unidad de β -glucuronidasa corresponde a 1 nmol de sustrato (p-nitrofenil- β -D-glucurónido) hidrolizado por minuto por μ g de proteína. Los valores representan el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

Mutante	Gen	Producto	Sitio de inserción y orientación
C239	Avin12240	Transposasa putativa	Nucleótido 126; mismo sentido
C526	<i>topA</i> (Avin14470)	DNA topoisomerasa I	Nucleótido 1940; contrasentido
C549	Avin51430	Transportador de carbohidratos putativo	Nucleótido 840; contrasentido

Tabla 4: Análisis del sitio de inserción del transposón *HimarI* en las mutantes C239, C526 y C549.

Con respecto a las mutantes C239 y C459, es difícil definir cuál es el motivo de la disminución en la actividad β -glucuronidasa, pues la transposición no se llevó a cabo dentro de genes relacionados con el metabolismo de ácidos grasos ni genes con un posible papel regulador, por lo que se decidió no profundizar en su estudio.

El análisis de la mutante C526 reveló que tiene interrumpido el gen *topA* (Avin14470), que codifica para una DNA topoisomerasa I, y que el transposón se insertó en sentido contrario de su transcripción (figura 9). Es posible que una mutación en la DNA topoisomerasa I afecte no sólo la transcripción de los genes de síntesis de ácidos grasos, sino de muchos otros genes, simplemente por impedimentos topológicos provocados por cambios en el superenrollamiento del DNA. Revisando el contexto genético del gen *topA*, se puede observar que, aproximadamente 2000 pb río arriba respecto al sentido de la inserción del transposón, se encuentra el gen *psrA*.

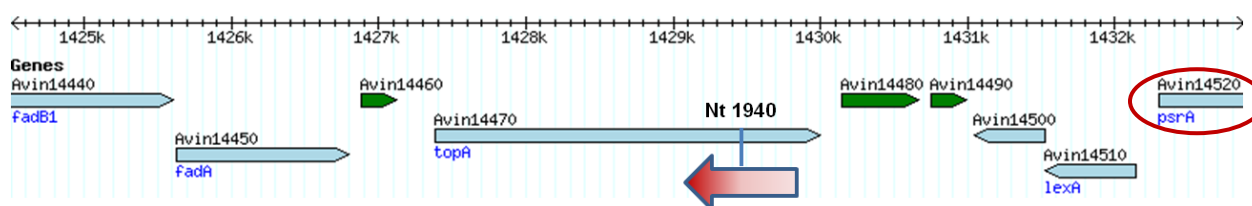


Figura 9: Ubicación y sentido de la inserción del transposón en la mutante C526. El transposón se esquematiza con una flecha roja y la locación de *psrA* se señala con un círculo rojo.

Como se comentó en el apartado 1.3.3, en *P. aeruginosa*, PsrA es un regulador que reprime la transcripción del operón *fadBA5*, involucrado en la β -oxidación (Kang *et al.*, 2008). Adicionalmente, un estudio de genómica comparativa realizado por Kazakov y colaboradores, propuso que una red de regulación de la degradación de ácidos grasos alternativa a FadR, es aquella que se lleva a cabo por PsrA en grupos de gammaproteobacterias, como las Pseudomonadales, así como en varios grupos de beta y alfaproteobacterias. Mediante herramientas bioinformáticas, como la detección de motivos de unión DNA-proteína y la predicción de regulones, se predijo la existencia de posibles secuencias de unión a PsrA en genes involucrados en la degradación de ácidos grasos, lo que permitió concluir que PsrA podría regular dicho proceso catabólico, principalmente en especies de los géneros *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Shewanella* y algunas del género *Vibrio* (Kazakov *et al.*, 2009).

Aunque la inserción del transposón se encuentra lejana de *psrA*, y parecería improbable que dicha inserción afecte su expresión, se sabe que PsrA regula la síntesis de lípidos ARs y la formación de quistes resistentes a la desecación en *A. vinelandii* (Cocotl-Yañez *et al.*, 2011) y tomando en cuenta que la β -oxidación está involucrada en la síntesis de PHAs, se decidió investigar si este regulador está relacionado con la expresión de genes de metabolismo de ácidos grasos.

3. Expresión de los genes de la β -oxidación *fadA* y *fadB2* en una mutante en *psrA*

PsrA de *P. aeruginosa* reprime de manera directa al operón *fadBA5* de la β -oxidación; esta represión se abate en presencia de ácidos grasos de cadena larga. Una mutación en *psrA* conlleva a una expresión constitutiva de *fadBA5*, no importando el medio de cultivo ni la ausencia o presencia de oleato (C_{18:1}) como fuente de carbono (Kang *et al.*, 2008).

Para determinar si en *A. vinelandii* sucedía un efecto similar sobre los genes de la β -oxidación, se construyó la mutante PA6psrA, la cual tiene un *casete* de resistencia a kanamicina insertado en el gen *psrA* de la cepa silvestre OP. Mediante RT-qPCR, se midieron los niveles de expresión de los genes de β -oxidación *fadA* y *fadB2*, en las cepas OP y su mutante PA6psrA, a partir de RNA extraído de cultivos crecidos en medio líquido BS durante 18, 24 y 40 horas, como se describe en Materiales y Métodos.

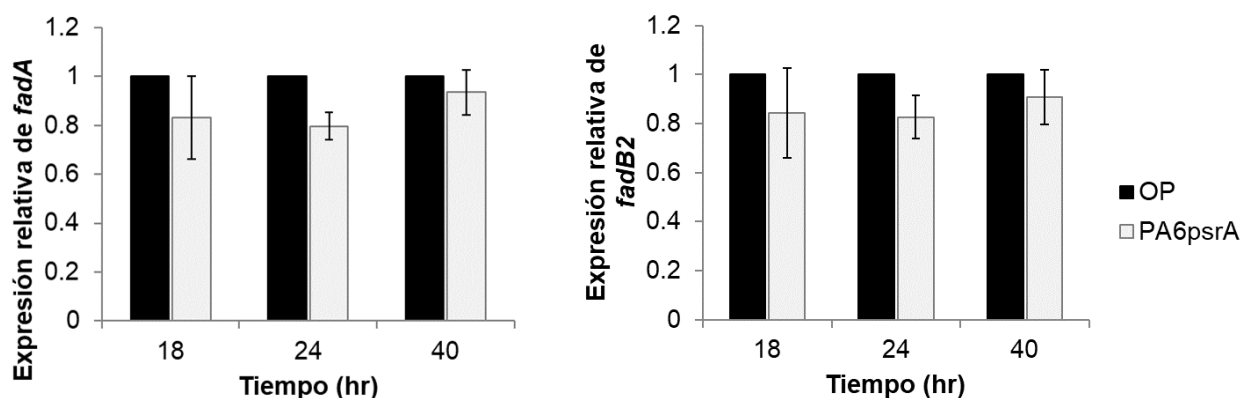


Figura 10: Expresión relativa de los genes *fadA* y *fadB2* en la cepa silvestre OP y en la mutante PA6psrA. Los niveles de mRNA de los genes de degradación de ácidos grasos en la mutante PA6psrA son relativos a los de la cepa silvestre OP (que se consideran con un valor de 1.0). Los valores representan el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

En contraste con lo reportado en *Pseudomonas*, los niveles de expresión de *fadA* y *fadB2* no presentaron cambios significativos en la cepa mutante PA6psrA, al compararlos con la cepa silvestre OP de *A. vinelandii* (figura 10).

Si bien *P. aeruginosa* y *A. vinelandii* son bacterias filogenéticamente relacionadas (ambas pertenecen a la familia Pseudomonadaceae), existen diferencias metabólicas importantes entre estas especies. Mientras que *P. aeruginosa* puede usar ácidos grasos de

cadena larga como fuente de carbono, éstos no pueden ser asimilados por *A. vinelandii*. Es posible que la incapacidad de *A. vinelandii* de asimilar ácidos grasos de cadena larga sea el reflejo de que la regulación de la β -oxidación sea diferente a la de *P. aeruginosa*. En *A. vinelandii*, el gen putativo Avin34900, codificaría para una proteína 23% idéntica y 41% similar a FadL de *E. coli* O157:H7, la proteína de membrana externa que transporta ácidos grasos de cadena larga; no obstante, se desconoce si este gen se expresa o se traduce en una proteína funcional, o bien, posiblemente su producto transporte ácidos grasos de cadena corta o media, puesto que *A. vinelandii* sólo puede incorporar ácidos grasos de hasta ocho carbonos de longitud (Garrity *et al.*, 2005).

4. Efecto de la mutación en *psrA* en la expresión de genes de la síntesis de ácidos grasos

Aunque PsrA está descrito como un regulador de la degradación de ácidos grasos, también se cuantificaron los niveles de transcripción de los genes de síntesis de ácidos grasos *fabA*, *fabY* y *fabD*. El RNA total de ambas cepas, silvestre OP y mutante PA6*psrA*, fue extraído de cultivos crecidos en medio líquido BS durante 18, 24 y 40 horas.

Los resultados mostraron que en la mutante PA6*psrA*, se reduce la expresión de los genes *fabA* y *fabY* durante la fase estacionaria del crecimiento (a partir de las 24 horas), no así la del gen *fabD* (figura 11). De hecho, como se discute más adelante, la región promotora del gen *fabA* contiene un sitio putativo de unión a PsrA, que no está presente en las regiones reguladoras de *fabY* y *fabD*. Por esta razón se profundizó en el estudio de la regulación del gen *fabA*.

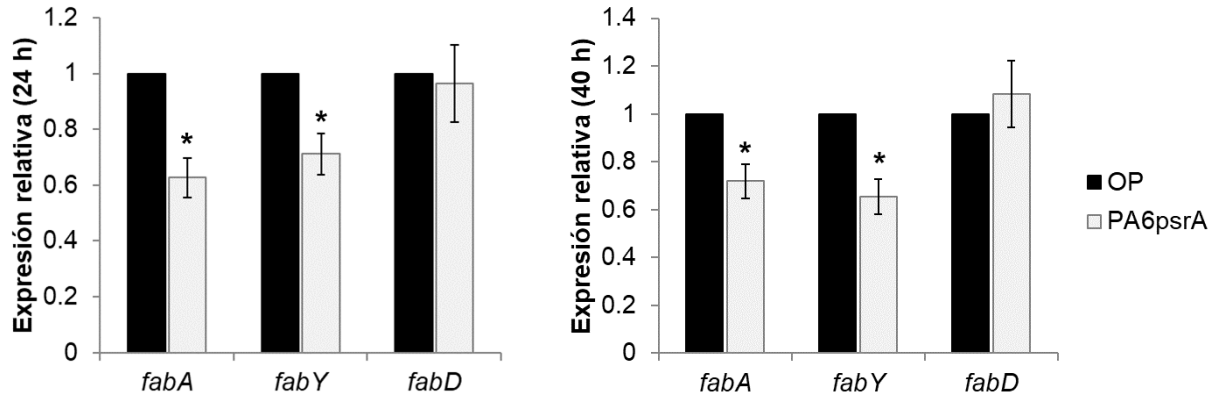


Figura 11: Expresión relativa de los genes *fabA*, *fabY* y *fabD* en la cepa silvestre OP y en la mutante PA6psrA en fase estacionaria de crecimiento. Los niveles de mRNA de los genes de síntesis de ácidos grasos en la mutante PA6psrA son relativos a los de la cepa silvestre OP (que se consideran con un valor de 1.0). Los valores representan el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes. * Significativo en $p < 0.05$.

Para comprobar el efecto de la mutación en *psrA* sobre la transcripción de *fabA*, se fusionó su región promotora al gen reportero *gusA*. Esta fusión transcripcional se integró ectópicamente en el locus *mela* del cromosoma de *A. vinelandii*, tanto en la cepa silvestre OP, como en la mutante PA6psrA, dando lugar a las cepas OP7gusA y PA626gusA. Con estas cepas se realizaron ensayos de β -glucuronidasa, a partir de muestras obtenidas a diferentes tiempos de cultivo (figura 12). Durante la fase exponencial (datos no mostrados) y hasta la fase estacionaria temprana (24 horas de cultivo), no se observaron diferencias significativas en la expresión de *fabA* entre ambas cepas; sin embargo, durante la fase estacionaria (a partir de las 40 horas), se observó que la transcripción de *fabA* presentó una expresión 50% menor en la cepa mutante en *psrA* (figura 12).

Debido a que PsrA es un regulador positivo de la transcripción de *rpoS* en *A. vinelandii* (Cocotl-Yañez *et al.*, 2011), el cual codifica para el factor sigma de fase

estacionaria, el efecto observado en la expresión de *fabA* en la mutante en *psrA* durante esta fase de crecimiento podría ejercerse mediante el control de RpoS. Para determinar si ese es el caso, se construyó la mutante en el gen *rpoS*, transformando DNA genómico de la cepa JGW-2 (Peralta-Gil *et al.*, 2002), una mutante en *rpoS* por inserción construida previamente en un fondo genético diferente al de este trabajo. Se seleccionó una transformante de la cepa OP con la inactivación de *rpoS*, y se le integró la fusión transcripcional *fabA-gusA*. A esta cepa se le denominó S66gusA.

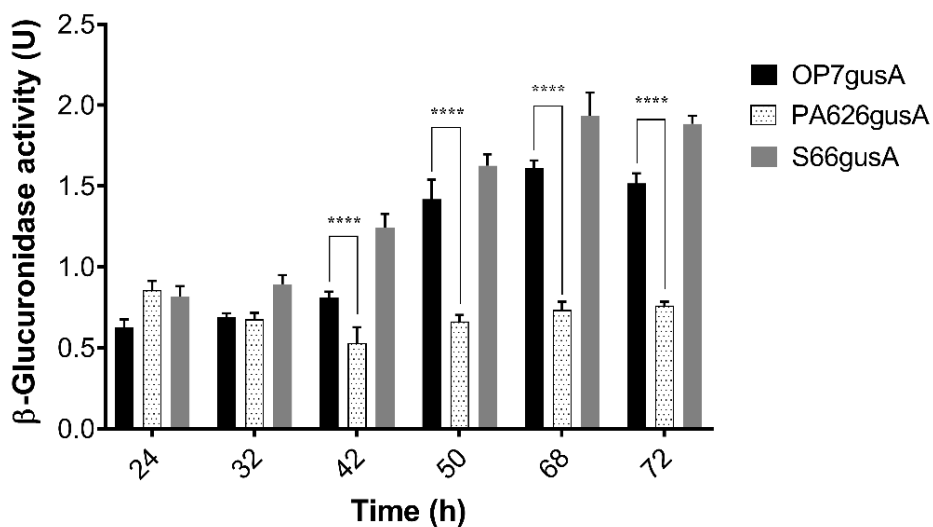


Figura 12: Actividad de β -glucuronidasa de la fusión *fabA-gusA* en la cepa OP7gusA, PA626gusA y S66gusA. Las células fueron obtenidas de cultivos en medio BS líquido a diferentes horas de crecimiento. Una unidad de β -glucuronidasa corresponde a 1nmol de sustrato (p-nitrofenil- β -D-glucurónido) hidrolizado por minuto por μ g de proteína. Los valores representan el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes. Se indica la significancia estadística (**** $p < 0.0001$).

Los resultados de los ensayos de β -glucuronidasa (figura 12) muestran que la expresión de *fabA* no está afectada en la mutante en *rpoS*, lo que demuestra que la regulación de PsaA sobre *fabA* no es a través de RpoS.

5. Caracterización de la región reguladora de los genes *fabA* y *fabB*

Los genes *fabA* y *fabB* están anotados en la secuencia del genoma de *A. vinelandii* como los genes de síntesis de UFAs, que codifican para las enzimas 3-hidroxicodecanoil-ACP deshidratasa/isomerasa y 3-cetoacil- ACP sintasa I (figura 7B). Con la secuencia de este locus, se realizó un análisis *in silico* usando las herramientas de predicción FGENESH y BPPROM del software Softberry (Solovyev and Salamov, 2011). En dicho análisis se predijo que: a) *fabA* y *fabB* forman una sola unidad transcripcional, lo cual se confirmó mediante análisis por PCR tiempo final, como se indica en Materiales y Métodos (datos no mostrados) y b) que se transcriben a partir de un promotor dependiente de σ^{70} , cuyo inicio de transcripción se localizó 196 nucleótidos río arriba del codón de inicio ATG de *fabA*, mediante un experimento de extensión del iniciador. Sus secuencias promotoras -10 y -35 (TTCCTC-N12-TGGTAGACT) corresponden con un promotor dependiente σ^{70} , lo que concuerda con la predicción *in silico* (figura 13).

El sitio de unión consenso de PsaA (C/GAAACN2-4GTTTG/C) se ha determinado en *Pseudomonas* spp. (Kojic *et al.*, 2005), el cual fue identificado en la región reguladora de *rpoS* de *A. vinelandii* (Cocotl-Yañez *et al.*, 2011). Aunque no se identificó una secuencia consenso para la unión de PsaA en la región reguladora del operón *fabAB* de *A. vinelandii*, 34 nucleótidos río arriba de la región promotora previamente identificada, se encontró la secuencia GAAAC (figura 13B). Esta secuencia es similar al sitio de unión de PsaA

(CAAAG) propuesto para la represión de su propia expresión en *A. vinelandii* (Cocotl-Yanez *et al.*, 2011). Las regiones reguladoras de *fabY* y *fabD* carecen de este tipo de secuencias.

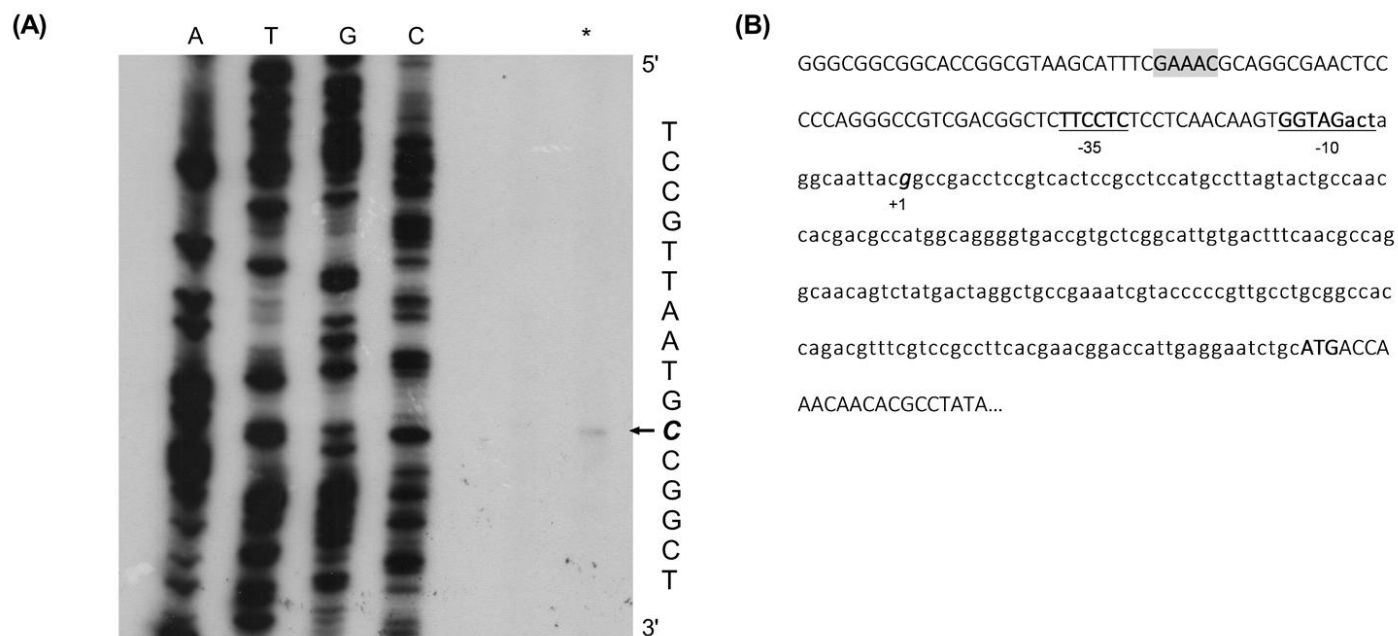


Figura 13: Identificación del sitio de inicio de la transcripción del operón *fabAB*. (A): Autorradiografía del análisis de extensión del iniciador. (B): Secuencia de la región promotora del operón *fabAB*, se indican: el codón de inicio de la traducción de *fabA* (negritas, mayúsculas), el sitio de inicio de la transcripción +1 (negritas, cursivas, minúsculas), las secuencias -10 y -35 del promotor dependiente de σ^{70} (subrayado, mayúsculas); el sitio putativo de unión a PsrA (caja gris, mayúsculas).

