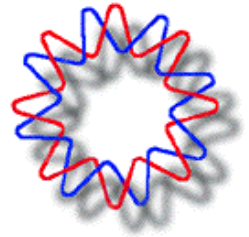




**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**Estudio del efecto del hierro e identificación de intermediarios del
sistema PTS^{Ntr} en la regulación de la acumulación de
Poli- β -hidroxibutirato en *Azotobacter vinelandii***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
PRESENTA LUIS FELIPE MURIEL MILLÁN**

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ELDA GUADALUPE ESPÍN OCAMPO

CUERNAVACA, MORELOS, DICIEMBRE 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se llevo a cabo en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el Departamento de Microbiología Molecular, bajo la dirección de la Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo.

DEDICATORIA:

A mis padres Luz Dary, Jairo, hermanos Diana y Carlos, a mis abuelos y tíos quienes han creído en mí y me han brindado su apoyo de manera incondicional.

A Leidy quien me ha brindado su amor, amistad y apoyo en todo momento.

A mi hija Itzel quien ha llenado nuestras vidas de felicidad.

AGRADECIMIENTOS:

A la doctora Elda Guadalupe Espín por permitirme hacer parte de su grupo, por su excelente dirección, compartir su conocimiento y brindarme su confianza.

A Soledad Moreno por su apoyo y compartir conmigo su conocimiento y experiencia en el trabajo de laboratorio.

A los doctores Mario Soberón Chaves y Victor Humberto Bustamante quienes hicieron parte de mi comité tutorial y me brindaron sugerencias y comentarios que contribuyeron a la realización del presente trabajo.

Al jurado evaluador compuesto por:

Dr. Guillermo Gosset Lagarda

Dr. David Romero Camarena

Dr. Alejandro García de los Santos

Dra. Claudia Martínez Anaya

Dra Katy Juarez López

por sus comentarios y recomendaciones para la culminación del presente trabajo.

A cada uno de los integrantes del grupo: Dra. Cinthia Núñez, Dr. Daniel Segura, Dra. Mildred Castellanos M. en C. José Alberto Hernández, M. en C. Josefina Guzmán, M en C. Yanet Romero, M en C. Miguel Cocotl, M. en C. Miguel Mejía, M. en C. Claudia Velásquez, Elva Quiroz, Armando Hernández, Libertad Adaya, M. en C. Adán Trejo, Ramses Gallegos, Pablo Canales, Adolfo Cosme, Eduardo Juárez; por su apoyo, amistad y hacer del laboratorio un lugar agradable.

A los "Merinos": M. en C. María Luisa Tabche, Dr. Mario Martínez, M en C. Christian Martínez, Zuemy Rodríguez y José Luis Rodríguez por su amistad.

A mis amigos: Mauro, Paulo, Shirley, Pablo, Oscar, Billy y James por su apoyo.

A CONACYT por el apoyo económico para mis estudios de posgrado.

CONTENIDO

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Los Poli-Hidroxicanoatos como una alternativa a los plásticos convencionales.	1
1.2. <i>Azotobacter vinelandii</i> sintetiza Poli- β -Hidroxibutirato.	3
2. ANTECEDENTES.....	6
2.1. Regulación genética de la síntesis de PHB en <i>A. vinelandii</i>	6
2.2. El Sistema fosfotransferasa relacionado a nitrógeno (PTS ^{Ntr}) regula la síntesis de PHB en <i>A. vinelandii</i>	7
2.3. El sRNA ArrF y su relación con la síntesis de PHB en <i>A. vinelandii</i>	11
3. HIPÓTESIS	16
3.1. Hipótesis primera parte.	16
3.2. Hipótesis segunda parte.	16
4. OBJETIVOS	17
4.1. Objetivo generales.....	17
4.1.1. Objetivo general primera parte	17
4.1.2. Objetivo general segunda parte.....	17
4.2. Objetivos específicos	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
5.1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados.....	18
5.2. Condiciones de crecimiento para <i>A. vinelandii</i> y <i>E. coli</i>	20
5.3. Purificación de DNA cromosomal de <i>A. vinelandii</i>	20
5.4. Purificación de RNA total de <i>A. vinelandii</i>	21
5.5. Construcción de cepas mutantes de <i>A. vinelandii</i>	22

5.6. Mutagénesis al azar con el transposón mini-Tn5 de las cepas <i>A. vinelandii</i> UW $ptsP^-$ y <i>phbR^-</i>	23
5.7. Identificación de genes interrumpidos por el transposón mini-Tn5.	25
5.8. Determinación de la expresión relativa de los genes <i>phbR</i> , <i>phbB</i> , <i>arrF</i> y <i>sodB</i>	26
5.9. Cuantificación de PHB.....	27
5.10. Determinación de la producción de alquilresorcinolos.	27
5.11. Cuantificación de la actividad β -glucuronidasa de las fusiones transcripcionales y traduccionales de <i>phbB::gusA</i> y <i>phbR::gusA</i>	28
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN PRIMERA PARTE.....	29
6.1 La limitación de hierro aumenta la síntesis de PHB y la transcripción de <i>phbBAC</i> en <i>A. vinelandii</i> UW136.....	29
6.2 La limitación de hierro activa la expresión de <i>phbR</i> a nivel postranscripcional.....	33
6.3 ArrF regula positivamente la expresión de <i>phbR</i> a nivel postranscripcional.	35
6.4. ArrF no es la única vía por la cual el hierro regula la síntesis de PHB en <i>A. vinelandii</i>	38
7. CONCLUSIONES PRIMERA PARTE	39
8.RESULTADOS Y DISCUSIÓN SEGUNDA PARTE	40
8.1. Mutagénesis al azar en las cepas <i>A. vinelandii</i> UW136 $ptsP^-$ y UW136 <i>phbR^-</i>	40
8.2. Una mutación en el gen <i>oprI</i> disminuye la acumulación de PHB en <i>A. vinelandii</i> UW136.	43
8.3. La mutación en <i>clpA</i> revierte parcialmente la acumulación de PHB en la cepa <i>A. vinelandii ptsP^-</i>	44
8.4. La mutación en <i>clpP</i> ejerce un efecto positivo mayor que la mutación en <i>clpA</i> sobre la síntesis de PHB en la cepa <i>A. vinelandii ptsP^-</i>	46
8.5. El sistema PTS ^{Ntr} regula la síntesis de alquilresorcinolos en <i>A. vinelandii</i> y una mutación en <i>clpP</i> revierte el fenotipo de la cepa <i>ptsP^-</i>	47

8.6. Relación entre el sistema PTS ^{Ntr} y la proteasa ClpP en la regulación de la síntesis de PHB y alquilresorcinoles en <i>A. vinelandii</i>	49
9. CONCLUSIONES SEGUNDA PARTE	52
10. PERSPECTIVAS.....	52
11. REFERENCIAS	53
12. APENDICE.....	57

FIGURAS

Figura 1. Estructura química de los PHA.	2
Figura 2. Fotografía electrónica de una célula de <i>A. vinelandii</i> UW136.	4
Figura 3. Biosíntesis de PHB en <i>A. vinelandii</i>	4
Figura 4. Organización del operón <i>phbBAC</i> y <i>phbR</i> en <i>A. vinelandii</i>	6
Figura 5. Sistema PTS ^{Ntr}	8
Figura 6. Niveles de PHB en cepas mutantes del sistema PTS ^{Ntr}	9
Figura 7. Mecanismo de regulación del sRNA RyhB de <i>E. coli</i>	12
Figura 8. Fenotipo de opacidad (acumulación de PHB) de las cepas <i>A. vinelandii</i> UW136, <i>ptsP⁻</i> , <i>arrF</i> y <i>ptsP⁻-arrF</i>	15
Figura 9. Modelo hipotético de la regulación del sistema PTS ^{Ntr} sobre la expresión de <i>phbB</i> y <i>phbR</i>	16
Figura 10. PCR recombinante de tres piezas para la creación de las mutantes en <i>arrF</i>	23
Figura 11. Acumulación de PHB en <i>A. vinelandii</i> crecida en medio BS con exceso y limitación de hierro.	30
Figura 12. Expresión relativa de <i>phbR</i> , <i>phbB</i> , <i>arrF</i> y <i>sodB</i> en <i>A. vinelandii</i> UW136 crecida en BS con limitación y exceso de hierro.	31
Figura 13. Actividad β-glucuronidasa de fusiones transcripcional y traduccional <i>phbB::gusA</i> en medio con exceso y limitación de hierro.	32
Figura 14. Actividad β-glucuronidasa de fusiones transcripcional y traduccional <i>phbR::gusA</i> en medio con exceso y limitación de hierro.	34
Figura 15. Niveles de expresión de <i>phbR</i> y <i>phbB</i> en las cepas <i>A. vinelandii</i> UW136 y <i>arrF</i>	36
Figura 16. Actividad β-glucuronidasa de las fusiones transcripcional y traduccional <i>phbR::gusA</i> en las cepas UW136 y <i>arrF</i>	37
Figura 17. Cinética de acumulación de PHB en <i>A. vinelandii</i> UW136 y <i>arrF</i> en medio BS con exceso y limitación de hierro.	38
Figura 18. Alineamiento de ClpA de <i>A. vinelandii</i> , <i>P. aeruginosa</i> y <i>E. coli</i>	42
Figura 19. Alineamiento de OprI de <i>A. vinelandii</i> y <i>P. aeruginosa</i>	43

Figura 20. Fenotipo de opacidad y acumulación de PHB de las cepas <i>A. vinelandii</i> UW136 y <i>oprI</i>	44
Figura 21. Fenotipo de opacidad y acumulación de PHB de las cepas <i>A. vinelandii</i> UW136, <i>ptsP</i> ⁻ , <i>clpA</i> ⁻ y <i>ptsP</i> ⁻ <i>clpA</i> ⁻	45
Figura 22. Mecanismo de reconocimiento y degradación de sustratos por ClpP.	46
Figura 23. Fenotipo de opacidad y acumulación de PHB de las cepas <i>A. vinelandii</i> UW136, <i>ptsP</i> ⁻ , <i>clpP</i> ⁻ y <i>ptsP</i> ⁻ <i>clpP</i> ⁻	47
Figura 24. Fenotipo de producción de alquilresorcinolos en cepas de <i>A. vinelandii</i>	49
Figura 25. Modelo hipotético de la regulación del sistema PTS ^{Ntr} y ClpP sobre la expresión de <i>phbR</i> , <i>phbBAC</i> y <i>arsR</i>	51

TABLAS

Tabla 1. Comparación de los fenotipos y blancos asociados al sistema PTS ^{Ntr} y el sRNA ArrF en <i>A. vinelandii</i>	14
Tabla 2. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo.	18
Tabla 3. Mutagénesis al azar en las cepas <i>A. vinelandii</i> UW136 <i>ptsP</i> ⁻ y <i>phbR</i> ⁻	40

RESUMEN

Azotobacter vinelandii es una gammaproteobacteria de vida libre, quimiorganotrófica, capaz de fijar nitrógeno en condiciones aeróbicas y de resistir a la desecación mediante un proceso de diferenciación a quiste, en el cual se sustituyen los fosfolípidos de la membrana por lípidos fenólicos denominados alquilresorcinoles. También tiene la capacidad de sintetizar Poli- β -Hidroxibutirato (PHB), el cual es un poliéster de interés industrial para la producción de plástico biodegradable. Los genes que codifican para las enzimas de la biosíntesis de PHB se organizan en el operón *phbBAC* y corriente arriba del mismo y de manera divergente se encuentra el gen *phbR*, el cual codifica para la proteína PhbR, un regulador positivo de la transcripción de *phbBAC*. En nuestro grupo previamente se ha identificado que el sistema PTS^{Ntr}, el cual es homólogo al sistema PTS de carbohidratos, regula la síntesis de PHB, fijación de nitrógeno y expresión de la superóxido dismutasa SodB en *A. vinelandii*. PTS^{Ntr} está conformado por las proteínas EI^{Ntr}, Npr y IIA^{Ntr}, las cuales son codificadas por los genes *ptsP*, *ptsO* y *ptsN* respectivamente. Existe evidencia que sugiere que la proteína IIA^{Ntr} no fosforilada (como se presenta en las mutantes *ptsP*⁻ y *ptsO*⁻) regula de manera negativa la síntesis de PHB mediante la inhibición de la expresión de *phbB* y *phbR* a través de uno o más intermediarios desconocidos hasta el momento.

Por otro lado, recientemente fue reportado que el RNA pequeño ArrF, el cual es homólogo a PrrF1 y PrrF2 de *Pseudomonas aeruginosa* y análogo a RyhB de *Escherichia coli*, ejerce un efecto negativo sobre la expresión de *phbB*, *phbR*, *sodB* y de *feSII*, siendo este último codificante de la proteína FeSII la cual confiere protección a la nitrogenasa. Estos RNAs están asociados al metabolismo de hierro en bacterias y su expresión es reprimida en presencia de altos niveles del metal. Debido a que el sistema PTS^{Ntr} y ArrF comparten blancos de regulación, se planteó una hipótesis inicial en la cual el posible intermediario era ArrF, sin embargo diferente a lo reportado, nuestra cepa mutante en *arrF* presentó una disminución en la síntesis de PHB, por lo tanto dicha hipótesis fue descartada. Es conocido que la limitación de hierro aumenta la acumulación de PHB en *A. vinelandii*, sin embargo se desconoce el mecanismo por el cual esto sucede. Debido a que ArrF tiene un efecto sobre el PHB y su expresión responde a los niveles de hierro, en el presente trabajo se propuso caracterizar el efecto del hierro y de ArrF sobre la síntesis de PHB y la expresión de *phbB* y *phbR*, mediante RT-PCR tiempo real y fusiones con el gen reportero *gusA*. Adicionalmente con el fin de identificar intermediarios del sistema PTS^{Ntr} en la regulación de la síntesis de PHB, se realizó una mutagénesis al azar con el mini-Tn5 en la cepa *ptsP*⁻ para obtener mutantes candidatas con restauración en la síntesis de PHB. Los experimentos realizados permitieron identificar que la limitación de hierro y ArrF regulan positivamente la expresión de *phbR* a nivel postranscripcional. Por otro lado se identificó que el sistema PTS^{Ntr} también regula la síntesis de alquilresorcinoles. La mutagénesis al azar permitió identificar que una mutación en el gen *clpP*, restaura parcialmente el fenotipo de PHB y aparentemente de manera completa el de alquilresorcinoles en la cepa *ptsP*.

SUMMARY

Azotobacter vinelandii is a free-living Gammaproteobacterium, chemoorganotrophic, which can fix nitrogen in aerobic conditions and able to resist to desiccation through a differentiation process to form cysts. In this process, the membrane phospholipids are replaced by phenolic lipids called alkylresorcinols. *A. vinelandii* also is able to synthesize poly- β -hydroxybutyrate (PHB), which is a polyester of industrial interest to production of biodegradable plastic.

The genes coding for enzymes of PHB biosynthesis are organized in the *phbBAC* operon and *phbR* gene, located upstream and opposite direction to *phbB*, encodes a transcriptional activator of *phbBAC*. In our group has been previously identified that PTS^{Ntr} system, which is homologous to the carbohydrate PTS system, regulates the PHB synthesis, nitrogen fixation and expression of SodB superoxide dismutase in *A. vinelandii*. PTS^{Ntr} consists of EI^{Ntr}, NPr and IIA^{Ntr} proteins, which are encoded by *ptsP*, *ptsO* and *ptsN* genes, respectively. There is evidence that suggests that non-phosphorylated protein IIA^{Ntr} (present in the *ptsP*⁻ and *ptsO*⁻ mutants) negatively regulates the PHB synthesis, inhibiting the expression of *phbB* and *phbR* through one or more intermediaries unknown at moment.

On the other hand, there was recently reported the ArrF small RNA, which is homologous to *Pseudomonas aeruginosa* PrrF1 and PrrF2 and analogous to *Escherichia coli* RyhB, has a negative effect on the expression of *phbB*, *phbR*, *sodB* and *feSII* (this last encodes the FeSII protein, which confers protection to nitrogenase). These RNAs are associated with iron metabolism in bacteria and their expressions are repressed in the presence of high levels of metal. Because the system PTS^{Ntr} and ArrF share targets, an initial hypothesis was proposed in which the possible intermediary was ArrF, however different those reported, our *arrF* mutant strain showed a decrease in the PHB synthesis, therefore this hypothesis was discarded. It is known that iron limitation increases the PHB accumulation in *A. vinelandii*, however the mechanism by which this happens is unknown. Due to ArrF has an effect on the PHB and its expression responds to iron levels, in the present study was proposed to characterize the effect of iron and ArrF on the PHB synthesis and *phbB* and *phbR* expression by RT- real-time PCR and fusions with *gusA* reporter gene. Additionally, in order to identify intermediaries of PTS^{Ntr} system in the regulation of PHB synthesis, we performed a random mutagenesis with mini-Tn5 in *ptsP*⁻ strain to obtain new candidate mutants with restoration in the PHB synthesis. The experiments allowed identifying that iron limitation and ArrF positively regulated the *phbR* expression at the post-transcriptional level. On the other hand it was found that PTS^{Ntr} system also regulates the alkylresorcinols synthesis. Random mutagenesis allowed identifying that a *clpP* mutation, in the *ptsP*⁻ mutant, partially restored the PHB phenotype and apparently in full the alkylresorcinols phenotype.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Los Poli-Hidroxicanoatos como una alternativa a los plásticos convencionales.

Los plásticos son materiales altamente versátiles, de bajo costo, fuertes, durables y resistentes a la corrosión. Los plásticos convencionales son producidos a partir de monómeros derivados del petróleo, siendo resistentes a la degradación en el medio ambiente. La producción global de plástico convencional aumentó de menos de un millón de toneladas producidas en el año 1950 a 230 millones de toneladas en el 2009, lo cual refleja el gran consumo que ha tenido el plástico desde su invención (Thompson *et al.*, 2009b).

La durabilidad y el aumento del uso del plástico han llevado al problema de la disposición final de sus residuos (Thompson *et al.*, 2009a). Varias estrategias han sido implementadas para la disminución de estos y su impacto negativo sobre el medio ambiente, como la reducción del uso, el reuso, el reciclaje y la producción de plástico a partir de polímeros biodegradables como el ácido poliláctico y los poli-hidroxicanoatos (PHAs), siendo estos últimos producidos por plantas y microorganismos (Song *et al.*, 2009).

Los PHAs constituyen una familia de poliésteres con una estructura general presentada en la figura 1. Los PHAs se dividen en tres clases de acuerdo al número de carbonos presentes en un monómero, Los de cadena corta (sclPHAs) que van de C_3 a C_5 , PHAs de cadena media (mclPHAs) de C_6 - C_{14} y los de cadena larga (lclPHAs) $>C_{14}$ (Zinn *et al.*, 2001). El poli- β -Hidroxi-butorato (PHB) presenta un grupo CH_3 en la posición *R* (figura 1) siendo un sclPHA, el cual ha sido ampliamente estudiado y aplicado para la producción de plástico biodegradable (Zinn *et al.*, 2001).

