



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

REGULACIÓN DEL OPERÓN BIOSINTÉTICO DE POLI- $\beta$ -HIDROXIBUTIRATO  
*phbBAC* POR EL SISTEMA DE REPRESIÓN CATABÓLICA POR CARBONO  
*CbrA/B-Hfq/Crc* EN *Azotobacter vinelandii*

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
**Maestro en Ciencias**

PRESENTA:

Lic. Victor Vicente Barrios Rafael

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Cinthia Ernestina Núñez López  
Instituto de Biotecnología, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Ricardo Oropeza Navarro  
Instituto de Biotecnología, UNAM

Dr. Alfredo Martínez Jiménez  
Instituto de Biotecnología, UNAM

Cuernavaca, Morelos. Mayo, 2021



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.



**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.

## **COMITÉ TUTOR**

<sup>1</sup>Dra. Cinthia E. Núñez López

<sup>1</sup>Dr. Alfredo Martínez Jiménez

<sup>1</sup>Dr. Ricardo Oropeza Navarro

## **JURADO DE EXAMEN**

<sup>1</sup>Dra. Clarita Olvera Carranza

<sup>1</sup>Dr. José Adelfo Escalante Lozada

<sup>1</sup>Dr. Baltazar Becerril Luján

<sup>1</sup>Dr. José Luis Puente García

<sup>2</sup>Dr. Víctor Manuel González Zúñiga

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología (IBt), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

<sup>2</sup>Centro de Ciencias Genómicas (CCG), Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la tutoría de la Dra. Cinthia E. Núñez López.

Durante el desarrollo del presente trabajo recibí financiamiento por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), con número de becario 957237, así como apoyo del proyecto PAPIIT-UNAM IN209521 a nombre de la Dra. Cinthia E. Núñez L., para la realización de este trabajo de investigación.

## **AGRADECIMIENTOS**

Principalmente a la Dra. Cinthia Núñez, quien me permitió ser parte de su grupo de trabajo desde la licenciatura. También por apoyarme innumerable veces en todos mis problemas académicos. Agradezco su confianza que siempre me ha brindado. La admiro mucho por la gran persona que es y por su enorme cariño que siempre la ha caracterizado. ¡Gracias jefa!

A los Drs. Guadalupe Espín y Daniel Segura, por sus comentarios y sugerencias que surgieron durante los seminarios que fueron de gran ayuda para darle una visión amplia de este proyecto.

A los Drs. Alfredo Martínez y Ricardo Oropeza por sus comentarios en cada tutorial y que gracias a ellos se planteaban nuevos objetivos en busca de mejorar el presente proyecto.

A los miembros del Jurado Revisor, los Drs. Clarita Olvera, José Adelfo Escalante, Baltazar Becerril, José Luis Puente y Víctor Manuel González, por su tiempo y dedicación que se tomaron para la revisión de este escrito.

A las técnicas académicas del laboratorio Espín-Merino: Biol. María Soledad Moreno León, M.C. Josefina Guzmán Aparicio y M. B. María Luis Tabche Barrera. Gracias por el apoyo técnico durante la realización de este trabajo, por siempre estar ahí para aconsejarnos y apoyarnos en todo momento, por sus pláticas amenas y por todas sus enseñanzas.

A la Unidad de Biblioteca ya que gracias a ellos fue posible acceder a varios artículos necesarios para este proyecto, además de que fueron una GRRAAAANNN ayuda durante el confinamiento ocasionado por la pandemia debido a que gracias a ellos fue posible tomar clases, seminarios, conferencias y muchas otras cosas más.

A la Unidad de Docencia del IBt conformada por Gloria Villa, José Antonio Bolaños y Jalil Saab (que ya se nos adelantó, QEP donde quiera que te encuentres), por su gran trabajo, especialmente Toño quien ha sido un salvador en este mundo de la burocracia.

A mi familia, por estar ahí siempre que los necesito, en las buenas y en las malas. Al apoyo de mis papás, que siempre se han preocupado por mi, a mi hermano y mis hermanas que siempre nos comunicamos, aunque sea por mensaje. ¡Gracias a todos los quiero mucho!

A toooooooooodos los y las estudiantes del laboratorio que hicieron los días más amenos y divertidos aún cuando las cosas no salían como queríamos. Al doctor señor profesor Carlitos Leonel (La joya) por todas sus enseñanzas, sus consejos, su paciencia. Chantal Ortiz (Chanty, que por cierto me debes unos tacos de los primis), Citlalli Gonzaga (La Gonzis, nunca la hagas enojar jugando fut, bastque o vóley porque no la cuentas), Pablo Olache (¡Ese pablurrissss!, aguas que es de la madero), Cristian Camilio (El Rolo, que después de vacaciones regresa con un rayón más), Juliana Rojo (La bere, que hasta la fecha creo que sigue intentando terminar de ver One Pice), Jesica Ruiz (La Jesiquita, no la molestes cuando está trabajando porque luego anda enojada y jijos pa' que quieres), Andrea Moyao (¡Moyis!, que espero el huerto de setas si haya funcionado), Thalía Barrientos (¡La Thalís!, buenaza para los goles aunque después de la pandemia quien sabe como ande), Fernando Loyola (Fer mamado, ya mide tu fuerza no todo queda con colaloca), Alan David (Alambrito, lo reconoces por su melena larga larga larga), Karen Amellaly (Karencita, una mujer muy ocupada porque siempre anda en llamada). A las personas que estuvieron y luego tomaron otro rumbo como Marcela Martínez, gracias por tus consejos y por tus enseñanzas, Holjes (¡Primo! que se fue con la competencia), Gabriela Morales, Ricardo Farrera (El kobe), entro otros muchos.

Al grupo de Dr. Enrique Merino, especialmente a su estudiante la M.C. Maricela Carrera quien me apoyo mucho en el aspecto bioinformático de este proyecto. Al M.C. Ricardo Ciria quien también fue un gran apoyo en el mismo aspecto. A José Luis Gama (El pepe) por tener todo el material listo siempre que lo necesitábamos. A doña Francis y Doña Mago que se encargaban de nuestro material. ¡Muchas Gracias!

A Andrea Castillo, mi compañera de vida que me ha soportado todo este tiempo (y el que falta y sino "quedé" jajaja). Por estar en las buenas, en las malas y en las peores. Gracias por estar ahí siempre...

## INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>1.- INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>2</b>
1.1 <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	2
1.2 Poli-hidroxiclcanoatos (PHAs).....	3
1.3 Producción de Poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) .....	4
1.4 Regulación de la síntesis de PHB en <i>A. vinelandii</i> .....	5
1.5 Represión catabólica por carbono (CCR) .....	9
1.6 Represión catabólica en <i>E. coli</i> .....	10
1.7 Represión catabólica en <i>Pseudomonas</i> y <i>Azotobacter</i> .....	11
1.8 Regulación de la represión catabólica por carbono en <i>Pseudomonas</i> y <i>A. vinelandii</i> .....	13
1.9 Sistema de dos componentes CbrA/CbrB .....	15
1.10 Producción de Poli-hidroxiclcanoatos (PHAs) en <i>Pseudomonas putida</i> y su regulación por la proteína Crc .....	16
<b>2.- ANTECEDENTES</b> .....	<b>18</b>
2.1 Abatimiento de la acumulación de PHB en la mutante <i>cbrA</i> de <i>A. vinelandii</i> ..	18
2.2 Síntesis de PHB en medio diaúxico (acetato-glucosa) en <i>A. vinelandii</i> .....	19
<b>3.- HIPÓTESIS</b> .....	<b>21</b>
<b>4.- OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
4.1 GENERAL .....	21
4.2 PARTICULARES .....	21
<b>5.- MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>22</b>
5.1 Material biológico .....	22
5.2 Condiciones de cultivo .....	23
5.3 Conjugación de cepas <i>A. vinelandii</i> y <i>E. coli</i> .....	24
5.4 Manipulación de ADN. ....	24
5.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	25
5.6 Construcción de plásmidos .....	25
5.7 Preparación de células competentes de <i>A. vinelandii</i> .....	27
5.8 Transformación de <i>A. vinelandii</i> .....	27
5.9 Preparación de cultivos de <i>A. vinelandii</i> .....	27
5.10 Cuantificación de proteína .....	28



5.11 Extracción y Cuantificación de PHB .....	28
5.12 Determinaciones de la actividad de $\beta$ -glucuronidasa.....	29
5.13 Análisis MEME-MAST .....	30
<b>6.- RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>31</b>
6.1 Efecto de la sobre-expresión de Crc sobre la producción de PHB en medio líquido .....	31
6.1.1 Expresión de Crc en <i>trans</i> a partir de un promotor inducible .....	31
6.1.2 Expresión de Crc en <i>cis</i> a partir de un promotor constitutivo .....	33
6.1.3 Efecto de la sobre-expresión de Crc en la traducción de <i>phbB</i> .....	34
6.2 Efecto de la expresión de Crc sobre la producción de PHB en medio sólido..	35
6.2.1 Expresión de Crc en <i>trans</i> a partir de un promotor inducible .....	35
6.2.2 Expresión de Crc en <i>cis</i> a partir de un promotor constitutivo .....	36
6.2.3 Efecto de la sobre-expresión de Crc en la traducción del mRNA de <i>phbB</i> . .....	37
6.3 Análisis de la región líder de <i>phbB</i> .....	39
6.4 Búsqueda <i>in silico</i> de los posibles blancos de Crc en <i>A. vinelandii</i> .....	42
<b>7.- COMENTARIOS FINALES.....</b>	<b>52</b>
<b>8.- CONCLUSIONES .....</b>	<b>56</b>
<b>9.- REFERENCIA.....</b>	<b>57</b>
<b>10.- APÉNDICE.....</b>	<b>62</b>

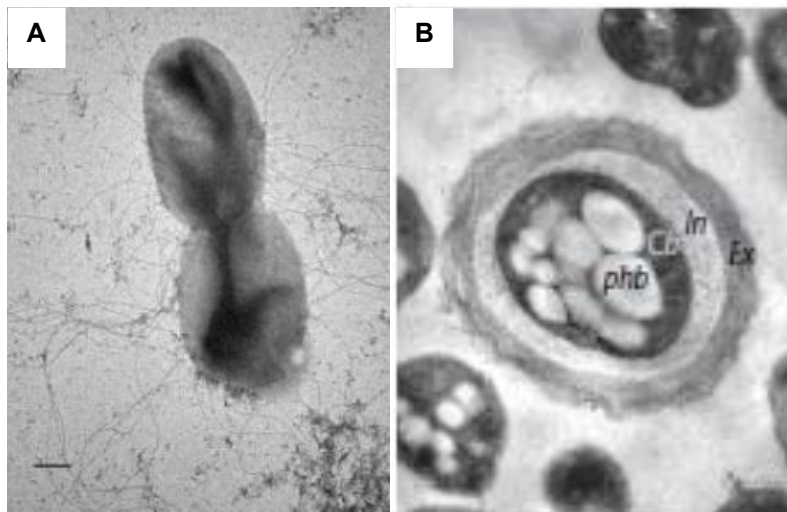
## RESUMEN

*Azotobacter vinelandii* es una bacteria gram-negativa de vida libre perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*. Su importancia como modelo de estudio se debe a la capacidad de producir un poliéster intracelular, el poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB), que sirve de reserva de carbono y energía y que posee propiedades similares a los plásticos derivados del petróleo. Una característica de las especies de la familia *Pseudomonadaceae* y que las diferencia de otras como *Escherichia coli*, es su preferencia en la asimilación de fuentes de carbono, ya que prefieren los ácidos orgánicos, como el acetato, sobre los carbohidratos, como la glucosa. Así mismo, contrario a lo que sucede en *E. coli*, el proceso de Represión Catabólica por Carbono (RCC) es regulado por el sistema de regulación post-transcripcional CbrA/CbrB-Crc/Hfq. El complejo represor Crc/Hfq inhibe la traducción al reconocer secuencias ricas en adeninas (AANAANAA, llamados sitios CA) localizadas cerca del sitio de unión a ribosoma en el RNA mensajero (RNAm) de sus genes blanco. La actividad de Crc/Hfq es antagonizada por los pequeños RNAs (sRNAs) CrcZ y CrcY debido a que en su estructura presentan múltiples sitios CA. La expresión de estos sRNAs es activada por el sistema de dos componentes CbrA/CbrB. Por tanto, CbrA/CbrB encabeza la cascada de señalización para el control de la RCC y otros procesos celulares. En un trabajo previo se observó que en una mutante de *A. vinelandii* deficiente en CbrA la acumulación de PHB se abate. En el presente trabajo se investigó al complejo represor Crc/Hfq como un posible intermediario en el control del PHB por el sistema CbrA/CbrB. Para lograrlo, se investigó si el operón biosintético de PHB, *phbBAC* era blanco directo de la regulación por Crc/Hfq ya que en la secuencia líder del RNAm de *phbB* identificamos un posible sitio CA. Nuestros resultados indican que el complejo Crc/Hfq no está involucrado de manera directa en el control de la producción de PHB ya que los niveles de traducción del RNAm del gen *phbB* ni la acumulación de PHB se vieron afectados al sobre-expresar la proteína Crc en cultivos desarrollados en medio líquido. Curiosamente, en medio sólido, observamos un incremento en la acumulación de PHB al sobre-expresar Crc. Dicho efecto no correlacionó con un incremento en la traducción del operón biosintético *phbBAC*, lo que sugiere un efecto indirecto. Para investigar blancos alternativos de regulación del PHB por el complejo Crc/Hfq se estableció su regulón mediante un análisis *in silico* MEME/MAST. Sin embargo, no pudimos identificar genes bajo el control de Crc/Hfq que participen directamente en la acumulación de PHB, pero sí genes involucrados en el metabolismo central, catabolismo de aminoácidos, degradación de ácidos grasos, transportadores, entre otros. En conjunto, nuestros resultados indican que el complejo Crc/Hfq regula de manera indirecta la producción de PHB controlando la disponibilidad y/o canalización de los precursores necesarios para la biosíntesis de este polímero.

# 1.- INTRODUCCIÓN

## 1.1 *Azotobacter vinelandii*

*A. vinelandii* fue descubierta en 1903 y aislada por primera vez en la región de Vineland, New Jersey. Es una bacteria Gram-negativa de la familia *Pseudomonadaceae*, de vida libre y aerobia estricta, con la particularidad de fijar nitrógeno en presencia de oxígeno (Kennedy *et al.*, 2005). En vida libre, y cuando las condiciones son favorables, muestra un crecimiento vegetativo teniendo una conformación alargada con flagelos en la periferia permitiendo su motilidad (Fig. 1a). Cuando las condiciones son adversas, las células sufren cambios morfológicos y fisiológicos en donde pierde sus flagelos y reduce su actividad metabólica para formar quistes resistentes a desecación (Fig. 1b) (Segura *et al.*, 2020). En esta etapa se observa una célula contraída ovalada conocida como “cuerpo central” con gránulos de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) en su interior y se encuentra rodeado por dos capas, la primera cercana al cuerpo central llamada intina y la segunda que interactúa con el entorno, denominada exina. Cuando las condiciones vuelven a ser favorables, la célula germina e inicia la fase vegetativa (Segura *et al.*, 2020).



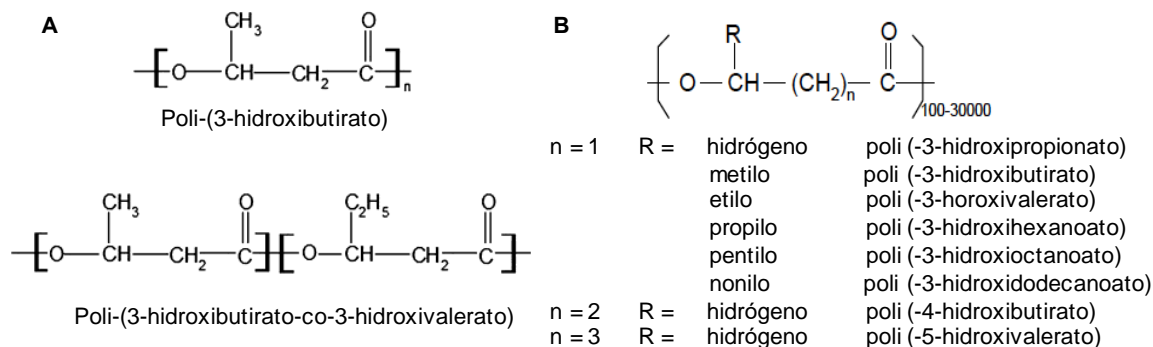
**Figura 1. Micrografía electrónica de células de *A. vinelandii*.** (a) Fase vegetativa. (b) Fase quística, *phb*: Poli  $\beta$  hidroxibutirato, *Cb*: Cuerpo central, *In*: intina, *Ex*: exina. (León and Espín 2008) (Segura *et al.*, 2014).