Para analizar la interacción de PsrA con el posible sitio de unión encontrado en la región promotora de *fabAB*, se realizó un análisis de cambio en la movilidad electroforética (EMSA). Por un lado, para la expresión de la proteína PsrA, se partió de un vector de expresión construido previamente (Cocotl-Yañez *et al.*, 2011). Brevemente, el gen *psrA* se clonó bajo el control de un promotor inducible con arabinosa, y se etiquetó el extremo carboxilo terminal con una secuencia que añade seis histidinas, para facilitar su purificación

mediante cromatografía de afinidad. La proteína, de un peso aproximado de 29 kDa, fue expresada, purificada y concentrada para su uso posterior. Por otro lado, para obtener el fragmento de DNA del operón *fabAB*, al cual se propone que se une P_{srA}, se diseñaron oligonucleótidos que amplifican un fragmento de 244 pb, que corresponde a la región promotora de *fabAB*, el cual se marcó radiactivamente usando dCTP [α -³²P]. El fragmento obtenido fue purificado y ambos, la proteína y el DNA, fueron cuantificados.

Se realizaron los análisis tipo EMSA usando 100 ng de DNA marcado radiactivamente, y concentraciones crecientes de la proteína P_{srA}-His purificada en el rango de 0 a 4 μ M. En la figura 14B, se puede observar que existe un cambio en la movilidad electroforética del fragmento de DNA usado, con lo que se concluye que la proteína P_{srA} se une a la región promotora de los genes *fabAB*, a partir de una concentración de 0.2 μ M.

Para demostrar la especificidad de la interacción, se realizaron dos tipos de ensayos de competencia. En el primero, se usó un DNA inespecífico, que consistió en un fragmento de 100 pb de la región estructural del gen *fabY*. Como ya se había observado, la región promotora de *fabAB* y P_{srA} se unen para formar complejos DNA-proteína, mientras que el control negativo no es capaz de hacerlo (figura 14C). En el segundo ensayo, se usó el mismo fragmento *fabAB* de 244 pb marcado radiactivamente (DNA caliente) y sin marcar (DNA frío), con concentraciones crecientes de este último, y con una concentración fija de proteína (3 μ M). Al aumentar la concentración de DNA frío, hay una competencia por la proteína y el retardo deja de ser visible (figura 14D).

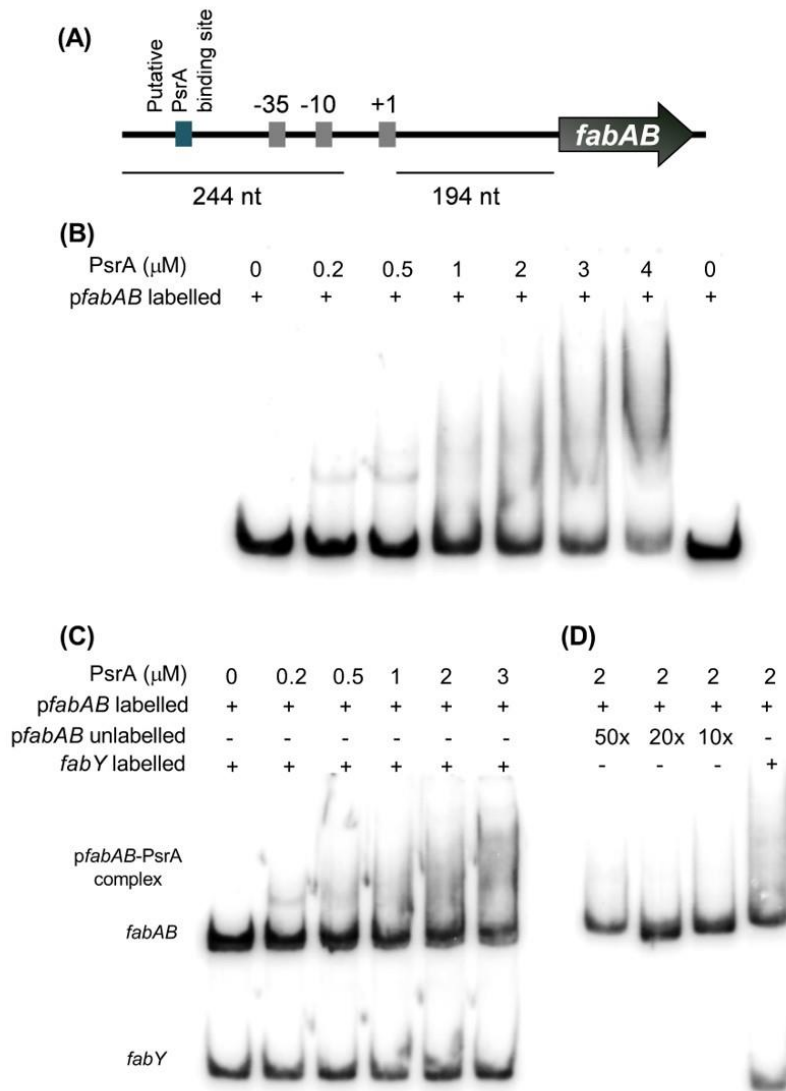


Figura 14: Análisis tipo EMSA de la región promotora de *fabAB* y PsrA. (A): Representación esquemática de la región promotora de *fabAB*. Se indica el fragmento de DNA de 244 nucleótidos (nt) utilizado como sonda. (B) Autorradiografía del análisis tipo EMSA de la región reguladora de *fabAB* con PsrA: se usaron cantidades crecientes de PsrA-His₆ purificada y 100 nM del fragmento *fabAB* marcado radiactivamente. (C): Ensayos de competencia con un fragmento inespecífico (*fabY*). (D): Competencia con un exceso del fragmento *fabAB* sin marcar.

Esta interacción entre PsrA y la región promotora de *fabAB* concuerda con el papel putativo de dicha proteína como regulador positivo directo de la expresión del operón

biosintético de UFAs. Del mismo modo, la ausencia de un sitio de unión para PsrA en la región reguladora de *fabD* coincide con el efecto nulo en su expresión en el fondo de la mutante en *psrA*. Para *fabY*, es posible que la disminución en su expresión se deba a una regulación indirecta, ya sea por RpoS u otro elemento regulador, pero este mecanismo aún no se ha dilucidado.

6. Análisis de la producción de lípidos totales y ácidos grasos en la mutante en *psrA*

Ya que la evidencia genética indicaba que la expresión del operón *fabAB* se afecta en una mutante en *psrA*, se determinó si esta disminución en la expresión tenía un efecto sobre la biosíntesis de ácidos grasos en *A. vinelandii*. Para ello, se realizó un análisis cualitativo de lípidos totales de las cepas OP y PA6*psrA*. Los lípidos totales de células cultivadas durante 40 horas en medio BS se obtuvieron mediante la técnica descrita por Bligh y Dyer (1959); posteriormente, se resolvieron mediante cromatografía en capa fina (TLC) de dos dimensiones, en una placa de sílica revelada con yodo (figura 15). Este análisis mostró algunas variaciones con respecto a los fosfolípidos de membrana, pero la diferencia más significativa fue la reducción de una mancha cuyo corrimiento parecía coincidir con ácidos grasos en la mutante *psrA*, sugiriendo que la ausencia de PsrA impacta negativamente en la biosíntesis de ácidos grasos.

Para investigar más a fondo el efecto de la inactivación de *psrA* sobre el contenido de ácidos grasos, se analizaron extractos de lípidos de cultivos de 40 y 68 horas de cepas OP y PA6*psrA* mediante TLC de una dimensión (figura 16), con una fase móvil que permite la separación de lípidos polares de no polares compuesta por acetato de etilo/hexano/ácido acético (60:40:5) (Pech-Canul *et al.*, 2011). Los ácidos esteárico y oleico (C₁₈ saturado e insaturado, respectivamente) se utilizaron como estándares de ácidos grasos. Debido a que el

yodo tiene una alta afinidad por los compuestos insaturados y aromáticos (Zbierzak *et al.*, 2011), las placas se tiñeron primero con yodo, para revelar la presencia de lípidos insaturados, y luego con ANS (ácido 8-anilino-1-naftaleno sulfónico), un reactivo que permite observar otras moléculas hidrofóbicas, tanto saturadas como insaturadas. Como se esperaba, el estándar de ácido oleico se tiñó con yodo, no así el estándar de ácido esteárico. Ambos fueron visibles con ANS. Las manchas que corren aparentemente como ácidos grasos insaturados (comparadas con los estándares) se aprecian disminuidas en la mutante PA6psrA, tanto a las 40 como a las 68 horas y las principales diferencias observadas entre la cepa silvestre y la mutante PA6psrA fueron las observadas con tinción de yodo, que evidencia principalmente compuestos con insaturaciones (figura 16A y 16C).

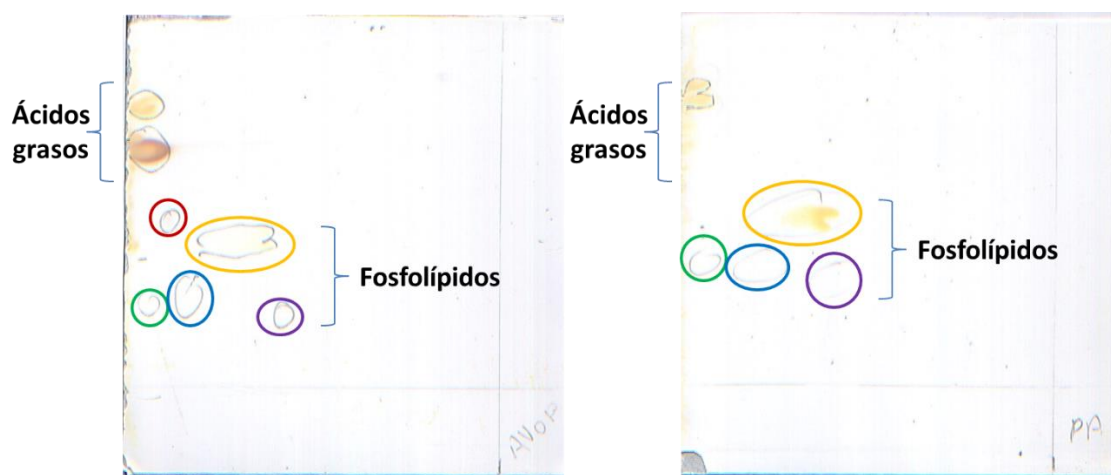


Figura 15: Perfil de lípidos totales de la cepa silvestre OP (izquierda) y mutante PA6psrA (derecha). Los lípidos se resolvieron mediante TLC de dos dimensiones, como se especifica en Materiales y Métodos. Las placas fueron reveladas con yodo y comparadas entre sí. Los círculos de color representan: rojo, fosfatidilinositol; amarillo, fosfatidiletanolamina; verde, cardiolipina; azul, fosfatidilglicerol; morado, fosfatidilserina.

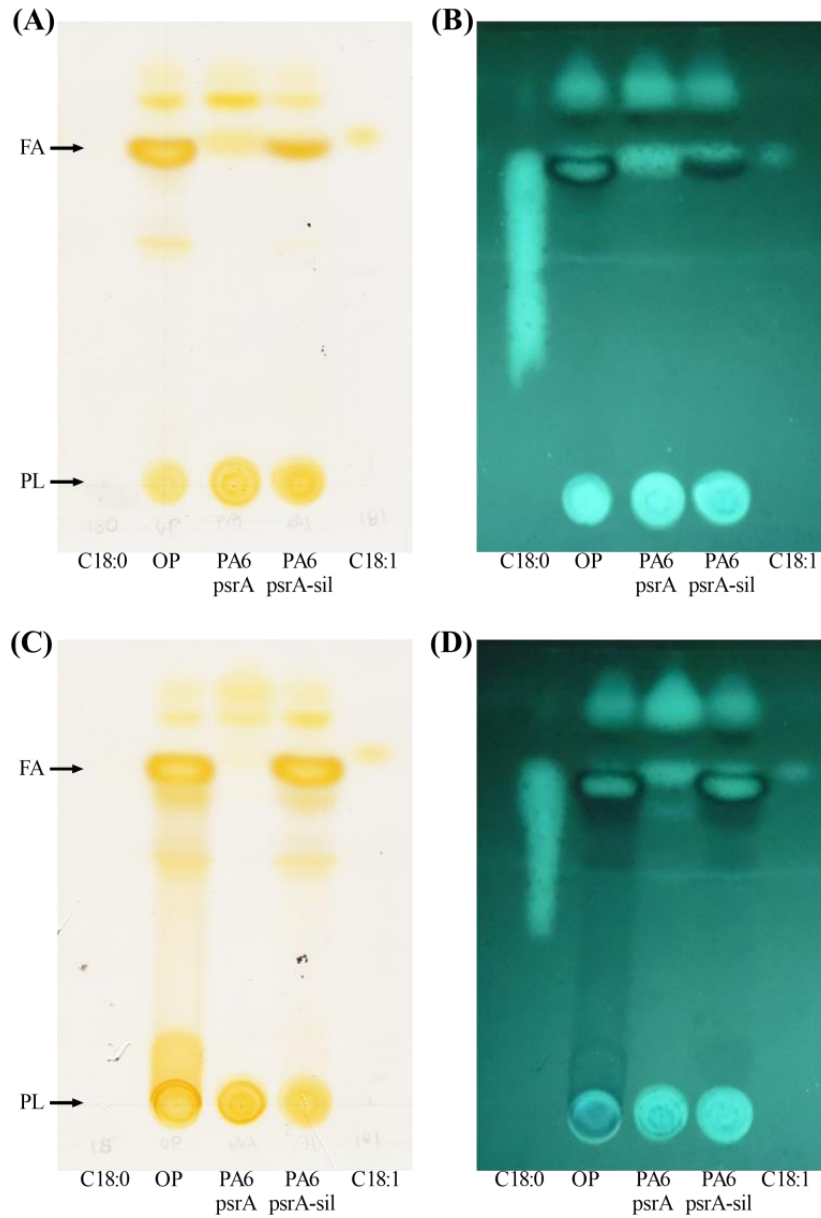


Figura 16: Análisis cromatográfico de lípidos totales polares y no polares de las cepas silvestre OP, mutante PA6psrA y complementada PA1psrA-sil. Los lípidos se extrajeron de células cultivadas en BS durante 40 (A, B) y 68 horas (C, D) y se separaron por TLC de una dimensión. Las placas fueron reveladas con yodo (A, C) como primera tinción y ANS (B, D) como segunda tinción. Los ácidos esteárico (C_{18:0}) y oleico (C_{18:1}) se utilizaron como estándares de ácidos grasos saturados e insaturados. Los fosfolípidos de membrana (PL) permanecen en el origen, mientras que los ácidos grasos (FA) migran al frente de la placa.

Para demostrar que las diferencias observadas entre la cepa silvestre OP y la mutante PA6psrA se deben a la inactivación de *psrA*, la mutante fue complementada cointegrando en el cromosoma un plásmido que contiene el alelo *psrA* silvestre. El análisis por TLC de los lípidos producidos por esta cepa, denominada PA6psrA-sil, mostró un restablecimiento del perfil lipídico observado en la cepa silvestre (figura 16), lo que indica que las diferencias observadas se deben a la ausencia de *psrA*.

La tinción con yodo manifestó una reducción de compuestos que migran como UFAs relacionada con la ausencia de *psrA*. Asimismo, los datos obtenidos de la expresión relativa (figura 11) y de las actividades de β -glucuronidasa (figura 12), sugieren que podría tratarse de UFAs, puesto que los niveles de transcripción de los genes *fabAB* disminuyen en ausencia de *PsrA*. Tomando en cuenta estos resultados, se continuó con un análisis más detallado del contenido de UFAs.

7. Análisis mediante cromatografía de gases/espectrometría de masas de los ácidos grasos totales en la mutante en *psrA*

Para corroborar cuantitativamente las diferencias en el contenido de UFAs observadas en TLC, se analizaron mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC/MS) los ácidos grasos contenidos en extractos de lípidos obtenidos a las 68 horas de las diferentes cepas, los cuales fueron comparados contra una mezcla de ésteres metilados de ácidos grasos (FAMEs) como estándares. Como se muestra en la figura 17, los UFAs detectados fueron los ácidos palmitoleico (C_{16:1}) y oleico (C_{18:1}). Las cantidades de estos UFAs C_{16:1} y C_{18:1} fueron menores en la mutante PA6psrA con respecto a la cepa silvestre. La cepa complementada PA1psrA-sil mostró un restablecimiento parcial del contenido de UFAs.

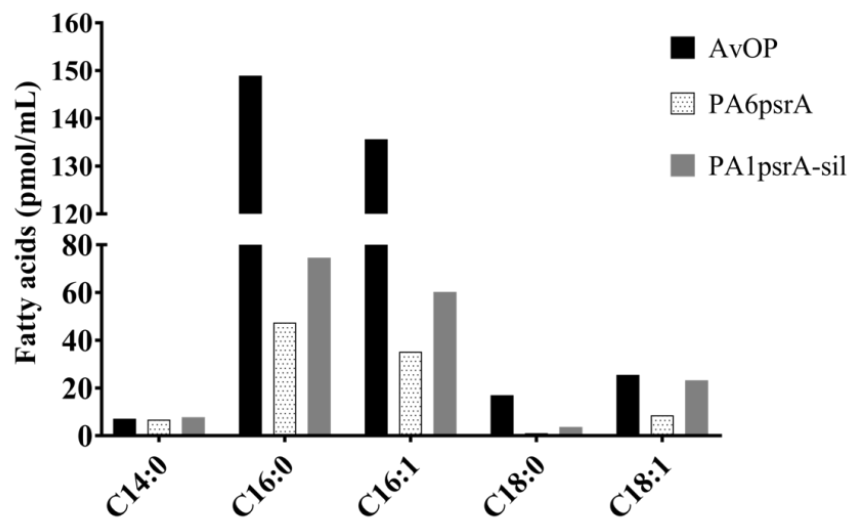


Figura 17. Perfil de ácidos grasos determinado por GC/MS a partir de extractos lipídicos de la cepa OP, PA6psrA y PA1psrA-sil. Los lípidos se extrajeron de células cultivadas en BS líquido durante 68 horas. Los valores representan el promedio de dos experimentos independientes.