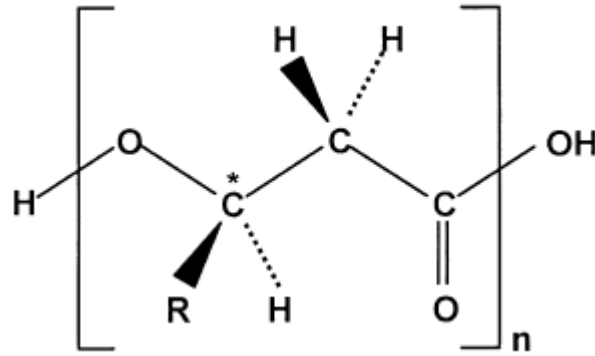


Figura 1. Estructura química de los PHA.
Tomado de Zinn *et al.*, 2001.

Las propiedades físicas del PHB son similares a las de los plásticos convencionales como el polipropileno, con la ventaja que los plásticos producidos a partir de PHB pueden ser degradados por microorganismos presentes en el ambiente (que contienen enzimas PHB hidrolasas y depolimerasas), en un periodo de tiempo que varía de pocos meses a años (Verlinden *et al.*, 2007). A nivel industrial, el PHB ha sido empleado en la producción de plásticos biodegradables para envolturas de alimentos, envases para cosméticos, etc. También se ha descrito la aplicabilidad de PHB en la producción de dispositivos médicos como válvulas cardiacas, tornillos para fijación interna, transportadores internos de medicamentos, etc (Grage *et al.*, 2009, Zinn *et al.*, 2001).

A pesar que los plásticos producidos a partir de PHA son una buena alternativa a los plásticos derivados del petróleo, su costo actual de producción es de 5 a 10 veces más, sin embargo en la última década la fabricación de plástico biodegradable ha aumentado y se espera que su costo llegue a ser razonable cuando se alcance una cantidad crítica, basada en un proceso optimizado de producción (Song *et al.*, 2009).

1.2. *Azotobacter vinelandii* sintetiza Poli- β -Hidroxibutirato.

Azotobacter vinelandii es una gammaproteobacteria de vida libre, quimiorganotrófica, con un tamaño de 2x5 μm por lo que tiene de 5 a 10 veces más el volumen de *Escherichia coli*. Tiene la capacidad de fijar nitrógeno en presencia de oxígeno debido a que posee tres diferentes complejos de nitrogenasas y a varios mecanismos que previenen la inactivación por oxígeno de los mismos (Setubal *et al.*, 2009).

A. vinelandii puede sintetizar alginato (un polisacárido constituido de ácido gulurónico y ácido manurónico), que forma una barrera externa la cual disminuye el paso de oxígeno al interior de la célula (Setubal *et al.*, 2009). Debido a sus propiedades, el alginato es utilizado en la industria alimenticia y farmacéutica como agente estabilizante (Galindo *et al.*, 2007).

Otra característica de *A. vinelandii* es la capacidad de sufrir un proceso de diferenciación a una célula resistente a la desecación denominada quiste, el cual está recubierto de dos capas llamadas exina y entina constituidas principalmente por alginato, siendo este último esencial para la formación de quistes maduros (Setubal *et al.*, 2009). Durante el proceso de enquistamiento, *A. vinelandii* sintetiza lípidos fenólicos llamados alquilresorcinoles y alquelpironas los cuales son incorporados a la membrana plasmática y tienen una función estructural en la capsula del quiste, sin embargo no son esenciales para la resistencia a la desecación (Segura *et al.*, 2009).

Otra propiedad de *A. vinelandii* es la capacidad de producir PHB, el cual es almacenado en forma de gránulos intracelulares (figura 2) y es utilizado como fuente de reserva de energía y de carbono en periodos de estrés, como disminución de nutrientes en el medio, desecación y temperaturas adversas. Por otro lado, en ausencia de sustratos oxidables en el medio ambiente, el PHB puede actuar como sustrato, de esta manera, al oxidarse disminuye la concentración de oxígeno dentro de *A. vinelandii* protegiendo así al complejo de la nitrogenasa (Anderson & Dawes, 1990)



Figura 2. Fotografía electrónica de una célula de *A. vinelandii* UW136.

La síntesis de PHB en *A. vinelandii* está dada por las reacciones de tres enzimas a partir del sustrato acetil coenzima A (acetil-CoA) (figura 3). Inicialmente dos moléculas de acetil-CoA son condensadas por la enzima β -cetotiolasa para dar lugar a una molécula de acetoacetyl-CoA. Posteriormente se presenta una segunda reacción, donde la enzima acetoacetyl-CoA reductasa, en presencia de NADPH, reduce al acetoacetyl-CoA a β -hidroxibutiril-CoA. La última reacción está catalizada por la enzima PHB sintasa, la cual polimeriza varias unidades de β -hidroxibutiril-CoA, liberando a la coenzima A (Segura *et al.*, 2003).

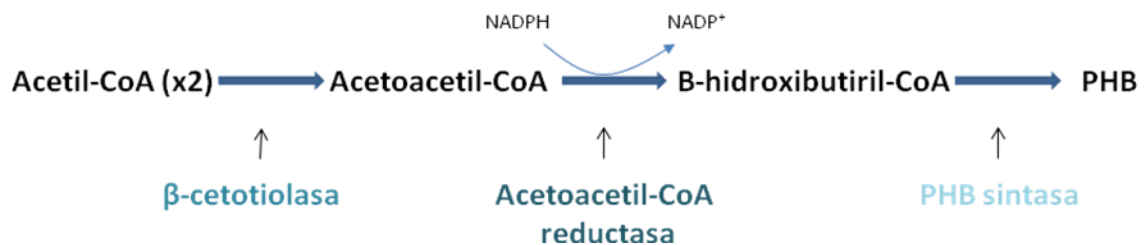


Figura 3. Biosíntesis de PHB en *A. vinelandii*.

En presencia de oxígeno el acetil-CoA es dirigido al ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y la coenzima A producida inhibe la actividad de la enzima β -cetotiolasa. En condiciones de limitación de oxígeno y exceso de una fuente de carbono, la síntesis de PHB es activada, debido a que se acumula poder reductor NADH, el cual inhibe la actividad de la citrato sintasa, disminuyendo la entrada de acetil-CoA al ciclo TCA. La β -cetotiolasa es activada por altas concentraciones de acetil-CoA, dando inicio a la síntesis de PHB (Senior & Dawes, 1973).

La generación de nuevo conocimiento en los mecanismos de regulación de la síntesis de PHB en *A. vinelandii* permite la creación de cepas hiperproductoras del polímero, lo cual contribuye a la optimización de la producción de PHB a nivel industrial.

2. ANTECEDENTES

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

Los genes que codifican para las enzimas β -cetotilasa (*phbA*), acetoacetyl-CoA reductasa (*phbB*) y PHB sintasa (*phbC*) conforman el operón *phbBAC* (Segura *et al.*, 2003) (figura 4). Corriente arriba del operón y de manera divergente se encuentra el gen *phbR*, el cual codifica para la proteína PhbR, un activador transcripcional de *phbBAC* perteneciente a la familia de reguladores XylS/AraC (Peralta-Gil *et al.*, 2002).

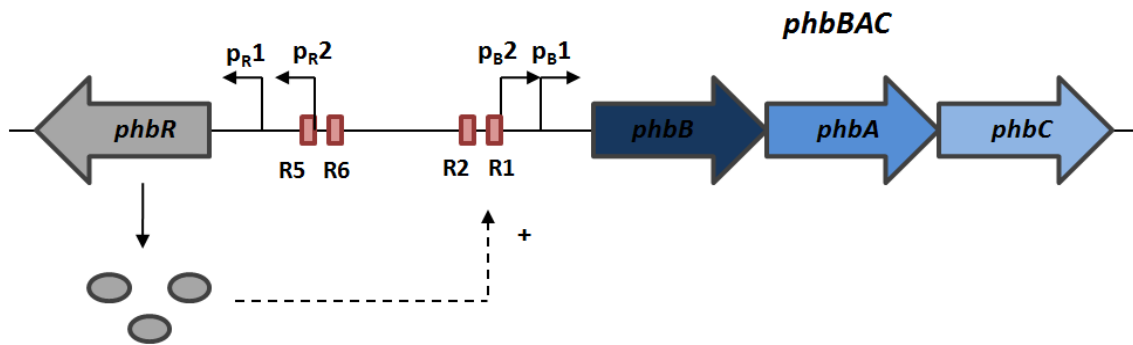


Figura 4. Organización del operón *phbBAC* y *phbR* en *A. vinelandii*.

El operón *phbBAC* se transcribe a partir de los promotores p_{B1} y p_{B2} que se encuentran superpuestos (Peralta-Gil *et al.*, 2002). La transcripción a partir de p_{B1} es activada por PhbR, mediante el reconocimiento específico de las secuencias TGTCACCAA N-4 CACTA (R2) y TGTCACCAA N-4 CAGTA (R1) (Hernandez-Eligio *et al.*, 2011). La transcripción a partir de p_{B2} es dependiente del factor transcripcional de fase estacionaria RpoS (Peralta-Gil *et al.*, 2002). El gen *phbR* se transcribe a partir de los promotores p_{R1} y p_{R2} y existe evidencia que se autoregula positivamente (Hernandez-Eligio *et al.*, 2011) probablemente mediante la unión de PhbR a las secuencias CGATATCAA N-4 CAGGA (R5) y GTACATCAC N-4 CAGAA (R6) que se encuentran corriente arriba de p_{R1} . La transcripción de *phbR* a partir de p_{R2} es dependiente de manera indirecta de RpoS (Hernandez-Eligio *et al.*, 2011, Peralta-Gil *et al.*, 2002).

El sistema de dos componentes GacS/GacA también regula la síntesis de PHB en *A. vinelandii*. Mutaciones en *gacS* y *gacA*, que codifican para una histidina cinasa y su cognado regulador respuesta, producen una incapacidad en la acumulación del polímero (Castañeda *et al.*, 2000, Castañeda *et al.*, 2001). Recientemente en nuestro grupo se ha identificado que el sistema GacS/GacA regula la síntesis de PHB de manera indirecta mediante la regulación del sistema RsmA/RsmB (homólogo a CsrA/CsrB de *E. coli*) (Hernández Eligio, datos no publicados). GacA activa la transcripción del gen *rsmB*, el cual codifica para una proteína que puede unirse a RsmA, un RNA pequeño que interacciona con la región 5' no traducida de *phbB* y *phbR*, produciendo una inestabilidad de los RNAs mensajeros de estos genes. Por lo tanto en la mutante *gacA*⁻, RsmA se encuentra libre y puede unirse a los mRNAs de *phbB* y *phbR*, disminuyendo su traducción y por consiguiente la síntesis de PHB (Hernández Eligio, datos no publicados).

2.2. El Sistema fosfotransferasa relacionado a nitrógeno (PTS^{Ntr}) regula la síntesis de PHB en *A. vinelandii*.

A. vinelandii posee los genes *ptsP*, *ptsO* y *ptsN* que codifican las proteínas I^{Ntr}, NPr y IIA^{Ntr} respectivamente y que son homólogas a las proteínas I, HPr y IIA^{glu} del sistema fosfotransferasa PTS para carbohidratos (Noguez *et al.*, 2008). Los genes *ptsN* y *ptsO* se encuentran localizados corriente abajo del gen *rpoN* (el cual codifica para el factor σ^{54} , asociado a la asimilación de nitrógeno) dentro del cluster *orf107-ptsN-orf284-ptsO*, siendo este arreglo conservado en *Pseudomonas aeruginosa* y *E. coli* (Noguez *et al.*, 2008).

La enzima I^{Ntr} se autofosforila a partir del fosfoenolpiruvato, transfiere el grupo fosfato a la proteína NPr y ésta finalmente fosforila a la proteína IIA^{Ntr} en el residuo His68 (Figura 5). Esta variante de sistema de PTS ha sido asociada a la regulación del metabolismo de nitrógeno (PTS^{Ntr}), debido a que los genes *ptsN* y *ptsO* se encuentran en el operón que contiene a *rpoN* (Peterkofsky *et al.*, 2006).

El sistema PTS^{Ntr} ha sido descrito en varias bacterias, sin embargo no se ha demostrado que transfiera el grupo fosfato a un sustrato como sucede en el PTS para carbohidratos, lo que hace considerar que su función está asociada a procesos de regulación (Pflüger-Grau & Görke, 2010).

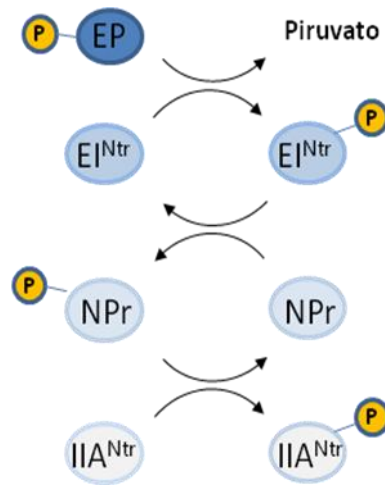


Figura 5. Sistema PTS^{Ntr}

Inicialmente en nuestro grupo se identificó que una mutación en *ptsP* (EI^{Ntr}) en la cepa *A. vinelandii* UW136, produce una disminución drástica en la acumulación de PHB, al igual que una deficiencia en la fijación de nitrógeno cuando la bacteria crece en presencia de altas concentraciones de oxígeno y bajas concentraciones de glucosa (Segura & Espín, 1998). Sin embargo no afecta la transcripción del gen de la nitrogenasa *nifH*, lo cual sugiere que la incapacidad de la fijación de nitrógeno posiblemente se deba a una deficiencia en la protección del complejo de la nitrogenasa (Segura & Espin, 1998). Por otro lado, el proteoma de la cepa *ptsP⁻* revela que los niveles de la enzima superóxido dismutasa SodB se encuentran disminuidos en dicha cepa en comparación con los presentes en la cepa silvestre UW136 (Noguez R. Datos no publicados).

Posteriormente se identificó que el estado no fosforilado de IIA^{Ntr} está relacionado con la disminución en la síntesis de PHB (Noguez *et al.*, 2008). Cepas con mutaciones en los

genes *ptsP* (EI^{Ntr}) y *ptsO* (NPr) (IIA^{Ntr} no fosforilada presente) exhiben disminución en los niveles de PHB, mientras que una cepa *ptsN⁻* (IIA^{Ntr} ausente) exhibe niveles de PHB mayores a la cepa silvestre (figura 6). Adicionalmente el cambio de aminoácido H68A en el sitio de fosforilación de la proteína IIA^{Ntr} , produce una disminución en la síntesis de PHB similar al producido por las mutaciones en *ptsP* y *ptsO* (Noguez *et al.*, 2008).

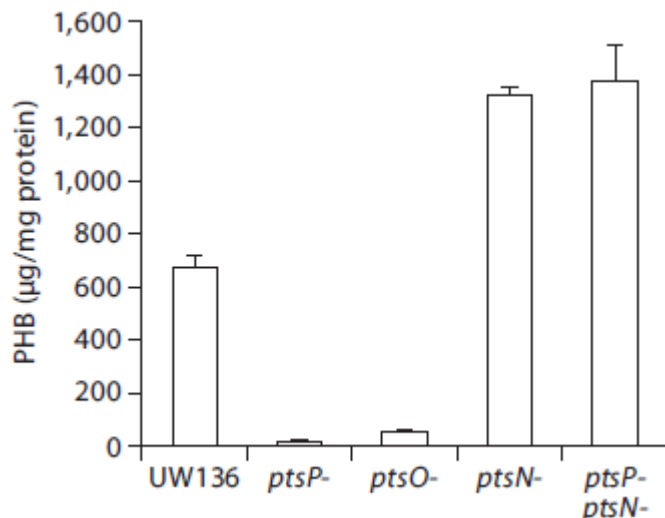


Figura 6. Niveles de PHB en cepas mutantes del sistema PTS^{Ntr} .

Las cepas fueron crecidas en medio sólido PY 2% sacarosa y cosechadas a las 120 horas de incubación. Tomado de Noguez *et al.*, 2008.

Las mutantes *ptsP⁻* y *ptsO⁻* presentan niveles disminuidos de los transcritos de los genes *phbR* y *phbB*. Sin embargo el mecanismo molecular por el cual IIA^{Ntr} actúa sobre la expresión de estos genes no es claro, se presume que existe un regulador intermediario debido a que IIA^{Ntr} no tiene motivos de unión a DNA (Noguez *et al.*, 2008). En otras bacterias se han descrito otros fenotipos que están asociados al sistema PTS^{Ntr} y se han identificado proteínas que interaccionan con IIA^{Ntr} (Pflüger-Grau & Görke, 2010).

En *E. coli* se identificó que la proteína IIA^{Ntr} en su estado no fosforilado confiere protección a la toxicidad por leucina y péptidos que contienen leucina (Lee *et al.*, 2005). Inicialmente se reportó que mutaciones en *ptsP* y *ptsO* (que codifican para EI^{Ntr} y NPr) confirieron mayor resistencia a la toxicidad por péptidos que contienen leucina comparado con la

cepa silvestre, mientras que una mutación en *ptsN* (que codifica para IIA^{Ntr}) produjo una extrema sensibilidad a la leucina, debido a la represión de la expresión del operón *ilvBN* que codifica para la enzima acetohidroxi-acido sintasa I, la cual cataliza el primer paso común en la síntesis de aminoácidos ramificados (Lee *et al.*, 2005).

Posteriormente Lee y colaboradores determinaron que la proteína IIA^{Ntr} no fosforilada interacciona con el transportador de potasio (K⁺) de baja afinidad TrkA, inhibiendo la acumulación intracelular del catión. Una doble mutación en *ptsN* y *trkA* inhibió el efecto tóxico de la acumulación de leucina en *E. coli*. Por lo tanto la represión del operón *ilvBN* en la mutante *ptsN* fue debida a la acumulación de K⁺ por la ausencia de la interacción entre TrkA y IIA^{Ntr} no fosforilada (Lee *et al.*, 2007).

Recientemente Lee y colaboradores describieron que una mutación en el gen *rpoS* suprime la sensibilidad a péptidos que contienen leucina, producida por la mutación en *ptsN*. La unión de los factores transcripcionales σ^{70} y σ^s al core de la RNA polimerasa (RNAP) es influenciada por los niveles de K⁺. En presencia de altos niveles de K⁺ (como sucede por la mutación en *ptsN*) σ^s se une preferencialmente a RNAP que σ^{70} , lo cual hace que disminuya la transcripción de genes dependientes de σ^{70} como el operón *ilvBN* (Lee *et al.*, 2010).