Esta bacteria produce dos polímeros, un exopolisacárido (alginato) y un poliéster intracelular (PHB), los cuales presentan características que los hacen

atractivos para su utilización a nivel industrial. El primero con propiedades viscosificantes y gelificante y el segundo un polímero biodegradable con propiedades similares a los plásticos derivados de petróleo. En el presente trabajo nos enfocamos en el poliéster PHB.

## 1.2 Poli-hidroxicanoatos (PHAs)

Los poli-hidroxicanoatos (PHAs) son poliésteres lineales sintetizados por diversas bacterias. Son almacenados en el citoplasma celular como reserva de carbono y de energía (Chen, 2009). Están compuestos por monómeros de hidroxicanoatos (HAs) los cuales pueden ser homopolímeros (compuestos por un tipo de HA) o copolímeros (compuestos por variedades de HAs) (Fig. 2a) (Rai *et al.*, 2011). Los HAs tienen una estructura general con variación en su grupo R del Hidroxiacilo (Fig. 2b) (Ojumu *et al.*, 2004).



**Figura 2. Estructura de PHAs** a) Homopolímero de PHA, parte superior. Copolímero de PHA, parte inferior. b) Estructura de HAs con variaciones en el número de CH<sub>2</sub> en su cadena (n) y en su grupo R. (Peña *et al.*, 2014) (Ojumu *et al.*, 2004).

Los PHAs clasifican dependiendo del número de átomos de carbono en las unidades del monómero. Entre ellos se encuentran, los PHAs de cadena corta PHAs (SCL-PHA), que contienen cadenas de 3-5 átomos de carbono como el poli (3-hidroxi butirato) (PHB), poli (4-hidroxi butirato) (P4HB). También, se encuentran los de cadena media PHAs (MCL-PHA) que van de 6-14 átomos de carbono como el poli (3-hidroxi hexanoato) (PHHx) y el poli (3-hidroxi octanoato) (P3HO) (Sharma *et al.*, 2017).

Estos poliésteres presentan propiedades físicas similares a los plásticos derivados de petróleo (Tabla 1) (Ojumu *et al.*, 2004). Dichas propiedades están

dadas por el tamaño de la cadena lateral, por los grupos R del monómero y por la masa molecular. Por ende, es posible su utilización como alternativa a estos tipos de plásticos.

**Tabla 1.** Propiedades físicas de varios PHAs y del polipropileno.

Propiedad	PHB	P(HB-HN) <sup>a</sup>			Polipropileno
		3 mol %	14 mol %	25 mol %	
Punto de fusión (°C)	175	169	150	137	176
Temperatura de cristalización (°C)	15	-	-	-1	-10
Cristalino (%)	80	-	-	40	70
Módulo de Young	3.5	2.9	1.5	0.7	1.7
Fuerza de tensión (MPa)	40	38	35	30	34.5
Alargamiento de ruptura (%)	6	-	-	-	400
Fuerza de impacto (v/m)	50	60	120	400	45

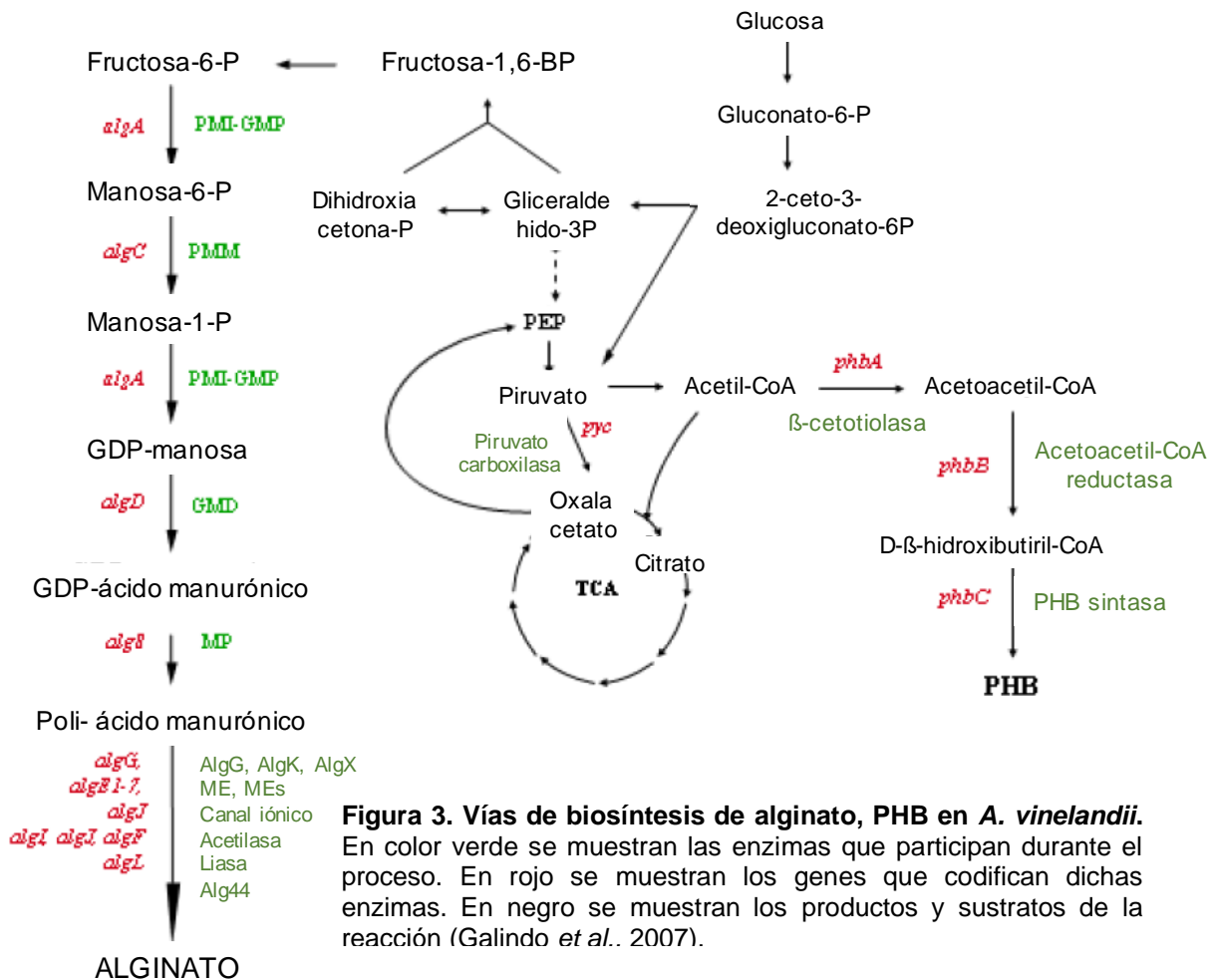
Datos adaptados de Lee (1996) y Poirier *et al.*, (1995).

- Datos no disponibles

<sup>a</sup> poly (-3-hydroxybutyrate-co-3hydroxyvalerate)

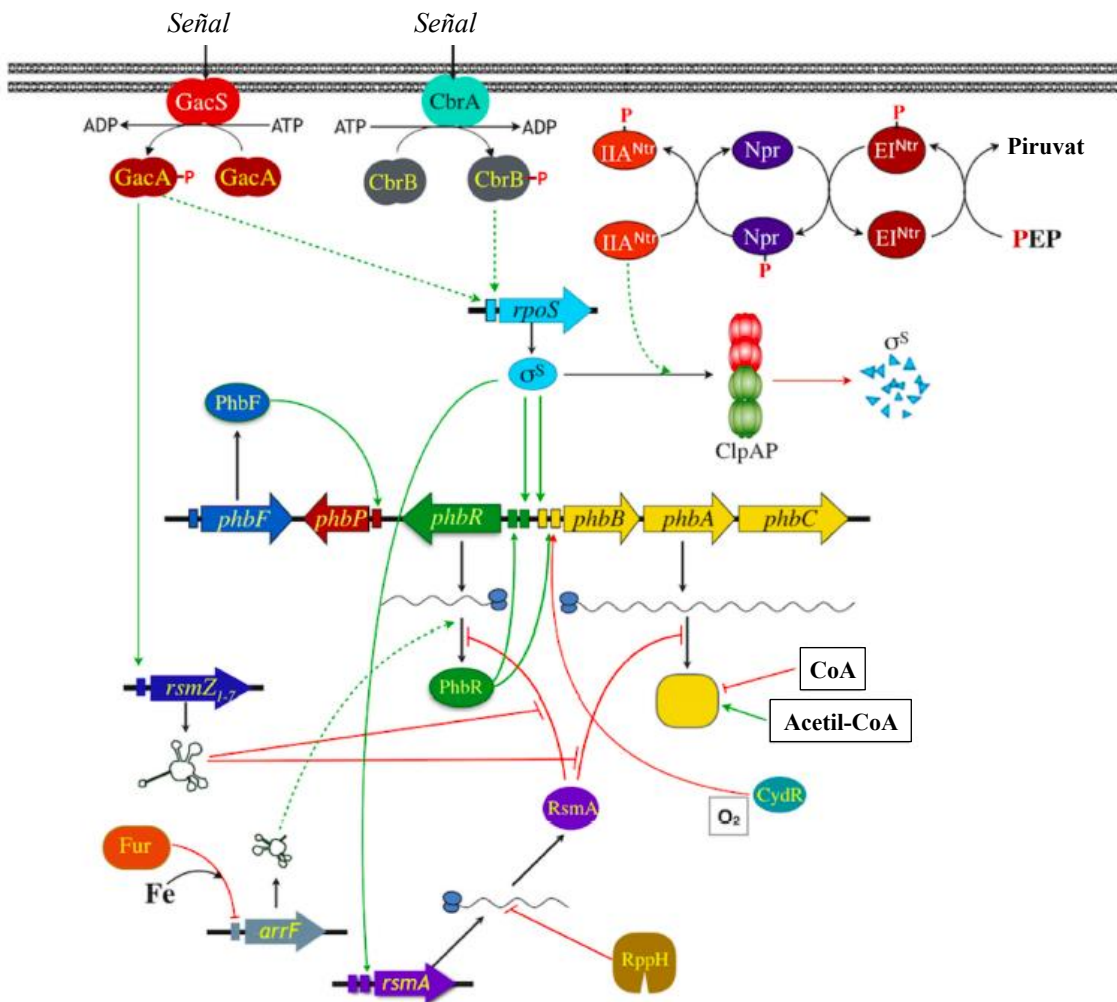
### 1.3 Producción de Poli-β-hidroxibutirato (PHB)

*A. vinelandii* produce un tipo de PHA, el poli-β-hidroxibutirato (PHB), que se almacena en forma de gránulos intracelulares. Es utilizado como fuente de carbono y energía cuando las condiciones en el medio son limitantes, pero también está implicado en la regulación de los equivalentes de reducción intracelular (Senior *et al.*, 1972). La biosíntesis de PHB comienza con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA, mediada por la β-cetotiolasa (*phbA*), dando como producto la acetoacetil-CoA. Posteriormente, la acetoacetil-CoA reductasa (*phbB*) dependiente de NADPH cataliza una reacción de reducción para la formación de monómeros de β-hidroxibutiril-CoA. Por último, la PHB sintasa (*phbC*) polimeriza estos monómeros para formar PHB liberando la -CoA (Fig. 3). Los genes que codifican para las enzimas que participan en la biosíntesis de PHB se encuentran organizados en un operón denominado *phbBAC*. De manera divergente se localiza el gen *phbR*, el cual, codifica para el activador transcripcional del operón *phbBAC*, PhbR. (Galindo *et al.*, 2007).



#### 1.4 Regulación de la síntesis de PHB en *A. vinelandii*

La regulación de la biosíntesis de PHB es compleja e involucra distintos niveles de regulación, entre los cuales se encuentra la expresión génica, la actividad enzimática y la regulación alostérica. La regulación alostérica involucra a la primera enzima de la biosíntesis de PHB, la  $\beta$ -cetotiolasa. Estudios realizados en *Azotobacter beijerinckii* y en *A. vinelandii* UWD (cepa sobre-productora de PHB) mostraron que la actividad de la  $\beta$ -cetotiolasa es inhibida por la forma competitiva de la coenzima A (CoA) libre. Esto se observa cuando las condiciones de oxígeno no son limitantes, provocando que el acetil-CoA se canalice al Ciclo del Ácido Tricarboxílico (TCA, por sus siglas en inglés). La CoA liberada inhibe a la  $\beta$ -cetotiolasa, impidiendo la síntesis de PHB (Senior *et al.*, 1973; Manchak *et al.*, 1994).



**Figura 5. Modelo para la regulación de la expresión del operón *phbBAC* en *A. vinelandii*.** Los promotores se indican como rectángulos coloreados, dos de ellos indican dos promotores identificados. La regulación positiva se indica con líneas verdes; las líneas rojas indican regulación negativa; las líneas discontinuas indican intermedios o mecanismos desconocidos (Velázquez-Sánchez *et al.*, 2020).

El control a nivel de la expresión génica se basa principalmente en la transcripción del operón *phbBAC*. En su región reguladora se encuentran dos promotores que se superponen (pB1 y pB2); la región -35 de PB1 se superpone a la región -10 de PB2. La proteína PhbR, codificada por el gen *phbR*, es el regulador transcripcional del operón *phbBAC*. PhbR activa la biosíntesis del operón mediante el promotor pB1, mientras que el promotor pB2 está regulado por el factor de fase estacionaria y de respuesta a estrés general RpoS ( $\sigma^{38}$ ). El gen *phbR* se transcribe a partir de dos promotores, pR1 y pR2, en donde PhbR reconoce a pR1, mientras que pR2 es dependiente de RpoS ( $\sigma^{38}$ ). Durante el crecimiento exponencial, la actividad de la  $\beta$ -cetotilasa se encuentra disminuida. Estas condiciones de crecimiento aunadas a un reducido nivel de transcripción del operón *phbBAC* debido a la ausencia del factor RpoS, afectan la actividad del promotor dependiente de este

factor (pB2). Adicionalmente, se observa una baja concentración de PhbR, ya que su transcripción está mediada parcialmente por el mismo factor (Peralta-Gil *et al.*, 2000). Por otro lado, cuando las células entran a fase estacionaria, se produce una acumulación de RpoS y, por tanto, de PhbR, estimulando con ello la transcripción del operón *phbBAC*. Durante esta fase de crecimiento existe una disminución en la actividad del ciclo del TCA, favoreciendo un aumento en la relación acetil-CoA/CoA, lo que libera el efecto inhibitorio sobre la  $\beta$ -cetotilasa (Galindo *et al.*, 2007).

La producción de PHB también está regulada por el sistema de dos componentes (TCS) GacS/GacA (Castañeda *et al.*, 2000). GacS es una histidín quinasa que detecta una señal (aún desconocida) y GacA es su regulador de respuesta, que activa la transcripción de sus blancos de manera directa. GacS/A regula la producción de PHB de dos maneras: la primera, mediante la regulación de la expresión del factor RpoS, el cual, es necesario para la expresión del operón *phbBAC*. La otra vía de regulación se controla a través de la expresión de un conjunto de RNAs pequeños (RsmZ/Y). Estos sRNAs antagonizan la actividad de la proteína de unión a RNA, denominada RsmA. RsmA inhibe la traducción de los mRNAs de *phbR* y de *phbB* mediante la unión a éstos, teniendo como consecuencia una disminución en la expresión del operón *phbBAC* (Hernández-Eligio *et al.*, 2012) (Fig. 5).

También se ha reportado que la pirofosfohidrolasa RppH, involucrada en el control de la degradación del mRNA, codificada por el gen *rppH*, tiene un efecto positivo sobre la producción de PHB. Una mutante de este gen, está asociada a una menor producción de PHB explicado por la reducción, a nivel traduccional, de la expresión del activador PhbR. Este efecto se le atribuye al represor post-traduccional RsmA, ya que al inactivar el gen *rsmA* en la mutante *rppH* se restablece la expresión de PhbR (Bedoya *et al.*, 2018). Estos resultados indican que un tipo de regulación de la producción de PHB se asocia con la degradación de su mRNA con la participación de RppH.