Además de los ácidos grasos, el análisis de espectrometría de masas también mostró la presencia de CFA C_{17:0} y C_{19:0} en los extractos lipídicos. Como se discutió en el apartado 1.2.1, los CFA se sintetizan a partir de UFAs (figura 3). El ácido graso ciclopropano C_{17:0} se sintetiza a partir de C_{16:1} y el C_{19:0} a partir de C_{18:1}. Una estimación del porcentaje de estos ácidos grasos modificados en los extractos, calculados a partir de las áreas bajo la curva obtenidas (Total CFA, tabla 5), mostró que representan 23.68% del total de ácidos grasos presentes en la cepa OP, mientras que sólo fueron el 0.68% en la mutante PA6psrA. Debido a su origen biosintético, la aparición de CFA en otras bacterias coincide con una disminución en el contenido de UFAs (Grogan y Cronan, 1997). Por lo tanto, la disminución del contenido de CFA en la mutante *psrA* concuerda con un menor contenido de los UFAs precursores.

Como se esperaba, la síntesis de estos lípidos fue parcialmente restaurada (hasta casi 5%) en la cepa complementada PA1psrA-sil.

El análisis general del contenido de UFAs más sus derivados biosintéticos CFA (Total UFA + CFA, tabla 5) respecto a la cantidad total de ácidos grasos, mostró una disminución de UFAs en la mutante PA6psrA. En la cepa silvestre OP, los UFAs más sus derivados CFA correspondieron al 60.48% del total, mientras que en la mutante PA6psrA el porcentaje disminuyó al 44.61%. La cepa complementada PA1psrA-sil mostró nuevamente un restablecimiento parcial del contenido de UFAs más CFA, alcanzando un 51.96%. Estos resultados confirmaron los observados mediante TLC y coinciden con el efecto negativo observado en la expresión de *fabAB* en la mutante *psrA*, así como con la unión de P_{psrA} a la región reguladora de este operón.

Cepa	Porcentaje del total de ácidos grasos saturados (SFA), insaturados (UFA) y ciclopropano (CFA)								Total UFA + CFA
	SFA			UFA		CFA		Total CFA	
	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{16:1}	C _{18:1}	C _{17:0}	C _{19:0}		
OP	1.63	34.02	3.87	30.98	5.82	16.43	7.25	23.68	60.48
PA6psrA	6.76	47.57	1.06	35.34	8.59	0.45	0.23	0.68	44.61
PA1psrA-sil	4.36	41.91	2.04	33.86	13.06	2.46	2.31	4.77	51.69

Tabla 5. Porcentaje de ácidos grasos totales (saturados, insaturados y ciclopropano) en extractos lipídicos de las cepas OP, mutante PA6psrA y complementada PA1psrA-sil.

En bacterias productoras de CFA, su síntesis ocurre durante la fase de crecimiento exponencial tardía o estacionaria (Grogan y Cronan, 1997). La presencia de CFA en *A. vinelandii* fue reportada por primera vez por Su *et al.* (1979), como parte de los grupos acilo en los fosfolípidos encontrados en quistes, pero no en células vegetativas que crecen exponencialmente. Posteriormente, Reusch y Sadoff (1983) mostraron su presencia en células envejecidas cultivadas con glucosa. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran la presencia de CFA durante la fase estacionaria en *A. vinelandii*, y que la inactivación de *psrA* tiene un efecto negativo sobre la cantidad de estos lípidos (tabla 5). Este efecto posiblemente se debe a la disminución del contenido de los UFAs precursores, aunque no se descarta que *PsrA* regule directa o indirectamente la síntesis de CFA.

De igual manera, se detectó un menor contenido de SFAs en la mutante en *psrA* (figura 17), lo que sugiere que *PsrA* ejerce un efecto regulador adicional (directo o indirecto) sobre otros genes biosintéticos de ácidos grasos, lo que concuerda con el efecto negativo observado sobre la expresión de *fabY* (figura 11). Sin embargo, la disminución en la expresión de *fabY* también podría deberse a un efecto de regulación indirecto por *RpoS* u otro elemento regulador, pero este mecanismo aún se desconoce.

8. Efecto de la mutación en *psrA* sobre el crecimiento y la viabilidad celular

En el apartado 1.2.2 se comentó que en *P. aeruginosa* la síntesis de UFAs ocurre mayoritariamente en condiciones de estrés, como estrés osmótico, exposición a solventes o bajas temperaturas (Kondakova *et al.*, 2015). En otras bacterias, esta síntesis también se incrementa durante la fase estacionaria de crecimiento. En el caso de *Bacillus subtilis*, se ha demostrado que la síntesis de UFAs es importante para la supervivencia durante el crecimiento prolongado, ya que una mutación que altera esta vía metabólica mostró

problemas para la supervivencia durante el crecimiento prolongado, es decir, más allá de la fase estacionaria de crecimiento (Aguilar *et al.*, 1998). En cuanto a los CFA, su síntesis también ocurre cuando las bacterias están expuestas a condiciones ambientales adversas (Grogan and Cronan, 1997; Kim *et al.*, 2005) y su presencia se ha asociado con tolerancia a alta presión osmótica, altas temperaturas, pH ácido y privación de nutrientes (Poger y Mark, 2015).

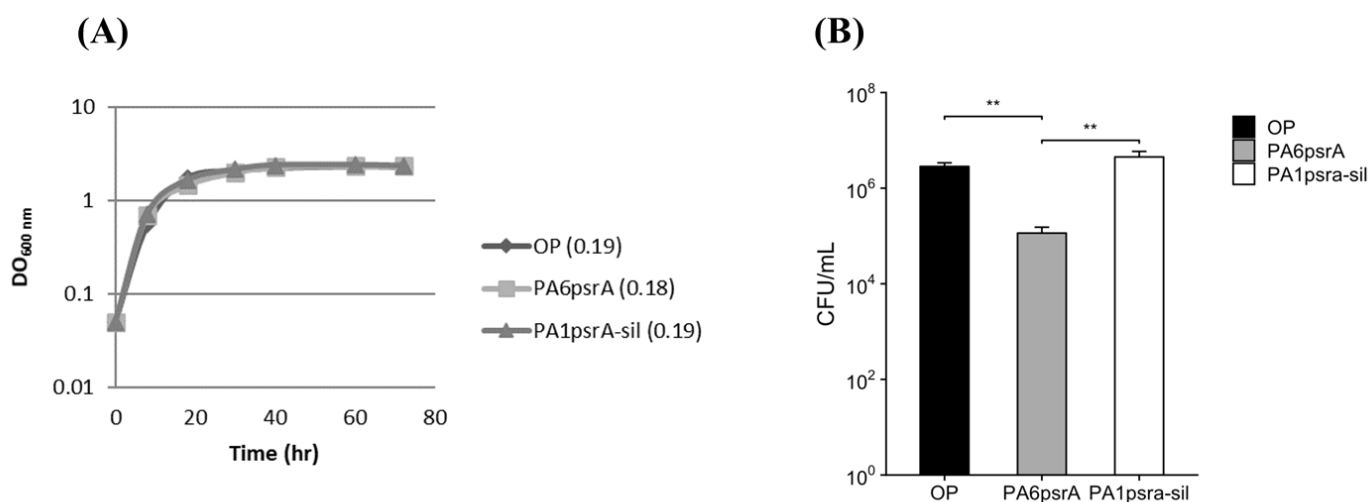


Figura 18. La interrupción de *psrA* reduce la supervivencia en la fase de crecimiento estacionario tardío de *A. vinelandii*. (A): Curva de crecimiento de las cepas OP, mutante PA6psrA y complementada PA1psrA-sil durante 72 horas. El número entre paréntesis indica el valor de μ (h^{-1}). (B): Número de células viables (CFU) de las tres cepas después de 5 días. Se muestran las barras de desviación estándar de tres experimentos independientes. Se indica la significancia estadística (** $p < 0.01$).

Para evaluar si la mutante en *psrA* presentaba alteraciones en la velocidad de crecimiento o la viabilidad celular, la cepa silvestre OP, mutante PA6psrA y complementada PA1psrA-sil, se cultivaron en medio BS a 30 °C durante 72 horas. En estas condiciones, todas las cepas mostraron un crecimiento similar, como se muestra en la figura 18A. No

obstante, durante el crecimiento prolongado, la ausencia de P_{sr}A afectó la viabilidad celular: cinco días después de que la mutante en *psrA* entrara en la fase estacionaria de crecimiento, su viabilidad disminuyó considerablemente, en comparación con la cepa silvestre. Como se esperaba, la viabilidad celular en la cepa complementada presentó valores similares a los alcanzados por la cepa silvestre (figura 18B).

Este resultado concuerda con el papel putativo que tienen los UFAs, y probablemente también los CFA, en la modificación de las propiedades de la membrana celular para mejorar la supervivencia de *A. vinelandii* más allá de la fase estacionaria de crecimiento (como en *B. subtilis*). Asimismo, hay una concordancia con el aumento de la expresión de *fabAB* observado en la cepa silvestre OP durante la fase estacionaria de crecimiento (figuras 11 y 12) y con un aumento en el contenido de C_{16:1} en *A. vinelandii* a medida que el cultivo envejece (Larsen *et al.*, 2005).

PARTE II: ESTRATEGIAS PARA SOBREPDUCCIÓN DE ÁCIDOS GRASOS

Con el propósito de aumentar la síntesis de ácidos grasos en cepas heterólogas productoras de copolímeros de PHAs, se propuso la modificación de esta vía anabólica mediante la sobreexpresión de genes estructurales de la vía de síntesis, aspecto que se detalla en adelante.

1. Sobreexpresión de genes estructurales de la síntesis de ácidos grasos de *A. vinelandii*

Se ha reportado que en cepas de *E. coli* productoras de PHAs, la sobreexpresión de genes de la vía de síntesis de ácidos grasos, como *fabH* (3-cetoacil sintasa III) y *fabG* (3-cetoacil-ACP reductasa), incrementa las pozas de precursores para la síntesis de PHAs; en particular, la sobreexpresión de *fabG* promueve la síntesis y acumulación de mcl-PHAs (Handke *et al.*, 2011). De este modo, es posible que una sobreexpresión de dichos genes en *A. vinelandii* pueda proveer de intermediarios necesarios para la biosíntesis de PHAs, sin comprometer la síntesis *de novo* de ácidos grasos.

Considerando lo anterior, se construyeron dos plásmidos: pUMA-DGF y pUMA-Y. El primero de ellos abarca las regiones estructurales y reguladoras putativas de los genes *fabD*, *fabG*, *acpP* y *fabF*, pues todos ellos forman parte de la vía de síntesis y se agrupan en una misma región del cromosoma (figura 7B). El segundo plásmido contiene la región estructural y reguladora putativa del gen *fabY*. Estos plásmidos fueron diseñados para permitir su integración al cromosoma de *A. vinelandii*, mediante recombinación homóloga en el gen *mclA*, dando origen a las cepas DGF3 (el modelo de sobreexpresión de los genes *fabD*, *fabG*, *acpP* y *fabF*) y Y2 (el modelo de sobreexpresión del gen *fabY*). Aunque las construcciones integradas en estas cepas no son inducibles, se propone que la presencia de

una copia extra de los genes blanco de interés, favorezca una mayor síntesis de ácidos grasos por incremento de dosis génica.

Con el fin de determinar si las cepas DGF3 y Y2 presentan variaciones en cuanto a su capacidad de crecimiento, se realizó una curva de crecimiento de ambas cepas, incluyendo también a la cepa parental OP. Bajo las condiciones de cultivo utilizadas (matraces Erlenmeyer de 250 mL con 50 mL de medio BS líquido, incubadas a 30 °C y en agitación constante a 200 rpm; ver Materiales y Métodos), las cepas DGF3 y Y2 presentan una velocidad de crecimiento menor en comparación con la cepa silvestre OP (figura 19); sin embargo, el valor de biomasa (determinado como densidad óptica) alcanzado es similar en las tres cepas, por lo que se esperaría que el rendimiento en la síntesis de copolímeros de PHAs no estuviera afectado.

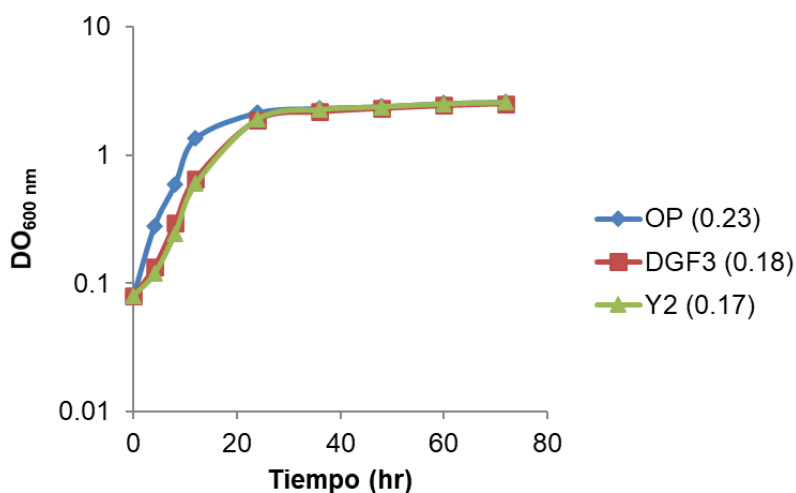


Figura 19: Curva de crecimiento de la cepa silvestre OP y de las cepas DGF3 y Y2 en medio BS líquido durante 72 horas. El número entre paréntesis indica el valor de μ (h^{-1}).

Para determinar la aportación que la copia adicional de los genes de síntesis de ácidos grasos tiene en los niveles de los transcritos correspondientes, se cuantificó mediante RT-qPCR la expresión relativa de los genes *fabD*, *fabG*, *fabF* y *fabY* en las cepas DGF3 y Y2, y se comparó con la de la cepa silvestre OP. Todos los experimentos se llevaron a cabo con RNA total extraído de cultivos crecidos por 24 horas en medio BS líquido. Los resultados se muestran en la tabla 6.

La cepa Y2 presenta un aumento en la expresión de los genes *fabG* y *fabY*, mientras que en la cepa DGF3 no se registraron cambios significativos en los niveles de expresión. Si bien el aumento en la cepa Y2 es ligero, constituye una buena posibilidad de que, en condiciones de síntesis de copolímeros, este aumento sea suficiente para contribuir a la producción de PHAs sin comprometer la síntesis de ácidos grasos. Además, una ventaja de estas cepas es que, al estar integrado al cromosoma, el sistema de sobreexpresión es estable, lo cual aumenta las posibilidades de lograr una mayor biosíntesis de ácidos grasos.

Tabla 6. Niveles relativos de mRNA de diferentes genes de la síntesis de ácidos grasos en las cepas DGF3 y Y2 respecto a la cepa silvestre OP.

CEPA	NIVELES RELATIVOS DE mRNA ^a			
	<i>fabD</i>	<i>fabG</i>	<i>fabF</i>	<i>fabY</i>
DGF3	0.902 ± 0.113	1.097 ± 0.03	0.807 ± 0.112	0.907 ± 0.26
Y2	1.055 ± 0.075	1.33 ± 0.192*	0.7551 ± 0.09	1.4245 ± 0.184*

^a Los niveles de mRNA de los genes biosintéticos de ácidos grasos en las cepas DGF3 y Y2 son relativos a los de la cepa OP (que se consideran con un valor de 1.0). Los valores representan el promedio y la desviación estándar de tres experimentos independientes.

* Significativo en $p < 0.05$.

Aunque la velocidad específica de crecimiento es menor en ambas cepas, y los niveles de expresión de los genes de biosíntesis de ácidos grasos no tuvieron el aumento esperado, no se descarta su uso para la producción de copolímeros de PHAs, puesto que podrían comportarse diferente una vez que se prueben en el fondo genético de las cepas heterólogas que expresan los genes *phaG* y PA3924 de *Pseudomonas* (ver sección Antecedentes). Asimismo, se pueden ajustar algunas condiciones de cultivo, como el volumen de llenado o la velocidad de agitación, que, al modificar la concentración de oxígeno en el medio, modifican también el crecimiento y la acumulación del biopolímero (Peña *et al.*, 2014).

2. Obtención de aislados resistentes a cerulenina

La producción de aceites y compuestos lipídicos a partir de microorganismos oleaginosos es un tema de investigación e interés industrial por sus potenciales aplicaciones, por lo que se busca mejorar los rendimientos de lípidos en cepas oleaginosas. Un método que se ha empleado de manera exitosa para la mejora genética y posterior selección de levaduras oleaginosas como *Rhodotorula glutinis* (Wang *et al.*, 2009), *Lipomyces starkeyi* (Tapia V *et al.*, 2012) y *Rhodospiridium toruloides* (Yamada *et al.*, 2017), consiste en la selección de mutantes resistentes al antibiótico cerulenina, fenotipo asociado con un alto rendimiento lipídico, tras algún tipo de tratamiento mutágeno al azar (radiación ionizante, radiación UV o mutagénesis química con nitrosoguanidina).

La razón de usar cerulenina ((2R, 3S)-2,3-epoxi-4-oxo-7,10-*trans,trans*-dodecadienamida), es por ser un inhibidor irreversible de la síntesis de ácidos grasos, tanto en procariotas como en eucariotas. Este metabolito sintetizado por el hongo *Cephalosporium caerulens*, forma un aducto covalente con un residuo de cisteína en el sitio activo de las 3-cetoacil-ACP sintasa I (FabB) y II (FabF) de *E. coli*, ocupando el sitio de unión a acilos (*acyl*

binding pocket). De este modo, imita e impide la condensación de Claisen, necesaria para la elongación de las cadenas carbonadas en la síntesis de ácidos grasos (Price *et al.*, 2001).

Tomando en cuenta lo anterior, se planteó realizar una mutagénesis al azar de *A. vinelandii* con el transposón *HimarI* y seleccionar clonas con una mayor capacidad de crecimiento en presencia de cerulenina que podrían presentar mayor rendimiento lipídico, usando una concentración mínima inhibitoria (MIC) conocida de la cepa silvestre OP.

Antes de iniciar la mutagénesis, se determinó que la MIC de cerulenina para la cepa OP de *A. vinelandii* fue de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Interesantemente, algunos cultivos comenzaron a presentar crecimiento después de un tiempo, en presencia concentraciones inhibitorias del antibiótico, por lo que fueron recuperados y crecidos nuevamente en medio BS líquido fresco en presencia de cerulenina $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, obteniéndose crecimiento desde el principio del cultivo. Este resultado indicó que los cultivos originales permitieron la selección de mutantes espontáneas resistentes a cerulenina. Para comprobar el incremento en resistencia, se realizó un ensayo de viabilidad en placa, en el que, a partir de cultivos estandarizados a una misma DO, se hicieron diluciones seriadas desde 10^{-1} hasta 10^{-4} en placas de BS con ($100 \mu\text{g mL}^{-1}$) y sin cerulenina, usando la cepa silvestre OP como control. Las colonias que crecieron en la placa se volvieron a recuperar y de nueva cuenta, se hicieron diluciones seriadas para obtener clonas individuales.

En total, se obtuvieron nueve aislados resistentes, de los cuales seis se compararon con la cepa silvestre en cuanto a su capacidad de crecimiento. En la figura 20A se corrobora la resistencia a cerulenina de los seis aislados tras 48 horas de cultivo en presencia de diferentes concentraciones de cerulenina. Asimismo, en la figura 20B se observa que, en un

medio libre de cerulenina, ninguno de los aislados presenta problemas para alcanzar densidades ópticas comparables con la de la cepa OP.