En *E. coli* la proteína IIA^{Ntr} no fosforilada también interacciona con la cinasa sensora KdpD del sistema de dos componentes KdpD/KdpE, el cual controla la expresión del operón *kdpFABC* que codifica para el sistema de transporte de K⁺ de alta afinidad Kdp. La transcripción de *kdpFABC* es activada en condiciones limitadas de K⁺ o en estrés osmótico (Lüttmann *et al.*, 2009). La interacción con IIA^{Ntr} aumenta la actividad cinasa de KdpD, incrementando la fosforilación del regulador respuesta KdpE, lo cual a su vez aumenta la expresión de *kdpFABC* y finalmente el transporte intracelular de K⁺ (Lüttmann *et al.*, 2009).

En *Pseudomonas putida* se ha identificado que IIA^{Ntr} no fosforilada interacciona con la subunidad E1 del complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) (Pflüger-Grau *et al.*, 2011). Una mutación en *ptsN* produjo un aumento aproximadamente del 50% en la actividad específica de la PDH, sin embargo los niveles de Acetil-CoA en la cepa mutante permanecieron similares a los exhibidos por la cepa silvestre, por lo que aún no se comprende cual es la función biológica de dicha interacción (Pflüger-Grau *et al.*, 2011).

En *Salmonella* la proteína IIA^{Ntr} interacciona con el regulador respuesta SsrB del sistema de dos componentes SsrA/SsrB, que regula positivamente la expresión de los genes de la isla de patogenicidad 2 (SPI-2). Una mutación en *ptsN* aumenta los niveles de expresión de los genes de SPI-2 debido a que la proteína IIA^{Ntr} inhibe la unión de SsrB a sus promotores blanco (Choi *et al.*, 2010).

2.3. El sRNA ArrF y su relación con la síntesis de PHB en *A. vinelandii*.

A. vinelandii posee el RNA pequeño (sRNA-small RNA) ArrF (*Azotobacter regulatory rna involving Fe*) el cual es homólogo a los RNA pequeños PrrF1-2 en *P. aeruginosa* y análogo a RyhB en *E. coli* (Jung & Kwon, 2008). Estos RNAs están involucrados en la homeostasis de hierro en la bacteria y su expresión es regulada de manera negativa por la proteína Fur (*Ferric uptake regulator*) (Massé *et al.*, 2007). La figura 7 presenta el mecanismo de acción del sRNA RyhB de *E. coli* durante la limitación de hierro (Massé *et al.*, 2007).

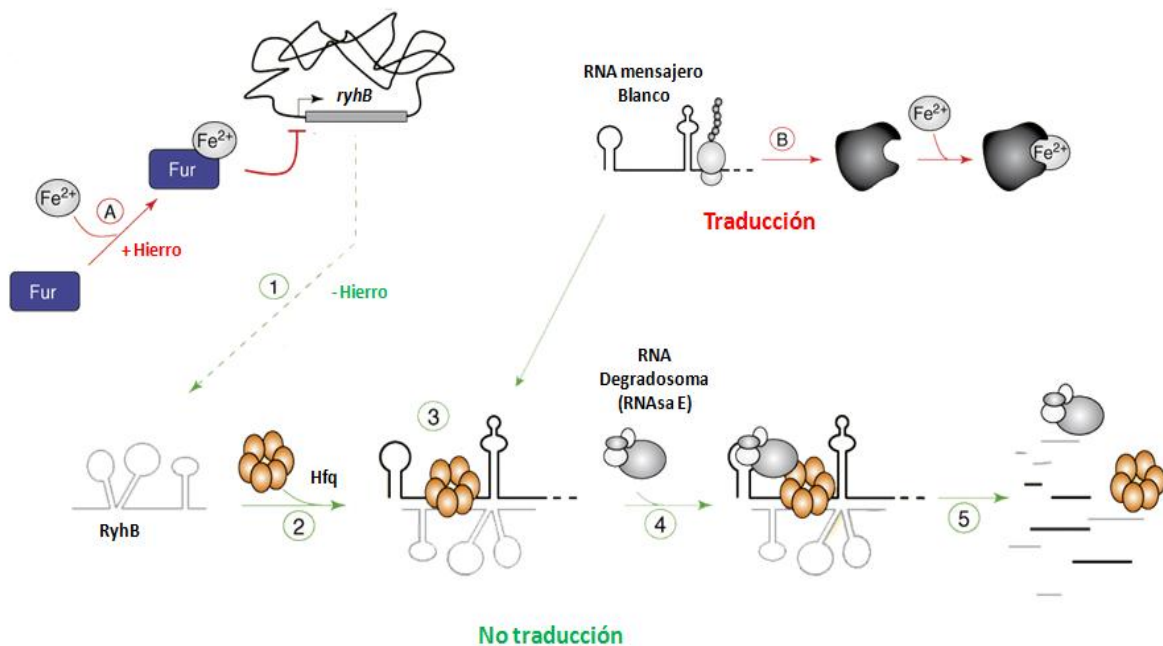


Figura 7. Mecanismo de regulación del sRNA RyhB de *E. coli*.
Adaptado de Massé *et al.*, 2007

En concentraciones altas de Fe^{2+} (situación A), Fur es activado, se une a la secuencia “iron box” que sobrelapa la región -10 y reprime la transcripción del gen *ryhB*. Por lo tanto (situación B) se da la traducción de RNA mensajeros (mRNAs) de proteínas no esenciales que utilizan hierro. En condiciones de limitación de hierro (1) Fur permanece inactivo, por lo tanto el gen *ryhB* se transcribe. (2) RyhB es estabilizado por la proteína Hfq, (3) se aparea de manera antisentido con los mRNAs blanco impidiendo su traducción. (4) El complejo RyhB-mRNA-Hfq es reconocido por el degradosoma y degrada ambos RNAs (Massé *et al.*, 2007).

En *E. coli* se ha identificado que los RNA mensajeros blanco de RyhB codifican para proteínas no esenciales que utilizan Fe^{2+} , lo cual permite que en condiciones de limitación de hierro, la poca disponibilidad del metal sea utilizada por proteínas esenciales como la dihidroxiácido dehidratasa y la ribonucleótido reductasa, involucradas en la síntesis de aminoácidos y ácidos nucleicos respectivamente (Massé *et al.*, 2007).

Hasta el momento en *A. vinelandii* se ha identificado que la mutación en *arrF* aumenta los niveles de los transcritos de los genes *sodB* y *feSII* (este último codifica para la proteína FeSII involucrada en la protección del complejo de la nitrogenasa) (Jung & Kwon, 2008). También se ha evidenciado una relación entre ArrF y la producción de PHB en *A. vinelandii*. Pyla y colaboradores reportaron que la mutación en *arrF* produce un aumento en los niveles de los transcritos de *phbR*, *phbB*, *phbA* y *phbC* y por consiguiente un aumento en los niveles de PHB (Pyla *et al.*, 2009). Un posible apareamiento entre el extremo 5' no traducido del transcrito de *phbR* y ArrF fue propuesto por Pyla y colaboradores como una posible vía de regulación del sRNA sobre la expresión de *phbR* y *phbBAC* (Pyla *et al.*, 2009). Posteriormente Pyla y colaboradores reportaron que el efecto de ArrF sobre la síntesis de PHB no es mediante la regulación de *phbR*, sino posiblemente sobre los transcritos de *phbF*, el cual codifica para un represor de la transcripción de *phbP* (gen codificante de la fasina, una proteína asociada a la membrana de los gránulos de PHB) (Pyla *et al.*, 2010, Segura *et al.*, 2003). Sin embargo hasta el momento no se ha demostrado de manera experimental que ArrF se aparee de manera antisentido con sus posibles blancos como los transcritos de *sodB*, *feSII* y *phbF*.

De acuerdo a los fenotipos y blancos reportados hasta el momento para el sistema PTS^{Ntr} y el sRNA ArrF en *A. vinelandii* (tabla 1) se planteó la posible hipótesis que el sistema PTS^{Ntr} y ArrF podrían estar regulando la síntesis de PHB mediante la misma vía de regulación. Debido a que los efectos negativos de la mutación en *ptsP* sobre PHB, la expresión de *phbR*, deficiencia en fijación de nitrógeno y disminución de SodB, son positivos en la mutante *arrF* (tabla 1), se consideró que posiblemente en la mutante *ptsP*⁻ los niveles de ArrF se encontrarían aumentados.

<i>A. vinelandii</i> UW136 <i>ptsP</i> [*]	<i>A. vinelandii</i> <i>arrF</i> ^{**}
-Niveles bajos de transcritos de <i>phbR</i>	-Niveles altos de transcritos de <i>phbR</i>
-Deficiencia en la fijación de nitrógeno (posiblemente por alteración en la protección de la nitrogenasa)	-Niveles altos de transcritos de <i>feSII</i> (codifica para una proteína que confiere protección a la nitrogenasa)
-Disminución en los niveles de la proteína SodB	-Niveles altos de transcritos de <i>sodB</i>

Tabla 1. Comparación de los fenotipos y blancos asociados al sistema PTS^{Ntr} y el sRNA ArrF en *A. vinelandii*.

*Cepa reportada en Noguez *et al.*, 2008, Segura & Espin, 1998, **Cepa reportada en Pyla *et al.*, 2009, Jung & Kwon, 2008.

Para probar la hipótesis anterior se construyeron las cepas mutantes UW136 *arrF*⁻ y UW136 *ptsP*⁻-*arrF*⁻, esperando que esta última cepa presentara un aumento en la acumulación de PHB en comparación con la cepa *ptsP*⁻. Sin embargo, a diferencia a lo reportado por Pyla *et al* en el 2009, la mutación en *arrF* produjo una disminución en el fenotipo de opacidad de la cepa UW136 en medio PY 2% sacarosa, compatible con una disminución en la síntesis de PHB (Muriel *et al*, datos no publicados). En la cepa *ptsP*⁻ la mutación en *arrF* no produjo un aumento en la síntesis de PHB (figura 8).

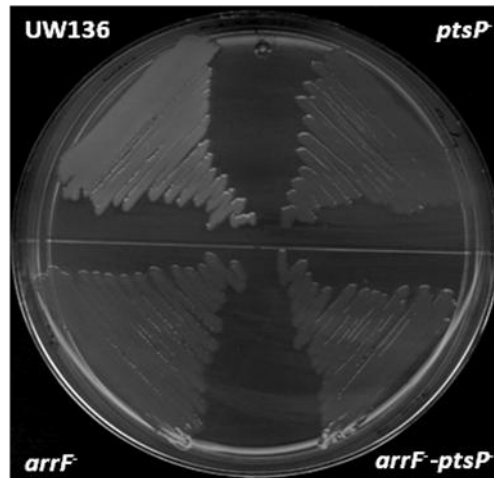


Figura 8. Fenotipo de opacidad (acumulación de PHB) de las cepas *A. vinelandii* UW136, *ptsP*, *arrF* y *ptsP*-*arrF*.

Las células fueron crecidas en medio PY 2% sacarosa hasta las 72 horas de incubación.

Los resultados anteriores descartan la hipótesis inicial de una posible relación entre el sistema PTS^{Ntr} y el sRNA ArrF en la regulación de la síntesis de PHB en *A. vinelandii*, por otro lado sugieren que ArrF contribuye a la acumulación del polímero.

En 1983 Reusch y Sadoff reportaron que células de *A. vinelandii* crecidas en un medio de competencia con limitación de hierro, presentaron mayor acumulación de PHB que células que crecieron en medio con una fuente de hierro (Reusch & Sadoff, 1983). Por otro lado Pyla y colaboradores también reportaron que en condiciones de exceso de hierro, su cepa silvestre presentó menores niveles de PHB en comparación con lo producido en medio con limitación de hierro (Pyla *et al.*, 2009), lo cual no correlaciona con el fenotipo de la mutación en *arrF* reportado por los autores, debido a que en ambas condiciones (mutación en *arrF* y presencia de hierro) el sRNA ArrF se encuentra reprimido (Jung & Kwon, 2008). De acuerdo a lo anterior es probable que el hierro regule la síntesis de PHB a través de ArrF en *A. vinelandii*.

Debido a que en nuestro grupo estamos interesados en el estudio de la genética molecular de la síntesis de PHB, en el presente trabajo se pretendió estudiar el efecto del

hierro, ArrF e identificar posibles intermediarios del sistema PTS^{Ntr} en la regulación de la síntesis del polímero en *A. vinelandii*.

3. HIPÓTESIS

3.1. Hipótesis primera parte.

El hierro regula la síntesis de PHB en *A. vinelandii* mediante el control de la expresión del gen *arrF*, el cual codifica para el sRNA ArrF.

3.2. Hipótesis segunda parte.

La proteína IIA^{Ntr} en su estado no fosforilado produce una disminución en la acumulación de PHB en *A. vinelandii* mediante la activación de un represor o la inactivación de un activador de la expresión de los genes *phbB* y *phbR*.

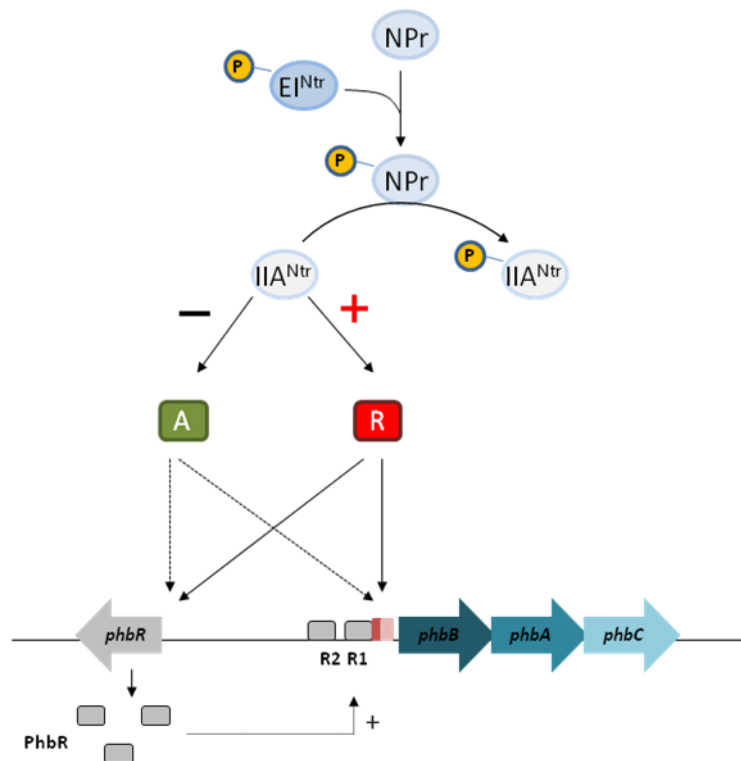


Figura 9. Modelo hipotético de la regulación del sistema PTS^{Ntr} sobre la expresión de *phbB* y *phbR*.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo generales

4.1.1. Objetivo general primera parte

Caracterizar el efecto regulatorio del hierro sobre la síntesis de PHB en *A. vinelandii*.

4.1.2. Objetivo general segunda parte.

Identificar y caracterizar posibles intermediarios del sistema PTS^{Ntr} en la regulación de la síntesis de PHB.

4.2. Objetivos específicos

Primera parte:

1. Determinar el efecto del hierro sobre la expresión de los genes *phbB* y *phbR* en *A. vinelandii*.
2. Determinar el efecto de la mutación en *arrF* sobre la expresión de *phbB* y *phbR*.
3. Caracterizar el papel de ArrF en la regulación del hierro sobre la síntesis de PHB.

Segunda parte:

1. Obtener nuevas cepas doble mutantes de *A. vinelandii* UWpts^P y UWphbR⁻ mediante mutagénesis al azar con mini-Tn5, que presenten aumento o disminución en la acumulación de PHB.
2. Identificar los genes interrumpidos por el transposón en las mutantes obtenidas en el objetivo 1 y determinar su relación con la síntesis de PHB.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados.

La tabla 2 presenta las cepas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo.

Cepa	Características	Referencia
<i>A. vinelandii</i>		
UW 136	Mutación natural en <i>algU</i> , Nal ^r , Rif ^r	(Setubal <i>et al.</i> , 2009)
UW <i>ptsP</i>	UW136 mutación <i>ptsP</i> ::Tc ^r	(Segura & Espin, 1998)
RN4	UW136 mutación <i>ptsN</i> ::Km ^r	(Noguez <i>et al.</i> , 2008)
RN6	UW136 mutación <i>ptsO</i> ::Sp ^r	(Noguez <i>et al.</i> , 2008)
RN7	RN4 mutación <i>ptsP</i> ::Tc ^r	(Noguez <i>et al.</i> , 2008)
JGW-R	UW136 mutación <i>phbR</i> :: <i>gusA</i> -Gm ^r	(Peralta-Gil <i>et al.</i> , 2002)
AHW13	UW136 fusión transcripcional <i>phbR</i> :: <i>gusA</i>	(Hernández-Eligio)
AHW17	UW136 fusión traduccional <i>phbR</i> :: <i>gusA</i>	(Hernández-Eligio)
AHW21	UW136 fusión transcripcional <i>phbB</i> :: <i>gusA</i>	(Hernández-Eligio)
AHW25	UW136 fusión traduccional <i>phbB</i> :: <i>gusA</i>	(Hernández-Eligio)
SMW1	Mutación <i>arrF</i> ::Km ^r	Presente trabajo
LMW1	AHW13 mutación <i>arrF</i> ::Km ^r	Presente trabajo
LMW2	AHW17 mutación <i>arrF</i> ::Km ^r	Presente trabajo
UW <i>ptsP</i> 12	UW <i>ptsP</i> <i>clpA</i> ::miniTn5Km ^r	Presente trabajo
UW <i>ptsP</i> 18	UW <i>ptsP</i> <i>clpA</i> ::miniTn5Km ^r	Presente trabajo
UW <i>phbR</i> 12	JGW-R <i>oprI</i> ::miniTn5Km ^r	Presente trabajo
UW <i>clpA</i>	UW136 mutación <i>clpA</i> ::Km ^r	Presente trabajo
UW <i>clpP</i>	UW136 mutación <i>clpP</i> ::Km ^r	Presente trabajo
UW <i>ptsP-clpA</i>	UW <i>ptsP</i> mutación <i>clpA</i> ::Km ^r	Presente trabajo
UW <i>ptsP-clpP</i>	UW <i>ptsP</i> mutación <i>clpP</i> ::Km ^r	Presente trabajo
UW <i>oprI</i>	UW136 mutación <i>oprI</i> ::Km ^r	Presente trabajo
<i>E. coli</i>		
S17-1/λ <i>pir</i>	<i>pir</i> , hospedero para plásmidos dependientes de Pir	(Simon <i>et al.</i> , 1983)
HB101	<i>supE44 hsdS20 recA13 ara-14 proA2 lacY1 galK2 rpsL20 xyl-5 mtl-1</i>	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 relA</i>	(Sambrook <i>et al.</i> , 1989)

Tabla 2. Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo.