Estudios previos han demostrado que existe una regulación de la producción de PHB por el sistema de fosfotransferencia relacionado con el nitrógeno (PTS<sup>Ntr</sup>), el cual es análogo al sistema de fosfoenolpiruvato-azúcar fosfotransferasa (PTS) cuya función es mediar la asimilación de glucosa y otros carbohidratos en un amplio rango de géneros bacterianos (Deutscher *et al.*, 2006). El PTS<sup>Ntr</sup> está compuesto por tres proteínas EI<sup>Ntr</sup>, Npr y EIIA<sup>Ntr</sup>, codificadas por *ptsP*, *ptsO* y *ptsN* respectivamente. Estas proteínas forman parte de una cascada de fosforilación, donde el fosfoenolpiruvato transfiere el fosfato hasta llegar a la EIIA<sup>Ntr</sup>. Mutaciones en los genes *ptsP* y *ptsO* provocan una disminución de la producción de PHB, debido a una reducción en el nivel de expresión de los promotores pB1 y pB2. Por otro lado, en una mutante *ptsN* la producción de PHB aumenta en comparación a la WT y se aprecia un incremento en los niveles de expresión de los promotores pB1 y pB2 (Noguez *et al.*, 2008). Curiosamente, cuando la proteína EIIA<sup>Ntr</sup> se encuentra en su forma no fosforilada reduce los niveles de transcripción del activador *phbR* y del operón *phbBAC*, mientras que en su ausencia provoca un aumento en la producción de PHB. La presencia de EIIA<sup>Ntr</sup> en su forma no fosforilada induce la degradación de RpoS mediante el complejo proteolítico ClpAP, afectando con ello la transcripción de sus genes blanco (Muriel-Millán *et al.*, 2017) (Fig. 5).

Un estudio reveló que existe una relación entre el sistema GacA/S y el PTS<sup>Ntr</sup>. En una cepa WT de *A. vinelandii* están presentes la forma fosforilada y la no fosforilada de la proteína EIIA<sup>Ntr</sup>. En una mutante *gacA* solo está presente la forma no fosforilada de EIIA<sup>Ntr</sup>. Considerando que la expresión de *ptsP* y *ptsO* no está bajo el control de GacA, queda abierta la pregunta si GacA controla la fosforilación de EIIA<sup>Ntr</sup> por interacción directa (Trejo *et al.*, 2017). Una posible explicación de la ausencia de la forma fosforilada de la proteína EIIA<sup>Ntr</sup> en la mutante *gacA* se basa en la presencia de un dominio GAF en la enzima EI<sup>Ntr</sup>. Este dominio tiene la capacidad de unirse a una gran variedad de ligandos (Anantharaman *et al.*, 2001). En especies como *Escherichia coli*, *Caulobacter crescentus* y *Sinorhizobium meliloti*, se ha reportado que el nivel de nitrógeno celular regula la fosforilación de PTS<sup>Ntr</sup>, inhibiendo la fosforilación de EI<sup>Ntr</sup> por la unión de glutamina al dominio GAF

o favoreciéndola por la unión de  $\alpha$ -cetoglutarato al mismo dominio (Lee *et al.*, 2013). Por lo tanto, es posible que los genes bajo el control de GacA puedan afectar la asimilación de nitrógeno en *A. vinelandii*.

Otra proteína que se ve implicada en la regulación de producción de PHB es CydR, un represor de la transcripción de los genes responsables de la oxidasa terminal del citocromo bd (*cydAB*), pieza fundamental para la fijación del nitrógeno. En condiciones limitantes de oxígeno la capacidad de unión de CydR al DNA es débil, por tanto, su efecto represor se reduce. Una mutante *cydR* en la que se sobreexpresa la  $\beta$ -cetotilasa y la acetoacetil-CoA, muestra una disminución de la expresión de succinil-CoA. Como se requiere esta última para la movilización del PHB, el resultado es una acumulación del mismo a lo largo de la fase de crecimiento exponencial (Wu *et al.*, 2001; Galindo *et al.*, 2007).

### **1.5 Represión catabólica por carbono (CCR)**

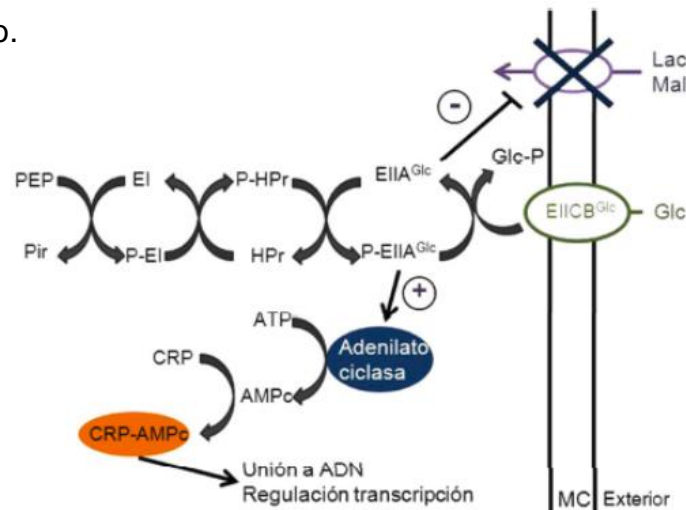
En la naturaleza se encuentra una gran variedad de condiciones ambientales cambiantes, por lo que los microorganismos deben responder de manera adecuada para adaptarse rápidamente y así asegurar su supervivencia. Es por ello que las bacterias de vida libre poseen un metabolismo versátil que les permite aprovechar los nutrientes que están presentes en determinado momento. Esta característica del metabolismo versátil se debe a mecanismos moleculares flexibles de regulación génica, asegurando una rápida y adecuada respuesta ante una señal del ambiente (Rojo, 2010).

La represión catabólica por carbono (CCR, por sus siglas en inglés) es un mecanismo que permite la asimilación preferente de fuentes de carbono dentro de una mezcla de ellas (Quiroz-Rocha *et al.*, 2017-a). Cuando la bacteria se encuentra en vida libre, sus nutrientes preferidos pueden escasear, por lo que resulta necesario asimilar otra fuente de carbono que no sea preferida. La jerarquización de su asimilación se logra mediante el control de la expresión génica, lo que resulta en una reorganización y modificación de su metabolismo en general (Görke *et al.*,

2008). Este proceso de reordenamiento metabólico para asimilar otras fuentes de carbono no preferidas se le denomina “activación catabólica de carbono (CCA, por sus siglas en inglés)”. Dicho proceso está mediado o regulado por el control catabólico de carbono (CCC) (Rojo, 2010). Es importante tener presente que la regulación del mecanismo y los factores que desencadenan la CCR son distintos en diferentes microorganismos.

### 1.6 Represión catabólica en *E. coli*.

El proceso de CCR se ha estudiado exhaustivamente en *E. coli* que tiene como fuente de carbono preferida los carbohidratos, como la glucosa. Para que esta pueda ser asimilada, *E. coli* presenta un sistema de fosfotransferencia dependiente de fosfoenolpiruvato (PTS) (Fig. 6). El sistema PTS es el principal mecanismo de transporte de este azúcar, permitiendo la asimilación y fosforilación del mismo en un solo paso, donde el fosfoenolpiruvato (PEP) es el que participa como donador del grupo fosfato.



**Figura 6.** Representación esquemática de la represión catabólica por carbono y del transporte de glucosa en *E. coli*. (Rojo, 2010)

Cuando la glucosa se encuentra disponible, esta es internalizada por el transportador de membrana externa EIICB<sup>Glc</sup>. Mientras los niveles internos de glucosa estén elevados, la enzima EIIA<sup>Glc</sup> se encuentra defosforilada, ya que el fosfato disponible es utilizado para fosforilar la glucosa, formando así glucosa-6-fosfato. La presencia de la enzima EIIA<sup>Glc</sup> defosforilada, inhibe la expresión de otros

transportadores de fuentes de carbono no preferidas, como lactosa o maltosa, así como las enzimas necesarias para su asimilación. En ausencia de glucosa, se incrementan los niveles de la forma fosforilada de EIIA<sup>Glu</sup>, liberando con ello la represión que existe sobre los transportadores, permitiendo entonces, internalizar otro tipo de fuente de carbono (Rojo, 2010). La internalización de otro tipo de fuente de carbono que no es preferida, es solo un paso inicial del proceso. El siguiente paso es poder asimilarla, para lo cual es necesaria la activación de su vía metabólica, por lo que requiere activar la transcripción de los genes relacionados con el metabolismo de dicha fuente. En *E. coli*, el complejo cAMP-CRP es el encargado de activar la transcripción de los genes necesarios para la asimilación de distintas fuentes de carbono. El proceso de represión catabólica mediada por la glucosa se lleva a cabo de la siguiente manera: En una mezcla de fuentes de carbono distintas, la glucosa es asimilada de manera preferente, inhibiéndose la asimilación de otras fuentes, la cual finaliza cuando la glucosa se agota. Al haber una disponibilidad de fosfato, este es utilizado para fosforilar la enzima EIIA<sup>Glu</sup>, la cual, activa a la adenilato ciclasa para producir cAMP a expensas de la hidrólisis de ATP. Este cAMP interactúa con el regulador CRP formando un dímero que activa la expresión de sus genes blanco favoreciendo con ello el transporte de otras fuentes de carbono. (Fig. 6) (Rojo, 2010).

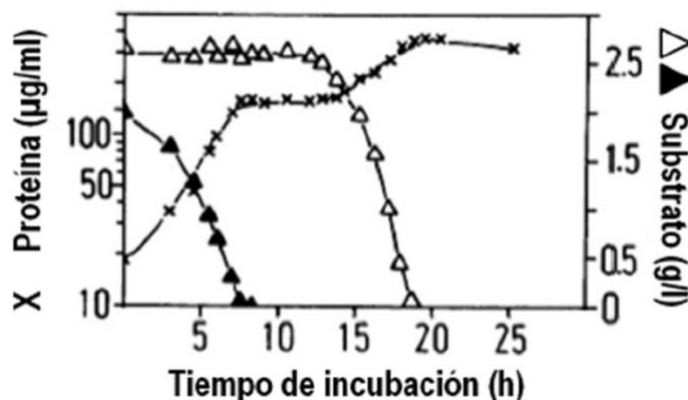
### **1.7 Represión catabólica en *Pseudomonas* y *Azotobacter***

El género de *Pseudomonas* tiene la capacidad de vivir en distintos tipos de ambientes, como agua, suelos, asociaciones con plantas, animales o tejidos (Scales *et al.*, 2014). Una gran diferencia entre las *Pseudomonas* con respecto a *E. coli*, es la preferencia del tipo de fuente de carbono. Como ya se mencionó anteriormente, *E. coli* prefiere los carbohidratos, mientras que *Pseudomonas* prefiere otro tipo de fuente de carbono como ácidos orgánicos o aminoácidos. Estudios previos (Collier *et al.*, 1996) han observado que en un medio donde están presentes dos fuentes de carbono distintas, tales como glucosa y succinato, este último es asimilado de manera preferente. Cuando se agota su disponibilidad, inicia la asimilación de la glucosa.

Al tener una preferencia de fuentes de carbono distinta a *E. coli*, su regulación de asimilación también lo es. La CCR en *E. coli* ocurre de manera transcripcional, mediada por el complejo cAMP-CRP y por una dependencia en el estado de fosforilación de la enzima EIIA<sup>Glc</sup> (Fig. 6). *Pseudomonas* y *A. vinelandii* presentan una regulación de la CCR de manera similar entre ellas y se lleva a cabo a nivel traduccional por medio del complejo de proteínas para el control de la represión catabólica (Crc-Hfq) (Fig. 8) (Rojo, 2010; Quiroz-Rocha *et al.*, 2017-a).

Otra diferencia entre *E. coli* y estas dos bacterias es el tipo de transporte de la glucosa. Mientras que en *E. coli* es a través de un transportador de membrana (EIICB<sup>Glc</sup>) para *Pseudomonas* la glucosa es internalizada al espacio periplásmico mediante la porina OprB-1 donde puede ser oxidada a gluconato o transportada al citoplasma por medio de un transportador del tipo ABC (del Castillo *et al.*, 2007), por otro lado, *A. vinelandii* presenta un transportador de membrana externa denominado GluP (Quiroz-Rocha *et al.*, 2017-a) que internaliza a la glucosa al espacio periplásmico, esta es transportada al citoplasma por un transportador tipo ABC, de no ser así, es oxidada a gluconato o 2-cetogluconato en este espacio (del Castillo *et al.*, 2007).

*A. vinelandii*, tiene como fuente de carbono preferida los ácidos orgánicos, como succinato, malato o incluso acetato, sobre el uso de carbohidratos como glucosa o sacarosa y en una mezcla de fuentes de carbono preferida (acetato) y no preferida (glucosa) se asimila de primera instancia el acetato y posteriormente la glucosa (Tauchert *et al.*, 1990) (Fig. 7).



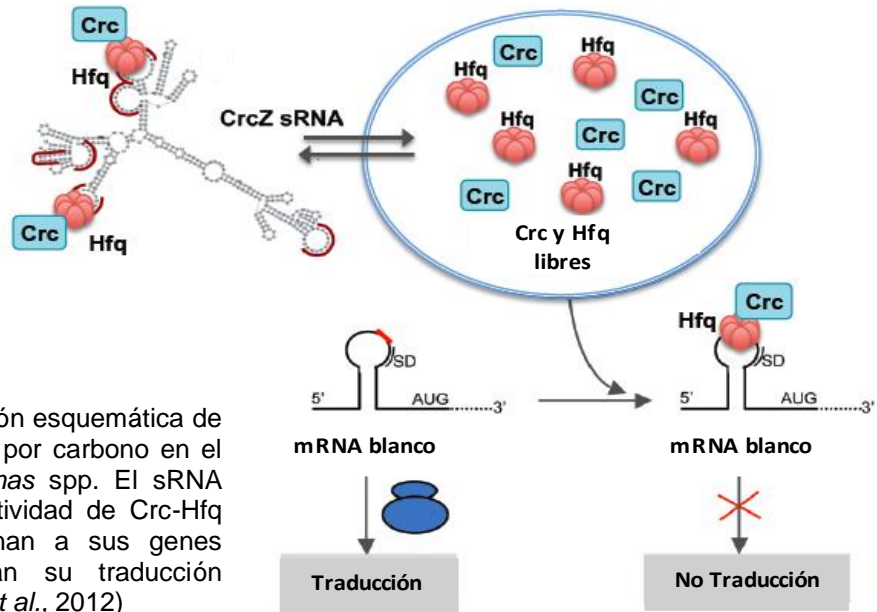
**Figura 7. Crecimiento diauxico en *A. vinelandii*.** Crecimiento de la cepa de *A. vinelandii* OP en medio diauxico Burk en presencia de acetato y glucosa como fuentes de carbono. Se representa el crecimiento (cruces) así como el consumo de acetato (triángulos negros) y el de glucosa (triángulos blancos) (Tauchert *et al.*, 1990).

## 1.8 Regulación de la represión catabólica por carbono en *Pseudomonas* y *A. vinelandii*

La regulación sobre la asimilación de distintas fuentes de carbono en *A. vinelandii* tanto como en especies de *Pseudomonas* es a través del Sistema CbrA/CbrB-Hfq/Crc (Rojo, 2010). En presencia de una fuente de carbono preferida, el complejo proteico Hfq/Crc, reprime la traducción de genes necesarios para la asimilación de fuentes de carbono no preferidas o secundarias uniéndose a sus mRNAs correspondientes. Esta unión es mediada por el reconocimiento de una secuencia específica denominada sitio de actividad catalítica (CA, dadas sus siglas en inglés), el cual es rico en adeninas y está presente en la secuencia líder del mRNA cerca del sitio de unión al ribosoma (Moreno *et al.*, 2015). Estudios previos han demostrado que Hfq reconoce sus sitios de unión en el mRNA, mientras que Crc estabiliza esta unión (Quiroz-Rocha *et al.*, 2017-a).