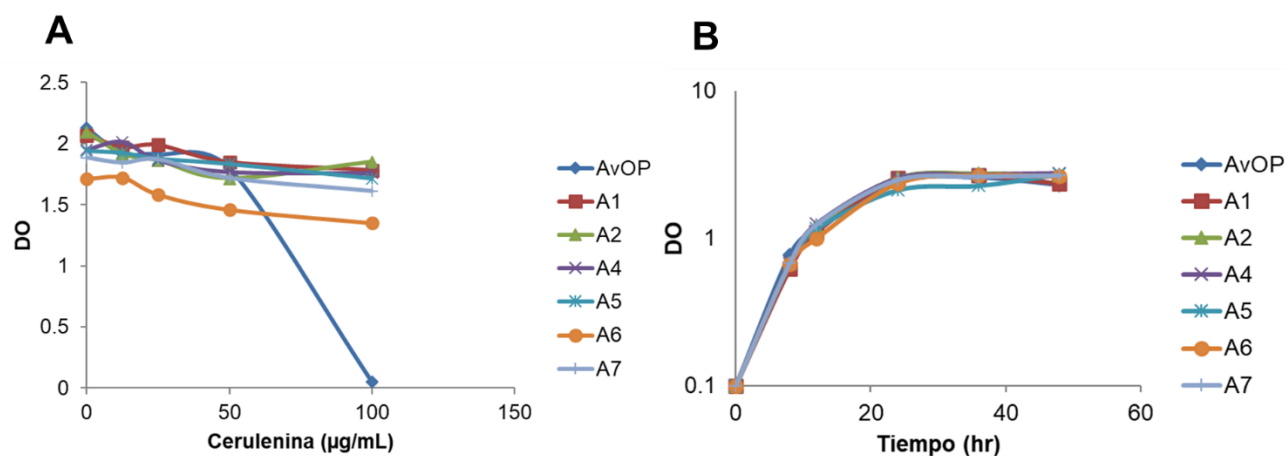


Figura 20: Crecimiento en medio BS líquido de la cepa OP y de seis mutantes resistentes en presencia y ausencia de cerulenina. Todos los cultivos fueron estandarizados a una misma DO inicial. (A): Crecimiento obtenido después de 48 horas y con concentraciones de cerulenina de 0, 12.5, 25, 50 y 100 µg mL⁻¹. (B): Cinética de crecimiento en medio libre de cerulenina durante 48 horas.

Se ha reportado que el uso de cerulenina a ciertas concentraciones, es ventajoso para mejorar la producción intracelular de ácidos grasos poliinsaturados (PUFA) en bacterias productoras, como *Moritella marina* (Morita *et al.*, 2005) o *Colwellia psychrerythraea* (Wan *et al.*, 2016). En esta última, el tratamiento con cerulenina no solo aumentó su producción de PUFAs, sino que modificó sustancialmente su perfil de ácidos grasos, pues mostró un aumento de los niveles de SFAs de cadena corta y media, así como de ácidos grasos hidroxilo (Wan *et al.*, 2016).

Queda como perspectiva determinar si los aislados resistentes a cerulenina obtenidos presentan o no una alta actividad de ácido graso sintasa, así como la o las mutaciones que dieron lugar a la resistencia. Aquellas con un aumento de actividad pueden ser una herramienta muy útil, tanto para la sobreproducción de ácidos grasos como para proporcionar monómeros de cadena corta y media a la síntesis de PHAs en las cepas diseñadas que expresan la enzima PhaG.

CONCLUSIONES

Los resultados descritos en la Parte I, y los cuales se publicaron en el artículo de investigación (Anexo 2), demuestran que en *A. vinelandii*, PsrA regula positivamente la expresión del operón *fabAB*, principalmente durante la fase estacionaria de crecimiento de células vegetativas, y por lo tanto modula el contenido de UFAs y sus derivados CFA, lo cual podría ser relevante para mantener la homeostasis de la membrana. Esta regulación no se ejerce mediante el control de la expresión del factor sigma RpoS por PsrA, ya que la inactivación del gen *rpoS* no tuvo efecto sobre la expresión de *fabAB*.

Las diferencias observadas entre la cepa silvestre OP y la mutante PA6psrA, tanto en la expresión del operón *fabAB*, como en el contenido de UFAs y CFA durante la fase estacionaria de crecimiento, sugieren que *A. vinelandii* aumenta la síntesis de estos compuestos para ajustar la fluidez de su membrana celular vegetativa en respuesta a condiciones desafiantes, como la limitación de nutrientes durante el crecimiento prolongado.

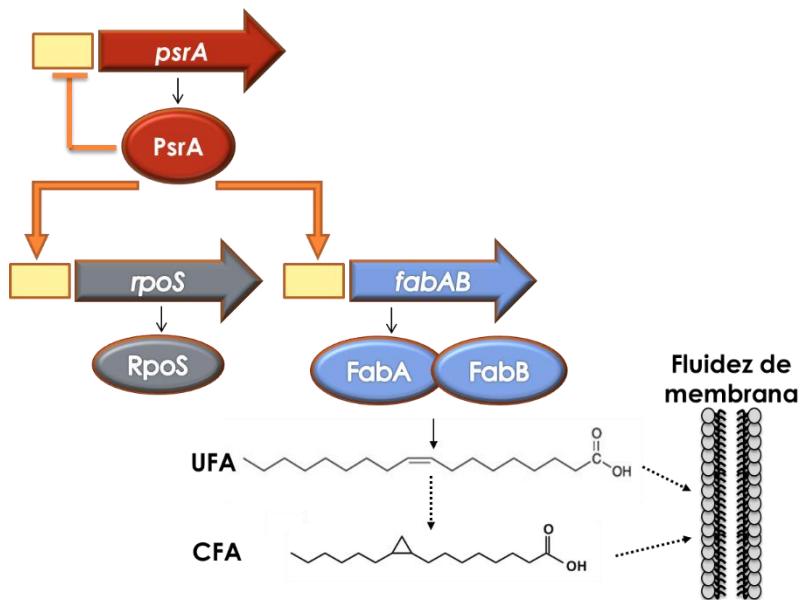


Figura 21: Ilustración que muestra los blancos directos de regulación de PsrA identificados hasta ahora en *A. vinelandii*, así como su posible participación en la regulación de la fluidez membranaral. Las flechas color naranja indican regulación directa; las líneas con barras, regulación negativa y las flechas punteadas, participación hipotética y/o indirecta.

PERSPECTIVAS

- Profundizar en el mecanismo por el cual se regulan los otros genes de la vía de síntesis de ácidos grasos, particularmente el gen *fabY*.
- Evaluar si PsrA regula la síntesis de CFA.
- Identificar otros reguladores involucrados en la regulación de la vía de síntesis de ácidos grasos.
- Concretar la construcción del sistema heterólogo de producción de copolímeros de scl-mcl-PHAs.
- Emplear las estrategias desarrolladas en el presente trabajo para la sobreproducción de ácidos grasos, las cuales podrían ser de utilidad para comprobar si se favorece la síntesis de copolímeros de scl-mcl-PHAs.
- Caracterizar los aislados resistentes a cerulenina, secuenciando su genoma para identificar la(s) mutación(es) que les confieren dicha resistencia; cuantificando los niveles de expresión de sus genes para la síntesis de ácidos grasos; analizando si presentan modificaciones en sus perfiles de ácidos grasos y determinando su factibilidad para usarlos en la síntesis de copolímeros de PHAs. Adicionalmente, dicha caracterización podría arrojar información valiosa sobre otros aspectos de la regulación del metabolismo de ácidos grasos.

REFERENCIAS

- Aguilar, P.S., Cronan, J.E., De Mendoza, D., 1998. A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. *J. Bacteriol.*
- Akaraonye, E., Keshavarz, T., Roy, I., 2010. Production of polyhydroxyalkanoates: The future green materials of choice. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*
<https://doi.org/10.1002/jctb.2392>
- 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.* [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(95\)00108-I](https://doi.org/10.1016/0378-1119(95)00108-I)
- Anjum, A., Zuber, M., Zia, K.M., Noreen, A., Anjum, M.N., Tabasum, S., 2016. Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *Int. J. Biol. Macromol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.04.069>
- Barry, T., Geary, S., Hannify, S., Macgearailt, C., Shalloo, M., Heery, D., Gannon, F., Powell, R., 1992. Rapid mini-preparations of total RNA from bacteria. *Nucleic Acids Res.* <https://doi.org/10.1093/nar/20.18.4940>
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method for total lipid extraction. *Biochem. Cell Biol.*
- Bush, J.A., Wilson, P.W., 1959. A non-gummy chromogenic strain of *Azotobacter vinelandii*. *Nature.* <https://doi.org/10.1038/184381a0>
- Chan, D.I., Vogel, H.J., 2010. Current understanding of fatty acid biosynthesis and the acyl carrier protein. *Biochem. J.* <https://doi.org/10.1042/BJ20100462>
- Chen, Y.Y., Gänzle, M.G., 2016. Influence of cyclopropane fatty acids on heat, high pressure, acid and oxidative resistance in *Escherichia coli*. *Int. J. Food Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.017>
- Cocotl-Yañez, M., Moreno, S., Encarnación, S., López-Pliego, L., Castañeda, M., Espín, G., 2014. A small heat-shock protein (Hsp20) regulated by RpoS is essential for cyst desiccation resistance in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiol. (United Kingdom).* <https://doi.org/10.1099/mic.0.073353-0>
- Cocotl-Yañez, M., Sampieri, A., Moreno, S., Núñez, C., Castañeda, M., Segura, D., Espín, G., 2011. Roles of RpoS and PsrA in cyst formation and alkylresorcinol synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology.* <https://doi.org/10.1099/mic.0.046268-0>
- Cronan, J.E., Subrahmanyam, S., 1998. FadR, transcriptional co-ordination of metabolic expediency. *Mol. Microbiol.* <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1998.00917.x>
- Díaz-Barrera, A., Soto, E., 2010. Biotechnological uses of *Azotobacter vinelandii*: Current state, limits and prospects. *African J. Biotechnol.* <https://doi.org/10.4314/ajb.v9i33>.
- Fujita, Y., Matsuoka, H., Hirooka, K., 2007. Regulation of fatty acid metabolism in bacteria. *Mol. Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2007.05947.x>

- Fukui, T., Doi, Y., 1997. Cloning and analysis of the poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyhexanoate) biosynthesis genes of *Aeromonas caviae*. J. Bacteriol. <https://doi.org/10.1128/jb.179.15.4821-4830.1997>
- Garrity, G.M., Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T., 2005. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 2 part B. The gammaproteobacteria., Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 2 part B. The gammaproteobacteria. <https://doi.org/10.1245/s10434-010-1229-3>
- Gómez-Hernández, E., Salgado-Lugo, H., Segura, D., García, A., Díaz-Barrera, A., Peña, C., 2021. Production of Poly-3-Hydroxybutyrate (P3HB) with Ultra-High Molecular Weight (UHMW) by Mutant Strains of *Azotobacter vinelandii* Under Microaerophilic Conditions. Appl. Biochem. Biotechnol. <https://doi.org/10.1007/s12010-020-03384-w>
- Grogan, D.W., Cronan, J.E., 1997. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. J. Mol. Biol. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(83\)80284-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(83)80284-8)
- Handke, P., Lynch, S.A., Gill, R.T., 2011. Application and engineering of fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli* for advanced fuels and chemicals. Metab. Eng. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2010.10.007>
- Hazer, D.B., Kiliçay, E., Hazer, B., 2012. Poly(3-hydroxyalkanoate)s: Diversification and biomedical applications: A state of the art review. Mater. Sci. Eng. C. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2012.01.021>
- Kang, Y., Nguyen, D.T., Son, M.S., Hoang, T.T., 2008. The *Pseudomonas aeruginosa* PsrA responds to long-chain fatty acid signals to regulate the *fadBA5* β -oxidation operon. Microbiology. <https://doi.org/10.1099/mic.0.2008/018135-0>
- Kawashima, Y., Cheng, W., Mifune, J., Orita, I., Nakamura, S., Fukui, T., 2012. Characterization and functional analyses of R-specific enoyl coenzyme a hydratases in polyhydroxyalkanoate-producing *Ralstonia eutropha*. Appl. Environ. Microbiol. <https://doi.org/10.1128/AEM.06937-11>
- Kazakov, A.E., Rodionov, D.A., Alm, E., Arkin, A.P., Dubchak, I., Gelfand, M.S., 2009. Comparative genomics of regulation of fatty acid and branched-chain amino acid utilization in proteobacteria. J. Bacteriol. <https://doi.org/10.1128/JB.01175-08>
- Kennedy, C., Dean, D., 1992. The *nifU*, *nifS* and *nifV* gene products are required for activity of all three nitrogenases of *Azotobacter vinelandii*. MGG Mol. Gen. Genet. <https://doi.org/10.1007/BF00292722>
- Kim, B.H., Kim, S., Kim, H.G., Lee, J., Lee, I.S., Park, Y.K., 2005. The formation of cyclopropane fatty acids in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Microbiology. <https://doi.org/10.1099/mic.0.27265-0>
- Kojic, M., Aguilar, C., Venturi, V., 2002. TetR family member PsrA directly binds the *Pseudomonas rpoS* and *psrA* promoters. J. Bacteriol. <https://doi.org/10.1128/JB.184.8.2324-2330.2002>

- Kojic, M., Jovcic, B., Vindigni, A., Odreman, F., Venturi, V., 2005. Novel target genes of PsrA transcriptional regulator of *Pseudomonas aeruginosa*. FEMS Microbiol. Lett. <https://doi.org/10.1016/j.femsle.2005.04.003>
- Kojic, M., Venturi, V., 2001. Regulation of rpoS gene expression in *Pseudomonas*: Involvement of a TetR family regulator. J. Bacteriol. <https://doi.org/10.1128/JB.183.12.3712-3720.2001>
- Koller, M., Atlić, A., Dias, M., Reiterer, A., Brauneegg, G., 2010. Microbial PHA Production from Waste Raw Materials. https://doi.org/10.1007/978-3-642-03287-5_5
- Kondakova, T., D'Heygère, F., Feuilloley, M.J., Orange, N., Heipieper, H.J., Duclairoir Poc, C., 2015. Glycerophospholipid synthesis and functions in *Pseudomonas*. Chem. Phys. Lipids. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2015.06.006>
- Kourmentza, C., Plácido, J., Venetsaneas, N., Burniol-Figols, A., Varrone, C., Gavala, H.N., Reis, M.A.M., 2017. Recent advances and challenges towards sustainable polyhydroxyalkanoate (PHA) production. Bioengineering. <https://doi.org/10.3390/bioengineering4020055>
- Larsen, A., Sliskovic, I., Juric, D., Pinnock, C.L., Kullman, H., Segstro, E., Reinfelds, G., Eze, M.O., 2005. The fatty acid profile of vegetative *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837: Growth phase-dependence. Appl. Microbiol. Biotechnol. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1908-3>
- Li, Z., Yang, J., Loh, X.J., 2016. Polyhydroxyalkanoates: Opening doors for a sustainable future. NPG Asia Mater. <https://doi.org/10.1038/am.2016.48>
- López-Lara, I.M., Soto, M.J., 2019. Fatty Acid Synthesis and Regulation, in: Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50430-8_26
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin. J. Biol. Chem. [https://doi.org/10.1016/0304-3894\(92\)87011-4](https://doi.org/10.1016/0304-3894(92)87011-4)
- Madison, L.L., Huisman, G.W., 1999. Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. Microbiol. Mol. Biol. Rev. <https://doi.org/10.1128/membr.63.1.21-53.1999>
- Mærk, M., Johansen, J., Ertesvåg, H., Drablos, F., Valla, S., 2014. Safety in numbers: Multiple occurrences of highly similar homologs among *Azotobacter vinelandii* carbohydrate metabolism proteins probably confer adaptive benefits. BMC Genomics. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-192>
- Maniatis, T., Fritsch, E.F., Sambrook, J., 1988. Molecular Cloning : a laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harb. ,New York.
- Matsusaki, H., Abe, H., Doi, Y., 2000. Biosynthesis and properties of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoates) by recombinant strains of *Pseudomonas* sp. 61-3. Biomacromolecules. <https://doi.org/10.1021/bm9900040>
- Meléndez-Rodríguez, B., Torres-Giner, S., Reis, M.A.M., Silva, F., Matos, M., Cabedo, L., Lagarón, J.M., 2021. Blends of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) with

- fruit pulp biowaste derived poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate-co-3-hydroxyhexanoate) for organic recycling food packaging. *Polymers* (Basel). <https://doi.org/10.3390/polym13071155>
- Morita, N., Nishida, T., Tanaka, M., Yano, Y., Okuyama, H., 2005. Enhancement of polyunsaturated fatty acid production by cerulenin treatment in polyunsaturated fatty acid-producing bacteria. *Biotechnol. Lett.* <https://doi.org/10.1007/s10529-005-1532-4>
- My, L., Ghandour Achkar, N., Viala, J.P., Bouveret, E., 2015. Reassessment of the genetic regulation of fatty acid synthesis in *Escherichia coli*: Global positive control by the functional dual regulator FadR. *J. Bacteriol.* <https://doi.org/10.1128/JB.00064-15>
- Noguez, R., Segura, D., Moreno, S., Hernandez, A., Juarez, K., Espín, G., 2008. Enzyme INtr, NPr and IANtr are involved in regulation of the poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1159/000108658>
- Page, W.J., Manchak, J., Rudy, B., 1992. Formation of poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Appl. Environ. Microbiol.* <https://doi.org/10.1128/aem.58.9.2866-2873.1992>
- Page, W.J., Von Tigerstrom, M., 1978. Induction of transformation competence in *Azotobacter vinelandii* iron-limited cultures. *Can. J. Microbiol.* <https://doi.org/10.1139/m78-254>
- Panchal, B., Bagdadi, A., Roy, I., 2013. Polyhydroxyalkanoates: The natural polymers produced by Bacterial Fermentation. *Adv. Struct. Mater.* https://doi.org/10.1007/978-3-642-20940-6_12
- Parsons, J.B., Rock, C.O., 2013. Bacterial lipids: Metabolism and membrane homeostasis. *Prog. Lipid Res.* <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.02.002>
- Pech-Canul, A., Nogales, J., Miranda-Molina, A., Álvarez, L., Geiger, O., Soto, M.J., López-Lara, I.M., 2011. FadD is required for utilization of endogenous fatty acids released from membrane lipids. *J. Bacteriol.* <https://doi.org/10.1128/JB.05450-11>
- Peña, C., Castillo, T., García, A., Millán, M., Segura, D., 2014. Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): A review of recent research work. *Microb. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12129>
- Peralta-Gil, M., Segura, D., Guzmán, J., Servín-González, L., Espín, G., 2002. Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *J. Bacteriol.* <https://doi.org/10.1128/JB.184.20.5672-5677.2002>
- Poger, D., Mark, A.E., 2015. A ring to rule them all: The effect of cyclopropane fatty acids on the fluidity of lipid bilayers. *J. Phys. Chem. B.* <https://doi.org/10.1021/acs.jpccb.5b00958>
- Price, A.C., Choi, K.H., Heath, R.J., Li, Z., White, S.W., Rock, C.O., 2001. Inhibition of β -ketoacyl-acyl carrier protein synthases by thiolactomycin and cerulenin: Structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.M007101200>