Plásmido	Características	Referencia
pUT/miniTn5/lacZ2 Km	Mini Tn5, <i>lacZ</i> , Km ^r	(de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990)
pRK2013 (helper)	oriColE1, <i>tra</i> , <i>mob</i> , Km ^r	(Figurski & Helinski, 1979)
pJET 1.2	Vector de clonación	Fermentas®
pLM1	pJET con <i>clpA</i>	Presente trabajo
pLM2	pLM1 con <i>clpA::Km^r</i>	Presente trabajo
pLM3	pJET con <i>clpP</i>	Presente trabajo
pLM4	pLM3 con <i>clpP::Km^r</i>	Presente trabajo
pLM5	pJET con <i>oprI</i>	Presente trabajo
pLM3	pLM4 con <i>oprI::Km^r</i>	Presente trabajo

Oligonucleótidos	Secuencia (5 → 3)	Referencia
gyrAFw	CCAGCAAGGGCAAGGTCTA	(Noguez <i>et al.</i> , 2008)
gyrARv	TCGTCCAGCGGCAACAGGT	(Noguez <i>et al.</i> , 2008)
phbRFw	CCACATGCGTTTGGTTCTTG	(Noguez <i>et al.</i> , 2008)
phbRRv	TCTGCCCTAAGCGTCTCCTC	(Noguez <i>et al.</i> , 2008)
phbBFw	TTCGCAATCCAAACGCAAAG	(Noguez <i>et al.</i> , 2008)
phbBRv	GTGCTCTCCCAATCGTTAC	(Noguez <i>et al.</i> , 2008)
Tn50	GGCCGCACTTGTGTATAAG	(de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990)
Tn5I	GGCCAGATCTGATCAAGAG	(de Lorenzo <i>et al.</i> , 1990)
arrF-1up	GTGGAACGCAAGCGCCTG	Presente trabajo
arrF-2lw	GTTGGTCAAGTAGTGGC	Presente trabajo
arrF-3up	GCCACTACTTGACCAACACCTGGGA TGAATGTC AGCTAC	Presente trabajo
arrF-4lw	CGAAAACCGTAATTAGCCTGAGAAGGCG GCGGTGGAATCG	Presente trabajo
arrF-5up	CAGGCTAATTACGGTTTTTCG	Presente trabajo
arrF-6lw	CAGCCCTATCCGTTGTTGG	Presente trabajo
qarrFFw	CGGCTACTCTCAGGTTATCTCC	Presente trabajo
qarrFRv	CCGGGTCGAAAACCGTA	Presente trabajo
qsodBFw	CGAGACCCTGGAATACCACTAC	Presente trabajo
qsodBRv	AGAGGTCTTGACGATGTCTTCC	Presente trabajo
clpAFw	CGAACTGACCCCTTACGAC	Presente trabajo
clpARv	TGCGGAATGTTTACTCGTG	Presente trabajo
clpPFw	CACGCTGGGGTTGATTG	Presente trabajo
clpPRv	CGGTAGGCTTGCAACAC	Presente trabajo
oprIFw	GGAAGTTGTGCGAGAAGTGG	Presente trabajo
oprIRv	GCCTGCTTAATCGGATGGG	Presente trabajo

Continuación tabla 2.

5.2. Condiciones de crecimiento para *A. vinelandii* y *E. coli*.

Las cepas de *A. vinelandii* utilizadas en este trabajo fueron crecidas a 30°C en medio Burk (BS) y en medio Peptona y extracto de levadura (PY), ambos adicionados con 2% sacarosa (ver apéndice). Las cepas de *E. coli* fueron crecidas en medio Luria Bertani (LB) a 37°C. Los antibióticos y concentraciones usadas en µg/mL para la selección de las cepas de *A. vinelandii* fueron kanamicina 1, tetraciclina 10, gentamicina 1, espectinomicina 25 y ácido nalidixico 15 y para las cepas de *E. coli* fueron ampicilina 200, kanamicina 30, tetraciclina 10 y gentamicina 10.

Para la crucea triparental empleada en la mutagénesis al azar, se utilizó agar BS+LB 2% sacarosa, 0.2% de glucosa y acetato de amonio 15 mM libre de antibiótico. Las placas fueron incubadas a 30°C durante 24-48 horas. Las nuevas mutantes fueron seleccionadas en agar BS con ácido nalidixico 15 µg/mL, kanamicina 1µg/mL y gentamicina 1 µg/mL para las descendientes de JGW-R y ácido nalidixico 15 µg/mL, kanamicina 1µg/mL y tetraciclina 10 µg/mL para las mutantes de la cepa *UWptsP⁻*.

Para la condición de exceso de hierro se empleó el medio BS adicionado con FeSO₄ 18µM, mientras que para la condición de limitación de hierro se utilizó FeSO₄ 1.8µM. Estas concentraciones son similares a las empleadas en estudios anteriores para obtener las condiciones deseadas (Cornish & Page, 1998).

5.3. Purificación de DNA cromosomal de *A. vinelandii*

A partir de cultivos celulares, se tomó una alícuota y se centrifugó. El paquete celular se lavó una vez con buffer TE 50/20. Las células fueron resuspendidas en 450 µL de buffer TE 50/20, se les adicionó 50 µL de lisozima (10 mg/mL) y se incubó a 37°C durante 30 minutos. A continuación se adicionaron 50 µL de proteasa (10 mg/mL) y se incubó a 37°C durante 30 minutos.

Posteriormente se adicionaron 50 μL de SDS 10% y se incubó a 37°C durante al menos 15 minutos, luego se adicionaron 100 μL de NaCl 5M y se incubó a 65°C durante 10 minutos. En seguida se adicionaron 80 μL de solución CTAB 10%/NaCl 0.7M previamente calentada a 65°C y se incubó a 65° durante 15-20 minutos. Se adicionó un volumen de solución de cloroformo-álcohol isoamílico 24:1 y se centrifugó. Se tomó el sobrenadante, se transfirió a otro tubo, se adicionó un volumen de solución de fenol-cloroformo-álcohol isoamílico. (1 volumen de fenol saturado + 1 volumen de cloroformo-álcohol isoamílico) y se centrifugó. Se tomó el sobrenadante se transfirió a otro tubo, se adicionó un volumen de cloroformo-álcohol isoamílico 24:1 y se centrifugó nuevamente. Posteriormente se adicionó 0.6 volumen de isopropanol, se centrifugó y se descartó el sobrenadante. El DNA precipitado fue lavado tres veces con etanol al 70%. La pastilla de DNA fue secada, se resuspendió en 50 μL de solución de RNAsa 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y se incubó a 37°C durante 1 hora. Finalmente fue almacenado a -20°C.

5.4. Purificación de RNA total de *A. vinelandii*.

A partir de cultivos celulares, se tomó una alícuota y se centrifugó. La pastilla celular fue resuspendida en 50 μL de agua tratada con Di-etil pirocarbonato (DEPC) 0.1% y se adicionó 5 μL de agua DEPC 0.5%. Posteriormente se adicionaron 200 μL de acetona fría, se mezcló manualmente y se centrifugó. Se descartó el sobrenadante, y la pastilla fue resuspendida en 50 μL de DEPC 0.1%. Se adicionaron 10 μL de lisozima (10 mg/mL) preparada con DEPC 0,5% y se incubó a 37°C durante 10 minutos.

Posteriormente se adicionó 1 μL de proteínasa K (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y se incubó en hielo por 10 minutos. En seguida se adicionaron 3.5 μL de DEPC 0.5%, 200 μL de fenol precalentado a 70°C y 150 μL de cloroformo. La reacción se mezcló manualmente, se adicionaron 120 μL de DEPC 0.1% y se centrifugó. Se extrajo la fase acuosa y se adicionó 1 mL de etanol absoluto. El RNA fue precipitado -20°C mínimo por una hora. Posteriormente se centrifugó, se secó la pastilla y se resuspendió en 50 μL de DEPC 0.1%. El RNA fue almacenado a -20°C.

5.5. Construcción de cepas mutantes de *A. vinelandii*.

Los genes a interrumpir fueron amplificados por PCR con los oligonucleótidos descritos en la tabla 1. Cada uno de los productos amplificados fue clonado en el vector pJET 1.2 de Fermentas®. Posteriormente se procedió a la digestión del nuevo vector con una enzima de restricción que solo tuviera un sitio de reconocimiento dentro del gen clonado para insertar un casete de resistencia a determinado antibiótico.

Los nuevos plásmidos incapaces de replicarse en *A. vinelandii*, fueron introducidos en las cepas para transformación mediante doble recombinación (Page & Tigerstrom, 1978). En medio BS sólido con antibiótico, se seleccionaron las cepas transformantes resistentes al marcador de resistencia utilizado. Mediante PCR se confirmó que las nuevas mutantes no presentaron copias silvestres de los genes interrumpidos (datos no mostrados).

Para la construcción de las mutantes en *arrF* se empleó la técnica de PCR recombinante de tres piezas (figura 10) (Lloyd *et al.*, 2003). Utilizando los oligonucleótidos *arrF1-up*, *arrF2-lw*, *arrF5-up* y *arrF-6lw* (tabla 2) se amplificaron regiones corriente arriba y corriente abajo del gen *arrF*. Con los oligonucleótidos *arrF3-up* y *arrF-4lw* se amplificó el marcador de resistencia a kanamicina flanqueado por regiones complementarias a los oligonucleótidos *arrF-2lw* y *arrF-5up*. Los tres productos de PCR fueron purificados por columna y se utilizaron como templados para el PCR recombinante. Inicialmente se corrieron 25 ciclos sin adicionar oligonucleótidos para permitir el ensamblaje de los tres productos y producir un solo fragmento de 2,3 Kb. Finalmente se utilizó una alícuota de la reacción anterior y se realizó un PCR de 25 ciclos con los oligonucleótidos *arrF-1up* y *arrF-6lw* para amplificar el fragmento de 2,3 Kb (figura 10). Este último fue utilizado para transformar células competentes de *A. vinelandii* mediante doble recombinación. Se seleccionaron las células transformantes en medio BS con kanamicina. Se confirmó la mutante en *arrF* mediante PCR empleando los oligonucleótidos *arrF1-up* y *arrF6lw* (dato no mostrado).

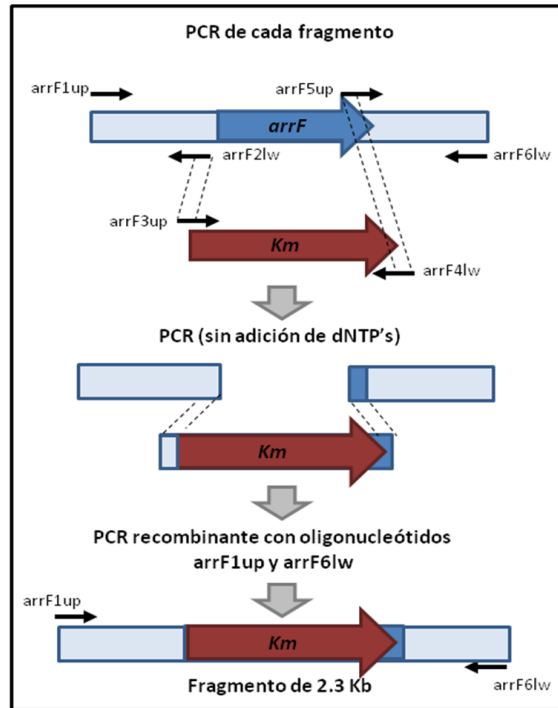


Figura 10. PCR recombinante de tres piezas para la creación de las mutantes en *arrF*.

5.6. Mutagénesis al azar con el transposón mini-Tn5 de las cepas *A. vinelandii* *UWptsP⁻* y *phbR⁻*.

Con la mutagénesis al azar se pretendió identificar intermediarios entre la proteína IIA^{Ntr} no fosforilada y la expresión de los genes *phbR* y *phbB*, las hipótesis más simples son: 1- IIA^{Ntr} no fosforilada activa a un represor de *phbR* y/o *phbB* o 2- IIA^{Ntr} inhibe a un activador de estos genes (figura 9). Sin embargo no se descartó que la vía de regulación involucre más de un intermediario.

Si IIA^{Ntr} no fosforilada inhibe a un activador, la mutagénesis en la cepa *UWptsP⁻* no permitiría identificar al gen que codifica para el activador hipotético, debido a que no se observaría reversión de fenotipo. Por lo tanto también se mutagenizó a la cepa *phbR⁻* la cual no expresa el activador PhbR y al compararla con la cepa silvestre UW136, presenta cerca de un 30% de actividad de las enzimas de la biosíntesis de PHB y cerca del 20% de acumulación del polímero (Peralta-Gil *et al.*, 2002), sugiriendo que en ausencia de PhbR todavía se presenta una expresión significativa del operón. Lo anterior sugiere que una

mutación en el activador hipotético en la cepa *phbR*⁻ produciría una disminución en la acumulación remanente de PHB.

Las cepas *A. vinelandii* UWptsP⁻ y *phbR*⁻ fueron crecidas en medio líquido BS a 30°C durante 48 horas y las cepas de *E. coli* S17 λ pir y HB101 que portan los plásmidos pUT/miniTn5/lacZ2 Km y el plásmido ayudador PRK2013 respectivamente, fueron crecidas en medio líquido LB Km 30 µg/mL a 37°C durante 12 horas. Después del periodo de incubación, se tomó un 1 mL de cada cultivo y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos. Las pastillas celulares fueron resuspendidas en MgSO₄ 10 mM y se realizaron tres lavados de las células. Posteriormente las células de *A. vinelandii* fueron resuspendidas en 1 mL de MgSO₄ y las células de *E. coli* en 1 mL de LB sin antibiótico.

Se mezclaron 200 µL de células de *A. vinelandii*, 20 µL de cada una de las suspensiones celulares de las cepas de *E. coli* S17 λ pir y HB101. Las mezclas bacterianas se colocaron en el centro de la superficie del medio sólido BS-LB y se incubaron a 30°C durante 24-48 horas.

Posterior al periodo de incubación, con la ayuda de una asa estéril, se recogió la cuarta parte de cada siembra y se resuspendió en 1 mL de MgSO₄ 10 mM. A partir de estas suspensiones se realizaron diluciones seriadas de 10⁰ a 10⁻³. De cada dilución se tomaron 100 µL y se sembraron en medio sólido BS con antibióticos para selección de las nuevas mutantes. Los cultivos fueron incubados a 30°C durante 48-72 horas.

Cada una de las nuevas mutantes fue sembrada en medios sólidos selectivos de BS y PY 2% sacarosa. Este último se utilizó para la evaluación del fenotipo de opacidad relacionado con la acumulación de PHB.

5.7. Identificación de genes interrumpidos por el transposón mini-Tn5.

De acuerdo al fenotipo de opacidad de las nuevas mutantes de *A. vinelandii*, se seleccionaron candidatas que presentaron variación en el fenotipo de las cepas de fondo UWptsP y phbR⁻. Se extrajo DNA cromosomal (ver apéndice) de cada mutante candidata y se digirió con la enzima *Pst*I (para la cual no existe sitio de restricción dentro de la secuencia del mini-Tn5) colocando los siguientes volúmenes: 10 µL de DNA, 2 µL de buffer 10X, 1.5 µL de enzima *Pst*I y 6.5 µL de H₂O para un volumen final de 20 µL. Las reacciones de digestión se incubaron a 37°C durante 2-3 horas.

Posteriormente se llevaron a cabo reacciones de religación del DNA cromosomal digerido con la enzima *Pst*I con el fin de circularizar el fragmento de DNA que contiene el mini-Tn5. Se utilizó la enzima T4 DNA ligasa siguiendo las instrucciones del fabricante (Roche®). Las reacciones se incubaron a 16 °C durante 12-24 horas.

Pasado el periodo de incubación, el DNA religado se usó como templado para llevar a cabo un PCR empleando los oligonucleótidos Tn50 y Tn51, los cuales están orientados hacia afuera del mini-Tn5 y amplifican los fragmentos adyacentes del sitio de inserción. Las condiciones de PCR fueron: 1 ciclo 96°C/1min, 1 ciclo 96°C/1min, 1 ciclo 58°C/1min, 72°C/3min repitiendo 25 veces los tres últimos ciclos y finalmente 1 ciclo 72°C/10 min. Los productos amplificados fueron secuenciados usando los oligonucleótidos Tn50 y Tn51.

5.8. Determinación de la expresión relativa de los genes *phbR*, *phbB*, *arrF* y *sodB*.

Se extrajo RNA total de cultivos de las cepas de *A. vinelandii* de 30 horas a 30°C. Posteriormente se midió la concentración de RNA (ng/μL) mediante el equipo Nanodrop® y se trató con DNAsa para eliminar el DNA cromosomal remanente.

A partir de las muestras de RNA tratadas, se obtuvo cDNA de los transcritos de los genes *phbR*, *phbB*, *arrF*, *sodB* y *gyrA* (control interno) preparando la siguiente reacción: 4 μL de RNA, 2 μL de oligonucleótido reverso a una concentración de 20 picomol y 6 μL de H₂O estéril; esta mezcla fue incubada a 65°C por 5 minutos; inmediatamente después, la mezcla fue colocada en hielo por 2 minutos. Posteriormente se le adicionaron 4 μL de buffer de reacción (5X), 1 μL de inhibidor de ribonucleasa (20 u/μL), 2 μL de dNTP's (10 mM) y 1 μL de reverso transcriptasa Fermentas® (200 U/μL). La mezcla se incubó por 1 hora a 42°C. Terminado el tiempo de incubación, la reacción se detuvo con un choque de calor a 70 °C por 10 minutos.

La cuantificación de los transcritos de *phbR*, *phbB*, *arrF* y *sodB* se llevó a cabo por PCR en tiempo real empleando el equipo Light Cycler 480 II de Roche®. La mezcla de reacción consistió de: 10 μL de SYBRGREEN (Fermentas®), 1 μL de cDNA (5 ng), 1 μL de oligonucleótido Fw (250 nM), 1 μL de oligonucleótido Rev (250 nM) y 7 μL de H₂O estéril. Las condiciones de reacción fueron: 1 ciclo a 95 °C por 10 min, 1 ciclo a 95 °C por 15 segundos y 1 ciclo a 60 °C por 1 min; los dos últimos ciclos se repitieron 40 veces. Se emplearon controles internos los cuales consistieron en la misma reacción anterior sin adicionar cDNA. Todas las reacciones fueron realizadas por triplicado. El nivel de transcritos de *gyrA* fue usado como control interno para normalizar los niveles de los transcritos de los genes a evaluar. Los datos fueron analizados mediante el método $2^{-\Delta\Delta CT}$ reportado por Livak y Schmittgen (Livak & Schmittgen, 2001).

5.9. Cuantificación de PHB.

Posterior al periodo de incubación de cultivos de *A. vinelandii*, para los medios sólidos, las células fueron levantadas del agar y resuspendidas en 12 mL de MgSO₄ 10 mM. Las células de medio líquido y sólido fueron centrifugadas a 4000 rpm durante 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y las pastillas celulares fueron resuspendidas en MgSO₄ 10 mM.