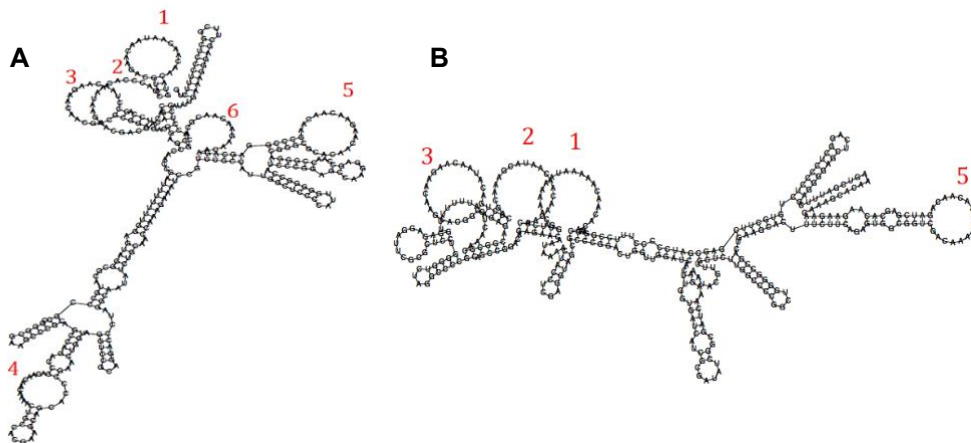
En especies de *Pseudomonas* se ha reportado la presencia de RNAs pequeños (sRNAs) que pueden antagonizar la actividad del complejo Hfq/Crc. En *P. aeruginosa* se descubrió al sRNA CrcZ, en *P. putida* se describió a CrcY, además de CrcZ y por último en *P. syringae* se descubrió CrcX. La característica principal de estos sRNAs es la presencia de múltiples sitios CA en su secuencia, al momento de que forman su estructura secundaria, estos sitios CA se sitúan en las asas, quedando expuestos, de tal manera que pueden antagonizar la función de Hfq/Crc uniéndose a estos (Quiroz-Rocha *et al.*, 2017-a). Los niveles de los sRNAs están fuertemente relacionados con la preferencia de la fuente de carbono y son inversamente proporcionales a esta. Cuando los niveles de sRNAs son bajos existe en una condición de alta represión catabólica debido a que el complejo Hfq/Crc se encuentra libre y actuando como represor de sus mRNAs blanco inhibiendo su traducción, dicha condición se da principalmente en fase exponencial. Por el contrario, cuando los niveles de los sRNAs van aumentando en fase estacionaria, cuando se ha terminado la fuente de carbono preferida, se favorece la unión con el complejo Hfq/Crc antagonizando su función y liberando la CCR de las vías de

asimilación de fuentes de carbono no preferidas (Quiroz-Rocha *et al.*, 2017-a) (Fig. 8).



**Figura 8.** Representación esquemática de la represión catabólica por carbono en el modelo de *Pseudomonas* spp. El sRNA CrcZ antagoniza la actividad de Crc-Hfq impidiendo que se unan a sus genes blanco y que inhiban su traducción (Modificad de Moreno *et al.*, 2012)

*A. vinelandii* presenta dos sRNAs (CrcZ y CrcY) con una longitud aproximada de 369 nucleótidos, los cuales tienen seis y cinco motivos CA, respectivamente (Fig. 9). Se han reportado que la transcripción de estos sRNAs está mediada por un sistema de dos componentes, denominado CbrA/CbrB, situado al inicio de la cascada de regulación de la CCR (Fig. 10).



**Figura 9.** Estructura secundaria predicha de los sRNAs de *A. vinelandii* a) CrcZ y b) CrcY. Se realizó utilizando el algoritmo RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAfold.cgi>). Se indican los motivos de unión a Hfq ricos en A predichos. (Quiroz-Rocha *et al.*, 2017-a, suplementaria 1 y 3)

## 1.9 Sistema de dos componentes CbrA/CbrB

Este sistema se describió por primera vez en especies de *Pseudomonas* y participa en la regulación de la CCR. Cuando la histidín quinasa (CbrA), situada en la membrana interna, detecta una señal del ambiente (relacionado al estado energético de la célula), se autofosforila y transfiere su fosfato a su regulador de respuesta (CbrB), el cual, activa la traducción de sus genes blancos. CbrA/CbrB pertenece a la familia NtrB/NtrC (Nishijyo *et al.*, 2001). La característica principal de CbrB es el reconocimiento de promotores del tipo RpoN proporcionando energía necesaria para poder abrir la doble cadena de DNA, ya que RpoN por si solo no puede realizarlo, de esta manera promoviendo la expresión de sus genes blanco (Barroso *et al.*, 2018; Rojo, 2010).

El modelo actual de la regulación de la CCR para *A. vinelandii* propone que, en presencia de una fuente de carbono no preferida, como glucosa CbrA se autofosforila y transfiere su fosfato a CbrB, una vez fosforilado CbrB, activa la expresión de los sRNAs CrcZ y CrcY. Una vez presentes estos sRNAs secuestran al complejo Hfq-Crc liberando la represión catabólica y de esta manera se pueda asimilar una fuente de carbono no preferida. Por el contrario, en presencia de una fuente de carbono preferida, como acetato, el TCS CbrA/B se encuentra inactivo, por tanto, los niveles de los sRNAs son bajos, promoviendo una alta actividad del complejo Hfq/Crc y una condición de alta represión catabólica sobre fuentes de carbono no preferidas (Quiroz-Rocha *et al.*, 2017-a).

En nuestro grupo de trabajo se estableció que en presencia de una fuente de carbono preferida como el acetato, la cual representa una condición de alta represión catabólica, el complejo Hfq/Crc se encuentra unido al mRNA del transportador de glucosa (GluP). Este mRNA presenta un sitio CA y la unión de Hfq/Crc inhibe su traducción. Una vez asimilado el acetato, se eleva la expresión de los sRNAs, que al unirse al complejo Hfq/Crc, se favorece la traducción del mRNA de GluP, permitiendo con ello la internalización de la glucosa para su asimilación (Martínez-Valenzuela 2018; Quiroz-Rocha *et al.*, 2017-a) (Fig. 10).



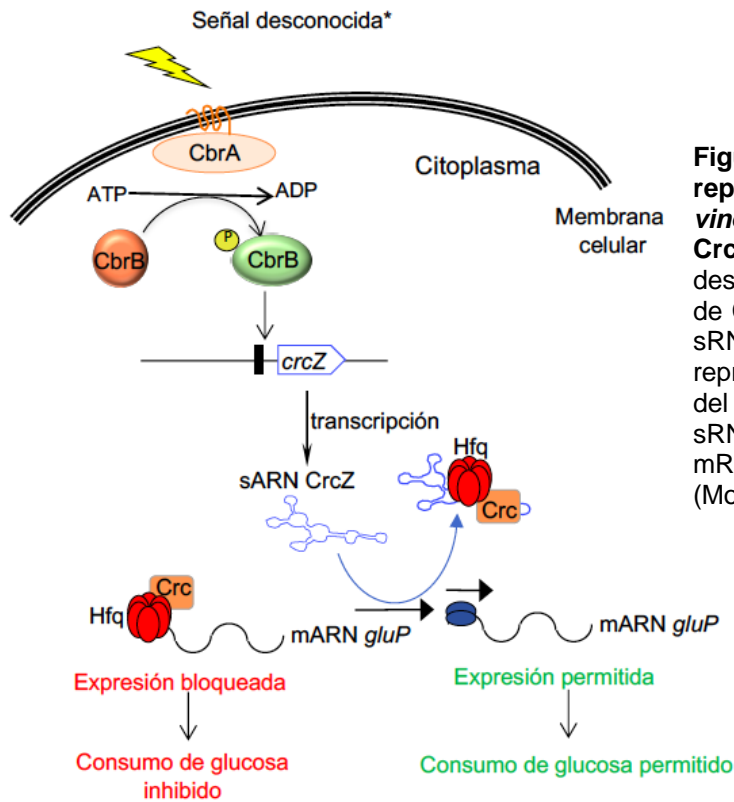
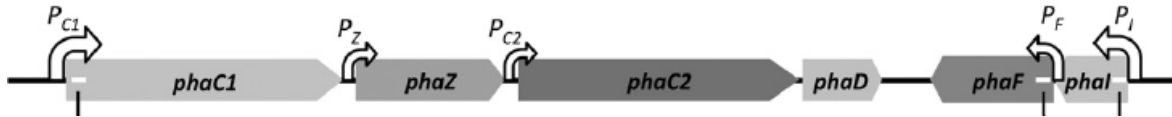


Figura 10. Esquema del mecanismo de represión catabólica por carbono en *A. vinelandii* por el Sistema CbrA/CbrB-Hfq-Crc. CbrA responde a una señal (aún desconocida) promoviendo la fosforilación de CbrB, este activa la transcripción de los sRNAs CrcZ/Y que titulan al complejo represor Hfq/Crc promoviendo la traducción del mRNA de *gluP*. En ausencia de estos mRNA Hfq/Crc se mantienen unidos al mRNA de *gluP* reprimiendo su traducción. (Modificado de Martínez-Valenzuela, 2018)

### 1.10 Producción de Poli-hidroxialcanoatos (PHAs) en *Pseudomonas putida* y su regulación por la proteína Crc

Una de las bacterias de gran interés biotecnológico en el área de bioremediación es *Pseudomonas putida*, una bacteria bacilar, Gram-negativa, aerobia estricta y de vida libre, aunque también se le puede encontrar en asociación con plantas. Debido a su capacidad de degradar alcanos posee un gran potencial biotecnológico. La cepa KT2440 es una mutante con una deficiencia del sistema de restricción de DNA (Nikel *et al.*, 2014). Dentro de sus características, esta bacteria puede producir PHAs de cadena media, los cuales puede utilizar como fuente de carbono y energía. Los genes que participan en la biosíntesis y en la degradación de PHA se encuentran en el clúster *pha*, organizados en dos operones: *phaC<sub>1</sub>ZC<sub>2</sub>D* y *phaIF* (Prieto *et al.*, 2007; de Eugenio *et al.*, 2010). *phaC<sub>1</sub>* y *C<sub>2</sub>* codifican para dos PHAs polimerasas y son capaces de incorporar monómeros de (R)-3-hidroxiacil-CoA al polímero de PHA. Estos monómeros pueden provenir de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos o de la síntesis de *novo*. *phaZ* codifica para una depolimerasa y *phaD* codifica para un activador transcripcional, activo en respuesta a la presencia de

ácidos grasos (de Eugenio *et al.*, 2010). Por otro lado, *phal* y *phaF* codifican para fasinas. Ambos operones presentan sus propios promotores, 5 en total ( $P_{C1}$ ,  $P_Z$ ,  $P_{C2}$ ,  $P_I$  y  $P_F$ ), de los cuales solo  $P_{C1}$  y  $P_I$  están bajo el control de PhaD (La Rosa *et al.*, 2014). (Fig. 11)



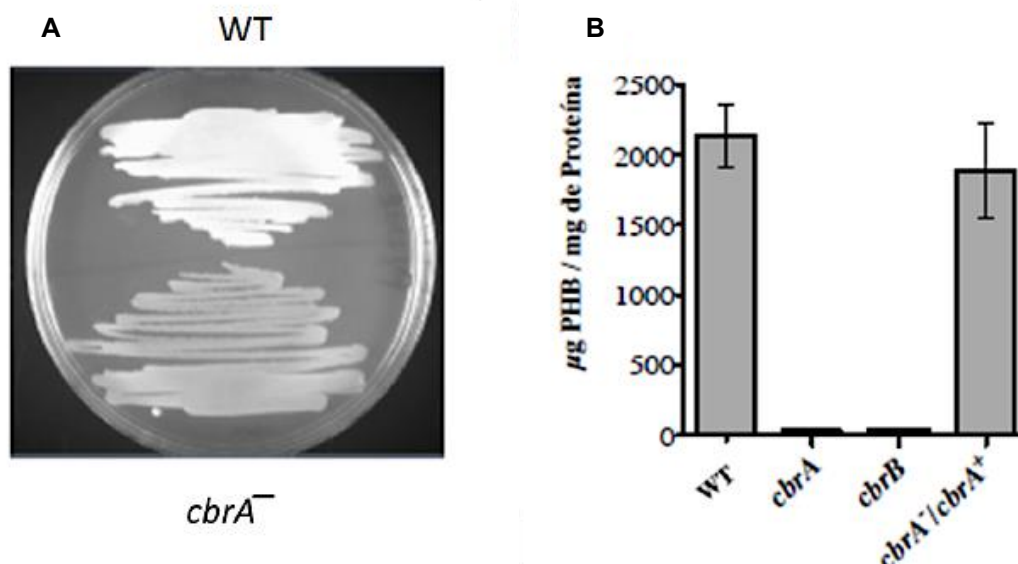
**Figura 11. Organización genética del clúster *pha*.** Las flechas abiertas dobladas indican la posición y orientación de los promotores  $P_{C1}$ ,  $P_Z$ ,  $P_{C2}$ ,  $P_I$  y  $P_F$ . Los pequeños rectángulos blancos en los genes *phaC1*, *phaF* y *phal* denotan la posición de los supuestos motivos CA indicativos de la represión de catabolitos mediada por Crc. (de Eugenio *et al.*, 2010)

Estudios previos han demostrado que en *P. putida* la producción de PHA esta regulada negativamente por la proteína Crc, en condiciones de balance C/N. Crc se une al mRNA de *phaC* inhibiendo su traducción. Así, en una mutante deficiente en Crc la acumulación de PHA se incrementó en un 40% con respecto a la cepa silvestre, en medio LB suplementado con 20 mM de ácido octanoico para aliviar el desbalance C/N del medio rico LB (La Rosa *et al.*, 2014). Sin embargo, en medio LB no se observó ningún efecto de Crc en la producción de PHA.

## 2.- ANTECEDENTES

### 2.1 Abatimiento de la acumulación de PHB en la mutante *cbrA* de *A. vinelandii*

En un reporte previo de nuestro grupo de trabajo se estableció que el sistema de dos componentes CbrA/CbrB era esencial para la producción de PHB en *A. vinelandii* ya que, en una mutante carente de la proteína sensora CbrA, se observó un fenotipo menos blanquecino con respecto a la silvestre en placas de medio Burk-sacarosa (BS), lo que sugiere que la cepa está acumulando menos PHB (Fig. 12a). Cuando se cuantificó dicho fenotipo en medio líquido BS, se confirmó que en la mutante *cbrA* la producción de PHB se encuentra abatida, al igual que en la cepa mutante *cbrB*. Además, en la cepa complementada *cbrA/cbrA+*, dicha producción se restableció (Fig. 12b) (Quiroz-Rocha, 2017-b). En conjunto, estos resultados indican que el sistema CbrA/B es necesario para la producción de PHB en *A. vinelandii*.



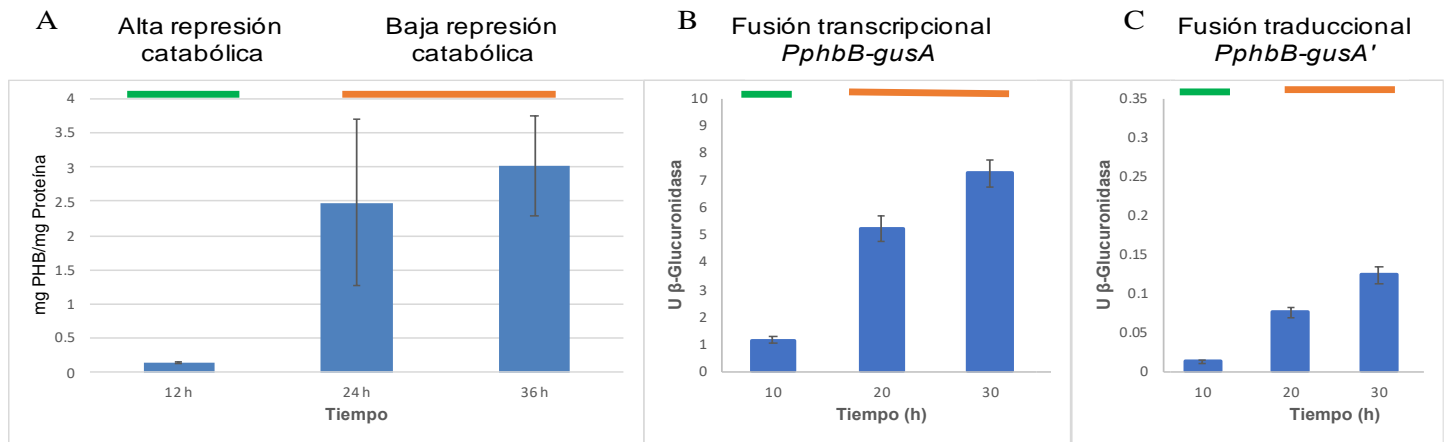
**Figura 12. Efecto del TCS CbrA/CbrB en la acumulación de PHB.** a) Crecimiento en placa de la cepa silvestre (WT) y de su derivada *cbrA*<sup>-</sup> en placas de PY-sacarosa. La tonalidad blanquecina refleja la acumulación de PHB sólo en la cepa silvestre. b) Cuantificación de PHB en la cepa silvestre y en sus derivadas *cbrA* y *cbrB*, así como en la cepa *cbrA* complementada (*cbrA*<sup>-</sup>/*cbrA*<sup>+</sup>) (Quiroz-Rocha *et al.*, 2017-b).

Vale la pena mencionar que en la mutante *cbrA*<sup>-</sup> prevalece una condición que simula una alta represión catabólica debido a la falta de expresión de los sRNAs CrcZ y CrcY, lo que provoca una alta actividad del complejo Hfq-Crc (Quiroz-Rocha *et al.*, 2017-a).