- Rand, J.M., Gordon, G.C., Mehrer, C.R., Pflieger, B.F., 2017. Genome sequence and analysis of *Escherichia coli* production strain LS5218. *Metab. Eng. Commun.* <https://doi.org/10.1016/j.meteno.2017.10.001>
- Rehm, B.H.A., Krüger, N., Steinbüchel, A., 1998. A New Metabolic Link between Fatty Acid de Novo Synthesis and Polyhydroxyalkanoic Acid Synthesis . *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.273.37.24044>
- Rehm, B.H.A., Mitsky, T.A., Steinbüchel, A., 2001. Role of Fatty Acid de novo Biosynthesis in Polyhydroxyalkanoic Acid (PHA) and Rhamnolipid Synthesis by Pseudomonads: Establishment of the Transacylase (PhaG)-Mediated Pathway for PHA Biosynthesis in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* <https://doi.org/10.1128/AEM.67.7.3102-3109.2001>
- Reusch, R.N., Sadoff, H.L., 1983. Novel lipid components of the *Azotobacter vinelandii* cyst membrane. *Nature.* <https://doi.org/10.1038/302268a0>
- Reusch, R.N., Sadoff, H.L., 1981. Lipid metabolism during encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*
- Rholl, D.A., Trunck, L.A., Schweizer, H.P., 2008. In vivo *HimarI* transposon mutagenesis of *Burkholderia pseudomallei*. *Appl. Environ. Microbiol.* <https://doi.org/10.1128/AEM.01973-08>
- Sahonero-Canavesi, D.X., Sohlenkamp, C., Sandoval-Calderón, M., Lamsa, A., Pogliano, K., López-Lara, I.M., Geiger, O., 2015. Fatty acid-releasing activities in *Sinorhizobium meliloti* include unusual diacylglycerol lipase. *Environ. Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12814>
- Samui, A.B., Kanai, T., 2019. Polyhydroxyalkanoates based copolymers. *Int. J. Biol. Macromol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.147>
- Segura, D., Cruz, T., Espín, G., 2003. Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly- β -hydroxybutyrate synthesis. *Arch. Microbiol.* <https://doi.org/10.1007/s00203-003-0553-4>
- Segura, D., Núñez, C., Espín, G., 2014. *Azotobacter* Cysts , in: ELS. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000295.pub2>
- Segura, D., Vargas, E., Espín, G., 2000. β -Ketothiolase genes in *Azotobacter vinelandii*. *Gene.* [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00462-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00462-5)
- Setubal, J.C., Dos Santos, P., Goldman, B.S., Ertesvåg, H., Espin, G., Rubio, L.M., Valla, S., Almeida, N.F., Balasubramanian, D., Cromes, L., Curatti, L., Du, Z., Godsy, E., Goodner, B., Hellner-Burris, K., Hernandez, J.A., Houmiel, K., Imperial, J., Kennedy, C., Larson, T.J., Latreille, P., Ligon, L.S., Lu, J., Mærk, M., Miller, N.M., Norton, S., O'Carroll, I.P., Paulsen, I., Raulfs, E.C., Roemer, R., Rosser, J., Segura, D., Slater, S., Stricklin, S.L., Studholme, D.J., Sun, J., Viana, C.J., Wallin, E., Wang, B., Wheeler, C., Zhu, H., Dean, D.R., Dixon, R., Wood, D., 2009. Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *J. Bacteriol.* <https://doi.org/10.1128/JB.00504-09>

- Shen, D.K., Filopon, D., Kuhn, L., Polack, B., Toussaint, B., 2006. PsrA is a positive transcriptional regulator of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* <https://doi.org/10.1128/IAI.74.2.1121-1129.2006>
- Solovyev, V., Salamov, A., 2011. Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences, in: *Metagenomics and Its Applications in Agriculture, Biomedicine and Environmental Studies*.
- Su, C.J., Reusch, R., Sadoff, H.L., 1979. Fatty acids in phospholipids of cells, cysts, and germinating cysts of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.*
- Subramanian, C., Rock, C.O., Zhang, Y.M., 2010. DesT coordinates the expression of anaerobic and aerobic pathways for unsaturated fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* <https://doi.org/10.1128/JB.00404-09>
- Surendran, A., Lakshmanan, M., Chee, J.Y., Sulaiman, A.M., Thuoc, D. Van, Sudesh, K., 2020. Can Polyhydroxyalkanoates Be Produced Efficiently From Waste Plant and Animal Oils? *Front. Bioeng. Biotechnol.* <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00169>
- Tapia V, E., Anschau, A., Coradini, A.L., T Franco, T., Deckmann, A., 2012. Optimization of lipid production by the oleaginous yeast *Lipomyces starkeyi* by random mutagenesis coupled to cerulenin screening. *AMB Express.* <https://doi.org/10.1186/2191-0855-2-64>
- Tsuge, T., Taguchi, K., Taguchi, S., Doi, Y., 2003. Molecular characterization and properties of (R)-specific enoyl-CoA hydratases from *Pseudomonas aeruginosa*: Metabolic tools for synthesis of polyhydroxyalkanoates via fatty acid β -oxidation. *Int. J. Biol. Macromol.* [https://doi.org/10.1016/S0141-8130\(02\)00082-X](https://doi.org/10.1016/S0141-8130(02)00082-X)
- Urtuvia, V., Maturana, N., Peña, C., Díaz-Barrera, A., 2020. Accumulation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* with different 3HV fraction in shake flasks and bioreactor. *Bioprocess Biosyst. Eng.* <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02340-6>
- Urtuvia, V., Villegas, P., González, M., Seeger, M., 2014. Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. *Int. J. Biol. Macromol.* <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2014.06.001>
- Van Aalten, D.M.F., DiRusso, C.C., Knudsen, J., 2001. The structural basis of acyl coenzyme A-dependent regulation of the transcription factor FadR. *EMBO J.* <https://doi.org/10.1093/emboj/20.8.2041>
- Velázquez-Sánchez, C., Espín, G., Peña, C., Segura, D., 2020. The Modification of Regulatory Circuits Involved in the Control of Polyhydroxyalkanoates Metabolism to Improve Their Production. *Front. Bioeng. Biotechnol.* <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00386>
- Vences-Guzmán, M.Á., Guan, Z., Ormeño-Orrillo, E., González-Silva, N., López-Lara, I.M., Martínez-Romero, E., Geiger, O., Sohlenkamp, C., 2011. Hydroxylated ornithine lipids increase stress tolerance in *Rhizobium tropici* CIAT899. *Mol. Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07535.x>

- Wan, X., Peng, Y.F., Zhou, X.R., Gong, Y.M., Huang, F.H., Moncalián, G., 2016. Effect of cerulenin on fatty acid composition and gene expression pattern of DHA-producing strain *Colwellia psychrerythraea* strain 34H. *Microb. Cell Fact.* <https://doi.org/10.1186/s12934-016-0431-9>
- Wang, H.H., Zhou, X.R., Liu, Q., Chen, G.Q., 2011. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoate homopolymers by *Pseudomonas putida*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s00253-010-2964-x>
- Wang, J., Li, R., Lu, D., Ma, S., Yan, Y., Li, W., 2009. A quick isolation method for mutants with high lipid yield in oleaginous yeast. *World J. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s11274-009-9960-2>
- Wells, G., Palethorpe, S., Pesci, E.C., 2017. PsrA controls the synthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal via repression of the FadE homolog, PA0506. *PLoS One.* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189331>
- White, S.W., Zheng, J., Zhang, Y.M., Rock, C.O., 2005. The structural biology of type II fatty acid biosynthesis. *Annu. Rev. Biochem.* <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.74.082803.133524>
- Wilson, K.J., Sessitsch, A., Corbo, J.C., Giller, K.E., Akkermans, A.D.L., Jefferson, R.A., 1995. β -glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Microbiology.* <https://doi.org/10.1099/13500872-141-7-1691>
- Yamada, R., Kashihara, T., Ogino, H., 2017. Improvement of lipid production by the oleaginous yeast *Rhodospiridium toruloides* through UV mutagenesis. *World J. Microbiol. Biotechnol.* <https://doi.org/10.1007/s11274-017-2269-7>
- Yuan, Y., Sachdeva, M., Leeds, J.A., Meredith, T.C., 2012. Fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is initiated by the fabY class of β -ketoacyl acyl carrier protein synthases. *J. Bacteriol.* <https://doi.org/10.1128/JB.00792-12>
- Zbierzak, A.M., Dörmann, P., Hölzl, G., 2011. Analysis of lipid content and quality in *Arabidopsis* plastids. *Methods Mol. Biol.* https://doi.org/10.1007/978-1-61779-237-3_22
- Zhang, Y.M., Marrakchi, H., Rock, C.O., 2002. The *fabR* (YijC) transcription factor regulates unsaturated fatty acid biosynthesis in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* <https://doi.org/10.1074/jbc.M201399200>
- Zhang, Y.M., Rock, C.O., 2009. Transcriptional regulation in bacterial membrane lipid synthesis. *J. Lipid Res.* <https://doi.org/10.1194/jlr.R800046-JLR200>
- Zhang, Y.M., Rock, C.O., 2008. Membrane lipid homeostasis in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* <https://doi.org/10.1038/nrmicro1839>
- Zhu, K., Choi, K.H., Schweizer, H.P., Rock, C.O., Zhang, Y.M., 2006. Two aerobic pathways for the formation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05088.x>

Zhu, K., Zhang, Y.M., Rock, C.O., 2009. Transcriptional regulation of membrane lipid homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.*
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.068239>

ANEXO 1: TABLAS SUPLEMENTARIAS

**TABLA SUPLEMENTARIA 1: GENES INVOLUCRADOS EN LA
DEGRADACIÓN DE ÁCIDOS GRASOS EN *A. vinelandii***

ID/POSIBLE GEN	PRODUCTO/DETALLES
Avin30140/fadD	Acil-CoA sintetasa / El único resultado obtenido usando la secuencia del gen <i>fadD</i> de <i>E. coli</i> K12. No hay parálogos anotados.
Avin15490/fadE	Acil-CoA deshidrogenasa / Resultado obtenido usando la secuencia del gen <i>fadE</i> de <i>E. coli</i> K12. No hay parálogos anotados.
Avin43640/fadE Avin43650/seuB	Acil-CoA deshidrogenasa / Resultado obtenido usando la secuencia Avin15490. Los genes se encuentran adyacentes, sin embargo, el único anotado es <i>seuB</i> . No hay parálogos anotados.
Avin10680/fadE	Acil-CoA deshidrogenasa / Resultado obtenido del IMG, como un parálogo de la secuencia Avin15490.
Avin49560/fadE	Acil-CoA deshidrogenasa / Resultado obtenido del IMG, como un parálogo de la secuencia Avin15490.
Avin17380/fadE	Acil-CoA deshidrogenasa / Resultado obtenido del IMG, como un parálogo de la secuencia Avin15490.
Avin16400/fadE	Acil-CoA deshidrogenasa / Gen anotado como parálogo del Avin17380.
Avin14270/fadE	Acil-CoA deshidrogenasa / Resultado obtenido usando la secuencia Avin10680. No hay parálogos anotados.
Avin25210/fadE	Acil-CoA deshidrogenasa / Resultado obtenido usando la secuencia Avin14270.
Avin45920/fadE	Acil-CoA deshidrogenasa / Gen anotado como parálogo del Avin25210.
Avin14440/fadB	Enoil-CoA hidratasa - 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa / Resultado obtenido usando la secuencia del gen <i>fadB</i> de <i>E. coli</i> K12 y anotado como <i>fadB1</i> .
Avin16390/fadB	Enoil-CoA hidratasa - 3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa / Resultado obtenido usando la secuencia del gen <i>fadB</i> de <i>E. coli</i> K12 y anotado como <i>fadB2</i> , parálogo del gen anterior.
Avin17350	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa / Resultado obtenido usando la secuencia Avin16390. No hay parálogos anotados.
Avin25220	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa / Resultado obtenido usando la secuencia Avin16390. No hay parálogos anotados.
Avin14450/fadA	Acetil-CoA aciltransferasa / Resultado obtenido usando la secuencia del gen <i>fadA</i> de <i>E. coli</i> y anotado como <i>fadA</i> . No hay parálogos anotados
Avin16380	Acetil-CoA aciltransferasa / Resultado obtenido usando la secuencia Avin14450. No hay parálogos anotados

**TABLA SUPLEMENTARIA 2: GENES INVOLUCRADOS EN LA SÍNTESIS DE
ÁCIDOS GRASOS EN *A. vinelandii***

ID/POSIBLE GEN	PRODUCTO/DETALLES
Avin38830/accA	Acetil-CoA carboxilasa subunidad A / El único resultado obtenido usando la secuencia del gen <i>accA</i> de <i>E. coli</i> K12. No hay parálogos anotados.
Avin06960/accB	Acetil-CoA carboxilasa subunidad B / El único resultado obtenido usando la secuencia del gen <i>accB</i> de <i>E. coli</i> K12. No hay parálogos anotados.
Avin06950/accC	Acetil-CoA carboxilasa subunidad C / Resultado obtenido usando la secuencia del gen <i>accC</i> de <i>E. coli</i> K12.
Avin49520/accC	Acetil-CoA carboxilasa subunidad C / Resultado obtenido usando la secuencia del gen <i>accC</i> de <i>E. coli</i> K12.
Avin34190/accD	Acetil-CoA carboxilasa subunidad D / El único resultado obtenido usando la secuencia del gen <i>accD</i> de <i>E. coli</i> K12.
Avin14910/fabD	Malonil Co-A:ACP transacilasa / Resultado obtenido usando la secuencia del gen Avin29450 y anotado como <i>fabD</i> .
Avin29450	Malonil Co-A:ACP transacilasa / Resultado obtenido usando la secuencia del gen <i>fabD</i> de <i>E. coli</i> K12. No hay parálogos anotados.
Avin14920/fabG	3-oxiacil-ACP reductasa / Resultado obtenido por proximidad con el Avin14910.
Avin14940/fabF	3-cetoacil-ACP sintasa / Resultado obtenido por proximidad con el Avin14910
Avin29060/fabB	3-oxiacil-ACP sintasa / Resultado obtenido usando la secuencia del Avin14940.
Avin05510/fabY	3-cetoacil-ACP sintasa / Resultado obtenido usando la secuencia del gen <i>fabY</i> de <i>P. aeruginosa</i> .
Avin29050/fabA	3-hidroxidecanoil-ACP deshidratasa / Resultado obtenido por proximidad con el Avin29060.
Avin38880/fabZ	3-hidroxiacil-ACP deshidratasa / Resultado obtenido usando la secuencia del gen <i>fabZ</i> de <i>E. coli</i> K12. No hay parálogos anotados.
Avin29690/fabI	Enoil-ACP reductasa / Resultado obtenido usando la secuencia del gen <i>fabI</i> de <i>E. coli</i> K12. No hay parálogos anotados.

ANEXO 2: ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN

Velázquez-Sánchez, C., Vences-Guzmán, M.Á., Moreno, S., Tinoco-Valencia, R., Espín, G., Guzmán, J., Sahonero-Canavesi, D.X., Sohlenkamp, C., Segura, D., 2021. PsaA positively regulates the unsaturated fatty acid synthesis operon *fabAB* in *Azotobacter vinelandii*. Microbiol. Res. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126775>



PsrA positively regulates the unsaturated fatty acid synthesis operon *fabAB* in *Azotobacter vinelandii*

Claudia Velázquez-Sánchez^a, Miguel Ángel Vences-Guzmán^c, Soledad Moreno^a,
Raunel Tinoco-Valencia^b, Guadalupe Espín^a, Josefina Guzmán^a,
Diana X. Sahonero-Canavesi^{c,1}, Christian Sohlenkamp^c, Daniel Segura^{a,*}

^a Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

^b Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

^c Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México

ARTICLE INFO

Keywords:

Azotobacter vinelandii
Transcriptional regulation
Unsaturated fatty acids
Cyclopropane fatty acids

ABSTRACT

In *Pseudomonas* spp. PsrA, a transcriptional activator of the *rpoS* gene, regulates fatty acid catabolism by repressing the *fadBA5* β -oxidation operon. In *Azotobacter vinelandii*, a soil bacterium closely related to *Pseudomonas* species, PsrA is also an activator of *rpoS* expression, although its participation in the regulation of lipid metabolism has not been analyzed. In this work we found that inactivation of *psrA* had no effect on the expression of β -oxidation genes in this bacterium, but instead decreased expression of the unsaturated fatty acid biosynthetic operon *fabAB* (3-hydroxydecanoyl-ACP dehydratase/isomerase and 3-ketoacyl-ACP synthase I). This inactivation also reduced the unsaturated fatty acid content, as revealed by the thin-layer chromatographic analysis, and confirmed by gas chromatography; notably, there was also a lower content of cyclopropane fatty acids, which are synthesized from unsaturated fatty acids. The absence of PsrA has no effect on the growth rate, but showed loss of cell viability during long-term growth, in accordance with the role of these unsaturated and cyclopropane fatty acids in the protection of membranes. Finally, an electrophoretic mobility shift assay revealed specific binding of PsrA to the *fabA* promoter region, where a putative binding site for this regulator was located. Taken together, our data show that PsrA plays an important role in the regulation of unsaturated fatty acids metabolism in *A. vinelandii* by positively regulating *fabAB*.

1. Introduction

Fatty acids are important structural components of bacterial membrane phospholipids. They are synthesized *de novo* by an enzymatic complex whose components are encoded by the *fab* (fatty acid biosynthesis) genes (recently reviewed in López-Lara and Soto, 2019). The prototype fatty acid synthesis pathway of *Escherichia coli* has been extensively studied and comprises the enzymes FabA, FabB, FabD, FabF, FabG, FabH, FabI and FabZ. This enzymatic complex is conserved in diverse bacteria, although differences occur in some species. For example, a FabH homolog is not present in *Pseudomonas aeruginosa*, where a different class of 3-ketoacyl synthase III, FabY, initiates the synthetic pathway (Yuan et al., 2012).

The synthesis of all fatty acids follows the same path until the 10-

carbon intermediate (3-hydroxydecanoil-ACP) is produced. At this point, this molecule can continue either with the normal elongation cycles to produce a longer chain saturated fatty acid (SFA), or it can be used for unsaturated fatty acid (UFA) synthesis (Fig. 1). In *E. coli*, and other bacteria, FabA and FabB are the enzymes responsible for the *de novo* synthesis of UFAs. FabA has a dual catalytic function: first, it dehydrates the 3-hydroxydecanoil-ACP, producing trans-2-decenoil-ACP and subsequently isomerizes it into cis-3-decenoil-ACP. This molecule is a substrate for FabB, a 3-ketoacyl-ACP synthase able to continue with the next fatty acid elongation step, maintaining the double bond (Parsons and Rock, 2013). In *P. aeruginosa*, in addition to the FabA/B pathway for UFA synthesis, two oxidative desaturation systems of pre-existing fatty acids are present: DesA and DesC/B. Both systems introduce double bonds at carbon 9 of the carbon chain, but while DesA

* Corresponding author at: Departamento de Microbiología Molecular, Instituto de Biotecnología UNAM, Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, 62271, Mexico. E-mail address: daniel@ibt.unam.mx (D. Segura).

¹ Current Address: Department of Marine Microbiology and Biogeochemistry, NIOZ Royal Institute for Sea Research, and Utrecht University, Texel, The Netherlands.

<https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126775>

Received 20 November 2020; Received in revised form 12 March 2021; Accepted 27 April 2021

Available online 29 April 2021

0944-5013/© 2021 Elsevier GmbH. All rights reserved.

desaturates fatty acids associated with phospholipids, DesCB desaturates exogenous fatty acids (Zhu et al., 2006).

The properties of the bacterial cell membrane can be altered by modifying its fatty acid composition, changing the SFA/UFA ratio and incorporating modified fatty acids, such as cyclopropane fatty acids (CFAs). CFAs are formed by addition of a methylene group across the *cis* double bond of an UFA (Fig. 1) (Grogan and Cronan, 1997). UFA content is a major determinant of membrane fluidity, enabling bacteria to contend with different conditions, including growth phase or changes in temperature (Parsons and Rock, 2013; Kondakova et al., 2015). CFAs enhance the fluidity of lipid bilayers, and this has also been associated with stabilization of membranes against adverse conditions (Poger and Mark, 2015).