A un volumen determinado de las suspensiones celulares se les adicionó 1 mL de hipoclorito de sodio al 30% y se incubaron a 37°C durante 1 hora. Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm durante 10 minutos, se descartaron los sobrenadantes y se realizaron tres lavados a las pastillas celulares en el siguiente orden: 1 mL H₂O, 1 mL acetona y 1 mL etanol absoluto. Una vez las pastillas estuvieran secas, se les adicionó 1 mL de H₂SO₄ concentrado y se incubó a 95°C durante 10 minutos, llevándose a cabo la producción de ácido crotónico a partir de PHB. Se midió la absorbancia a las soluciones a una longitud de onda de 235 nm. La cantidad de PHB fue calculada utilizando el coeficiente de extinción molar del ácido crotónico a 235 nm (CEM=1.56 x 10⁴ M). La cuantificación de PHB se realizó por triplicado para cada cepa de *A. vinelandii*.

Adicionalmente para cada muestra de suspensión celular se determinó la cantidad de proteína mediante el método de Lowry.

5.10. Determinación de la producción de alquilresorcinolos.

Las cepas se inocularon en cultivos líquido BS con antibiótico a 30°C durante 48 horas. Las células fueron centrifugadas, lavadas tres veces con MgSO₄ 10 mM y resuspendidas en la misma solución. Se inocularon 10 µL de cada suspensión celular sobre filtros estériles de 0.45 µm previamente colocados sobre la superficie de medio sólido Burk butanol 0.2%. Se incubaron a 30°C durante 120 horas. Una vez cumplido el periodo de incubación, los cultivos fueron rociados con una solución de azul rápido B (ver apéndice) para determinar

la presencia de alquilresorcinolos (coloración roja del crecimiento bacteriano) (Segura *et al.*, 2009).

5.11. Cuantificación de la actividad β -glucuronidasa de las fusiones transcripcionales y traduccionales de *phbB::gusA* y *phbR::gusA*.

Las fusiones transcripcionales con *gusA* contienen la región promotora de los genes *phbB* y *phbR*, mientras que las fusiones traduccionales, contienen la región promotora, la región 5'-no traducida y parte de la región codificante de los genes *phbB* y *phbR* (Hernández Eligio, datos no publicados).

La actividad de β -glucuronidasa fue medida de acuerdo a lo reportado por Wilson *et al* (Wilson *et al.*, 1995). De los cultivos a evaluar, se extrajo 1 mL, se centrifugó y el paquete celular obtenido fue resuspendido en MgSO_4 10 mM. De la anterior suspensión celular se tomaron 20 μL y se mezclaron con 710 μL de Buffer Z (ver apéndice). Se adicionaron 10 μL de lisozima 10 mg/mL y se colocó a reaccionar a 37°C durante 5 minutos. Posteriormente se adicionaron 10 μL de tritón al 10%. Se agregó 100 μL de una solución de P-Nitrofenil- β -D-glucuronido (PNPG) 12.5 mM y se incubó durante 15 minutos a 28°C. La reacción se detuvo con la adición de 150 μL de Na_2CO_3 1.2 M. Se cuantificó la absorbancia de la mezcla a una longitud de onda de 405 nm y se calcularon las actividades específicas de acuerdo al CEM del PNPG=18000.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN PRIMERA PARTE

6.1 La limitación de hierro aumenta la síntesis de PHB y la transcripción de *phbBAC* en *A. vinelandii* UW136

En 1983 Reusch y Sadoff observaron que en medio mínimo con limitación de hierro, células competentes de *A. vinelandii* acumularon más PHB que células crecidas en medio adicionado con hierro (Reusch & Sadoff, 1983). Sin embargo se desconoce el mecanismo de regulación por el cual el metal produce dicho efecto sobre la síntesis PHB en *A. vinelandii*.

El medio BS contiene FeSO_4 18 μM , concentración similar de hierro a la que contiene el medio Luria Bertani y empleada en otros estudios como condición de exceso de hierro, en la cual *A. vinelandii* disminuye significativamente la producción de sideróforos (Cornish & Page, 1998). De acuerdo a lo anterior, se decidió evaluar el efecto de una concentración de hierro menor sobre la síntesis de PHB en la cepa *A. vinelandii* UW136, empleando medio BS adicionado con FeSO_4 1.8 μM . La figura 11 presenta que en limitación de hierro (medio BS FeSO_4 1.8 μM), *A. vinelandii* acumula más PHB que cuando crece en condiciones de exceso de hierro (medio BS FeSO_4 18 μM). La limitación de hierro afectó parcialmente el crecimiento de *A. vinelandii* en comparación con el exhibido en condición de exceso del metal (figura 11), debido a que este es un nutriente importante para esta bacteria para llevar a cabo diferentes procesos biológicos como respiración, fijación de nitrógeno y protección de la nitrogenasa (Page & von Tigerstrom, 1982, Page & Huyer, 1984).

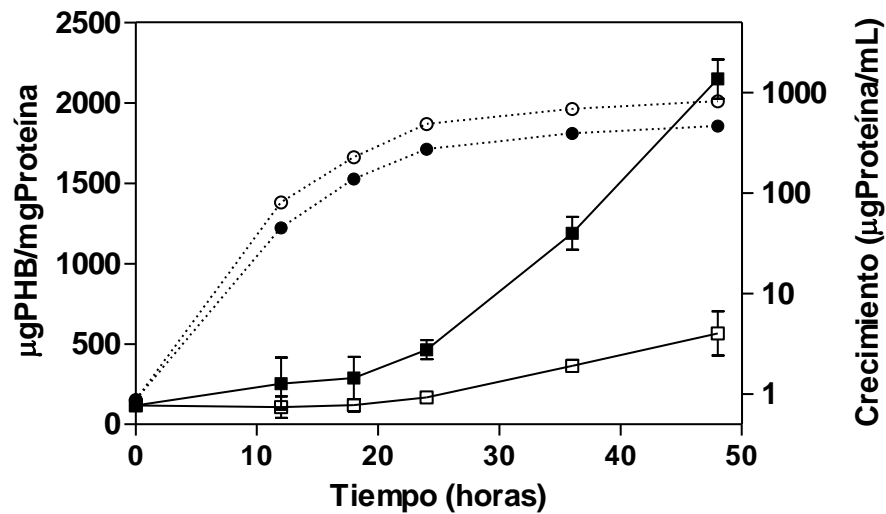


Figura 11. Acumulación de PHB en *A. vinelandii* crecida en medio BS con exceso y limitación de hierro.

Los cuadros corresponden a la cinética de acumulación de PHB y los círculos a la de crecimiento de la cepa UW136 en condiciones de exceso (símbolos abiertos) y limitación (símbolos cerrados) de hierro. Los resultados presentados corresponden al promedio de datos de dos experimentos independientes y las barras de error a la desviación estándar.

Para determinar si el aumento en la síntesis de PHB se debió a un aumento en la expresión de *phbBAC* se decidió comparar la expresión de *phbB* (niveles de transcritos) en las condiciones de exceso y limitación de hierro por RT-PCR en tiempo real. Como se observa en la figura 12, en medio con limitación de hierro los niveles de los transcritos de *phbB* aumentan de manera significativa en comparación con los presentados en condición de exceso de hierro. Estos resultados indican que el aumento de PHB en limitación de hierro es debido a un aumento en la expresión de *phbB*.

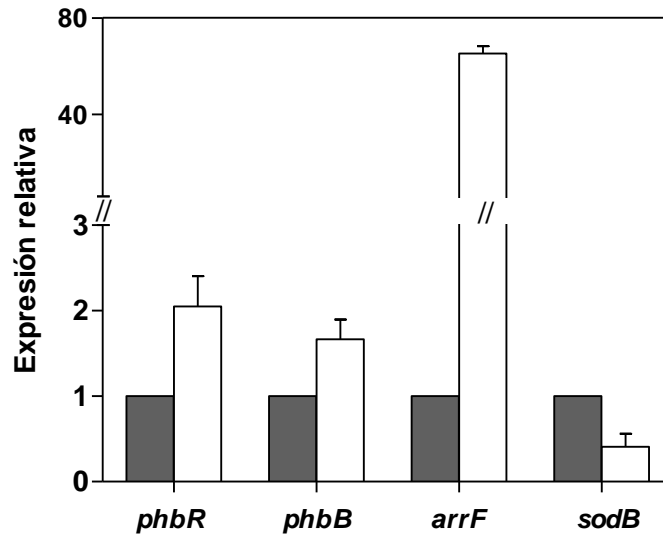


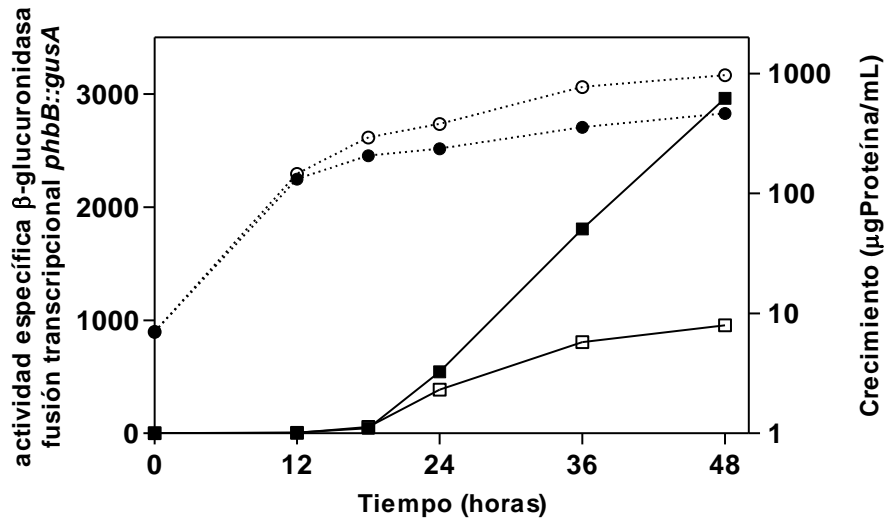
Figura 12. Expresión relativa de *phbR*, *phbB*, *arrF* y *sodB* en *A. vinelandii* UW136 crecida en BS con limitación y exceso de hierro.

Las barras grises corresponden a los valores obtenidos de la condición de exceso de hierro y las blancas de limitación de hierro. Estos datos representan el promedio de triplicados y las barras de error representan la desviación estándar.

Con el fin de determinar a qué nivel la limitación de hierro regula positivamente la expresión de *phbB*, se decidió comparar las actividades de las fusiones transcripcional y traduccional *phbB::gusA* en condiciones de exceso y limitación de hierro empleando las cepas AHW21 y AHW25 (ver tabla 2).

En las figuras 13A y 13B se observa que la limitación de hierro produjo un aumento en las actividades de las fusiones transcripcional y traduccional *phbB::gusA*. Debido a que el efecto es similar sobre ambas fusiones, se concluye que la limitación de hierro aumenta la expresión de *phbBAC* a nivel transcripcional.

(A)



(B)

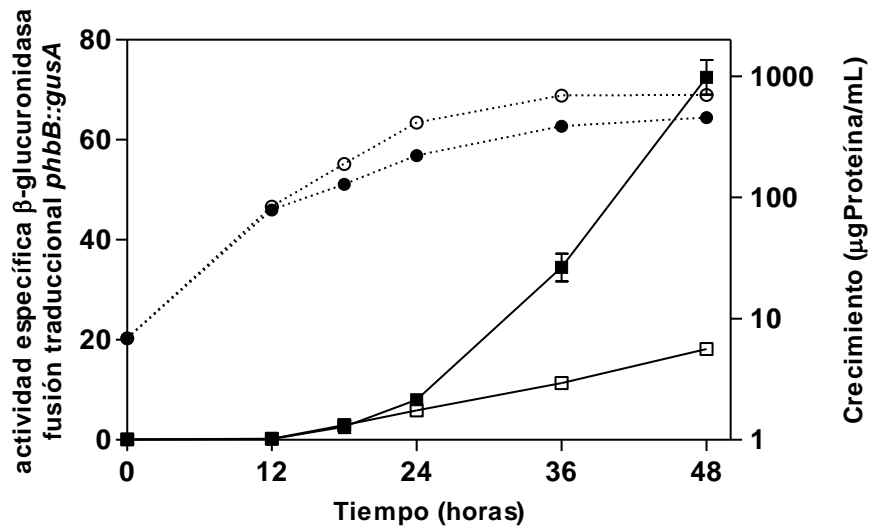


Figura 13. Actividad β -glucuronidasa de fusiones transcripcional y traduccional *phbB::gusA* en medio con exceso y limitación de hierro.

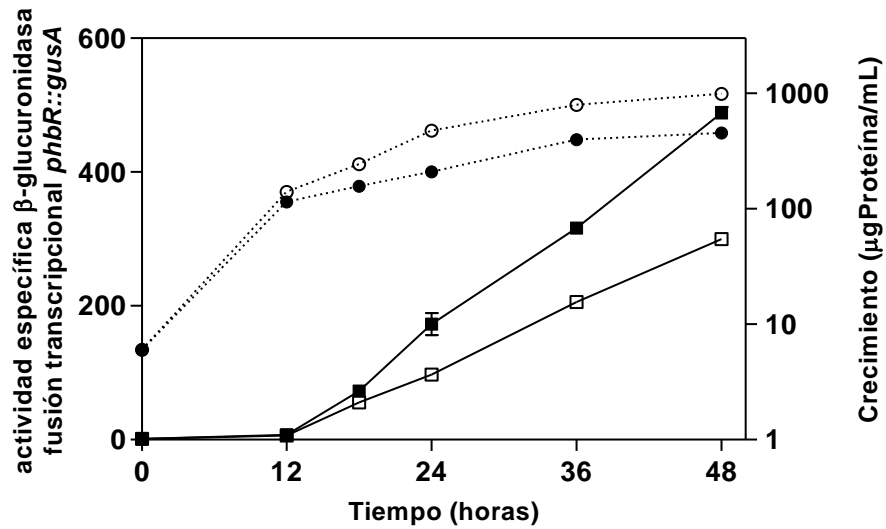
Actividad β -glucuronidasa (cuadros) de (A) fusión transcripcional y (B) fusión traduccional *phbB::gusA* en medio BS con exceso (símbolos abiertos) y limitación (símbolos cerrados) de hierro. Los círculos corresponden al crecimiento de las cepas AHW21 y AHW25. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

6.2 La limitación de hierro activa la expresión de *phbR* a nivel postranscripcional.

Los resultados anteriores indican que la limitación de hierro aumenta la transcripción de *phbBAC*, lo que produce un aumento en la síntesis de PHB. Es conocido que la transcripción del operón *phbBAC* sucede a partir de los promotores p_{B1} y p_{B2} , los cuales son activados por PhbR y RpoS respectivamente (Hernandez-Eligio *et al.*, 2011, Peralta-Gil *et al.*, 2002). Debido a que RpoS es un regulador global, en el presente trabajo no se determinó si en la condición de limitación de hierro, el aumento en la transcripción de *phbB* fue debida a un aumento en la expresión de *rpoS*. El siguiente paso fue determinar si la limitación de hierro produce un efecto sobre la expresión de *phbR*, que codifica para el regulador específico de *phbBAC*. Como se observa en la figura 12, la limitación de hierro aumenta los niveles de transcritos de *phbR* en comparación con lo presentado en la condición de exceso de hierro.

Adicionalmente se determinó el nivel de regulación de la limitación de hierro sobre la expresión de *phbR*. La figura 14A muestra que la limitación de hierro aumenta aproximadamente 0.6 veces la actividad de la fusión transcripcional y casi 3 veces la actividad de la fusión traduccional *phbR::gusA*, en comparación con lo presentado en la condición de exceso de hierro. Estos resultados sugieren que la limitación de hierro regula positivamente la expresión de *phbR* a nivel postranscripcional.

(A)



(B)

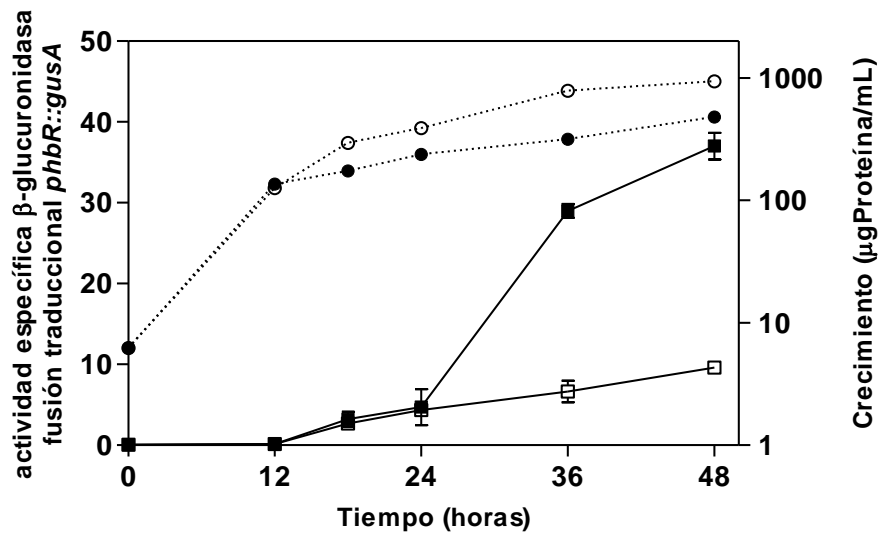


Figura 14. Actividad β -glucuronidasa de fusiones transcripcional y traduccional *phbR::gusA* en medio con exceso y limitación de hierro.

Actividad β -glucuronidasa (cuadros) de (A) fusión transcripcional y (B) fusión traduccional *phbR::gusA* en medio BS con exceso (símbolos abiertos) y limitación (símbolos cerrados) de hierro. Los círculos corresponden al crecimiento de las cepas AHW13 y AHW17. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

6.3 ArrF regula positivamente la expresión de *phbR* a nivel postranscripcional.

Hasta el momento se ha identificado que la limitación de hierro en *A. vinelandii*, aumenta la transcripción de *phbBAC* mediante la regulación positiva de *phbR* a nivel postranscripcional, sin embargo se desconoce el mecanismo por el cual esto sucede.

Los niveles de ArrF aumentan en condiciones de limitación de hierro y la expresión de sus genes blanco, como *sodB*, disminuye (figura 12) (Jung & Kwon, 2008). Normalmente los sRNAs dependientes de hierro regulan negativamente sus mRNAs blanco por apareamiento antisentido, lo cual lleva a una degradación de ambos RNAs por el degradosoma (Salvail & Massé, 2011). Sin embargo existe un caso en *E. coli* en el cual RyhB regula directamente de manera positiva la traducción de un mRNA (Prévost *et al.*, 2007). La región 5' no traducida del mRNA *shiA*, que codifica para una shikimato permeasa, forma una estructura secundaria que secuestra el Shine Dalgarno (SD) y al codón de inicio. La interacción entre mRNA *shiA* y RyhB produce una liberación del SD lo cual permite la traducción del mRNA *shiA* (Prévost *et al.*, 2007). De acuerdo a lo anterior y a la disminución en la acumulación de PHB que produce la mutación en *arrF* (figura 8), se decidió evaluar a ArrF como una vía por la cual el hierro regula la expresión de *phbR*.