## **2.2 Síntesis de PHB en medio diaúxico (acetato-glucosa) en *A. vinelandii***

En concordancia con este resultado, nosotros observamos que durante el crecimiento diaúxico en una mezcla acetato-glucosa la acumulación de PHB se inhibió durante el consumo de acetato, una condición de alta represión catabólica, mientras que durante el consumo de glucosa la acumulación de PHB se incrementó 6 veces (Fig. 13a) (Barrios Rafael, 2019). Además, este incremento correlacionó con la expresión del operón biosintético *phbBAC*. Con la construcción de fusiones transcripcionales y traduccionales de *phbB* con el gen reportero *gusA*, se pudo establecer que tanto la transcripción como la traducción de *phbBAC* se incrementó en condiciones de baja represión catabólica, es decir durante el consumo de glucosa (Fig. 13b y c) (Gonzaga-Pérez, 2019).

En conjunto, estos resultados indican que la acumulación de PHB es controlada por el sistema de dos componentes CbrA/CbrB-Hfq-Crc y que se inhibe en condiciones de alta represión catabólica. Probablemente esta regulación esta mediada por el complejo de proteínas Hfq-Crc que reconocen directamente el mRNA de *phbBAC* evitando su traducción, ya que un análisis de la región líder de *phbB* permitió identificar un sitio putativo de unión del complejo Hfq-Crc (Quiroz-Rocha, 2017-b). El incremento en la transcripción de *phbB* en condiciones de baja represión catabólica sugiere, además, que el sistema de represión catabólica pudiera controlar la transcripción del regulador PhbR.



**Figura 13. La producción de PHB y la expresión de los genes *phbBAC* varían a lo largo del crecimiento diaúxico Acetato-Glucosa.** A) Cuantificación de PHB en la cepa silvestre de *A. vinelandii* en un cultivo diaúxico acetato (barra verde) y glucosa (barra naranja), en condiciones de alta (crecimiento a expensas de acetato) o baja (crecimiento a expensas de glucosa) represión catabólica. B) Niveles de transcripción del promotor *phbB* en condiciones de alta (10 h) y baja (20 y 30h) represión catabólica por carbono. Se utilizó una fusión transcripcional del promotor de *phbB* con el gen reportero *gusA* (*PphbB-gusA*) en la cepa silvestre AEIV. c) Niveles de traducción del promotor *phbB* en condiciones de alta y baja represión catabólica por carbono. Se utilizó una fusión traduccional del promotor de *phbB* con el gen reportero *gusA* (*PphbB-gusA'*) en la cepa silvestre AEIV. Las células fueron crecidas en medio mínimo Burk adicionado con acetato 30 mM y glucosa 30mM como únicas fuentes de carbono (Tomado de Barrios-Rafael 2019 y Gonzaga-Pérez 2019).

### **3.- HIPÓTESIS**

En *A. vinelandii* la expresión del operón biosintético de PHB, *phbBAC* responde a las condiciones de represión catabólica por carbono y está controlado por el sistema CbrA/CbrB-Hfq-Crc

### **4.- OBJETIVOS**

#### **4.1 GENERAL**

Establecer el efecto del sistema CbrA/CbrB-Hfq-Crc sobre la expresión del operón biosintético *phbBAC* en respuesta a distintos grados de represión catabólica en *A. vinelandii*.

#### **4.2 PARTICULARES**

1. Establecer el efecto del complejo represor Hfq-Crc sobre la producción de PHB
2. Establecer el efecto del complejo represor Hfq-Crc sobre la expresión de *phbBAC*.
3. Establecer posibles blancos de regulación del complejo Crc-Hfq en *A. vinelandii* mediante un análisis *in silico*.
- 4.- Identificar posibles blancos alternativos del sistema CbrA/B-Hfq-Crc en la vía de síntesis de PHB con base en los resultados del objetivo anterior.

## 5.- MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Material biológico

Tabla 1. Lista de cepas y plásmidos utilizadas en este estudio.

Cepas	Genotipo/Observaciones	Fuente
AEIV	Cepa tipo silvestre de <i>A. vinelandii</i>	Larsen and Haug 1971
CGBgusPT	Derivada de la AEIV, porta la fusión traduccional <i>pphbB-gusA</i> en el cromosoma. Tc <sup>r</sup>	Gonzaga Pérez, 2018
VVB01	Derivada de AEIV. Porta la construcción P $\sigma^{70}$ - <i>crc</i> en el cromosoma. Tc <sup>r</sup> , Gm <sup>r</sup> .	Este trabajo
<i>E. coli</i> S17-1	Cepa tipo silvestre	Simon 1984

Plásmidos	Características	Fuente
pSRK-Km	Vector replicativo vector en <i>A. vinelandii</i> contiene un promotor inducible con IPTG Km <sup>r</sup>	Khan <i>et al.</i> , 2008
pSRK-crc	Derivado del pSRK-Km, porta una copia del gen <i>crc</i> , bajo el control del promotor inducible con IPTG Km <sup>r</sup>	Quiroz-Rocha, 2012
pJET1.2/ <i>Blunt</i>	Vector de Clonación Ap <sup>r</sup>	Thermo Fisher Scientific
pUMA2Tc(5'.3')	Derivado del pUC19, dirige la integración de DNA al genoma de <i>A. vinelandii</i> en el <i>locus mel.</i> Tc <sup>r</sup>	Cocotl-Yañez <i>et al.</i> , 2014

pLA65	Derivado del pJET1.2/Blunt. Porta la región del promotor $\sigma^{70}$ del casete de gentamicina. Gm <sup>r</sup>	Colección del laboratorio
pJVC	Derivado del pJET1.2/Blunt. Porta la región codificante del gen <i>crc</i> . Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pJVGC	Derivado del pJVC. Porta la construcción P $\sigma^{70}$ - <i>crc</i> . Ap <sup>r</sup>	Este trabajo
pUVGC	Derivado del pUMA2Tc(5'-3'). Porta la construcción P $\sigma^{70}$ - <i>crc</i> . Tc <sup>r</sup> Gm <sup>r</sup>	Este trabajo

## 5.2 Condiciones de cultivo

### Cepas de *A. vinelandii*

De manera rutinaria, las cepas se conservaron en glicerol al 50% a -70 °C y cuando así se requirió, fueron subcultivadas en placas de medio mínimo Burk-Sacarosa (BS) en presencia del respectivo antibiótico. El medio BS está compuesto por: 20 g/L de sacarosa, buffer fosfatos (0.8 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0.2 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7), 0.073 g/L de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.183 g/L de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.160 g/L de MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 0.0002 g/L de NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O y 0.005 de FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O. El medio Burk-Glucosa (BG) tiene como fuente de carbono glucosa (20 g/L) en lugar de sacarosa. Si va a ser sólido se le añade agar al 1.5%. El medio de competencia de *A. vinelandii* (CM) está compuesto por 20 g/L de sacarosa, buffer fosfatos (0.8 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 0.2 g/L de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH=7), 0.073 g/L de CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.183 g/L de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y 0.160 g/L de MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O. El medio para la conjugación de *A. vinelandii* y *E. coli* (medio para cruza) está compuesto por 250 mL de BS más 70 mL de medio LB y se adicionó una concentración final de 0.2% de glucosa. Las soluciones de los componentes se prepararon por separado y se esterilizaron a 120 °C durante 20 minutos, a excepción del FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O y la glucosa, los cuales fueron esterilizados por filtración usando una membrana de 0.25 µm. La temperatura de incubación fue de 30 °C por un



tiempo de 48 h. Para los cultivos líquidos se utilizó una agitación de 200 rpm y una fracción de llenado de 1/5. La concentración de antibiótico fue: Km 1µg/mL, Tc 30 µg/mL, Amp 200 µg/mL.

Las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio Luria Bertani (LB), compuesto por 10 g/L bacto triptona, 5 g/L extracto de levadura, 10 g/L cloruro de sodio y 1000 mL H<sub>2</sub>O destilada, con su respectivo antibiótico a una concentración de km 30 µg/mL. Se incubaron a 37°C y los cultivos líquidos se sometieron a 200 rpm de agitación.

### **5.3 Conjugación de cepas *A. vinelandii* y *E. coli***

Se prepararon dos matraces de 250 mL con 50 mL de BS cada uno, los cuales se inocularon con 400 µg de proteína de las cepas silvestre y CGBgusPT, previamente cultivadas por 24 h en 25 mL de medio a 30 °C/200 rpm. Posteriormente se incubaron a 30 °C durante 24 h a 200 rpm. Al día siguiente se cultivaron las cepas de *E. coli* (S17-1) que portan el plásmido pSRK-km y pSRK-Crc, en 5 mL de LB Km toda la noche. Una vez listos los cultivos, se cosecharon las células de *A. vinelandii* y S17-1 mediante centrifugación a 3 000 rpm y 4 °C. Las células de *A. vinelandii* se lavaron con un volumen de MgSO<sub>4</sub> 10 mM y la cepa S17-1 con NaCl 0.89%, resuspendiéndose en 1 mL de NaCl 0.89%. Se mezclaron 200 mL de ambas soluciones (proporción 1:1) y se extendió la solución de células sobre la superficie de placas de medio para cruza. Se secó en campana y se incubó a 30 °C durante 24 h. Al cabo de las 24 h se levantó el tapete de células y se lavó con NaCl 0.89%. Por último, se resuspendieron las células en 700 µL de BS y se platearon de 100 a 200 µL en medio de selección BS Km<sub>1</sub>.

### **5.4 Manipulación de ADN.**

La purificación del ADN plasmídico y la purificación de productos de PCR se realizaron utilizando kits de Thermo Fisher Scientific, siguiendo las instrucciones del fabricante. Se utilizaron enzimas de restricción y T4 DNA ligasa también de la misma compañía. Se utilizó el CloneJET PCR cloning kit y el vector de clonación

pJET1.2/*Blunt* siguiendo el protocolo establecido (Thermo Fisher Scientific). Para verificar la integridad y fidelidad de la secuencia todas las construcciones fueron secuenciadas por el método Sanger de Biosystems Applied.

### 5.5 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se utilizaron las enzimas de alta fidelidad KAPA Taq DNA polymerase de biosystems y la enzima Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Scientific). Estas enzimas fueron utilizadas siguiendo los parámetros establecidos dentro de los protocolos de cada una de ellas.

Para la realización de PCR de colonia se utilizó la enzima *Taq* DNA Polymerase (recombinante) de Thermo Scientific. El molde de DNA utilizado para la reacción de PCR proviene del lisado celular de una caja fresca de donde se tomó una asada y se resuspendió en 20  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O milli Q, se incubó a 95 °C durante 20 min. Al término, se centrifugó a 13000 rpm durante 10 min. Se tomaron 2  $\mu$ L del sobrenadante para un volumen de reacción de PCR de 25  $\mu$ L. Se utilizaron los parámetros establecidos en el protocolo de la *Taq* DNA Polymerase (recombinante) de Thermo Scientific.

### 5.6 Construcción de plásmidos

Para la construcción P $\sigma^{70}$ -*crc* se amplificó un fragmento de 920 pb, correspondiente a la región codificante del gen *crc*, con los oligos Crc-Rv (5'-CTGCGTCTGGTGAAGTGAG-3') y Crc-Fw (5'-CGAGGTCGGGTATCATACA-3'). El fragmento resultante se clonó en el vector pJET1.2/*Blunt* (Thermo Fisher Scientific), obteniendo así el plásmido pJVC. Posteriormente, el gen *crc* se liberó con la enzima BglII y se sub-clonó en el plásmido pLA65 (previamente digerido con la enzima BamHI) río abajo del promotor  $\sigma^{70}$ . El plásmido resultante se nombró pJVGC (Fig. 14).

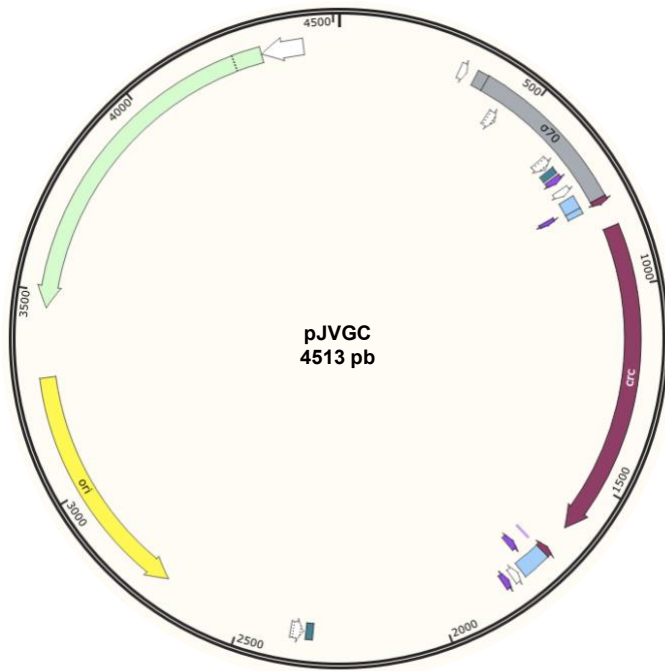


Fig. 14. Mapa del plásmido pJVGC que porta la construcción  $P_{\sigma^{70}}-crc$ .

Para la construcción del plásmido pUVGC, la construcción  $P_{\sigma^{70}}-crc$  (1585 pb) del plásmido pJVGC se liberó con la enzima BglIII y se sub-clonó en el plásmido pUMA2Tc(5'-3') previamente linealizado con la enzima BamHI (Fig. 15). Este plásmido permite la integración de DNA al cromosoma de *A. vinelandii* en una región del *locus mel* mediante doble recombinación homóloga (Cocotl-Yañez *et al.*, 2014).

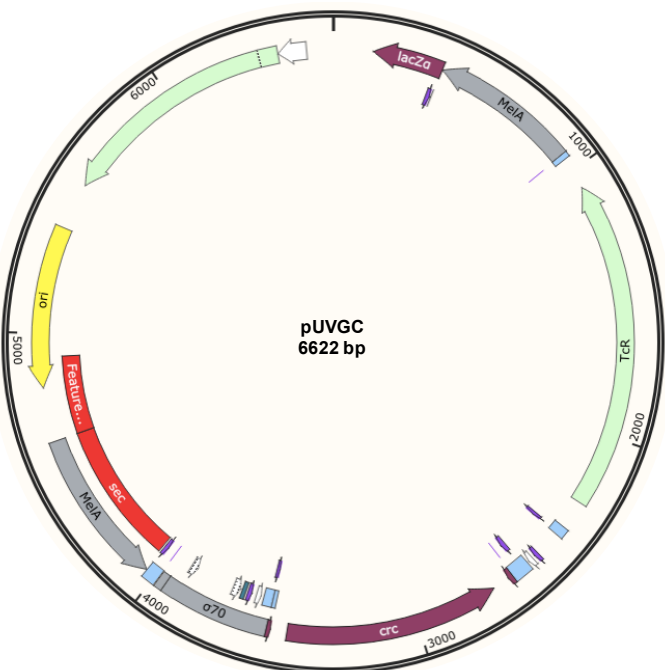


Fig. 15. Mapa del plásmido pUVGC, porta la construcción  $P_{\sigma^{70}}-crc$ . Nótese los sitios de recombinación del *locus mel*  $Amp^r$ .  $Tc^r$

### **5.7 Preparación de células competentes de *A. vinelandii***

Se sembró la cepa AEIV en una placa de medio CM y se incubó a 30 °C durante 48 h. Al día siguiente se subcultivó toda la superficie de una nueva placa CM, incubándola a 30 °C por 15 h (Page *et al.*, 1976). Se recolectó todo el tapete celular con una espátula estéril. Se lavaron las células varias veces con MgSO<sub>4</sub> 10 mM para eliminar el alginato. Una vez obtenidas las células libres de alginato, se resuspendieron en 400 µL de medio líquido CM.

### **5.8 Transformación de *A. vinelandii***

Para este proceso se utilizó aproximadamente ~5 µg del plásmido pUVGC (linealizado con la enzima Scal). El DNA se mezcló con 100 µL de células competentes en tubos Eppendorf estériles de 1.5 mL. Una vez mezclados la solución se extendió en un área de 2 cm<sup>2</sup> en placas de medio CM y se incubó a 30 °C durante 24 h. Al término, se recolectaron las células en medio BS, se lavaron con MgSO<sub>4</sub> 10mM para eliminar el alginato. Por último, se plateó un volumen de 100 µL en medio de selección (BS Km<sub>1</sub>). De esta forma se obtuvo la cepa VVB01, la cual porta en el cromosoma la construcción P $\sigma^{70}$ crc.