Regarding regulation of SFA/UFA metabolism, *E. coli* and other enterobacteria use FadR, a regulator that represses the expression of the degradative β -oxidation enzymes, but also activates *fabA* and *fabB* expression, increasing the synthesis of UFAs (Henry and Cronan, 1992; Campbell and Cronan, 2001). Another regulator involved in this network is FabR, a transcriptional repressor of *fabA* and *fabB* (Zhu et al., 2009). In *P. aeruginosa*, the expression of UFA synthesis pathways is regulated by DesT, which represses *fabAB* and *desCB* transcription in the presence of UFAs (Zhang et al., 2007; Subramanian et al., 2010). In this bacterium, β -oxidation is under the control of PsrA, a regulator of the TetR family. PsrA represses the *fadBA5* operon and the *fadE* homolog PA0506, which code for subunits of the multi-enzyme complex required for long-chain fatty acid β -oxidation; this repression is relieved by binding of long-chain fatty acids ($C_{14:0}$, $C_{16:0}$, $C_{18:1}^{\Delta 9}$) (Kang et al., 2008; Wells et al., 2017). In a *psrA* mutant, the *fadBA5* operon is constitutively expressed, regardless of the culture medium or the absence or presence of oleate ($C_{18:1}^{\Delta 9}$) (Kang et al., 2008). PsrA of *P. aeruginosa* was first described in this bacterium as the main transcriptional activator of *rpoS*, which codes for a stationary growth sigma factor (Kojic and Venturi, 2001). It also upregulates the transcription of the secretion system *exsCEBA* (Shen et al., 2006; Kang et al., 2009) and represses its own expression (Kojic and Venturi, 2001; Kojic et al., 2002).

Azotobacter vinelandii is a bacterium able to form metabolically inactive cysts resistant to adverse conditions, such as desiccation or ultraviolet radiation (Segura et al., 2020). Although the β -oxidation and the *de novo* fatty acid synthesis pathways have not been fully

characterized in *A. vinelandii*, the genes present in its genome show resemblance to those of *E. coli*, but lacking a homolog of the 3-ketoacyl synthase FabH. Instead, *A. vinelandii* has a FabY synthase, like its close relative *P. aeruginosa* (Setubal et al., 2009). The major fatty acids present in phospholipids of non-encysting cells are myristate ($C_{14:0}$), palmitate ($C_{16:0}$), palmitoleate ($C_{16:1}$), stearate ($C_{18:0}$), *cis*-vaccinate and oleate ($C_{18:1}$), suggesting that both saturated and unsaturated fatty acid synthesis pathways are completely active (Su et al., 1979; Larsen et al., 2005). In contrast, during the encystment process that occurs under some conditions, this bacterium changes its membrane composition, and the phenolic lipids alkylresorcinols and alkylpyrones replace most of the membrane phospholipids (Reusch and Sadoff, 1983). CFAs also increase, constituting 25 % of the acyl groups of the remaining phospholipids (Su et al., 1979).

To start establishing the regulatory network controlling fatty acids metabolism in *A. vinelandii*, we searched for known regulators encoded in its genome. We could not find either *fabR*, *fadR* or *desT* homologs; however, the PsrA regulator is present in this bacterium, where it regulates *rpoS* and its own transcription, the formation of cysts resistant to desiccation (Cocotl-Yañez et al., 2011) and the production of alkylresorcinols through the control of *rpoS* expression (Romero et al., 2013).

The aim of this study was to investigate the role of PsrA in the regulation of fatty acid metabolism in *A. vinelandii*.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains, growth conditions, and DNA methods

Bacterial strains and plasmids used in this work are described in Table A.1 (Supplementary information). The culture medium and growth conditions used were as follows: *A. vinelandii* was grown at 30 °C in Burk's nitrogen-free salts medium (Kennedy and Dean, 1992), supplemented with 2 % sucrose (BS medium). This is a medium for vegetative growth, and although some encystment occurs during late stationary phase, it represents a very low percentage of the cells (only 0.001 % of cysts) (Segura et al., 2009). *E. coli* strains DH5 α (Hanahan, 1983) and TOP10 (Invitrogen) were grown on Luria-Bertani medium (LB) at 37 °C. Antibiotic concentrations used for *A. vinelandii* and *E. coli*, respectively, were as follows ($\mu\text{g mL}^{-1}$): spectinomycin 50 and 50;

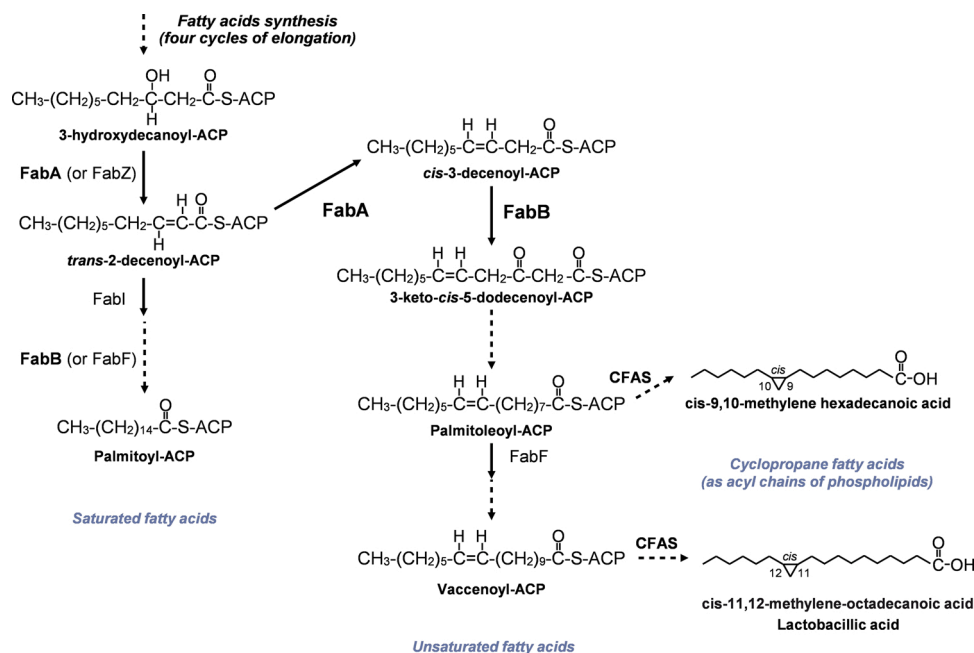


Fig. 1. Model for the unsaturated and cyclopropane fatty acid synthesis in *Azotobacter vinelandii*, based on the *Escherichia coli* model. CFAS: cyclopropane fatty acid synthase.

kanamycin 3 and 30, tetracycline 20 and 10; nalidixic acid 30 was used for *A. vinelandii* and ampicillin 200 was used for *E. coli*. Transformation of *A. vinelandii* competent cells was carried out as previously described (Page and von Tigerstrom, 1978).

The general techniques for the isolation and handling of DNA, agarose and sodium-dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and transformation of *E. coli*, were carried out as previously described (Sambrook et al., 1988). Chromosomal DNA used as template for the PCRs, was obtained from *A. vinelandii* OP wild type (Bush and Wilson, 1959). The sequences of primers used in this work are listed in Table A.2 (Supplementary information).

2.2. Analytical methods

Protein was measured by the method reported by Lowry et al. (1951), using bovine serum albumin (BSA) as standard. The β -glucuronidase activity was measured as described previously (Wilson et al., 1995), 1 U corresponds to 1 nmol of p-nitrophenyl- β -D-glucuronide hydrolyzed per minute per μ g of protein.

For growth quantification, fresh BS medium was inoculated with overnight cultures grown from a single colony, and growth was determined by recording the optical density (OD) of cultures at 600 nm (OD₆₀₀).

The number of viable cells was determined 5 days after the cells reached stationary phase; dilutions were plated onto BS medium plates and CFU were counted after 48 h of incubation at 30 °C.

2.3. Construction of *psrA* and *rpoS* mutant strains

Primers upLexA and lwPsrA were used to amplify a PCR fragment of 1.5 kb containing the complete *psrA* gene of *A. vinelandii*. This fragment was ligated into the pJET1.2/blunt cloning vector (Thermo Fisher Scientific), according to manufacturer's instructions, obtaining plasmid pJETpsrA. To insertionally inactivate the *psrA* gene, a *XhoI* digest of pJETpsrA was ligated to a *XhoI* fragment containing the kanamycin cassette excised from vector pBSL99 (Alexeyev et al., 1995). This new plasmid, named pJETpsrA::Km, was transformed into strain OP. A kanamycin-resistant transformant (PA6psrA), generated by a double recombination event, was isolated and confirmed to carry the *psrA*::Km mutation by PCR analysis using psrAmiguF and dwRT-psrA primers (data not shown).

To complement the *psrA* mutation, plasmid pMpsrAhis, which contains the *psrA* gene of *A. vinelandii* (Cocotl-Yañez et al., 2011), was digested with *ScaI* and ligated to a *SmaI* fragment containing a spectinomycin cassette excised from vector pMP01 (Peralta-Gil et al., 2002). This plasmid, named pBpsrA-sil, was transformed into strain PA6psrA. A kanamycin/spectinomycin-resistant transformant (PA1psrA-sil), generated by a single recombination event, was isolated and confirmed to carry the *psrA* gene under the control of its own promoter by PCR analysis using psrAmiguF and dwRT-psrA primers (data not shown).

To generate an *rpoS* mutant derivative from *A. vinelandii* OP, competent cells were transformed with total DNA obtained from strain JGW-S, which contains a spectinomycin resistance cassette inserted in *rpoS* (Peralta-Gil et al., 2002). A spectinomycin-resistant transformant (S6rpoS), generated by a double recombination event, was isolated and confirmed to carry the *rpoS*::Sp mutation by PCR using primers rpoS-miguF and dwRT-rpoS (data not shown).

2.4. Construction of strains carrying *fabA-gusA* transcriptional fusion

To generate a *fabA-gusA* transcriptional fusion, primers fabABret-F/Primer3'/fabAB were used to amplify a 387 bp DNA fragment containing the promoter region of the *fabA* gene of *A. vinelandii*. This PCR fragment was cloned into the suicide plasmid pUMATcgusAT (Cocotl-Yañez et al., 2014) digested with *SmaI* to obtain plasmid pUMAfabAB. The correct orientation of the *fabA* fragment with respect to the glucuronidase

reporter gene *gusA*, contained in pUMATcgusAT, was verified with restriction mapping and sequencing. As previously reported (Cocotl-Yañez et al., 2014), plasmid pUMATcgusAT allows to insert transcriptional fusions by double recombination into the *melA* gene locus of the chromosome of *A. vinelandii*. Competent cells of the wild type strain OP, and the PA6psrA and S6rpoS mutants, were transformed with this plasmid linearized with *NdeI*. A tetracycline-resistant transformant of each strain was selected, resulting strains OP7gusA, PA626gusA and S66gusA (wild type, *psrA* and *rpoS* mutant derivatives, respectively). The integration of the *fabA-gusA* transcriptional fusion into the *melA* gene locus of these strains was confirmed by PCR analysis using fabABret-F/gusAret primers.

2.5. RNA isolation and reverse transcription (RT)-PCR

Total RNA extraction from *A. vinelandii* OP strain was performed as reported by Barry et al. (1992). The RNA sample was treated with DNase I (Thermo Fisher Scientific), qualitatively analyzed on agarose gels and quantified spectrophotometrically with a NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific).

RT-PCR assay was carried out with the RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific), using 500 ng of total RNA and primer InterfabAB-R was used for the synthesis of cDNA. This cDNA was used as template for a conventional PCR reaction using InterfabAB-F/InterfabAB-R primers. Additionally, a negative control with only DNase-treated RNA as template and a positive control with genomic DNA was included (data not shown).

2.6. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

The expression levels of *fadA* and *fadB2* β -oxidation genes and the *fabA*, *fabY* and *fabD* fatty acid biosynthetic genes were measured by qRT-PCR, as previously reported (Noguez et al., 2008). Cultures of OP and PA6psrA strains were grown in BS medium and the cells were collected after 18, 24 and 40 h of growth. The extraction and treatment with DNase I of the RNA samples were the same described in the previous section. The primers (Table A.2 Supplementary information) were used as follows: *fadA*-F/*fadA*-R for *fadA* expression, *fadB2*-F/*fadB2*-R for *fadB2* expression, *fabA*-F/*fabA*-R for *fabA* expression, *fabD*-F/*fabD*-R for *fabD* expression, 05510-F/05510-R for *fabY* expression, and *fw-gyrA*/*rev-gyrA* for *gyrA* expression (internal control). All assays were performed in triplicate. The data are presented as fold change of mRNA levels of the mutant strains, relative to those of the wild type.

2.7. Purification of His₆-PsrA

To express and purify PsrA, plasmid pMpsrAhis was used in the *E. coli* strain LMG149, as reported by Cocotl-Yañez et al. (2011). Briefly, the expression of the His₆-PsrA protein was induced with 0.2 % of arabinose. Protein purification was performed at 4 °C under non-denaturing conditions using Qiagen Ni-NTA Agarose matrix, as described in the manufacturer's protocol. The protein was concentrated utilizing Microcon YM-10 centrifugal filters (Amicon), aliquoted and stored at 4 °C until use. The protein concentration was determined by the Bio-Rad Protein Assay, following the manufacturer's instructions. BSA was used as standard. SDS-PAGE of the purified protein revealed the expected molecular weight of approximately 27 kD (data not shown).

2.8. DNA gel mobility shift assays

A 244-bp DNA fragment, corresponding to the *fabA* promoter region including the putative PsrA binding site, was amplified by PCR using primers fabABret-F/fabABret-R (Table A.2 Supplementary information). The DNA binding reactions were carried out in a total volume of 20 μ L. The reactions contained the DNA binding buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.65, 100 mM KCl, 0.5 mM DTT, 1 mM EDTA, 5% glycerol

and 10 $\mu\text{g } \mu\text{L}^{-1}$ BSA), 100 nM of each DNA fragment labeled with (α - ^{32}P)-dCTP and variable amounts of P_{srA} (0–4 μM). As a negative control, a 105-bp fragment of DNA corresponding to the structural region of the *fabY* gene (Avin05510) was used. This fragment was obtained by PCR using primers 05510-F/05510-R. The DNA binding reactions were carried out at room temperature for 20 min, and the samples were then subjected to native PAGE in 6% polyacrylamide gels in a buffer containing 90 mM Tris, 90 mM H_3BO_3 and 2 mM EDTA. The gel was dried and the radioactive signals were detected by autoradiography (modified from Cocotl-Yañez et al., 2011).

2.9. Primer extension analysis

To determine the transcription start site of *fabA*, total RNA was isolated from a liquid culture of strain OP grown for 40 h in BS medium. The primer extension reactions were carried out at 42 °C using the oligonucleotide Primer3'/fabAB (Table A.2 Supplementary information) and Avian Myeloblastosis Virus (AMV) reverse transcriptase (Roche). The cDNA was end-labeled with (γ - ^{32}P)-dATP using polynucleotide kinase (Roche). The sequencing ladders were generated with the same primer, a Thermo Sequenase Cycle Sequencing kit (Affymetrix USB) and plasmid pJETSeq1 as template. This plasmid was constructed by cloning into the pJET1.2/blunt cloning vector (Thermo Fisher Scientific), a 1000 bp DNA fragment which contains the *fabA* structural and regulatory regions (amplified using oligonucleotides fabABRet-F/InterfabAB).

2.10. Extraction of total lipids and analysis by one-dimensional thin layer chromatography (TLC)

For total lipids analysis, strains OP, PA6_{psrA} and PA1_{psrA-sil} were grown in BS medium. After 40 or 68 h of growth, cells were harvested by centrifugation, resuspended in 1 mL of water, and lipid extracts were obtained according to the method reported by Bligh and Dyer (1959). Aliquots of the lipid extracts and fatty acid standards (stearic [$\text{C}_{18:0}$] and oleic [$\text{C}_{18:1}$] acid, Sigma) used as controls, were spotted on high-performance silica gel 60 plates (Merck), and resolved by TLC. For TLC analysis, the mobile phase was ethyl acetate-hexane-acetic acid (60:40:5 [v/v/v]), a solvent system which allows to separate polar from non-polar lipids, according with Pech-Canul et al. (2011). The developed TLC plates were stained by placing them in a glass chamber containing iodine vapor, revealing mainly unsaturated compounds (Zbierzak et al., 2011). The stained plates were immediately electronically scanned (Epson Perfection 610 Scanner). In order to distinguish between saturated and unsaturated fatty acids, the TLC plates were stained first with iodine, as it was described above, and subsequently the plates were sprayed with ANS reagent (8-anilino-1-naphthalenesulphonic acid, Sigma) at 0.2 % in methanol. With this reagent, lipids are visualized as fluorescent spots under UV light (366 nm).

2.11. Fatty acid analysis by gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS)

Cultures of 100 mL of strains OP, PA6_{psrA} and PA1_{psrA-sil}, were grown in BS medium for 68 h, harvested by centrifugation and resuspended in 10 mL of water. The lipid extracts were obtained as described above (Bligh and Dyer, 1959). For the quantification of fatty acids, 20 μg of tridecanoic acid ($\text{C}_{13:0}$) were added to each lipid extract as an internal standard. After drying each sample under a nitrogen stream, 300 μL of chloroform-methanol (1:1 [v/v]) were added, together with 500 μL of BF₃-Methanol Alkylation Reagent (Thermo Fisher Scientific). After 10 min of incubation at 60 °C, the reaction was stopped with 1.5 mL of a 5 M NaCl solution. The resulting methyl esters were extracted twice with 1 mL of hexane each time, followed by centrifugation. The upper hexane phases were pooled into a new glass vial and dried under nitrogen stream (Sahonero-Canavesi et al., 2015).

For quantitative analysis, the dried fatty acid methyl esters were

dissolved in 150 μL of hexane and 1 μL was used for GC/MS analysis in a Clarus 600 gas chromatography system coupled to a Clarus 600 T MS instrument. The column used was an Elite 5-MS from Perkin Elmer (length 30 m, ID 0.32 mm). Hydrogen was used as a carrier gas. The program for the gas chromatography was: 140 °C for 6 min, then an increase of 4 °C/minute up to 250 °C and finally hold 5 min at 250 °C. The injector temperature was 250 °C. The different kinds of fatty acids were identified by comparison with bacterial acid methyl esters mix standard (BAME 47080-U, Sigma), using retention times and mass spectral information. The amounts of fatty acid methyl esters were calculated by comparing the areas under the peaks on the chromatogram to the area under the peak of the tridecanoic acid used as an internal standard (Sahonero-Canavesi et al., 2015).

2.12. Statistical analysis

The data were analyzed using GraphPad Prism version 8.2.0 for Windows software. Means and standard deviations (SD) were calculated. The differences between means were assessed using Multiple *t*-test as provided by the GraphPad Prism software. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results and discussion

3.1. The inactivation of *psrA* does not affect expression of *fadA* and *fadB2* β -oxidation genes, but has a negative effect on the expression of the fatty acid biosynthetic genes *fabA* and *fabY*

As mentioned above, in *P. aeruginosa* P_{srA} is a repressor of the β -oxidation operon *fadBA5* and therefore inactivation of *psrA* leads to a constitutive expression of these genes, regardless of the medium composition or the absence or presence of long chain fatty acids (Kang et al., 2008). To determine if P_{srA} has a similar role in the fatty acid catabolism in *A. vinelandii*, a *psrA* mutant, named PA6_{psrA}, was constructed and the expression of the β -oxidation genes *fadA* and *fadB2* was studied. The expression levels of these genes were monitored by RT-qPCR, both in the PA6_{psrA} mutant and the OP wild type parental strain, at 18, 24 and 40 h of incubation on BS medium, corresponding to different growth stages of a condition with no fatty acids added. Contrary to the effect observed in the *psrA* mutant of *P. aeruginosa*, the expression of the fatty acid oxidation genes analyzed was not significantly affected in strain PA6_{psrA}, in comparison to the OP wild type strain (Table 1), indicating that P_{srA} is not a repressor of these genes.