Inicialmente se determinó si la mutación en *arrF* produce un efecto sobre la expresión de *phbR* y *phbB*. Como se observa en la figura 15, la mutante *arrF* presenta una disminución significativa en los niveles de transcritos de *phbR* y *phbB*, en comparación con los presentados en la cepa silvestre.

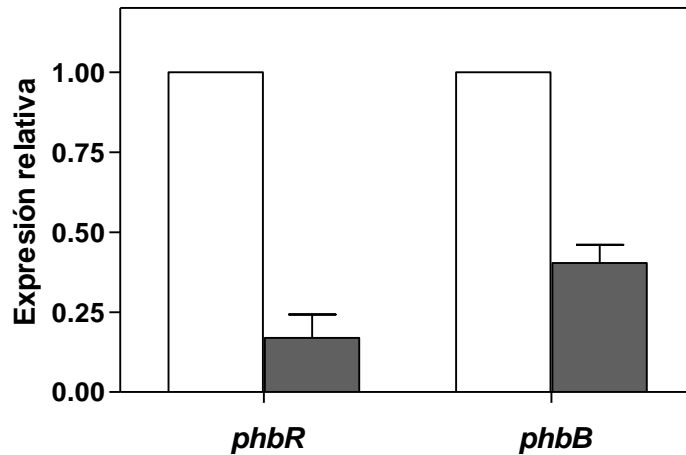
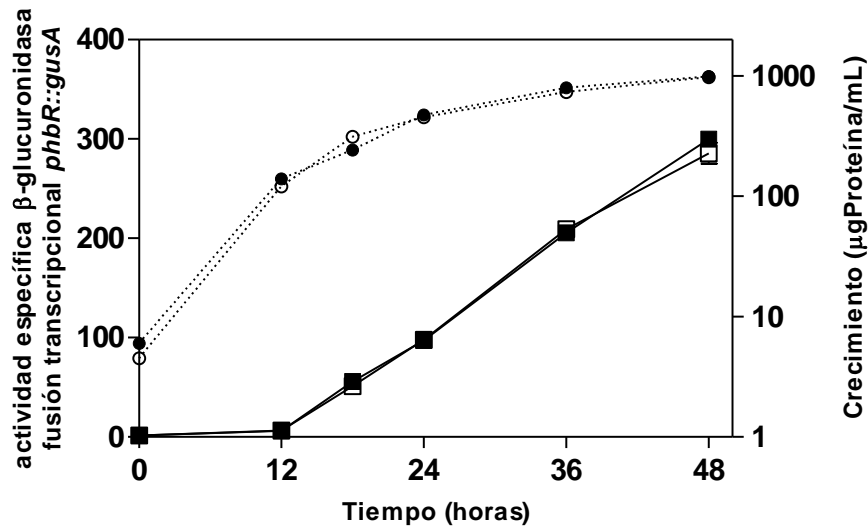


Figura 15. Niveles de expresión de *phbR* y *phbB* en las cepas *A. vinelandii* UW136 y *arrF*-. Las cepas UW136 (barras blancas) y *arrF*- (barras grises) fueron crecidas en medio líquido PY 2% sacarosa hasta 30 horas de incubación. Estos datos representan el promedio de triplicados y las barras de error representan la desviación estándar.

Debido a que el efecto de la mutación en *arrF* es mayor sobre la expresión de *phbR* que sobre *phbB*, se determinó a qué nivel la mutación en *arrF* afecta la expresión de *phbR* empleando las cepas AHW13, AHW17, LMW13 y LMW14 (ver tabla 2). La figura 16A presenta la actividad β -glucuronidasa de la fusión transcripcional *phbR::gusA* en la cepa silvestre y la mutante *arrF*-, la cual fue similar entre ambas cepas. De manera opuesta, en la figura 16B se observa que la mutante *arrF* presenta una disminución significativa en la actividad de la fusión traduccional *phbR::gusA* en comparación con la cepa silvestre. Estos resultados sugieren que el sRNA ArrF regula positivamente la expresión de *phbR* a nivel postranscripcional, probablemente por un mecanismo similar al de RyhB sobre mRNA *shiA* en *E. coli*.

(A)



(B)

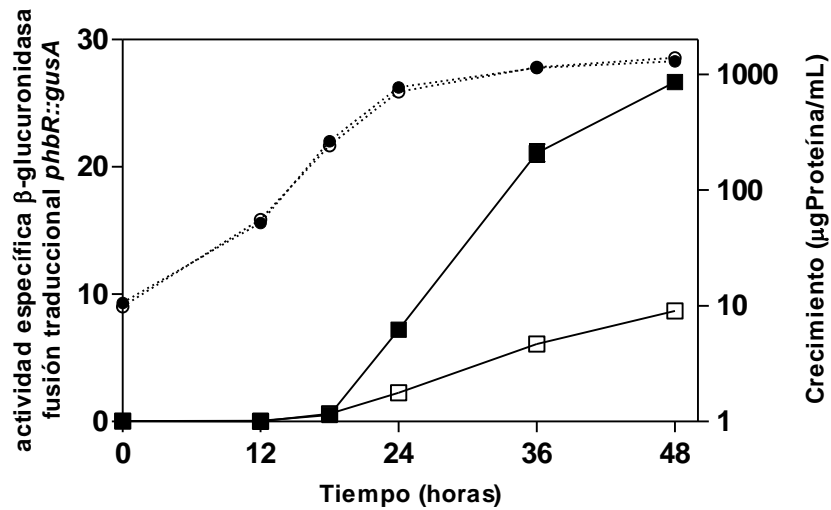


Figura 16. Actividad β -glucuronidasa de las fusiones transcripcional y traduccional *phbR::gusA* en las cepas UW136 y *arrF*.

Actividad β -glucuronidasa (cuadros) de (A) fusión transcripcional y (B) traduccional *phbR::gusA* en las cepas UW136 (símbolos cerrados) y *arrF* (símbolos abiertos) crecidas en medio BS FeSO_4 18 μM (exceso de hierro). Los círculos corresponden al crecimiento de las cepas AHW13, AHW17, LMW1 y LMW2. Los datos son representativos de dos experimentos independientes.

6.4. ArrF no es la única vía por la cual el hierro regula la síntesis de PHB en *A. vinelandii*.

Los resultados obtenidos hasta el momento indican que el hierro regula la síntesis de PHB en *A. vinelandii* mediante la regulación de la expresión de *arrF*, el cual regula positivamente a *phbR* a nivel post-transcripcional, sin embargo estos datos no descartan que exista otra vía por la cual el hierro regule la síntesis de PHB. Si ArrF es la única vía para la regulación asociada al hierro, la mutante *arrF* no debería presentar diferencias en la acumulación de PHB cuando crece en medio BS con exceso y limitación del metal. Para determinar lo anterior, se cuantificaron los niveles de PHB de la cepa *arrF* en ambas condiciones. La figura 17 muestra que en limitación de hierro la mutante *arrF* acumuló más PHB que en medio con exceso de hierro, sin embargo no llegó a alcanzar los niveles que acumula la cepa silvestre UW136 en medio con limitación de hierro. Estos resultados sugieren que el sRNA ArrF no es la única vía por la cual la limitación de hierro favorece la síntesis de PHB. Sin embargo puede ser la principal debido a que los valores de PHB en la mutante *arrF* en la condición de limitación de hierro, fueron similares a los presentados por la cepa silvestre UW136 en medio con exceso de hierro hasta las 36 horas y solamente el doble a las 48 horas de incubación.

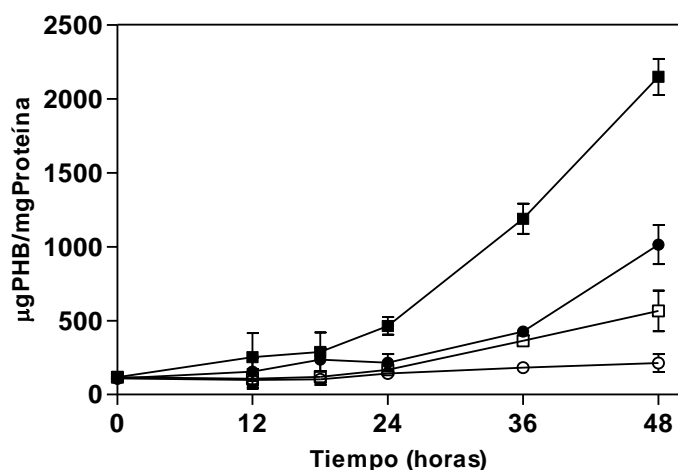


Figura 17. Cinética de acumulación de PHB en *A. vinelandii* UW136 y *arrF* en medio BS con exceso y limitación de hierro.

Cinética de acumulación de PHB de la cepa UW136 (cuadros) y la mutante *arrF* (círculos), en condiciones de exceso (símbolos abiertos) y limitación (símbolos cerrados) de hierro. Los datos corresponden al promedio de datos de dos experimentos independientes y las barras de error a la desviación estándar.

Estos resultados difieren a los obtenidos por Pyla y colaboradores en el 2009, quienes reportaron a ArrF como un regulador negativo de la expresión de *phbB* y *phbR*. Es probable que estas diferencias sean debidas a las cepas utilizadas, debido a que en el presente trabajo se empleó la cepa de referencia UW136 (Setubal *et al*, 2009) y en el estudio de Pyla y colaboradores la cepa KCTC 23243 (Pyla *et al*, 2010, Pyla *et al*, 2009). Cabe anotar que en el estudio de Pyla y colaboradores, la cepa KCTC 23243 si presentó mayores niveles de PHB en medio con limitación de hierro, en comparación con los presentados en medio con exceso del metal, lo cual no correlaciona con el fenotipo de la mutación en *arrF* reportado por los autores, debido a que en ambas condiciones (mutación en *arrF* y presencia de hierro) el sRNA ArrF se encuentra reprimido (Jung & Kwon, 2008) .

7. CONCLUSIONES PRIMERA PARTE

Los resultados obtenidos permiten concluir lo siguiente:

- La limitación de hierro regula positivamente la síntesis de PHB mediante la regulación de la expresión de *phbR* a nivel postranscripcional.
- El sRNA ArrF contribuye a la síntesis de PHB mediante la regulación de la expresión de *phbR* a nivel postranscripcional.
- Existe otra vía de regulación aparte de ArrF por la cual la limitación de hierro favorece la síntesis de PHB en *A. vinelandii*.

8. RESULTADOS Y DISCUSIÓN SEGUNDA PARTE

8.1. Mutagénesis al azar en las cepas *A. vinelandii* UW136 *ptsP*⁻ y UW136 *phbR*⁻.

Una estrategia que se ha empleado para identificar proteínas relacionadas con el sistema PTS^{Ntr} en la regulación de la síntesis de PHB, ha sido la realización de una mutagénesis al azar en las cepas *A. vinelandii* UW*ptsP*⁻ y *phbR*⁻ para obtener nuevas mutantes con variación en el fenotipo de opacidad asociado a la acumulación de PHB en medio sólido PY 2% sacarosa.

De 5174 mutantes obtenidas en la mutagénesis al azar de la cepa pUW136 *ptsP*⁻, dos mutantes candidatas (UW*ptsP*12 y UW*ptsP*18) presentaron reversión parcial de fenotipo de opacidad y una mutante (UW*ptsP*13) presentó menos opacidad (tabla 3). En el caso de la mutagénesis de la cepa *phbR*⁻, de 2155 mutantes evaluadas, dos mutantes (UW*phbR*3 y UW*phbR*12) presentaron menor opacidad y otras dos (UW*phbR*5 y UW*phbR*6) presentaron mayor opacidad (tabla 3).

Cepa	Mutantes Tn5 evaluadas	Candidatas PHB aumentado	Candidatas PHB disminuido
UW136 <i>ptsP</i> ⁻	5174	2	1
UW136 <i>phbR</i> ⁻	2155	2	2

Tabla 3. Mutagénesis al azar en las cepas *A. vinelandii* UW136 *ptsP*⁻ y *phbR*⁻.

La estrategia empleada para determinar el sitio de inserción del mini-Tn5 en las mutantes candidatas, descrita en materiales y métodos, permitió identificar el sitio de inserción del

transposón en las mutantes *UWptsP12*, *UWptsP18* y *UWphbR12*. Para las otras mutantes candidatas no se logró identificar el sitio de inserción del transposón.

Mediante análisis de alineamiento BLAST de las secuencias obtenidas, usando el programa clustalW2 (Goujon *et al*, 2010), se identificó que las mutantes candidatas *UWptsP12* y *UWptsP18* presentaron interrupción del gen *clpA* por el transposón a +166 y +1473 nucleótidos del codón de inicio respectivamente. La mutante candidata *UWphbR12* presentó interrupción del gen *Avin23100* a -7 nucleótidos del codón de inicio.

El gen *clpA* de 2271 pb codifica para una proteína de 756 aminoácidos, la cual tiene una identidad del 65% y 90% con ClpA de *E. coli* y *P. aeruginosa* respectivamente (figura 18). ClpA es una chaperona de proteínas perteneciente a la superfamilia AAA+ (*ATPase associated with diverse cellular activities*), se organiza en un estructura de anillo hexamérico, posee actividad ATPasa la cual es requerida para el desdoblamiento de proteínas y translocación al interior de la proteasa ClpP para su degradación (Kirstein *et al.*, 2009).

```

A.vinelandii      MLNRELEVTLNLAFLKAKRHEFMTVEHLLLALLDNEAAAALVLRACGANIDKLRHDLQE 60
P.aeruginosa     MLNRELEVTLNLAFLKAKRHEFMTVEHLLLALLDNEAAATVLRACGANLDKLRRLDLQE 60
E.coli           MLNQELELSLNMAFARAREHRHEFMTVEHLLLALLSNPSAREALEACSVDLVALRQLEA 60
***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:
A.vinelandii      FIDSTTPLIPQHDEERETQPTLGFQRVLRQAVFHVQSSGKREVTGANVLVVAVFSEQESQA 120
P.aeruginosa     FIDSTTPLIPQHDEERETQPTLGFQRVLRQAVFHVQSSGKREVTGANVLVVAVFSEQESQA 120
E.coli           FIEQTTPVLPASEEERDTQPTLGFQRVLRQAVFHVQSSGRNEVTGANVLVVAVFSEQESQA 120
***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:
A.vinelandii      VFLKQQSVARIDVVNYIAHGISKVPGHGDHP-DGEHEMQUEEGGDASASGHPLAYASN 179
P.aeruginosa     VFLKQQSIARIDVVNYIAHGISKVPGAHEHPQDGEQDMQDEEGGESATSNHPLDAYASN 180
E.coli           AYLLRKHEVSRDLVVNFISHGTRKDEPTQSSDPGSPNSEEQAGGE-----ERMENFTTN 175
.:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:
A.vinelandii      LNELARQGRIDPLVGREFEVERVAQILARRRKNPPLLVEAGVGKTAIAEGLAKRIVDNQ 239
P.aeruginosa     LNELARQGRIDPLVGREFEVERVAQILARRRKNPPLLVEAGVGKTAIAEGLAKRIVDQG 240
E.coli           LNQLARVGGIDPLIGREKELERAIQVLCRRRKNPPLLVEGSGVGKTAIAEGLAWRIVQGD 235
***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:
A.vinelandii      VPDLLTHSVVYSLDLGALLAGTKYRGDFEKRFKALLNELRKKPHAILFIDEIHTIIGAGA 299
P.aeruginosa     VPDLLADSVVYSLDLGALLAGTKYRGDFEKRFKALLNELRKRPHAVLFIDEIHTIIGAGA 300
E.coli           VPEVMADCTIYSLDIGSLLAGTKYRGDFEKRFKALLKQLEQDNTNSILFIDEIHTIIGAGA 295
***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:
A.vinelandii      ASGGVMDASNLLKPLLSSGEIRCIGSTTFQEFRGIFEKDRALARRFQKVDVIEPSVEDTV 359
P.aeruginosa     ASGGVMDASNLLKPVLSGGEIRCIGSTTFQEFRGIFEKDRALARRFQKVDVTEPSVEDTY 360
E.coli           ASGGQVDAANLIKPLLSSGKIRVIGSTTYQEFNSIFEKDRALARRFQKIDITEPSIEETV 355
***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:
A.vinelandii      GILRGLKPRFEQHGGIEYSDEALRAAAELSFYINDRHMPDKAIDVIDEAGAFQRLQPED 419
P.aeruginosa     GILKGLKGRFEQHHHIEYSDEALRAAAELAARYINDRHMPDKAIDVIDEAGAYQRLQPEE 420
E.coli           QIINGLKPKEYAHHVRYTAKAVRAAVELAVKYINDRHLPDKAIDVIDEAGARARLMPVS 415
*:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:
A.vinelandii      RRAKLIDVAQVEDIVAKIARIIPKHVSTSDKELLRNLERDLKLTVFGQDAIDSLATAIK 479
P.aeruginosa     KRVKRIEVAQVEDIVAKIARIIPKHVTTSDKELLRNLERDLKLTVFGQDDAIESLSTAIK 480
E.coli           KRKKTNVNADIESVVARIARIPEKSVSQRDRTLKNLGDRLKMLVFGQDKAIEALTEAIK 475
*:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:
A.vinelandii      APPGYVGFQDGGLLTEAITKPHCVLLLDEIEKAHPEVFNLLLQVMDHGTTLTDNNGRKAD 599
P.aeruginosa     APPGYVGFQDGGLLTEAITKPHCVLLLDEIEKAHPEVFNLLLQVMDHGTTLTDNNGRKAD 600
E.coli           APPGYVGFQDGGLLTDAVIKPHAVLLLDEIEKAHPDFVNILLQVMDNGTTLTDNNGRKAD 595
*****:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:
A.vinelandii      FRSVIIIMTTNAGAETAARASIGFTLQDHSSDAMEVIKKSFTPEFRNRLDTHIIQFGRLSH 659
P.aeruginosa     FRNIIIMTTNAGA EVAARASIGFNQDHTTDAMEVIKKSFTPEFRNRLDTHIIQFGRLST 660
E.coli           FRNVVLVMTTNAGVRETERKSIGLIHQDNSTDAMEEIKKIFTPEFRNRLDNI IWF DHLST 655
**:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:
A.vinelandii      EVIKNIVDKFTELQAQLEDKRVQLDVSERARGWLAEHGYDAQMGARPMARLIQDRIKRP 719
P.aeruginosa     ETIKSVVDKFLTELQAQLEDKRVQLEVS DAARGWLAEKGYDVQMGARPMARLIQDKIKRP 720
E.coli           DVIHQVVDKFI VELQVQLDQKGVSLVQS EARNWLAEKGYDRAMGARPMARVIQDNLKKP 715
.:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:
A.vinelandii      LAEEILFGELAEHG-GVVHIDLEGEELSDFDFET-AAEVA---- 756
P.aeruginosa     LAEEILFGELAEHG-GLVHVDLKGDELAFEEFITAAEPA---- 758
E.coli           LANELLEFGSLVDGGQVTVALDKEKNELTGFQSAQKHKAEEAH 758
***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:***:

```

Figura 18. Alineamiento de ClpA de *A. vinelandii*, *P. aeruginosa* y *E. coli*.
Realizado con el programa ClustalW2 (Goujon *et al*, 2010).