### **5.9 Preparación de cultivos de *A. vinelandii***

Preparación de pre-inóculos. Para la preparación de los pre-inóculos, se utilizaron cepas con un crecimiento en placa de 48 h de las cuales, en condiciones estériles, se tomó una muestra adecuada (aproximadamente 3 asadas con suficiente muestra) y se transfirieron a un matraz de 125 mL con 25 mL de BS líquido agregando su antibiótico adecuado, Km<sub>1</sub> o Tc<sub>30</sub>. Estos pre-inóculos se incubaron durante 18 h a 30 °C con agitación de 200 rpm.

Preparación de inóculos. Una vez pasado el periodo de incubación, se utilizaron para inocular matraces de 250 mL con 50 mL de BS con un volumen de cultivo equivalente a 400 µg de proteína con su antibiótico correspondiente y, cuando se requirió en presencia del inductor IPTG (1mM); se incubaron a 30°C con agitación constante de 200 rpm y se realizaron las cinéticas correspondientes.

### 5.10 Cuantificación de proteína

El método utilizado fue el reportado por Lowry *et al.*, 1951. Las pastillas celulares de *A. vinelandii* se lavaron con  $\text{MgSO}_4$  10mM y se resuspendieron en 1 mL de esta solución. Posteriormente, se tomó una cantidad adecuada de muestra y se aforó a 200  $\mu\text{L}$  con agua milli-Q, posteriormente se añadió 1 mL de solución reactiva, se dejó reposar 10 minutos y se agregó 100  $\mu\text{L}$  de reactivo de Folín (Sigma) diluido en un volumen de agua (1:1) y se dejó en reposo por 30 min. Por último, se midió la absorbancia a 625 nm. Paralelamente, se corrió una curva estándar con concentraciones de albúmina de 25, 50, 100, 200 y 400  $\mu\text{g/mL}$ .

Las soluciones utilizadas fueron:

- a)  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  2% en NaOH 0.1 N
- b) Tartrato de sodio y potasio al 2%
- c)  $\text{CuSO}_4$  1%.

La solución reactiva se preparó con 100  $\mu\text{L}$  de solución C, más 100  $\mu\text{L}$  de solución B, más 9.8 mL de solución A.

### 5.11 Extracción y Cuantificación de PHB

La cuantificación de PHB se realizó usando el método espectrofotométrico de Law and Slepecky, 1961, el cual se basa en la conversión de PHB a ácido crotonico en presencia de ácido sulfúrico concentrado. Las células se lavaron con 1 mL de EDTA 0.1 M, seguido de 500  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgSO}_4$  10 mM para remover por completo el alginato.

Para la extracción del PHB las muestras fueron mezcladas con 1 mL de NaClO al 30% e incubadas durante 1 hora a 30 °C. Las muestras fueron centrifugadas a 6 500 rpm durante 7 min, lavadas con 1 mL de agua y centrifugadas nuevamente. Por último, se realizaron lavados con etanol absoluto y acetona y se dejaron secar toda la noche. Una vez teniendo las pastillas de PHB secas, para la cuantificación, se resuspendieron en 1 mL de ácido sulfúrico concentrado y se calentaron durante 10 min a 95 °C. La densidad óptica de las muestras fue

determinada a una longitud de onda de 235 nm. Cuando las lecturas fueron >1, se realizaron diluciones correspondientes con ácido sulfúrico.

### 5.12 Determinaciones de la actividad de $\beta$ -glucuronidasa

Se prepararon las siguientes soluciones: lisozima 10 mg/mL, P-nitrofenil - $\beta$ -D-glucurónido (PNPG) 4mg/mL, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.2 M, tritón X100 solución 10% V/V de tritón en agua destilada, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5M, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5M, EDTA 0.25M, DTT 0.25M. El buffer Z, se prepara preferencialmente antes de iniciar la reacción mezclando: 3 mL de K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5M, 2 mL de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5M, 0.21 mL de EDTA 0.25 M y 1 mL de DTT 0.25 M, llevando el volumen a 50 mL con agua destilada.

Para la cuantificación primero se resuspendió la pastilla celular de la muestra en 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 10mM, posteriormente se tomaron 20  $\mu$ L (Vol. Rx) (este volumen puede variar dependiendo del grado de expresión que tenga la  $\beta$ -glucuronidasa), a este volumen de reacción se le agregó 710  $\mu$ L de buffer Z. Simultáneamente se preparó un blanco que contenía 730  $\mu$ L de buffer Z y se procesó junto a las demás muestras. Se les agregó 10  $\mu$ L de solución de lisozima y se incubaron los tubos a 37°C durante 5 minutos. Al término del tiempo de incubación se les agregaron 10  $\mu$ L de solución de Tritón 10%. Los tubos se transfirieron a un baño de agua a 28°C y se les agregó 100  $\mu$ L de la solución de PNPG, al instante se cronometró el tiempo de la reacción (tRx). Se agregó 150  $\mu$ L de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> para detener la reacción. Por último, se leyó la absorbancia a 405 nm contra el blanco. Para calcular la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa usamos la siguiente fórmula:

$$U \beta\text{-Gluc} = \frac{\text{D.O. (405mn)} \times 1000}{(0,018) (t \text{ Rx minutos}) (\text{Vol Rx } \mu\text{L}) (\mu\text{g Proteína/ml})}$$

1 U= nmoles de PNPG producidos/minuto/ $\mu$ g Proteína

### 5.13 Análisis MEME-MAST

Se generó una matriz de predicción para la proteína Crc con base en un trabajo previamente reportado para las distintas especies de *Pseudomonas* ( Browne *et al.*, 2010). Las secuencias de genes blanco de Crc se obtuvieron de la base de datos de genome.jp/kegg/ y se procesaron en el portal meme-suite.org/ bajos los siguientes parámetros: 1. Modo de descubrimiento de motivos: clásico; 2. Distribución de los sitios de motivos en la secuencia: cero o una ocurrencia de motivo por secuencia; 3. Números de motivos a encontrar por secuencia: 3. Las regiones -70 a +16 de todos los marcos de lectura abiertos del genoma de *A. vinelandii* (portal NCBI GCF 000021045.1 ASM2104v1) se descargaron de la herramienta de análisis de secuencia reguladora (RSAT) (Chollier-Thomas *et al.*, 2008). El análisis de estas secuencias, en búsqueda de posibles sitios putativos de Crc (AAnAAAnAA) en la hebra positiva, se realizó bajo los parámetros estadísticos predeterminados del mismo portal con un *pval* de 1.0 e-5 junto con la matriz de predicción, quedando un total de 190 posibles blancos de regulación.

## 6.- RESULTADOS Y DISCUSION

### 6.1 Efecto de la sobre-expresión de Crc sobre la producción de PHB en medio líquido

Como ya se mencionó en la sección de antecedentes, una mutante de *A. vinelandii* carente de la histidín quinasa CbrA, representa una condición de alta represión catabólica debido a la falta de expresión de los sRNAs CrcZ y CrcY, en esta cepa hay una reducción de los niveles de PHB (Fig. 13). Dado lo anterior, hipotetizamos que la alta actividad del complejo represor Crc-Hfq inhibe la síntesis de PHB, muy probablemente a través del control directo del operón *phbBAC*. Por tal razón, se planteó el Objetivo 1: Explorar el efecto del complejo represor Hfq-Crc sobre la producción de PHB y la expresión de *phbBAC*. Para lograr este objetivo, se evaluó el impacto de la sobre-expresión de la proteína Crc sobre la producción de PHB. Cabe recordar que, hasta el momento, no se han podido aislar mutantes carentes de la proteína Crc, lo cual, indica un papel esencial de esta proteína en el metabolismo de *Azotobacter* en las condiciones ensayadas.

Para sobre-producir Crc se abordaron dos estrategias. En la primera se expresó en *trans* a la proteína Crc utilizando un plásmido que porta al gen *crc* bajo el control de un promotor inducible con IPTG y en la segunda se expresa la proteína Crc en *cis* bajo un promotor constitutivo (tipo  $\sigma^{70}$ ) en el cromosoma. A continuación, se describe cada uno de estos dos enfoques.

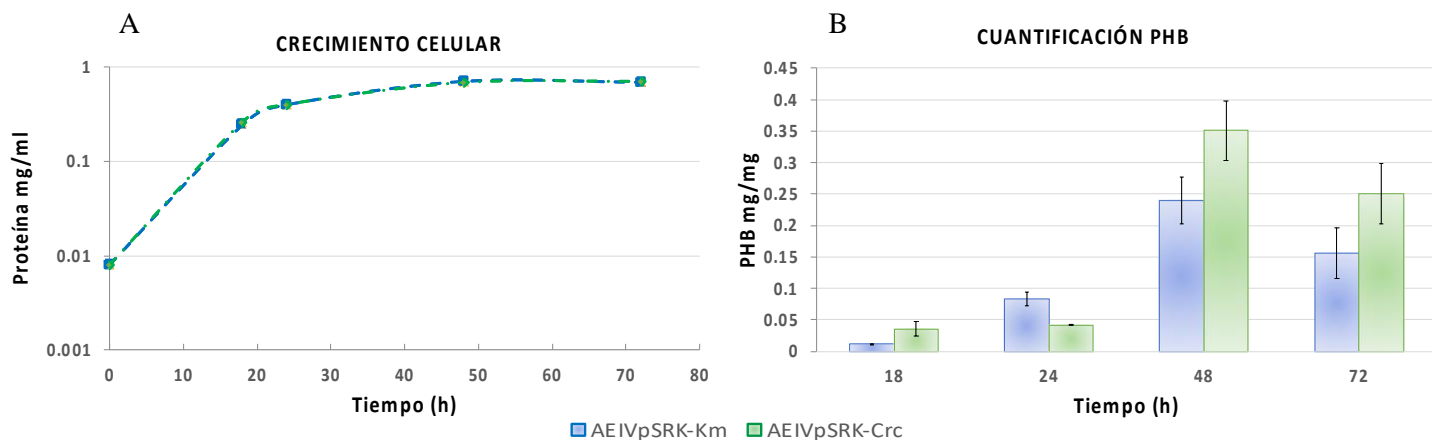
#### 6.1.1 Expresión de Crc en *trans* a partir de un promotor inducible

En un trabajo previo, realizado en el laboratorio, se reportó que la expresión en *trans* de Crc a partir de un promotor inducible con IPTG generaba un estado de “alta” represión catabólica, inhibiendo el crecimiento en glucosa como única fuente de carbono (Quiróz-Rocha *et al.*, 2017-a). El plásmido que se utilizó es un derivado del pSRK-Km (Khan *et al.*, 2008).

Por tal razón, exploramos el efecto de la sobre-expresión de Crc en *trans* utilizando esta estrategia. El plásmido que porta al gen *crc*, llamado pSRK-crc y el plásmido vacío se transfirieron a la cepa silvestre AEIV, generando las cepas



AEIV/pSRK-Km y AEIV/pSRK-Crc. Las cepas fueron cultivadas en medio líquido BS. Cabe mencionar que estas cepas sí pueden crecer en sacarosa como única fuente de carbono presumiblemente porque el transporte de este azúcar no está sujeto a una alta CCR en comparación a la glucosa (Quiroz-Rocha *et al.*, 2017-a). Por tal razón, se evaluó el efecto de la expresión de Crc en medio mínimo BS, realizando una cinética de acumulación de PHB, la cual se muestra en la Fig. 16.



**Figura 16. Cinética de acumulación de PHB en células que sobre-expresan Crc en *trans*.** La cepa silvestre que porta el plásmido vacío pSRK-Km y su derivado que expresa el gen *crc* a partir de un promotor inducible con IPTG (1 mM), se crecieron en medio líquido BS. A) Cinética de Crecimiento. B) Acumulación de PHB. Las barras representan la desviación estandar de los resultados obtenidos de 3 réplicas biológicas.

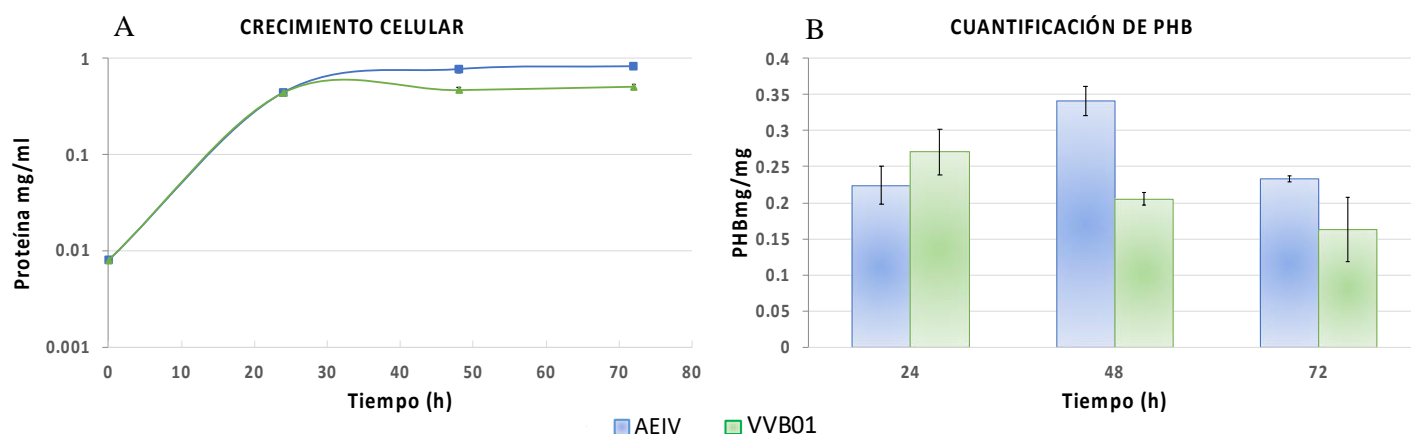
La concentración de proteína en ambas cepas a lo largo de la cinética en medio líquido BS (Fig. 16A) fue muy similar, conservando la misma concentración de proteína en fase estacionaria, a las 48 y 72 h, con un aproximado de 0.68 y 0.70 mg/mL en ambas cepas.

En la Fig. 16B podemos visualizar la acumulación de PHB de estas dos cepas a lo largo de la cinética. Se observa una tendencia a una mayor acumulación a las 48 y 72 h, correspondiente a la fase estacionaria, pero en estos puntos las diferencias no son estadísticamente significativas entre ambas cepas. Sin embargo, a las 24 h se observó una disminución de la acumulación de PHB en la cepa que sobre-expresa a Crc, con respecto a la cepa silvestre. Dichas diferencias fueron estadísticamente significativas ya que se observaron niveles de 0.08 y 0.04 mg PHB/mg proteína en la cepa silvestre y en la derivada que expresa a Crc,

respectivamente. La falta de efecto tras la sobre-expresión de Crc en tiempos posteriores puede deberse a que, en fase estacionaria, la actividad de los sRNAs CrcZ/Y esté inhibiendo la actividad del complejo Crc/Hfq ya que se ha observado que estos sRNA se acumulan marcadamente durante esta fase (Martínez-Valenzuela, 2018).

### 6.1.2 Expresión de Crc en *cis* a partir de un promotor constitutivo

Para abordar la segunda estrategia encaminada a aumentar la producción de la proteína Crc, se construyó una cepa que porta en el cromosoma una copia del gen *crc* y cuya expresión esta bajo el control de un promotor  $\sigma^{70}$ . Esta cepa se llamó VVB01 y su construcción se describe en Materiales y Métodos. Como control incluimos a la cepa AEIV WT. Las cepas fueron cultivadas en medio líquido BS y se realizó una cinética de acumulación de PHB a lo largo de la curva de crecimiento (Fig. 17).



**Figura 17. Cinética de acumulación de PHB en células que sobre-expresan Crc en *cis*.** Cinética de crecimiento (A) y acumulación de PHB en la cepa silvestre AEIV y en su derivada VVB01(Crc+) en medio líquido BS. Las barras representan la desviación estándar de los resultados obtenidos de 3 réplicas técnicas.

A las 24 h las cepas presentan una concentración de proteína similar, aproximadamente 0.43 mg proteína/mL cultivo (Fig. 17A). En horas posteriores el crecimiento de la cepa que sobre-expresa Crc se vio ligeramente disminuido en comparación a la WT.