Although P_{srA} has been described as a fatty acid degradation regulator (Kang et al., 2008), we also investigated if P_{srA} could participate in the control of fatty acid biosynthesis under conditions of vegetative growth (growth on carbohydrates), were the cell membranes contain mainly phospholipids, in contrast to encysting cells, which contain

Table 1

Relative mRNA levels of different fatty acid metabolic genes in the PA6_{psrA} mutant strain with respect to the wild type strain OP.

Time (hr)	Relative mRNA levels in the <i>psrA</i> mutant ^a				
	β -oxidation genes		Biosynthetic genes		
	<i>fadA</i>	<i>fadB2</i>	<i>fabA</i>	<i>fabY</i>	<i>fabD</i>
18	0.83 \pm 0.17	0.85 \pm 0.18	0.99 \pm 0.21	0.85 \pm 0.17	1.02 \pm 0.19
24	0.75 \pm 0.2	0.78 \pm 0.16	0.63 \pm 0.22	0.71 \pm 0.14	0.96 \pm 0.25
40	1.00 \pm 0.09	0.83 \pm 0.08	0.72 \pm 0.07	0.65 \pm 0.07	1.08 \pm 0.14

^a The mRNA levels of fatty acid metabolic genes in the PA6_{psrA} mutant are relative to those of the OP strain (expression level 1.0). The values are the mean \pm SD of three independent experiments.

* Significant at $p < 0.05$.

mainly alkylresorcinols and alkylpyrones phenolic lipids (Reusch and Sadoff, 1983; Segura et al., 2009). The transcript levels of three fatty acid biosynthetic genes: *fabA*, *fabY* and *fabD* were also measured by RT-qPCR at different growth stages, in both the wild type strain OP and the *psrA* mutant. At 24 and 40 h of growth (stationary phase), the expression levels of both *fabA* and *fabY* genes were significantly lower in the PA6*psrA* mutant, while there was no change in the expression of the *fabD* gene (Table 1).

Because of its role in UFA biosynthesis, we continued investigating the putative regulation on *fabA*. Therefore, to confirm the effect of the inactivation of *psrA* on *fabA* expression, we introduced a chromosomal transcriptional fusion of the *fabA* promoter region with the reporter gene *gusA* (coding for β -glucuronidase), both in the wild type and the *psrA* mutant backgrounds, to monitor the effect on expression of *fabA*. These strains were named OP7*gusA* and PA626*gusA* respectively. After 42 h of incubation, transcription of the *fabA* gene increased in the wild type strain OP7*gusA* but not in the *psrA* mutant strain PA626*gusA*, a result consistent with that obtained by RT-qPCR at 40 h (Fig. 2 and Table 1).

Because in *A. vinelandii* PsrA positively regulates transcription of *rpoS* (Cocotl-Yañez et al., 2011), which codes for the stationary phase sigma factor, and the effect observed on the expression of *fabA* in the *psrA* mutant was during this growth phase, we studied if this regulation could be exerted through the control of this alternative sigma factor. For this purpose, we constructed an *rpoS* mutant (strain S6*rpoS*) with the chromosomal *fabA-gusA* gene fusion (strain S66*gusA*) and analyzed the effect of the *rpoS* inactivation on *fabA* expression. The results illustrated in Fig. 2 show that the expression level of *fabA* was not significantly affected in the S6*rpoS* mutant, indicating that the regulation of *fabA* by PsrA is not exerted through the PsrA-RpoS regulatory pathway.

3.2. The PsrA protein directly interacts with the regulatory region of the *fabAB* operon

The *fabA* gene is located immediately upstream of *fabB*, both encoding the enzymes involved in the UFA synthesis. An *in silico* analysis of this locus performed with Softberry Fgenesh and BPROM tools (Solovyev and Salamov, 2011), predicted that these genes form a single transcriptional unit putatively transcribed from a σ 70 dependent promoter upstream *fabA*. This was experimentally confirmed by showing the existence of a transcript containing both *fabA* and *fabB* by PCR analysis of the cDNA synthesized from DNase-treated total RNA. A DNA fragment comprising the 3'-end of *fabA* and the 5'-end of *fabB* was obtained (data not shown), confirming that these genes form an operon. The transcription start site of this *fabAB* operon was determined by primer extension analysis (Fig. 3A). This site was located 194 nucleotides upstream from the ATG start codon of *fabA*. Its -10 and -35

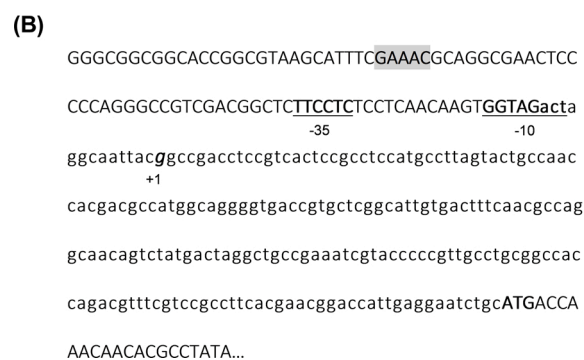
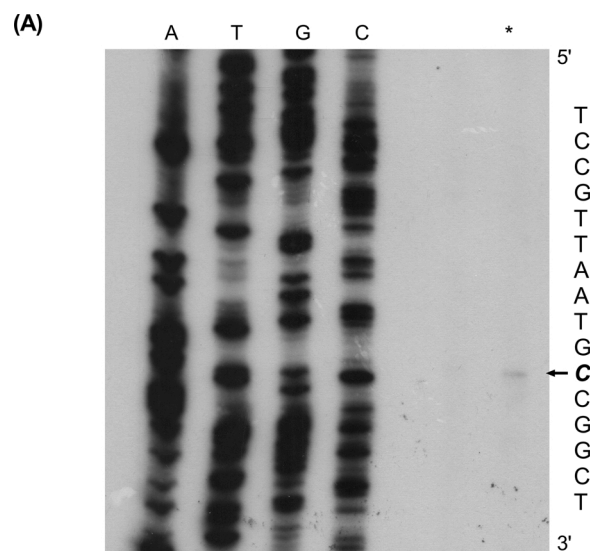


Fig. 3. Analysis of *fabAB* regulatory region. (A) Autoradiography of the primer extension analysis. The transcription start site is indicated with an arrow. (B) Sequence of the *fabAB* promoter region and its genetic regulatory elements. Uppercase bold letters: ATG translational start codon of *fabA*; Lowercase letters: the 5' *fabA* intergenic region; Uppercase letters: sequence of the gene upstream *fabA*; Italic bold: transcription start site (+1); Underlined: -10 and -35 sequences of the σ ⁷⁰ promoter identified; Grey box: the putative sequence recognized by PsrA.

promoter sequences (TTCCTC-N12-TGGTAGACT) (Fig. 3B), correspond with a σ 70 dependent promoter and are in agreement with the *in silico* prediction.

The consensus PsrA binding motif (C/GAAAC N2–4 GTTTG/C) has

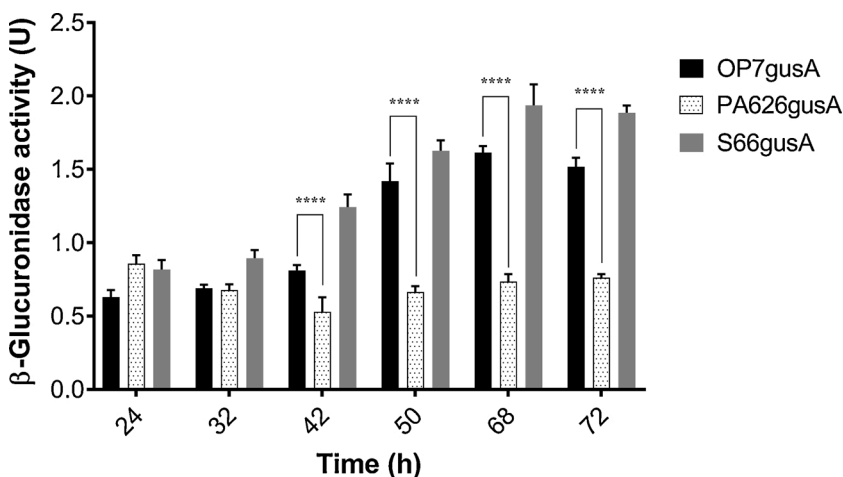


Fig. 2. Effect of *psrA* and *rpoS* mutations on *fabA* expression. Transcription of *fabA* was measured as β -glucuronidase activity (mean \pm SD) of a *fabA-gusA* transcriptional fusion in the wild type OP strain, and mutants PA626*gusA* (*psrA*⁻) and S66*gusA* (*rpoS*⁻). One unit of β -glucuronidase activity corresponds to 1 nmol of substrate (p-nitrophenyl- β -D-glucuronide) hydrolysed per minute per μ g protein. The bars of standard deviation from three independent experiments are shown. Statistical significance is indicated (*****p* < 0.0001).

been determined in *Pseudomonas* spp. (Kojic et al., 2005) and it was identified in the *rpoS* regulatory region of *A. vinelandii* (Cocotl-Yañez et al., 2011). Although no consensus sequence for PsrA binding was identified in the *A. vinelandii* *fabAB* regulatory region, 34 nucleotides upstream from the promoter region identified, the sequence GAAAC was found (Fig. 3B). This sequence is similar to the proposed PsrA binding site (CAAAG) for repression of *psrA* expression in *A. vinelandii* (Cocotl-Yañez et al., 2011). The regulatory regions of *fabY* and *fabD* lack this kind of sequences.

To analyze the possible interaction of PsrA with the putative binding site found in the *fabAB* promoter region, an electrophoretic mobility shift assay (EMSA) was performed. A DNA fragment of 244 bp, containing the PsrA binding site of *fabAB*, was amplified, radioactively labeled and incubated with increasing amounts of purified PsrA-His₆. The mixtures were analyzed on native polyacrylamide gels. As shown in Fig. 4A, the *fabAB* fragment used was shifted. To determine if PsrA binding to the *fabAB* promoter region is specific, the same experiment was performed, but now competing with an unrelated labeled fragment, corresponding to the *A. vinelandii* structural region of the *fabY* gene, which was used as a negative control. As previously observed, the *fabAB* fragment was still able to form protein-DNA complexes, while the

negative control (*fabY*) was not shifted (Fig. 4B). Moreover, competition assays using increasing concentrations of the unlabeled *fabAB* fragment were carried out to confirm the specificity (Fig. 4C). The labeled fragment was displaced, indicating that this binding is specific and that PsrA interacts directly with the upstream regulatory region of the *fabAB* operon. This interaction is in agreement with its putative role as a direct positive regulator of *fabAB* gene expression. The absence of a binding site for PsrA in the regulatory region of *fabD* is in agreement with the lack of effect of the *psrA* mutation. For *fabY*, it is possible that the observed effect is due to an indirect regulation, but this mechanism remains to be elucidated.

3.3. The inactivation of *psrA* modifies the fatty acid metabolism

Considering the positive regulation by PsrA of *fabAB*, the genes coding for the enzymes responsible for the synthesis of UFAs (Fig. 1), an exploratory analysis of total lipids extracts from the wild type strain OP and PA6*psrA* mutant was performed.

Lipid extracts obtained from cultures grown for 68 h of the OP and PA6*psrA* strains were analyzed by one-dimensional TLC (Fig. 5), with a mobile phase consisting of ethyl acetate-hexane-acetic acid (60:40:5) to

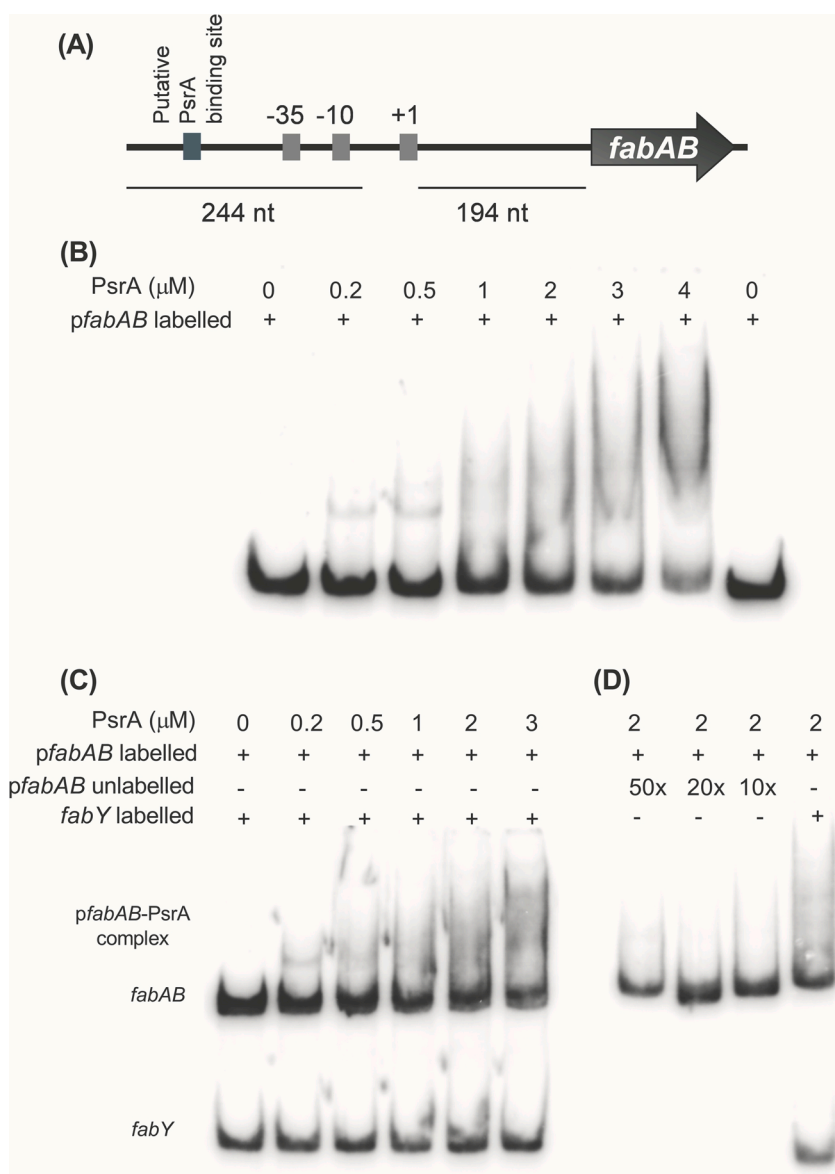


Fig. 4. PsrA specifically binds to the regulatory region of *fabAB*. (A) Schematic representation of the *fabAB* promoter region. The 244 nt DNA fragment used as probe is indicated. (B) Autoradiography of the EMSA analysis of the *fabAB* regulatory region with PsrA: increasing amounts of purified PsrA-His₆ and 100 nM of the radiolabeled *fabAB* fragment were used. (C) Competition with an unrelated labeled fragment (*fabY*) used as a negative control. (D) Competition assays with an excess of the *fabAB* unlabeled fragment.

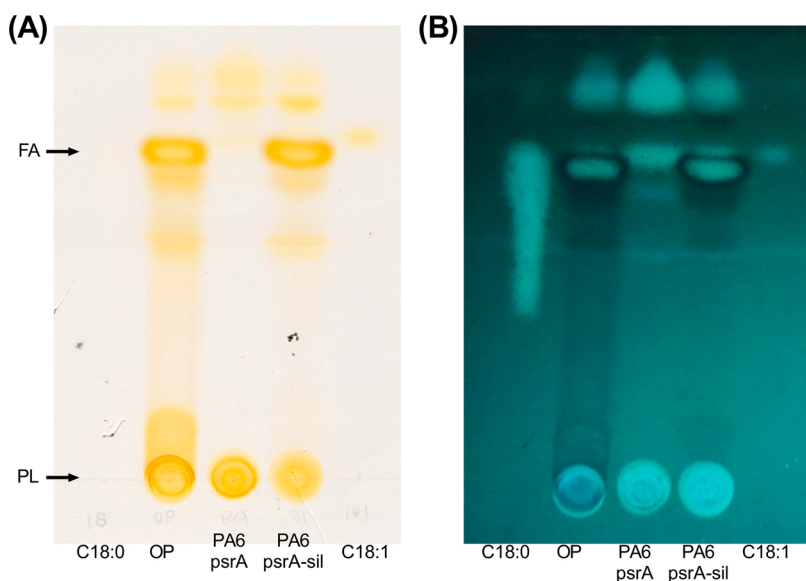
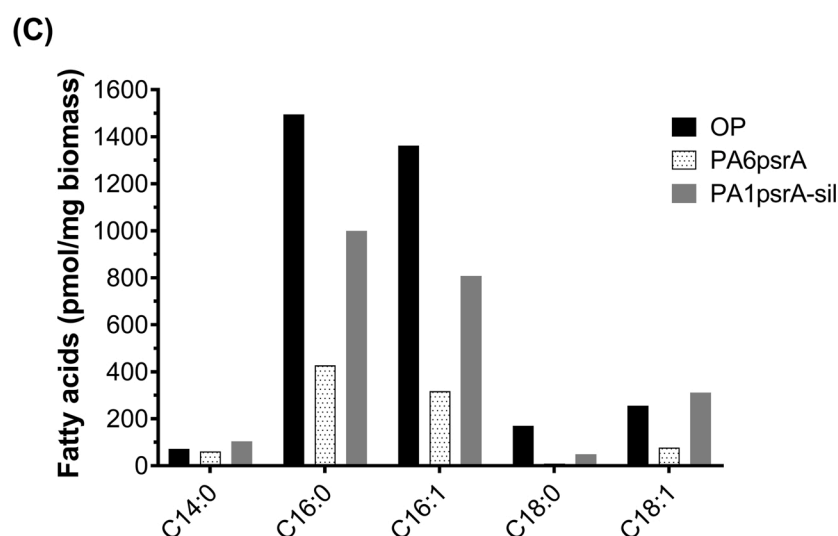


Fig. 5. Chromatographic analyses of total lipids and fatty acids from the wild-type strain OP, the PA6psrA mutant and the complemented strain PA1psrA-sil. Lipids were extracted from cultures grown in BS for 68 h, separated by one-dimensional TLC and revealed with iodine as a first stain (A), and ANS as a second stain (B). Stearic (C_{18:0}) and oleic (C_{18:1}) acids were used as standards of saturated and unsaturated fatty acids. Membrane phospholipids (PL) did not migrate from the origin, and the spot for fatty acids (FA) is indicated. (C) Fatty acids profile determined by GC/MS. For each strain, two independent cultures were analyzed.



allow separation of polar from non-polar lipids (Pech-Canul et al., 2011). Stearic and oleic acids (C₁₈, saturated and unsaturated) were used as fatty acids standards. Because iodine vapor, although unspecific, has higher affinity for unsaturated and aromatic compounds (Zbierzak et al., 2011), the plates were first stained with iodine, to reveal the presence of unsaturated lipids (Fig. 5A), and later with ANS reagent, to observe other hydrophobic molecules, both saturated and unsaturated (Fig. 5B). As expected, oleic acid was stained with iodine, but not the stearic acid standard. Both were visible with ANS. Spots running apparently like UFAs (according to the standards), were diminished in the PA6psrA mutant, and the main differences observed between the wild type strain and mutant PA6psrA were those observed with iodine. Similar results were obtained at 40 h (Fig. A.1 Supplementary information).