El gen Avin23100 presenta una secuencia codificante para una proteína con una identidad del 85% con Oprl de *P. aeruginosa* (figura 19). De acuerdo a lo anterior el gen Avin23100 fue denominado *oprI*. Oprl es una lipoproteína de membrana externa de 83 aminoácidos (Cornelis *et al.*, 1989). Los primeros 19 aminoácidos forman el péptido señal necesario para su exportación (figura 19) (Cornelis *et al.*, 1989). Oprl es una de las lipoproteínas mayoritarias en la membrana externa y es ortóloga a la lipoproteína Braun o Lpp en *E. coli* (Mizuno & Kageyama, 1979). En *P. aeruginosa* Oprl se encuentra en dos formas, una unida al peptidoglicano y otra libre pero con el ácido hexadecanoico adicionado en el extremo N-terminal (Mizuno & Kageyama, 1979).

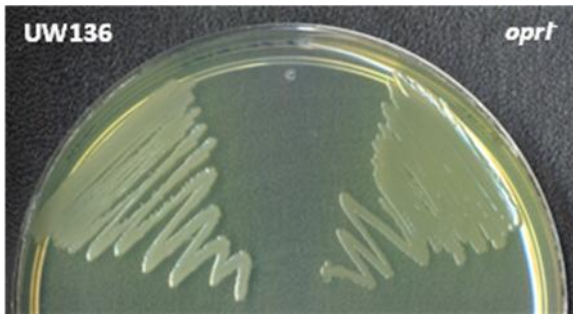
	Péptido señal
A.vinelandii	MNNALKISALTLAALLAAGCSSASKESDARITATEDAAARAQARADEAYRKADEALAAAQ 60
P.aeruginosa	MNNVLKFSALALAAVLATGCSSHSKETEARLTATEDAAARAQARADEAYRKADEALGAAQ 60
	*:*
A.vinelandii	RAQQTAEANERALRMLEKASRK 83
P.aeruginosa	KAQQTAEANERALRMLEKASRK 83
	:*****

Figura 19. Alineamiento de Oprl de *A. vinelandii* y *P. aeruginosa*. Los primeros 19 aminoácidos corresponden al péptido señal. Alineamiento realizado mediante ClustalW2 (Goujon *et al.*, 2010).

8.2. Una mutación en el gen *oprI* disminuye la acumulación de PHB en *A. vinelandii* UW136.

Se decidió producir la mutación en *oprI* en la cepa silvestre UW136 y evaluar su efecto en la síntesis de PHB. Al igual que la doble mutante *phbR⁻-oprI⁻* obtenida en la mutagénesis al azar, la mutante *oprI⁻* presentó una disminución en la acumulación de PHB (figuras 20A y 20B).

(A)



(B)

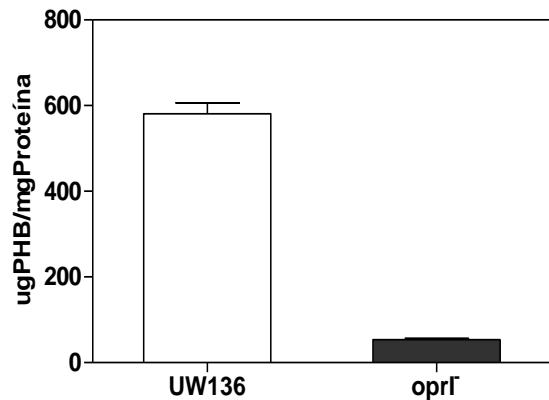


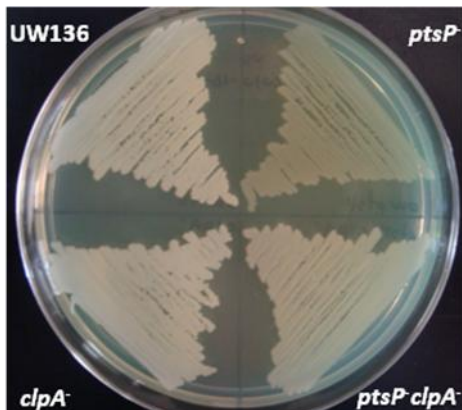
Figura 20. Fenotipo de opacidad y acumulación de PHB de las cepas *A. vinelandii* UW136 y *oprI*. (A) Fenotipo de opacidad. (B) Acumulación de PHB. Las células fueron crecidas en medio PY 2% hasta 72 horas de incubación a 30°C.

Debido a que la mutación en *oprI* tiene un efecto negativo sobre la síntesis de PHB, se descartó que exista una relación con el sistema PTS^{Ntr} en la regulación de la producción del polímero. Sin embargo es interesante identificar como la lipoproteína OprI está asociada a la síntesis de PHB.

8.3. La mutación en *clpA* revierte parcialmente la acumulación de PHB en la cepa *A. vinelandii ptsP*.

Una vez identificado el sitio de inserción del mini-Tn5 en las candidatas *ptsP12* y *ptsP18*, se decidió crear la cepa UW136 *clpA*⁻ y nuevamente la mutante UW*ptsP-clpA* por mutagénesis sitio-dirigida. Como se observa en la figura 21A, la mutación en *clpA* no produjo un cambio en el fenotipo de opacidad en la cepa silvestre, compatible con una cantidad similar acumulada de PHB (figura 21B). En el caso de la cepa *ptsP*⁻, la mutación en *clpA* produjo un fenotipo de opacidad compatible con un aumento en la síntesis de PHB, sin embargo los niveles acumulados del polímero en la doble mutante *ptsP*⁻*clpA*⁻ no llegaron a ser similares a los acumulados en la cepa silvestre (figuras 21A y 21B).

(A)



(B)

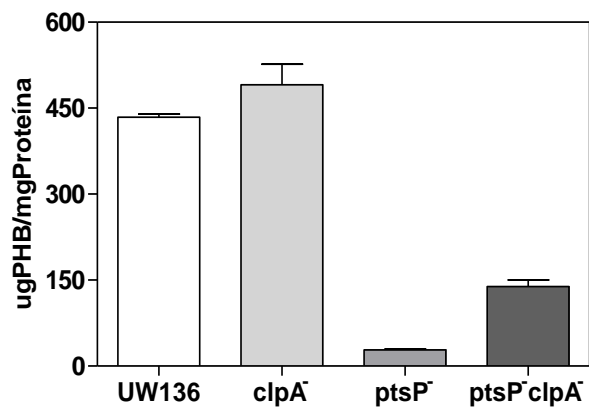


Figura 21. Fenotipo de opacidad y acumulación de PHB de las cepas *A. vinelandii* UW136, *ptsP*, *clpA* y *ptsP clpA*. (A) Fenotipo de opacidad. (B) Acumulación de PHB. Las células fueron crecidas en medio PY 2% hasta 72 horas de incubación a 30°C.

Estos resultados sugieren que la proteína ClpA podría estar asociada exclusivamente al sistema PTS^{Ntr} en la regulación de la síntesis de PHB en *A. vinelandii*, debido a que en la cepa silvestre no produce un cambio en la acumulación del polímero.

En *Pseudomonas putida* se conoce que existe una relación entre ClpA y la acumulación de PHA (Goff *et al.*, 2009), una mutación en *clpA* produce una disminución en la síntesis de PHA, tanto a temperaturas óptimas de crecimiento como a temperaturas adversas en presencia de glucosa, octanoato, estireno y ácido fenilacético como fuentes de carbono. Sin embargo se desconoce el mecanismo por el cual ClpA produce este efecto (Goff *et al.*, 2009).

8.4. La mutación en *clpP* ejerce un efecto positivo mayor que la mutación en *clpA* sobre la síntesis de PHB en la cepa *A. vinelandii ptsP⁻*.

La proteólisis intracelular es un proceso fundamental para la remoción de proteínas mal plegadas y la expresión génica (Kirstein *et al.*, 2009). Dentro de las proteasas descritas en bacterias, se encuentra ClpP, la cual se organiza en dos anillos heptaméricos (figura 22) e interacciona con las chaperonas ClpA y ClpX para el reconocimiento de los substratos a degradación. ClpA y ClpX reconocen los substratos mediante un dominio presente en el extremo N-terminal. Posteriormente los substratos son desdoblados mediante un proceso dependiente de ATP y translocados al interior de ClpP donde se encuentra la cámara proteolítica (figura 22) (Kirstein *et al.*, 2009).

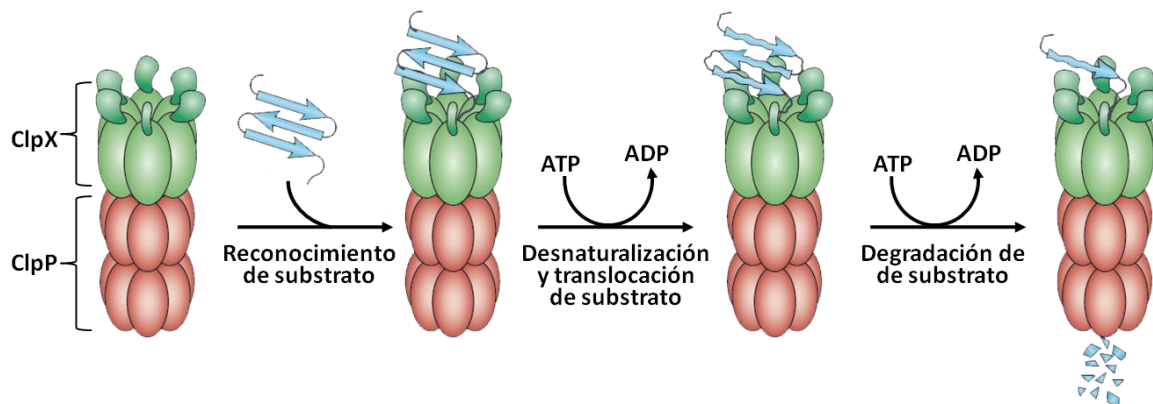
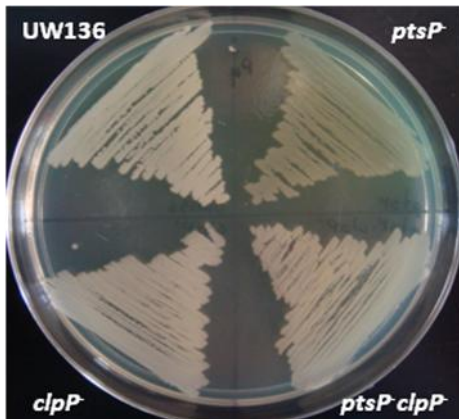


Figura 22. Mecanismo de reconocimiento y degradación de substratos por ClpP. Adaptado de (Kirstein *et al.*, 2009)

Debido a que la función de la chaperona ClpA está asociada a la función de la proteasa ClpP, se quiso determinar si una mutación en el gen *clpP* tendría algún efecto en la síntesis de PHB. Como se observa en las figuras 22A y 22B en la cepa silvestre, la mutación en *clpP* no produce variaciones en la acumulación de PHB, mientras que en la cepa *ptsP⁻*, la mutación en *clpP* produjo un fenotipo de mayor opacidad y acumulación de PHB (figuras 23A y 23B) en comparación con el producido por la mutación en *clpA* (figuras 21A y 21B).

(A)



(B)

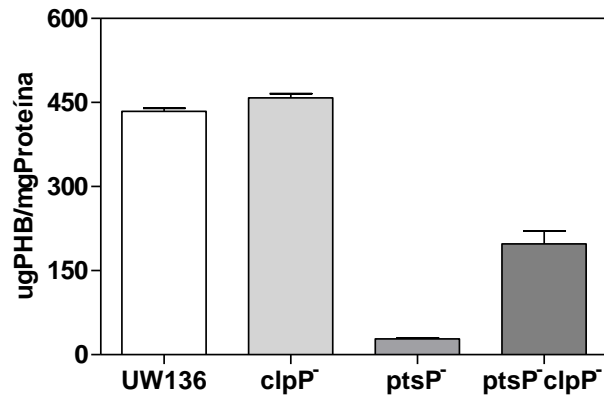


Figura 23. Fenotipo de opacidad y acumulación de PHB de las cepas *A. vinelandii* UW136, *ptsP*⁻, *clpP*⁻ y *ptsP*⁻*clpP*⁻.

(A) Fenotipo de opacidad. (B) Acumulación de PHB. Las células fueron crecidas en medio PY 2% hasta 72 horas de incubación a 30°C.

Estos resultados sugieren que la proteasa ClpP, en la cepa *ptsP*⁻, ejerce un efecto negativo sobre la síntesis de PHB, posiblemente mediante la degradación de un regulador positivo de la síntesis del polímero. Por otro lado, es probable que la proteasa ClpP y el sistema PTS^{Ntr} regulen la síntesis de PHB por una misma vía, debido a que la mutación en *clpP* fue capaz de revertir parcialmente el efecto negativo de la proteína IIA^{Ntr} no fosforilada. De acuerdo a lo anterior es posible que en una condición donde IIA^{Ntr} se encuentre no fosforilada, ClpP degrade a un regulador positivo de la síntesis de PHB.

8.5. El sistema PTS^{Ntr} regula la síntesis de alquilresorcinoles en *A. vinelandii* y una mutación en *clpP* revierte el fenotipo de la cepa *ptsP*⁻.

Durante la mutagénesis al azar, algunas mutantes candidatas fueron evaluadas para la producción de alquilresorcinoles (AR), debido a que en nuestro grupo se conoce que algunas mutaciones que afectan la síntesis de PHB, también afectan la producción de AR (Hernandez Eligio A., Romero Y., datos no publicados).

Durante el proceso de diferenciación a quiste, *A. vinelandii* produce los AR y alquilpironas (AP), los cuales reemplazan los fosfolípidos de la membrana y hacen parte de la capa exina. Sin embargo los AR no son esenciales para la formación del quiste o para la resistencia a la desecación (Segura *et al.*, 2009). Los genes que codifican para la síntesis de AR y AP conforman el operón *arsABCD*. ArsA y ArsD forman una sintasa de ácidos grasos y ArsB y ArsC son policétidos sintetas tipo III que sintetizan AR y AP respectivamente (Segura *et al.*, 2009). La expresión de *arsABCD* es activada por ArsR, un regulador tipo LysR (Romero Y., datos no publicados).

Durante la mutagénesis al azar se identificó que la mutante *ptsP*⁻ también presenta un fenotipo de no producción de AR, debido a que no presentó una tinción roja en comparación con la cepa silvestre (figura 24). Al igual que el efecto producido en la acumulación de PHB (figura 6), las mutaciones en los genes que codifican para las proteínas del sistema PTS^{Ntr}, produjeron fenotipos en la síntesis de AR (figura 24). Mutaciones en *ptsP* y *ptsO* afectaron negativamente la síntesis de AR, mientras que una mutación en *ptsN* no afectó el fenotipo de la producción de estos lípidos (figura 24). La mutación en *ptsN*, en la mutante *ptsP*⁻, produjo una tinción roja, compatible con una reversión en el fenotipo de producción de AR. Estos datos sugieren que al igual que en la regulación de la síntesis de PHB, probablemente la proteína IIA^{Ntr} no fosforilada ejerce un efecto negativo en la síntesis de AR.

La mutación en *clpP*⁻ produjo una reversión del fenotipo negativo en la síntesis de AR presentado por la cepa *ptsP*⁻, exhibiendo un aspecto similar al de la cepa silvestre UW136 (figura 24), lo cual sugiere que al igual que en la síntesis de PHB, la proteasa ClpP ejerce un efecto negativo en la síntesis de alquilresorcinolos.

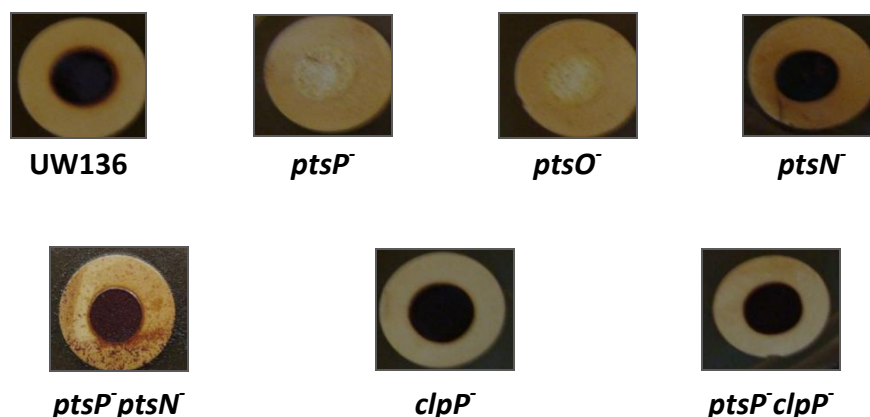


Figura 24. Fenotipo de producción de alquilresorcinoles en cepas de *A. vinelandii*

8.6. Relación entre el sistema PTS^{Ntr} y la proteasa ClpP en la regulación de la síntesis de PHB y alquilresorcinoles en *A. vinelandii*

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman el efecto regulatorio que ejerce el sistema PTS^{Ntr} sobre la síntesis de PHB en *A. vinelandii*, previamente reportado (Noguez *et al.*, 2008, Segura & Espin, 1998). Se conoce que la proteína IIA^{Ntr} en su estado no fosforilado ejerce un efecto negativo sobre la expresión de *phbB* y *phbR* mediante uno o más intermediarios desconocidos hasta el momento (Noguez *et al.*, 2008). Por otro lado, en el presente trabajo también se determinó que el sistema PTS^{Ntr} regula la síntesis de alquilresorcinoles, probablemente a través del estado de fosforilación de la proteína IIA^{Ntr}.

La estrategia experimental empleada permitió determinar que una mutación en el gen *clpP*, el cual codifica para una proteasa de igual nombre, restauró parcialmente los niveles de PHB y aparentemente de forma completa la síntesis de alquilresorcinoles en la mutante *ptsP*⁻, en comparación con lo presentado en la cepa silvestre. Estos resultados sugieren que probablemente el sistema PTS^{Ntr} y la proteasa ClpP regulan la síntesis de PHB y alquilresorcinoles por una misma vía, sin embargo también es probable que lo hagan por vías independientes.

La síntesis de PHB es regulada positivamente por el factor σ de fase estacionaria RpoS, el cual activa de manera directa la transcripción de *phbBAC* y de manera indirecta de *phbR* (Hernandez-Eligio *et al.*, 2011). Por otro lado, en nuestro grupo se ha identificado que RpoS activa la transcripción de *arsR*, el cual codifica para el principal regulador positivo de la transcripción del operón biosintético de alquilresorcinoles *arsABCD*. De acuerdo a lo anterior la síntesis de PHB y alquilresorcinoles comparten a RpoS como activador transcripcional.