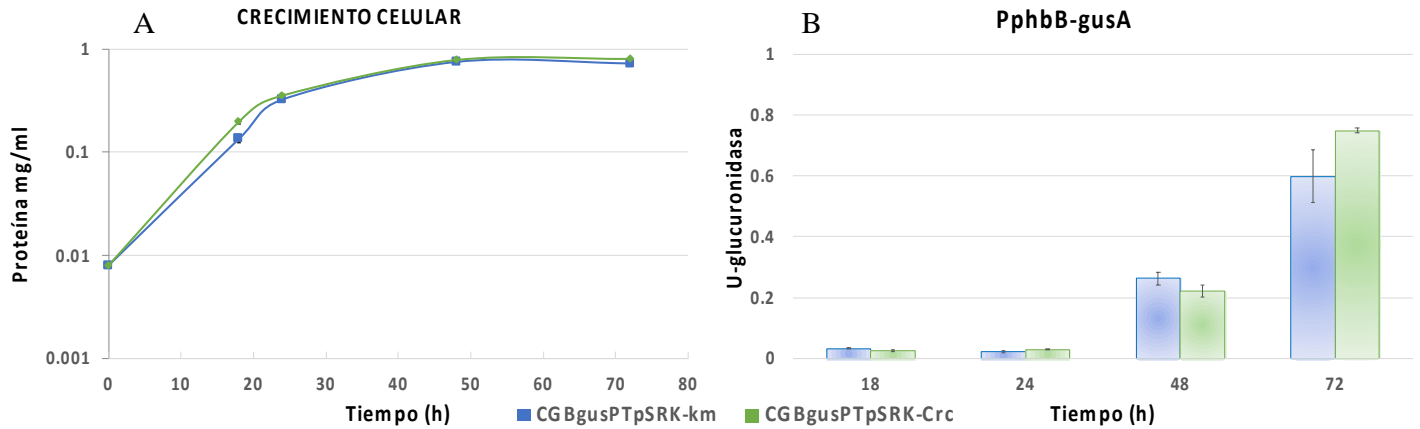
En la Fig. 17B se graficó la cinética de acumulación de PHB a lo largo del crecimiento. A las 24 y 72 h no se observa un efecto aparente de Crc sobre la acumulación de PHB; sin embargo, a las 48 h se aprecia una disminución sobre la acumulación de PHB en la cepa que sobre expresa la proteína Crc, obteniendo una acumulación de 0.20 mgPHB/mg de proteína en comparación a los 0.34 mgPHB/mg de proteína de la cepa WT, aunque dicho efecto no se conserva a las 72 h.

Estos resultados sugieren un efecto transitorio y parcial de Crc sobre la acumulación de PHB ya que no se abate por completo la acumulación de PHB y este efecto desaparece en fase estacionaria tardía.

### **6.1.3 Efecto de la sobre-expresión de Crc en la traducción de *phbB*.**

Como se muestra en la sección de antecedentes (Fig. 14C) en un medio diaúxico y en condiciones de alta represión catabólica por la presencia acetato (una fuente de carbono preferida) los niveles de traducción del mensajero de *phbBAC* están disminuidos, pero cuando esta represión se libera, la traducción se aumenta. Para explorar si esto se debía a un efecto directo del complejo Crc-Hfq sobre la traducción del mRNA de *phbBAC*, nos dimos a la tarea de evaluar el efecto de sobre-expresar a Crc en la expresión de este operón, lo cual forma parte del objetivo particular 2. Para lograr este Objetivo, transferimos por conjugación el plásmido que sobre-expresa Crc, pSRK-*crc*, a la cepa que porta una fusión traduccional *PphbB-gusA* (CGBgusPT). Como control se utilizó esta misma cepa, pero portando el plásmido pSRK-Km<sup>r</sup> vacío. Con la sobre-expresión de Crc buscábamos generar condiciones de alta represión catabólica, y si nuestra hipótesis fuera cierta, una reducción en la traducción de *phbB*.

Se evaluó el efector de sobre-expresar a Crc sobre la traducción de *phbB* en medio líquido BS adicionado con el inductor IPTG. En la Fig. 18A se muestra la curva de crecimiento de las cepas ensayadas y se puede apreciar un crecimiento similar entre ellas, alcanzando a las 48 h una concentración aproximada de 0.78 y 0.74 mg de proteína/mL en ambas cepas, la cual se mantiene hasta las 72 h.



**Figura 18. Efecto de Crc sobre la traducción de *phbB* en medio líquido.** A) Curva de crecimiento de la cepa silvestre que porta la fusión traduccional *phbB-gusA* con el plásmido vacío o con el plásmido que porta al gen *crc*. B) Actividad de B-glucuronidasa en cepas del panel A para estimar el grado de traducción de *phbB*. Las barras representan la desviación estandar de los resultados obtenidos de 3 réplicas técnicas.

En la Fig 18B se muestra la cinética de la actividad traduccional de la fusión *phbB-gusA* que se estimó mediante la determinación de  $\beta$ -glucuronidasa. Como se puede apreciar no se observan diferencias significativas en la traducción de *phbB* a lo largo de la curva. Aunque esto es contrario a lo esperado, este resultado es congruente con la falta de un claro efecto sobre la acumulación de PHB en medio líquido observado anteriormente con estos mismos plásmidos.

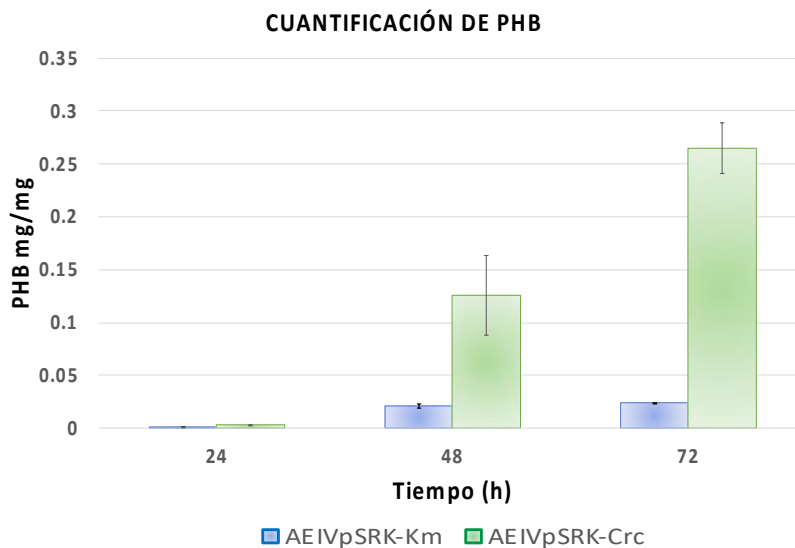
## 6.2 Efecto de la expresión de Crc sobre la producción de PHB en medio sólido

Como se puede apreciar en la Fig 13 del apartado de Introducción, el fenotipo de acumulación de PHB en medio sólido de la cepa mutante en la histidín cinasa CbrA es muy evidente. Debido a que en medio líquido no apreciamos un efecto claro de la actividad de Crc sobre la acumulación de PHB, nos dimos a la tarea de evaluar si, en medio sólido, una alta actividad de represión catabólica, mediada por la sobre-expresión de Crc, tiene un efecto sobre la acumulación de PHB.

### 6.2.1 Expresión de Crc en *trans* a partir de un promotor inducible

Las cepas AEIV/pSRK-Km y AEIV/pSRK-Crc fueron cultivadas en placas de BS adicionadas con el inductor IPTG. Se incubaron a 30 °C durante 72 h, tomando

muestras a las 24, 48 y 72 h. En la Fig. 19 se muestra el crecimiento celular y la cuantificación de PHB.

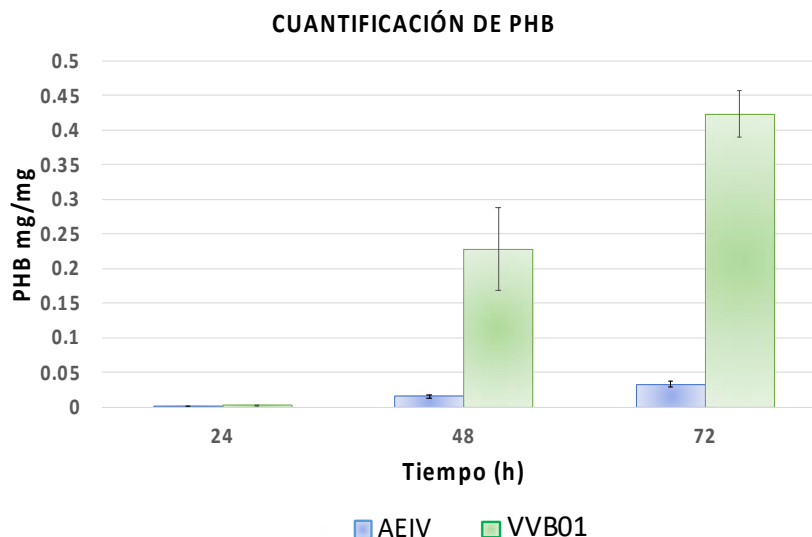


**Figura 19. Cinética de acumulación de PHB en células que sobre-expresan Crc en *trans*.** La cepa silvestre que porta el plásmido vacío pSRK-Km y su derivado que expresa el gen *crc* a partir de un promotor inducible con IPTG (1 mM), crecidas en medio sólido BS. Las barras representan la desviación estandar de los resultados obtenidos de 3 réplicas biológicas.

En la Fig 19 se muestra la acumulación de PHB a lo largo de la cinética, teniendo una acumulación similar a las 24 h en ambas cepas, sin embargo, a las 48 y 72, contrario a lo que nosotros esperábamos, la producción de PHB en la cepa que sobre expresa a Crc fue mayor en comparación a la cepa silvestre acumulando 3 veces más a las 48 h y hasta 5 veces a las 72 h.

### 6.2.2 Expresión de Crc en *cis* a partir de un promotor constitutivo

En la cuantificación de PHB en la cepa con el promotor constitutivo  $\sigma^{70}$  en medio líquido BS (Fig 17B) se observa una disminución a las 48 h. Para determinar si este efecto se conserva en medio sólido, se cultivaron las cepas AEIV y VVB01 (cepa con la sobre-expresión de Crc en el cromosoma con el promotor de expresión constitutiva) en placas de BS. Se tomaron muestras a las 24, 48 y 72 h y los resultados de la cuantificación de PHB se muestran en la Fig. 20.



**Figura 20. Cinética de acumulación de PHB en células que sobre-expresan Crc en *cis*.** Acumulación de PHB en la cepa silvestre AEIV y en su derivada VVB01(Crc+) en medio sólido BS. Las barras representan la desviación estandar de los resultados obtenidos de 3 réplicas biológicas.

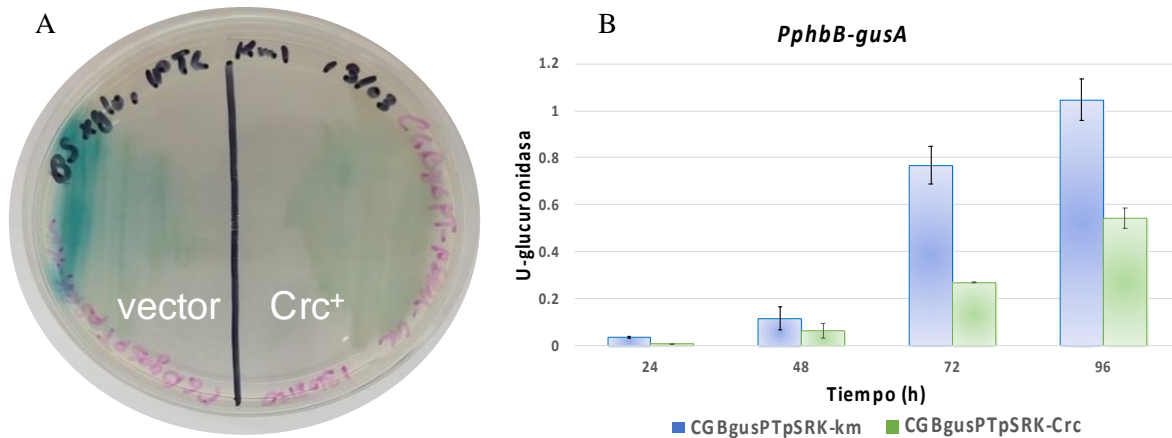
La producción de PHB en la cepa VVB01 fue aproximadamente 4 veces mayor a las 48 h y hasta más de 8 veces a las 72 h, en comparación a la cepa silvestre, teniendo el mismo comportamiento que la cepa con el plásmido inducible con IPTG.

Los resultados anteriores indican que la sobre-expresión de Crc tiene un comportamiento distinto sobre la biosíntesis de PHB en cultivos en medio líquido y en sólido debido a que se aumentó la acumulación de PHB en esta condición. Con la finalidad de investigar si esta acumulación observada en medio sólido es derivada de una alta actividad del operón biosintético, cuantificamos la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa. Se utilizaron las cepas que portan una fusión traduccional con el gen reportero *gusA*, así como los plásmidos que contienen un promotor inducible. Obteniendo los siguientes resultados.

### 6.2.3 Efecto de la sobre-expresión de Crc en la traducción del mRNA de *phbB*.

Se cultivaron las cepas CGBgusPT/pSRK-Km y CGBgusPT/pSRK-Crc en una placa de BS suplementada con IPTG y Xgluc (un sustrato que permite observar la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa mediante una coloración azul), la cual se incubó a 30 °C por 48 h. Por otro lado, se cultivaron las mismas cepas en placas de BS

suplementada solo con IPTG, de igual manera se incubaron a 30°C y se realizó un muestreo de 24, 48, 72 y 96 h. Los resultados se muestran en la Fig. 21.



**Figura 21. Efecto de la expresión de Crc sobre la traducción de *phbB* en medio sólido BS.** A) Crecimiento en presencia de X-gluc de la cepa CGBgusPT (*PphbB-gusA*) con el vector vacío o con el vector que porta al gen *crc* a las 48 h. B) Determinación de la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa en las cepas del panel A. Las barras representan la desviación estándar de los resultados obtenidos de 3 réplicas técnicas.

Como se observa en el panel A, la cepa *phbB-gusA* con el plásmido vacío mostró un franco color azul. Sin embargo, en su derivada Crc+ el color es tenue, sugiriendo un efecto inhibitorio de Crc en la traducción de *phbB*. Así mismo, la cuantificación de  $\beta$ -glucuronidasa (panel B) confirmó que, efectivamente, la traducción de *phbB* se vio disminuida al menos a la mitad en la cepa que expresa Crc, a lo largo del crecimiento en placas de medio BS.

De manera colectiva, nuestros resultados indican que, en medio líquido, Crc no tiene un efecto claro sobre la producción de PHB, dado que tras la sobreexpresión de esta proteína en *trans* o en *cis* la acumulación de PHB fue similar a la cepa silvestre. Estos resultados fueron congruentes con la falta de efecto de las cepas Crc+ sobre la traducción de *phbB*.

Por otro lado, en medio sólido, y contrario a nuestra predicción, se observó un incremento en la acumulación de PHB de más de 3 veces a las 48 hrs y de más de 5 veces a las 72 hrs en las cepas Crc+, con respecto a la cepa silvestre. Este

resultado contrasta con la disminución de la traducción del mRNA de *phbB* en la cepa Crc+ en las mismas condiciones (Fig. 21). Por el momento no sabemos a qué obedece este comportamiento. En conclusión, nuestros datos indican que Crc carece de un efecto claro de represión de la traducción del operón *phbBAC*.

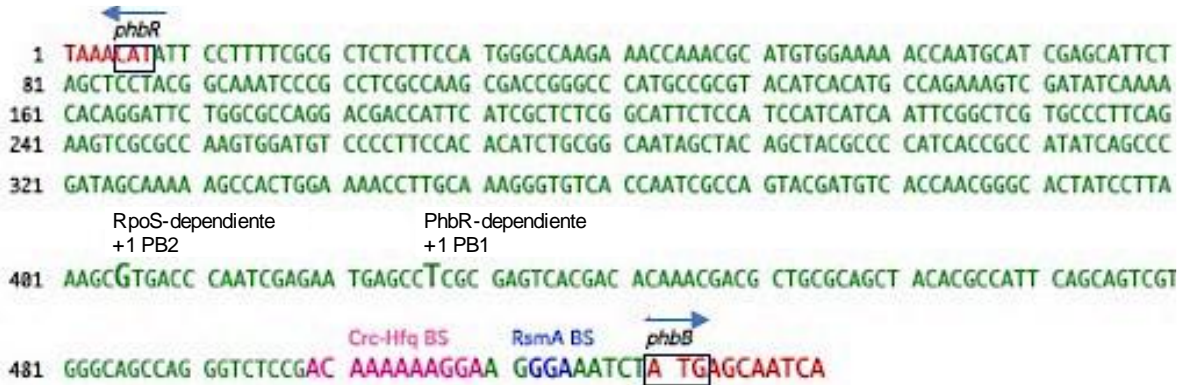
### **6.3 Análisis de la región líder de *phbB***

La traducción del mRNA del operón *phbBAC* esta regulada por la proteína RsmA, la cual reconoce un motivo GGA cerca de la región Shine-Dalgarno del ARNm de *phbBAC* (Hernández-Eligio *et al.*, 2012). Es posible que exista una interrelación entre el pegado de RsmA y el de Crc o alternativamente, que el pegado de RsmA prevenga un posible pegado de la proteína Crc. Por tal razón, analizamos la disposición del sitio de reconocimiento ya descrito para RsmA, en el ARNm de *phbB*, con respecto al sitio propuesto para el complejo Crc-Hfq.