In order to demonstrate that the differences observed between the wild type strain and the PA6psrA mutant were due to the inactivation of *psrA*, this mutant was complemented by cointegrating into the chromosome a plasmid containing the wild type allele of *psrA*. The TLC analysis of the lipids produced by this strain, named PA6psrA-sil, showed a reestablishment of the lipid profile observed in the wild type strain (Fig. 5), indicating that the difference observed is due to the inactivation of *psrA*. Considering these results and the previous data

showing the positive regulation of the operon *fabAB* by *PsrA*, we decided to further analyze the content of UFAs.

3.4. The absence of *PsrA* alters the content of UFAs and CFAs

To quantitatively corroborate the differences in the UFA content observed by TLC, we analyzed the content of fatty acids of lipid extracts obtained at 68 h from the different strains through gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC/MS). As shown in Fig. 5C, the UFAs detected were palmitoleic and oleic acids. The amounts of these C_{16:1} and C_{18:1} were lower in the PA6psrA mutant with respect to the wild type strain. The complemented strain PA1psrA-sil showed a partial reestablishment of the content of UFAs.

In addition to the UFAs, the mass spectrometry analysis showed the presence of cyclopropane-C_{17:0} and cyclopropane-C_{19:0} fatty acids in the extracts. As discussed above, CFAs are synthesized from UFAs (Fig. 1). The cyclopropane-C_{17:0} is synthesized from C_{16:1} and the cyclopropane-C_{19:0} from C_{18:1}. An estimation of the percentage of these fatty acids in the extracts (calculated from the recorded areas under the curve, Table 2) showed that they represent almost 24.0 % of the total fatty acids present in the wild type, whereas they were only the 0.7 % in the PA6psrA mutant. Due to their biosynthetic origin, the appearance of

Table 2

Percentage of total fatty acids (saturated, unsaturated and cyclopropane fatty acids) in lipid extracts of wild-type OP, PA6psrA mutant and PA1psrA-sil strains.

Strain	Percentage of total fatty acid composition of <i>A. vinelandii</i> strains						
	SFA			UFA and CFA			
	C _{14:0}	C _{16:0}	C _{18:0}	C _{16:1}	C _{17:0}	C _{18:1}	C _{19:0}
AvOP	1.63	34.02	3.87	30.98	16.43	5.82	7.25
PA6psrA	6.76	47.57	1.06	35.34	0.45	8.59	0.23
PA1psrA-sil	4.36	41.91	2.04	33.86	2.46	13.06	2.31

CFAs in other bacteria occurs at the expense of UFAs (Grogan and Cronan, 1997). Therefore, the lower content of CFAs in the *psrA* mutant is in accordance with the lower content of the precursor UFAs. As expected, the synthesis of these lipids was partially restored (to almost 5 %) in the complemented strain PA1psrA-sil. The overall analysis of the UFA content plus its biosynthetic derivatives CFAs, with respect to the total amount of fatty acids (Table 2) showed a diminished amount of UFAs in the mutant. In the wild type strain, UFAs + CFAs corresponded to 60.48 % of the total, whereas in the PA6psrA mutant the percentage decreased to 44.61 %. The complemented strain PA1psrA-sil showed again partial reestablishment of the UFAs + CFAs content, reaching a 51.96 % (Table 2). These results confirmed those observed by TLC analysis and are in accordance with the negative effect observed on *fabAB* expression in the *psrA* mutant and the binding of P_{srA} to the regulatory region of this operon.

In CFAs-producing bacteria, the formation of these fatty acids occurs during late exponential or stationary phases (Grogan and Cronan, 1997). The presence of CFAs in *A. vinelandii* was first reported by Su et al. (1979), as part of the phospholipid acyl groups remaining in cysts, but not in exponentially growing vegetative cells. Later, Reusch and Sadoff (1983) showed its presence in aging glucose grown cells. Our results show the presence of CFAs during the stationary phase in *A. vinelandii* OP, whose amount is negatively affected by inactivation of *psrA* (Table 2). We propose this is due to the diminished content of the precursor unsaturated fatty acids, although additional regulation by P_{srA} or other unidentified regulatory elements should not be ruled out.

We also found a lower content of saturated fatty acids in the *psrA* mutant (Fig. 5C), suggesting that P_{srA} exerts an additional regulatory effect (direct or indirect) on other fatty acid biosynthetic gene(s), which is in accordance with the slight negative effect observed on *fabY* expression (Table 1). The decrease in *fabY* expression also could be due to an indirect regulatory effect either by RpoS or other regulatory element, but this mechanism remains to be elucidated.

3.5. Disruption of *psrA* reduces cell viability during prolonged growth

The synthesis of UFAs occurs mostly under stress conditions, such as osmotic stress, solvent exposition or low temperature in *P. aeruginosa* (Kondakova et al., 2015). In other bacteria, this synthesis is also increased during the stationary phase of growth. In the case of *Bacillus subtilis*, UFA synthesis has been shown to be important for survival during prolonged growth, since a mutant impaired in this metabolic pathway showed a survival defect during late stationary phase (Aguilar et al., 1998). Regarding CFAs, their synthesis also occurs when bacteria are exposed to adverse environmental conditions (Grogan and Cronan, 1997; Kim et al., 2005) and their presence has been associated with tolerance to high osmotic pressure, high temperature, low pH and nutrient deprivation (Poger and Mark, 2015).

To evaluate whether the growth rate or viability of the *psrA* mutant strain was altered, the OP wild type, the PA6psrA mutant and the complemented PA1psrA-sil strains were cultured in BS medium at 30 °C. Under these conditions, the mutant strain PA6psrA, as well as complemented strain PA1psrA-sil, showed growth rates similar to those of the parental wild type strain OP, as shown in Fig. 6A. Nevertheless, during prolonged growth the lack of P_{srA} affected cell viability: five days after the *psrA* mutant entered into stationary growth phase, its viability was considerably diminished, compared with the wild type. As anticipated, cell viability returned to values similar to those reached by the wild type strain in the complemented strain (Fig. 6B). This is in agreement with the putative role of UFAs, and probably CFAs, on the modification of the properties of the cell membrane for improving viability during the stationary phase in *A. vinelandii* (as in *B. subtilis*), and this is in accordance with the increased expression of *fabAB* during the stationary phase observed in the OP wild type strain (Fig. 2). It is important to point out that this regulation and the changes in the fatty acids composition occur when growing as vegetative cells, as shown here. As aforementioned, in the cell membrane of cells induced to encyst, the phenolic lipids alkylresorcinols and alkylpyrones replace most of the membrane phospholipids (Reusch and Sadoff, 1983; Segura et al., 2020), limiting the importance of the fatty acids composition.

4. Conclusion

Our results demonstrate that P_{srA} plays a role in modulating the content of UFAs and their CFAs derivatives in *A. vinelandii*, by positively regulating the expression of the *fabAB* operon mainly during stationary phase of growth of vegetative cells, and this could be important to keep membrane homeostasis. This regulation is not exerted through the control of the expression of the RpoS sigma factor by P_{srA}, because inactivation of the *rpoS* gene had no effect on the expression of *fabAB*.

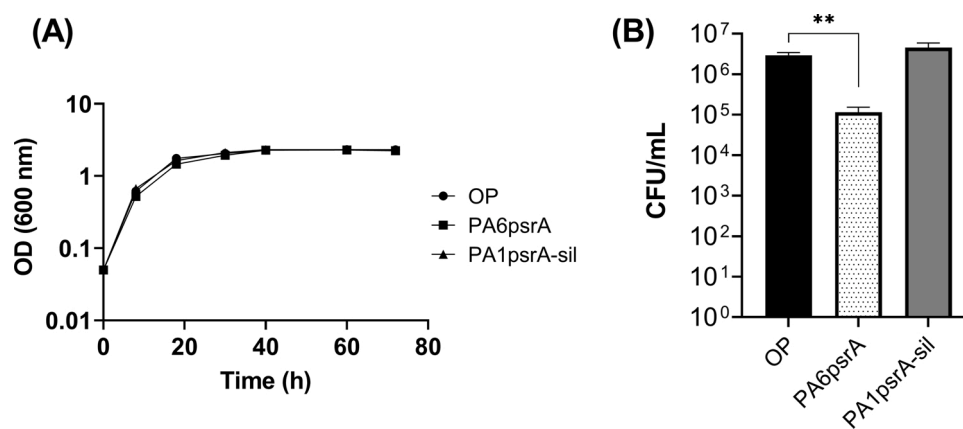


Fig. 6. Absence of *psrA* reduces survival in the stationary growth phase of *A. vinelandii*. Growth curves (A) and number of viable cells (CFU) (B) of the wild type strain OP, the PA6psrA mutant and PA1psrA-sil strain after 5 days. The bars of standard deviation from three independent experiments are shown. Statistical significance is indicated (***p* < 0.01).

The differences observed at the stationary phase in the expression of *fabAB* and in the content of unsaturated and cyclopropane fatty acids, between the wild type and the PA6_{psrA} strains, suggest that *A. vinelandii* increases the synthesis of these compounds with the participation of PsrA to adjust the fluidity of its vegetative cellular membrane when placed under challenging conditions, such as nutrient limitation that occurs during extended growth.

Funding

This work was supported by grants 255158 from Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología and IT200415 from Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica, UNAM. Claudia Velázquez-Sánchez thanks CONACyT for the Ph.D. scholarship number 332593.

Declaration of Competing Interest

The authors report no declarations of interest.

Acknowledgements

We are grateful to Miguel Cocotl-Yañez, Isabel M. López-Lara and Elva Y. Quiroz-Rocha for critical discussions on this work.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126775>.

References

- Aguilar, P.S., Cronan, J.E., De Mendoza, D., 1998. A *Bacillus subtilis* gene induced by cold shock encodes a membrane phospholipid desaturase. *J. Bacteriol.* 180 (8), 2194–2200.
- 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.
- Barry, T., Geary, S., Hannify, S., Macgearailt, C., Shaloo, M., Heery, D., Gannon, F., Powell, R., 1992. Rapid mini-preparations of total RNA from bacteria. *Nucleic Acids Res.* 20 (18), 4940.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method for total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* 37 (8), 911–917.
- Bush, J.A., Wilson, P.W., 1959. A non-gummy chromogenic strain of *Azotobacter vinelandii*. *Nature* 184 (4683), 381.
- Campbell, J.W., Cronan, J., 2001. *Escherichia coli* FadR positively regulates transcription of the *fabB* fatty acid biosynthetic gene. *J. Bacteriol.* 183 (20), 5982–5990.
- Cocotl-Yañez, M., Sampieri, A., Moreno, S., Núñez, C., Castañeda, M., Segura, D., Espín, G., 2011. Roles of RpoS and PsrA in cyst formation and alkylresorcinol synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology* 157 (Pt 6), 1685–1693.
- Cocotl-Yañez, M., Moreno, S., Encarnación, S., López-Pliego, L., Castañeda, M., Espín, G., 2014. A small heat-shock protein (Hsp20) regulated by RpoS is essential for cyst desiccation resistance in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiol. (United Kingdom)* 160 (Pt 3), 479–487.
- Grogan, D.W., Cronan, J.E., 1997. Cyclopropane ring formation in membrane lipids of bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61 (4), 429–441.
- Hanahan, D., 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* 166 (4), 557–580.
- Henry, M.F., Cronan, J.E., 1992. A new mechanism of transcriptional regulation: release of an activator triggered by small molecule binding. *Cell* 70 (4), 671–679.
- Kang, Y., Nguyen, D.T., Son, M.S., Hoang, T.T., 2008. The *Pseudomonas aeruginosa* PsrA responds to long-chain fatty acid signals to regulate the *fadBA5* β -oxidation operon. *Microbiology* 154 (Pt 6), 1584–1598.
- Kang, Y., Lunin, V.V., Skarina, T., Savchenko, A., Schurr, M.J., Hoang, T.T., 2009. The long-chain fatty acid sensor, PsrA, modulates the expression of *rpoS* and the type III secretion *exsCEBA* operon in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 73 (1), 120–136.
- Kennedy, C., Dean, D., 1992. The *nifU*, *nifS* and *nifV* gene products are required for activity of all three nitrogenases of *Azotobacter vinelandii*. *MGG Mol. Gen. Genet.* 231 (3), 494–498.
- Kim, B.H., Kim, S., Kim, H.G., Lee, J., Lee, I.S., Park, Y.K., 2005. The formation of cyclopropane fatty acids in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Microbiology* 151 (1), 209–218.
- Kojic, M., Venturi, V., 2001. Regulation of *rpoS* gene expression in *Pseudomonas*: involvement of a TetR family regulator. *J. Bacteriol.* 183 (12), 3712–3720.
- Kojic, M., Aguilar, C., Venturi, V., 2002. TetR family member PsrA directly binds the *Pseudomonas rpoS* and *psrA* promoters. *J. Bacteriol.* 184 (8), 2324–2330.
- Kojic, M., Jovcic, B., Vindigni, A., Odreman, F., Venturi, V., 2005. Novel target genes of PsrA transcriptional regulator of *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* 246 (2), 175–181.
- Kondakova, T., D'Heygère, F., Feuilloley, M.J., Orange, N., Heipieper, H.J., DuclairroirPoc, C., 2015. Glycerophospholipid synthesis and functions in *Pseudomonas*. *Chem. Phys. Lipids*. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2015.06.006>.
- Larsen, A., Sliskovic, I., Juric, D., Pinnock, C.L., Kullman, H., Segstro, E., Reinfelds, G., Eze, M.O., 2005. The fatty acid profile of vegetative *Azotobacter vinelandii* ATCC 12837: growth phase-dependence. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68 (4), 548–553.
- López-Lara, I.M., Soto, M.J., 2019. Fatty acid synthesis and regulation. In: Geiger, O. (Ed.), *Biogenesis of Fatty Acids, Lipids and Membranes. Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-50430-8_26.
- Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the folin. *J. Biol. Chem.* 193 (1), 265–275.
- Noguez, R., Segura, D., Moreno, S., Hernandez, A., Juarez, K., Espín, G., 2008. Enzyme INtr, NPR and IANtr are involved in regulation of the poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 15 (4), 244–254.
- Page, W.J., Von Tigerstrom, M., 1978. Induction of transformation competence in *Azotobacter vinelandii* iron-limited cultures. *Can. J. Microbiol.* 24 (12), 1590–1594.
- Parsons, J.B., Rock, C.O., 2013. Bacterial lipids: metabolism and membrane homeostasis. *Prog. Lipid Res.* 52 (3), 249–276.
- Pech-Canul, A., Nogales, J., Miranda-Molina, A., Álvarez, L., Geiger, O., Soto, M.J., López-Lara, I.M., 2011. FadD is required for utilization of endogenous fatty acids released from membrane lipids. *J. Bacteriol.* 193 (22), 6295–6304.
- Peralta-Gil, M., Segura, D., Guzmán, J., Servín-González, L., Espín, G., 2002. Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *J. Bacteriol.* 184 (20), 5672–5677.
- Poger, D., Mark, A.E., 2015. A ring to rule them all: the effect of cyclopropane fatty acids on the fluidity of lipid bilayers. *J. Phys. Chem. B* 119 (17), 5487–5495.
- Reusch, R.N., Sadoff, H.L., 1983. Novel lipid components of the *Azotobacter vinelandii* cyst membrane. *Nature* 302 (5905), 268–270.
- Romero, Y., Moreno, S., Guzmán, J., Espín, G., Segura, D., 2013. Sigma factor RpoS controls alkylresorcinol synthesis through ArpR, a LysR-type regulatory protein, during encystment of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 195 (8), 1834–1844.
- Sahonero-Canavesi, D.X., Sohlenkamp, C., Sandoval-Calderón, M., Lamsa, A., Pogliano, K., López-Lara, I.M., Geiger, O., 2015. Fatty acid-releasing activities in *Sinorhizobium meliloti* include unusual diacylglycerol lipase. *Environ. Microbiol.* 17 (9), 3391–3406.
- Sambrook, J., Maniatis, T., Fritsch, E.F., 1988. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edition. Cold Spring Harb., New York.
- Segura, D., Vite, O., Romero, Y., Moreno, S., Castañeda, M., Espín, G., 2009. Isolation and characterization of *Azotobacter vinelandii* mutants impaired in alkylresorcinol synthesis: alkylresorcinols are not essential for cyst desiccation resistance. *J. Bacteriol.* 191 (9), 3142–3148.
- Segura, D., Núñez, C., Espín, G., 2020. *Azotobacter* cysts. eLS, ed. John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000295.pub3>.
- Setubal, J.C., Dos Santos, P., Goldman, B.S., Ertesvåg, H., Espín, G., Rubio, L.M., Valla, S., Almeida, N.F., Balasubramanian, D., Cromes, L., Curatti, L., Du, Z., Gody, E., Goodner, B., Hellner-Burris, K., Hernandez, J.A., Houmiel, K., Imperial, J., Kennedy, C., Larson, T.J., Latreille, P., Ligon, L.S., Lu, J., Mærk, M., Miller, N.M., Norton, S., O'Carroll, I.P., Paulsen, I., Raulfs, E.C., Roemer, R., Rosser, J., Segura, D., Slater, S., Stricklin, S.L., Studholme, D.J., Sun, J., Viana, C.J., Wallin, E., Wang, B., Wheeler, C., Zhu, H., Dean, D.R., Dixon, R., Wood, D., 2009. Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobic specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *J. Bacteriol.* 191 (14), 4534–4545.
- Shen, D.K., Filopon, D., Kuhn, L., Polack, B., Toussaint, B., 2006. PsrA is a positive transcriptional regulator of the type III secretion system in *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 74 (2), 1121–1129.
- SolovyeV, V., Salamov, A., 2011. Automatic annotation of microbial genomes and metagenomic sequences. in: *metagenomics and its Applications in Agriculture*. Biomed. Environ. Stud. 2011, 61–78.
- Su, C.J., Reusch, R., Sadoff, H.L., 1979. Fatty acids in phospholipids of cells, cysts, and germinating cysts of *Azotobacter vinelandii*. *J. Bacteriol.* 137 (3), 1434–1436.
- Subramanian, C., Rock, C.O., Zhang, Y.M., 2010. DesT coordinates the expression of anaerobic and aerobic pathways for unsaturated fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 192 (1), 280–285.
- Wells, G., Palethorpe, S., Pesci, E.C., 2017. PsrA controls the synthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* quinolone signal via repression of the FadE homolog, PA0506. *PLoS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189331>.
- Wilson, K.J., Sessitsch, A., Corbo, J.C., Giller, K.E., Akkermans, A.D.L., Jefferson, R.A., 1995. β -glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other gram-negative bacteria. *Microbiology* 141 (Pt 7), 1691–1705.
- Yuan, Y., Sachdeva, M., Leeds, J.A., Meredith, T.C., 2012. Fatty acid biosynthesis in *Pseudomonas aeruginosa* is initiated by the *fabY* class of β -ketoacyl acyl carrier protein synthases. *J. Bacteriol.* 194 (19), 5171–5184.
- Zbierzak, A.M., Dörmann, P., Hölzl, G., 2011. Analysis of lipid content and quality in Arabidopsis plastids. *Methods Mol. Biol.* 775, 411–426.

- Zhang, Y.M., Zhu, K., Frank, M.W., Rock, C.O., 2007. A *Pseudomonas aeruginosa* transcription factor that senses fatty acid structure. *Mol. Microbiol.* 66 (3), 622–632.
- Zhu, K., Choi, K.H., Schweizer, H.P., Rock, C.O., Zhang, Y.M., 2006. Two aerobic pathways for the formation of unsaturated fatty acids in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* 60 (2), 260–273.
- Zhu, K., Zhang, Y.M., Rock, C.O., 2009. Transcriptional regulation of membrane lipid homeostasis in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 284 (50), 34880–34888.