En otras bacterias como *E. coli* y *P. aeruginosa* se conoce que ClpP con la chaperona ClpX reconocen de manera específica a RpoS para su degradación durante la fase exponencial (Schweder *et al.*, 1996, Bertani *et al.*, 2003). En *E. coli*, ClpXP reconoce a RpoS mediante la acción de la proteína RssB en su estado fosforilado. Durante la fase exponencial, RssB es fosforilada por ArcB, siendo capaz de interaccionar con RpoS (Mika & Hengge, 2005). Dicha interacción produce cambios conformacionales sobre RpoS lo que permite que ClpX lo reconozca como sustrato para degradación. Durante la fase estacionaria, se activan varias proteínas que son anti-adaptadoras de RssB, las cuales la secuestran, dejando libre a RpoS que ya no puede ser reconocido por ClpXP (Bougdour *et al.*, 2008). El genoma de *A. vinelandii* no presenta un homólogo al gen *rssB* de *E. coli* y hasta el momento no se ha identificado que ClpP degrade a RpoS en *A. vinelandii*, sin embargo existe evidencia de la regulación de RpoS a nivel transcripcional, postranscripcional o actividad en esta bacteria (Sandercock & Page, 2008).

De acuerdo a los resultados obtenidos hasta el momento y a la literatura reportada, es posible que RpoS sea un intermediario entre PTS^{Ntr} y la regulación de la síntesis de PHB y alquilresorcinoles. En esta posible vía de regulación, la proteasa ClpP estaría degradando a RpoS de manera dependiente de la proteína IIA^{Ntr} no fosforilada (figura 25). Para comprobar esta hipótesis es necesario comparar los niveles de RpoS entre la cepa silvestre y las mutantes de PTS^{Ntr} y *clpP*.

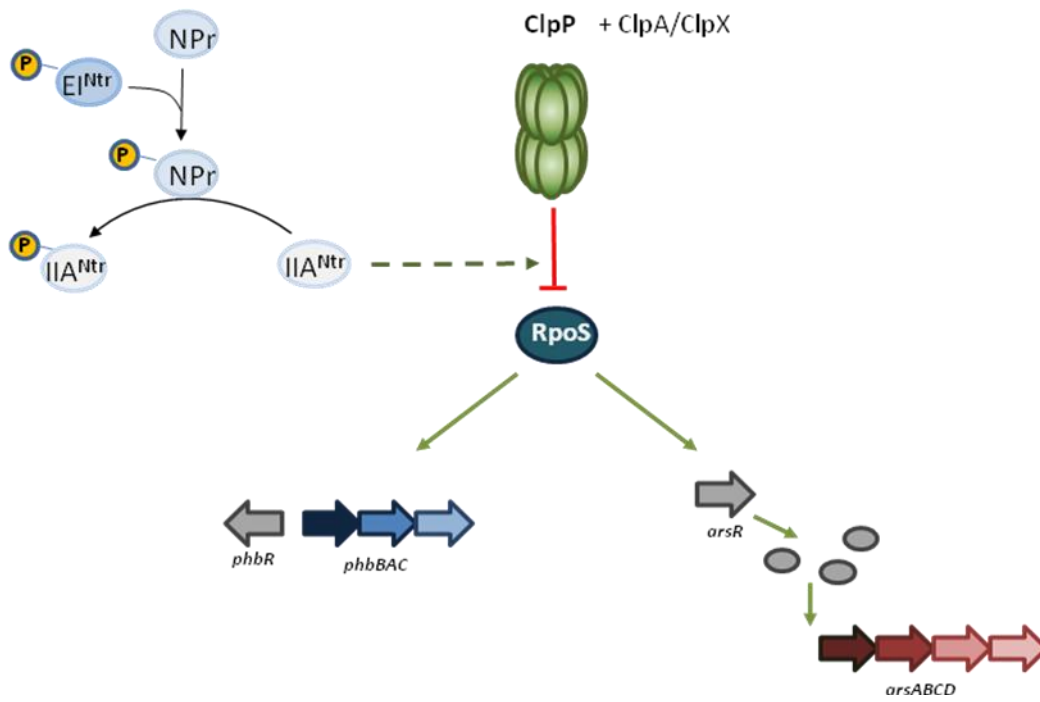


Figura 25. Modelo hipotético de la regulación del sistema PTS^{Ntr} y ClpP sobre la expresión de *phbR*, *phbBAC* y *arsR*.

9. CONCLUSIONES SEGUNDA PARTE

Los resultados obtenidos en el presente trabajo permiten concluir que:

- El sistema PTS^{Ntr} regula la síntesis de alquilresorcinoles en *A. vinelandii*, probablemente mediante el estado de fosforilación de IIA^{Ntr} .
- La mutación en *clpP* restaura parcialmente los niveles de PHB y aparentemente de forma completa los de alquilresorcinoles en la cepa mutante *A. vinelandii ptsP⁻*.
- El sistema PTS^{Ntr} representa un sistema de regulación global que controla diferentes procesos celulares en *A. vinelandii* y otras bacterias.

10. PERSPECTIVAS.

- Determinar si existe una interacción entre ArrF y el mRNA *phbR*.
- Identificar vías alternas a ArrF por las cuales la limitación de hierro contribuye a la síntesis de PHB.
- Comparar los niveles de RpoS entre la cepa silvestre y las mutantes PTS^{Ntr} y *clpP*.
- Caracterizar el mecanismo por el cual Oprl contribuye a la síntesis de PHB en *A. vinelandii*.

11. REFERENCIAS

- Anderson, A. J. & E. A. Dawes, (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev* **54**: 450-472.
- Bertani, I., M. Ševo, M. Kojic & V. Venturi, (2003) Role of GacA, LasI, RhII, Ppk, PsrA, Vfr and ClpXP in the regulation of the stationary-phase sigma factor *rpoS*/RpoS in *Pseudomonas*. *Arch Microbiol* **180**: 264-271.
- Bougdour, A., C. Cuning, P. J. Baptiste, T. Elliott & S. Gottesman, (2008) Multiple pathways for regulation of σ S (RpoS) stability in *Escherichia coli* via the action of multiple anti-adaptors. *Mol Microbiol* **68**: 298-313.
- Castañeda, M., J. Guzmán, S. Moreno & G. Espín, (2000) The GacS sensor kinase regulates alginate and poly-beta-hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **182**: 2624 - 2628.
- Castañeda, M., J. Sanchez, S. Moreno, C. Nunez & G. Espín, (2001) The global regulators GacA and sigma(S) form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **183**: 6787 - 6793.
- Cornelis, P., A. Bouia, A. Belarbi, A. Guyonvarch, B. Kammerer, V. Hannaert & J. C. Hubert, (1989) Cloning and analysis of the gene for the major outer membrane lipoprotein from *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **3**: 421-428.
- Cornish, A. S. & W. J. Page, (1998) The catecholate siderophores of *Azotobacter vinelandii*: their affinity for iron and role in oxygen stress management. *Microbiology* **144**: 1747-1754.
- Choi, J., D. Shin, H. Yoon, J. Kim, C.-R. Lee, M. Kim, Y.-J. Seok & S. Ryu, (2010) *Salmonella* pathogenicity island 2 expression negatively controlled by EIIA^{Ntr}-SsrB interaction is required for *Salmonella* virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 20506-20511.
- de Lorenzo, V., M. Herrero, U. Jakubzik & K. N. Timmis, (1990) Mini-Tn5 transposon derivatives for insertion mutagenesis, promoter probing, and chromosomal insertion of cloned DNA in gram-negative eubacteria. *J Bacteriol* **172**: 6568-6572.
- Figurski, D. H. & D. R. Helinski, (1979) Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc Natl Acad Sci USA* **76**: 1648-1652.
- Galindo, E., C. Pena, C. Nunez, D. Segura & G. Espín, (2007) Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Micro Cell Fact* **6**: 7.
- Goff, M., J. Nikodinovic-Runic & K. E. O'Connor, (2009) Characterization of temperature-sensitive and lipopolysaccharide overproducing transposon mutants of *Pseudomonas putida* CA-3 affected in PHA accumulation. *FEMS Microbiol Lett* **292**: 297-305.
- Goujon, M., H. McWilliam, W. Li, F. Valentin, S. Squizzato, J. Paern & R. López, (2010) A new bioinformatics analysis tools framework at EMBL-EBI. *Nucleic Acid Res* **38**: W695-W699.
- Grage, K., A. C. Jahns, N. Parlane, R. Palanisamy, I. A. Rasiah, J. A. Atwood & B. H. A. Rehm, (2009) Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and

- Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. *Biomacromolecules* **10**: 660-669.
- Hernández-Eligio, A., M. Castellanos, S. Moreno & G. Espín, (2011) Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes *phbBAC* by PhbR and RpoS. *Microbiology* **157**: 3014-3023.
- Jung, Y.-S. & Y.-M. Kwon, (2008) Small RNA ArrF Regulates the Expression of *sodB* and *feSII* genes in *Azotobacter vinelandii*. *Curr Microbiol* **57**: 593-597.
- Kirstein, J., N. Moliere, D. A. Dougan & K. Turgay, (2009) Adapting the machine: adaptor proteins for Hsp100/Clp and AAA+ proteases. *Nat Rev Micro* **7**: 589-599.
- Lee, C.-R., S.-H. Cho, H.-J. Kim, M. Kim, A. Peterkofsky & Y.-J. Seok, (2010) Potassium mediates *Escherichia coli* enzyme IIA^{Ntr}-dependent regulation of sigma factor selectivity. *Mol Microbiol* **78**: 1468-1483.
- Lee, C.-R., S.-H. Cho, M.-J. Yoon, A. Peterkofsky & Y.-J. Seok, (2007) *Escherichia coli* enzyme IIA^{Ntr} regulates the K⁺ transporter TrkA. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 4124-4129.
- Lee, C.-R., B.-M. Koo, S.-H. Cho, Y.-J. Kim, M.-J. Yoon, A. Peterkofsky & Y.-J. Seok, (2005) Requirement of the dephospho-form of enzyme IIA^{Ntr} for derepression of *Escherichia coli* K-12 *ilvBN* expression. *Mol Microbiol* **58**: 334-344.
- Livak, K. J. & T. D. Schmittgen, (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2⁻($\Delta\Delta C(T)$) Method. *Methods* **25**: 402-408.
- Lüttmann, D., R. Heermann, B. Zimmer, A. Hillmann, I. S. Rampp, K. Jung & B. Görke, (2009) Stimulation of the potassium sensor KdpD kinase activity by interaction with the phosphotransferase protein IIA^{Ntr} in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **72**: 978-994.
- Lloyd, J. R., C. Leang, A. L. Hodges Myerson, M. V. Coppi, S. Cuifo, B. Methe, S. J. Sandler & D. R. Lovley, (2003) Biochemical and genetic characterization of PpcA, a periplasmic c-type cytochrome in *Geobacter sulfurreducens*. *Biochem J* **369**: 153-161.
- Massé, E., H. Salvail, G. Desnoyers & M. Arguin, (2007) Small RNAs controlling iron metabolism. *Curr Opin Microbiol* **10**: 140-145.
- Mika, F. & R. Hengge, (2005) A two-component phosphotransfer network involving ArcB, ArcA, and RssB coordinates synthesis and proteolysis of SigmaS (RpoS) in *E. coli*. *Genes Dev* **19**: 2770-2781.
- Mizuno, T. & M. Kageyama, (1979) Isolation and Characterization of a Major Outer Membrane Protein of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Biochem* **85**: 115-122.
- Noguez, R., D. Segura, S. Moreno, A. Hernández, K. Juárez & G. Espín, (2008) Enzyme I^{Ntr}, NPr and IIA^{Ntr} Are Involved in Regulation of the Poly- β -Hydroxybutyrate Biosynthetic Genes in *Azotobacter vinelandii*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **15**: 244-254.
- Page, W. J. & M. Huyer, (1984) Derepression of the *Azotobacter vinelandii* siderophore system, using iron-containing minerals to limit iron repletion. *J Bacteriol* **158**: 496-502.
- Page, W. J. & M. v. Tigerstrom, (1978) Induction of transformation competence in *Azotobacter vinelandii* iron-limited cultures. *Can J Microbiol* **24**: 1590-1594.

- Page, W. J. & M. von Tigerstrom, (1982) Iron- and molybdenum-repressible outer membrane proteins in competent *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **151**: 237-242.
- Peralta-Gil, M., D. Segura, J. Guzman, L. Servin-Gonzalez & G. Espin, (2002) Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic phbBAC operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *J Bacteriol* **184**: 5672 - 5677.
- Peterkofsky, A., G. Wang & Y.-J. Seok, (2006) Parallel PTS systems. *Arch Biochem Biophysics* **453**: 101-107.
- Pflüger-Grau, K., M. Chavarría & V. de Lorenzo, (2011) The interplay of the EIIA^{Ntr} component of the nitrogen-related phosphotransferase system (PTS^{Ntr}) of *Pseudomonas putida* with pyruvate dehydrogenase. *Biochim Biophys Acta - General Subjects* **1810**: 995-1005
- Pflüger-Grau, K. & B. Görke, (2010) Regulatory roles of the bacterial nitrogen-related phosphotransferase system. *Trends Microbiol* **18**: 205-214.
- Prévost, K., H. Salvail, G. Desnoyers, J.-F. Jacques, É. Phaneuf & E. Massé, (2007) The small RNA RyhB activates the translation of *shiA* mRNA encoding a permease of shikimate, a compound involved in siderophore synthesis. *Mol Microbiol* **64**: 1260-1273.
- Pyla, R., T.-J. Kim, J. Silva & Y.-S. Jung, (2009) Overproduction of poly-β-hydroxybutyrate in the *Azotobacter vinelandii* mutant that does not express small RNA ArrF. *App Microbiol Biotechnol* **84**: 717-724.
- Pyla, R., T.-J. Kim, J. Silva & Y.-S. Jung, (2010) Proteome analysis of *Azotobacter vinelandii* ΔarrF mutant that overproduces poly-β-hydroxybutyrate polymer. *App Microbiol Biotechnol* **88**: 1343-1354.
- Reusch, R. N. & H. L. Sadoff, (1983) D-(-)-poly-beta-hydroxybutyrate in membranes of genetically competent bacteria. *J Bacteriol* **156**: 778-788.
- Salvail, H. & E. Massé, (2011) Regulating iron storage and metabolism with RNA: an overview of posttranscriptional controls of intracellular iron homeostasis. *WIREs RNA* doi: 10.1002/wrna.102
- Sandercock, J. R. & W. J. Page, (2008) RpoS Expression and the General Stress Response in *Azotobacter vinelandii* during Carbon and Nitrogen Diauxic Shifts. *J Bacteriol* **190**: 946-953.
- Schweder, T., K. Lee, O. Lomovskaya & A. Matin, (1996) Regulation of *Escherichia coli* starvation sigma factor (sigma s) by ClpXP protease. *J Bacteriol* **178**: 470-476.
- Segura, D., T. Cruz & G. Espin, (2003) Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly-beta-hydroxybutyrate synthesis. *Arch Microbiol* **179**: 437 - 443.
- Segura, D. & G. Espin, (1998) Mutational Inactivation of a Gene Homologous to *Escherichia coli ptsP* Affects Poly-beta -Hydroxybutyrate Accumulation and Nitrogen Fixation in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **180**: 4790-4798.
- Segura, D., O. Vite, Y. Romero, S. Moreno, M. Castaneda & G. Espin, (2009) Isolation and Characterization of *Azotobacter vinelandii* Mutants Impaired in Alkylresorcinol Synthesis: Alkylresorcinols Are Not Essential for Cyst Desiccation Resistance. *J Bacteriol* **191**: 3142-3148.

- Senior, P. & E. Dawes, (1973) The regulation of poly-beta-hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem J* **134**: 225 - 238.
- Setubal, J. C., P. dos Santos, B. S. Goldman, H. Ertesvag, G. Espin, L. M. Rubio, S. Valla, N. F. Almeida, D. Balasubramanian, L. Cromes, L. Curatti, Z. Du, E. Godsy, B. Goodner, K. Hellner-Burris, J. A. Hernandez, K. Houmiel, J. Imperial, C. Kennedy, T. J. Larson, P. Latreille, L. S. Ligon, J. Lu, M. Maerk, N. M. Miller, S. Norton, I. P. O'Carroll, I. Paulsen, E. C. Raulfs, R. Roemer, J. Rosser, D. Segura, S. Slater, S. L. Stricklin, D. J. Studholme, J. Sun, C. J. Viana, E. Wallin, B. Wang, C. Wheeler, H. Zhu, D. R. Dean, R. Dixon & D. Wood, (2009) Genome Sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *J Bacteriol* **191**: 4534-4545.
- Simon, R., U. Priefer & A. Puhler, (1983) A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Nat Biotech* **1**: 784-791.
- Song, J. H., R. J. Murphy, R. Narayan & G. B. H. Davies, (2009) Biodegradable and compostable alternatives to conventional plastics. *Phil Trans R Soc B* **364**: 2127-2139.
- Thompson, R. C., C. J. Moore, F. S. vom Saal & S. H. Swan, (2009a) Plastics, the environment and human health: current consensus and future trends. *Phil Trans R Soc B* **364**: 2153-2166.
- Thompson, R. C., S. H. Swan, C. J. Moore & F. S. vom Saal, (2009b) Our plastic age. *Phil Trans R Soc B* **364**: 1973-1976.
- Verlinden, R. A. J., D. J. Hill, M. A. Kenward, C. D. Williams & I. Radecka, (2007) Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *J Appl Microbiol* **102**: 1437-1449.
- Wilson, K. J., A. Sessitsch, J. C. Corbo, K. E. Giller, A. D. L. Akkermans & R. A. Jefferson, (1995) β -Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria. *Microbiology* **141**: 1691-1705.
- Zinn, M., B. Witholt & T. Egli, (2001) Occurrence, synthesis and medical application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv Drug Delivery Rev* **53**: 5-21.

12. APENDICE

Medio Burk 2% sacarosa (BS).

- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.79 mM
- $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 830 mM
- $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.018 mM
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mM
- Na_2SO_4 1.3 mM
- K_2HPO_4 4.6 mM
- KH_2PO_4 1.5mM
- Sacarosa 2%

Para medio sólido se adiciona 1.5% de agar.

Medio de competencia para *A. vinelandii* (CM).

- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.79 mM
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.5 mM
- Na_2SO_4 1.3 mM
- K_2HPO_4 4.6 mM
- KH_2PO_4 1.5mM
- Sacarosa 2%

Para medio sólido se adiciona 1.5% de agar.

Medio peptona extracto de levadura 2% sacarosa (PY).

- Peptona 5 g/L
- Extracto de levadura 3 g/L

Para medio sólido se adiciona 1.5% de agar.

Medio Luria Bertani (LB).

- Bacto triptona 10 g/L
- Extracto de Levadura 5 g/L
- NaCl₂ 172 mM

Para medio sólido se adiciona 1.5% de agar.

Buffer Z para ensayo de cuantificación actividad glucuronidasa.

- K₂HPO₄ 30 mM
- KH₂PO₄ 20 mM
- EDTA 1 mM
- Ditioneitol (DTT) 5 mM

Colorante azul rápido para detección de alquilresorcinoles.

- Azul rápido 0.5 %
- Ácido acético 5 %