Las proteínas Crc-Hfq controlan la traducción de sus genes blanco al reconocer sitios CA cerca de la secuencia SD, evitando la unión del ribosoma y el inicio de la traducción. Dichos sitios CA se localizan en una estructura de asa tras el plegamiento del mRNA blanco (Quiroz-Rocha, 2017).

El operón biosintético de PHB, encabezado por el gen *phbB*, se transcribe a partir de dos promotores, uno proximal llamado PB1 y uno distal PB2, y están bajo el control del activador transcripcional PhbR y del factor sigma RpoS, respectivamente (Peralta-Gil *et al.*, 2000) (Fig 22). Los inicios de transcripción de PB1 y PB2 se sitúan en las posiciones -94 y -115, respectivamente, con respecto al inicio de la traducción de *phbB* (Fig. 22).





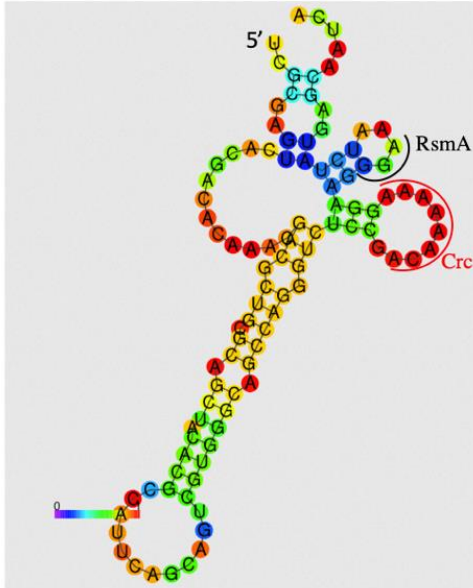
**Fig 22. Organización de la región reguladora del operón biosintético de PHB, *phbBAC*.** La transcripción de *phbB* inicia a partir de dos sitios, pB1 y PB2 los cuales dependen del activador transcripcional PhbR y del factor sigma RpoS, respectivamente. La proteína RsmA reconoce el líder de *phbB* (RsmA BS) en un sitio que se sobrepone al Shine-Dalgarno inhibiendo su traducción. Cerca de esta región se identificó un posible sitio de reconocimiento del complejo Crc-Hfq (Crc-Hfq BS). Los inicios de traducción de *phbB* y *phbR* se encuentran encerrados en cajas. Las flechas indican el sentido de la transcripción.

Para explorar la interrelación del sitio de pegado a RsmA con el posible sitio de reconocimiento por el complejo Hfq-Crc, analizamos la estructura secundaria de los transcritos PB1 y PB2 utilizando el servidor RNAfold (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>). Se analizaron los ARNm desde el inicio hasta 10 bases río abajo del codón de inicio de la traducción, lo cual corresponde a transcritos de 104 y 126 bases para PB1 y PB2, respectivamente (Fig. 23).

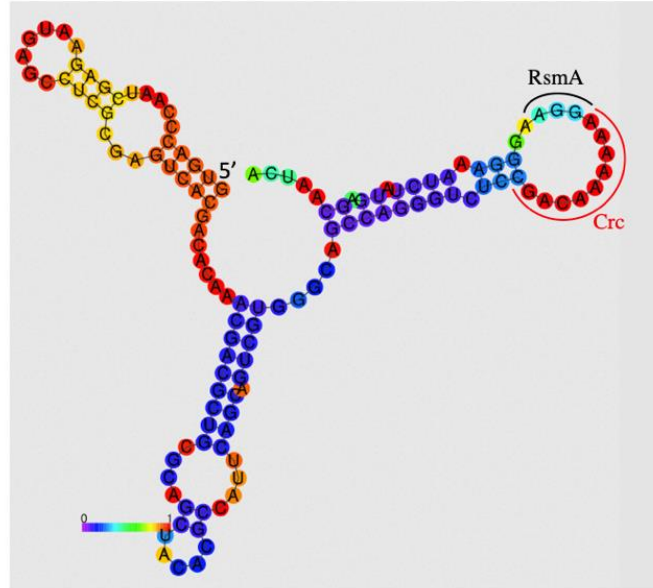
En el transcrito PB1, se observa que el sitio de reconocimiento de RsmA se localiza en un asa distinta al asa que presenta el sitio probable de reconocimiento de Crc-Hfq; mientras que en PB2, ambos sitios se localizan presumiblemente en la misma asa. Vale la pena hacer notar que la secuencia Shine-Dalgarno se localiza entre estos dos sitios, de esta manera, dicha secuencia parece estar mas expuesta en el transcrito PB2, el cual se expresa a partir de un promotor RpoS en fase estacionaria. Debido a la disposición de los sitios de pegado a RsmA y Crc-Hfq en la región líder de *phbB*, es posible que la unión de estas proteínas sea mutuamente excluyente dada su cercanía, sobretodo en el transcrito PB2 en donde se localizarían en la misma estructura de asa. Dado lo anterior, y considerando que el pegado de RsmA al mRNA de *phbB* ha sido ampliamente documentado, se sugiere

que el complejo Crc-Hfq no reconoce dicho sitio. Esto concuerda con nuestros resultados experimentales del apartado anterior.

## PB1



## PB2



**Fig 23. Predicción de la estructura secundaria de los ARNm PB1 y PB2 de *phbB*.** El plegamiento de los transcritos de *phbB*, PB1 y PB2, fue analizado con el programa RNAfold. Se consideraron los 104 y 126 bases iniciales, que abarcan desde el inicio hasta 10 bases río abajo del inicio de la traducción. Se muestra el sitio de reconocimiento de RsmA (GGA; línea negra) y el posible sitio de pegado de Crc (ACAAAAA; línea roja).

El antecedente de este trabajo comprende el abatimiento, tanto en medio sólido como en líquido, de la producción de PHB en la mutante que carece de la cinasa histidínica CbrA. En esta mutante los niveles de actividad del complejo represor Crc-Hfq es elevada, razón por la cual hipotetizamos que este complejo reconocía directamente el ARNm de *phbB* inhibiendo su traducción. Es posible que la estrategia de sobreexpresión de Crc no nos haya permitido detectar dicho efecto represor del complejo Crc-Hfq. Tal vez no se lograron obtener los niveles suficientes de Crc para observar un arresto en la traducción del operón biosintético de PHB. Además, en medio sólido, obtuvimos un incremento sobre la acumulación de PHB, pero no sobre la traducción del mRNA de *phbB*, indicando que Crc pudiera estar regulando otras vías involucradas en la producción de PHB. Por tal razón, nos propusimos investigar, mediante un análisis *in silico*, el regulón de Crc en *A. vinelandii* para identificar posibles blancos en esta ruta de biosíntesis.

#### **6.4 Búsqueda *in silico* de los posibles blancos de Crc en *A. vinelandii***

La proteína Crc junto con la chaperona Hfq es capaz de reconocer en el mRNA de sus genes blanco motivos ricos en adeninas cerca del sitio de unión al ribosoma, impidiendo así su traducción. Tomando en cuenta este antecedente, se planteó identificar, en *A. vinelandii*, genes bajo el control del complejo Crc-Hfq a través de un análisis *in silico* mediante la búsqueda de estas regiones de reconocimiento. Como se mencionó en la sección de Introducción, *A. vinelandii* pertenece a la familia de las *Pseudomonadaceae*, por tanto, existe una muy estrecha relación con las distintas especies de *Pseudomonas*. Se ha reportado que el mecanismo de CCR, mediada por Crc-Hfq y que involucra al sistema de dos componentes CbrA/CbrB y los sRNAs CrcZ/Y, se encuentra conservada en ambas especies. Además, Quiroz-Rocha en el 2017, demostró que las proteínas Crc y Hfq de *P. putida* pueden reconocer al mRNA de *gluP* de *A. vinelandii* concluyendo que estas proteínas son funcionalmente intercambiables y que están altamente conservadas en estos organismos. Por tales motivos, se tomó como referencia el regulón de Crc reportado por Browne *et al.*, 2010. Estos autores analizaron diferentes genomas de *Pseudomonas* spp. e identificaron posibles blancos de regulación de Crc, obteniendo así un total de 421 candidatos, de los cuales, se reportó un core de 40 genes comunes para las especies analizadas.

Con la finalidad de generar una matriz de predicción y obtener una secuencia consenso de unión de Crc, se seleccionaron 17 genes del core reportado por Browne (mostrados en la Tabla 1) de las especies de *Pseudomonas*. Tomando en cuenta que Crc participa en la asimilación de distintas fuentes de carbono tanto para especies de *Pseudomonas* y *A. vinelandii*, se consideraron genes del metabolismo y transporte de carbohidratos, conservación y producción de energía, metabolismo de lípidos, degradación y transporte de xenobióticos, entre otros.

<b>Tabla 1. Genes utilizados para el análisis <i>in-silico</i></b>					
<b>Gen</b>	<b>Función</b>	<b>PA01</b>	<b>PA14</b>	<b>PF01</b>	<b>KT2440</b>
<b>Transporte y metabolismo de aminoácidos</b>					
-	Probable amino ácido permeasa	0789	54040	4561	1059
<i>gltI</i>	Probable componente de proteína de unión del transportador tipo ABC	1342	46910	4535	1071
<b>Transporte y metabolismo de carbohidratos</b>					
-	Probable componente de proteína de unión del transportador de azúcar tipo ABC	3190	22980	4370	1015
<i>lldP</i>	L-lactato permeasa	4770	63080	4735	4735
<b>Producción y conservación de energía</b>					
<i>pntB</i>	Piridina nucleótido transhidrogenasa, subunidad beta	0196	02470	0112	0155
<i>acsA</i>	Acetil-coenzima A sintetasa	0887	52800	4293	4487
-	Probable D-beta-hidroxi butirato permeasa	2004	NM	3078	3074
<i>phaC1</i>	Poli (ácido 3-hidroxi alcanoico) sintasa 1	5056	66820	0394	5003
<i>phaF</i>	Proteína de síntesis de poli-hidroxi alcanoato PhaF	5060	66875	NM	5007
<b>Metabolismo de lípidos</b>					
<i>estA</i>	Esterasa	5112	67510	NM	0418
<b>Metabolismo de poliamina</b>					
<i>aphA</i>	Acetilpoliamina aminohidrolasa	NM	NM	5631	NM
<b>Replicación, recombinación y reparación de DNA</b>					
<i>recA</i>	Proteína RecA	3617	17530	1175	1629
<b>Transporte y metabolismo de nucleótidos</b>					
-	Probable transportador	1519	44800	1711	4284
<b>Traducción</b>					
<i>rplR</i>	Proteína ribosomal 50S L18	4247	09010	5063	0470
<b>Función desconocida</b>					
-	Proteína hipotética	0754	54540	NM	1418
-	Probable transportador de la superfamilia facilitadora principal (MFS)	3709	16410	3359	0057
-	Probable componente de unión ATP del transportador ABC	4461	57930	0858	0953

Los números indican la identificación del *locus* (según Genbank) con el motivo rico en A en la región río arriba. NM indica que el *locus* ortólogo no presenta un motivo rico en A en la región río arriba. El nombre de los genes aún no identificados se denota con un guión medio.

En primera instancia se buscaron las secuencias de los genes de acuerdo al ID acorde a la notación de Genebank en la página [genome.jp/kegg/](http://genome.jp/kegg/). Una vez localizadas, y recordando que el complejo Crc-Hfq comúnmente se une a la región no traducida del mRNA blanco, se tomaron 50 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la traducción (ATG) obteniendo un total de 61, las cuales se agruparon y se procesaron en el portal [meme-suite.org/](http://meme-suite.org/) generando la matriz necesaria para la búsqueda en nuestro modelo.



Figura 24. Secuencia consenso de Crc en especies de *Pseudomonas* generada en el portal [meme-suite.org/](http://meme-suite.org/).

El resultado arrojado del análisis de predicción (Fig 24) nos muestra una secuencia de adeninas interrumpidas como ya se ha reportado previamente para *Pseudomonas*. En *A. vinelandii* también se ha reportado la presencia de esta secuencia en los blancos de regulación de Crc-Hfq, por ejemplo, en el transportador de la glucosa (GluP), en los pequeños RNAs CrcZ/Y y en el gen *eda-1* que codifica una enzima de la vía de asimilación de glucosa, la vía Entner-Doudoroff (Quiroz-Rocha *et al.*, 2017).

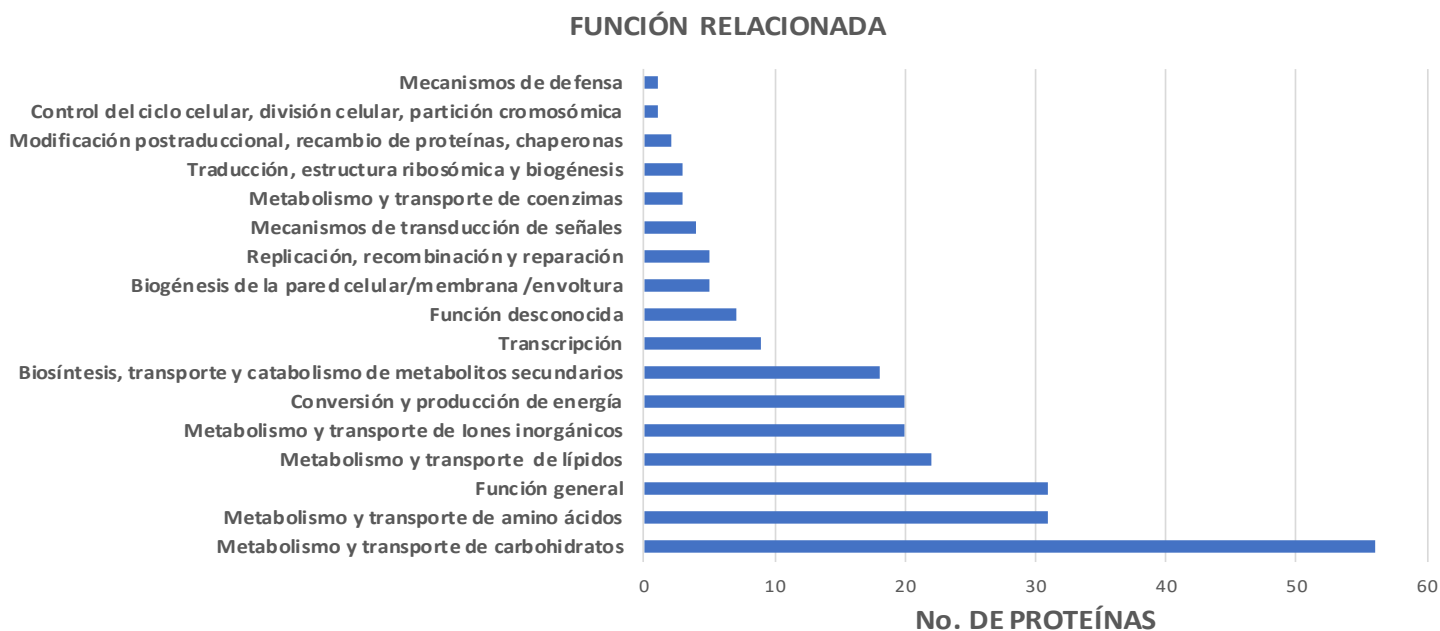
Una vez obtenida la matriz de predicción se realizó la búsqueda de los posibles blancos de regulación de Crc en nuestro modelo. Para ello se tomó el genoma reportado en la base de datos del portal NCBI con la notación *Azotobacter vinelandii* GCF 000021045.1 ASM2104v1 (se analizaron todos los marcos de lectura abiertos en la región -50 a +10 con respecto al ATG), posteriormente en la página <http://embnet.ccg.unam.mx/rsat/> bajo un criterio estadístico predeterminado, se realizó el procesamiento de los datos en donde se hizo la lectura de las regiones río arriba del ATG de todos los genes reportados en búsqueda de sitios ricos en adeninas, obteniendo así un total de 190 posibles blancos (Apéndice, Tabla 1).

Una vez obtenidos los posibles blancos de regulación de Crc para *A. vinelandii* se exploró si existen genes en común entre los reportados por Browne *et al.*, 2010, para las especies de *Pseudomonas* y los arrojados en nuestro análisis. Mediante un análisis de ortología entre los 400 genes reportados en el apartado suplementario de Browne *et al.* 2010 y el genoma de *A. vinelandii* DJ de obtuvieron un total de 12 genes que están presentes entre dichas especies (Tabla 2).

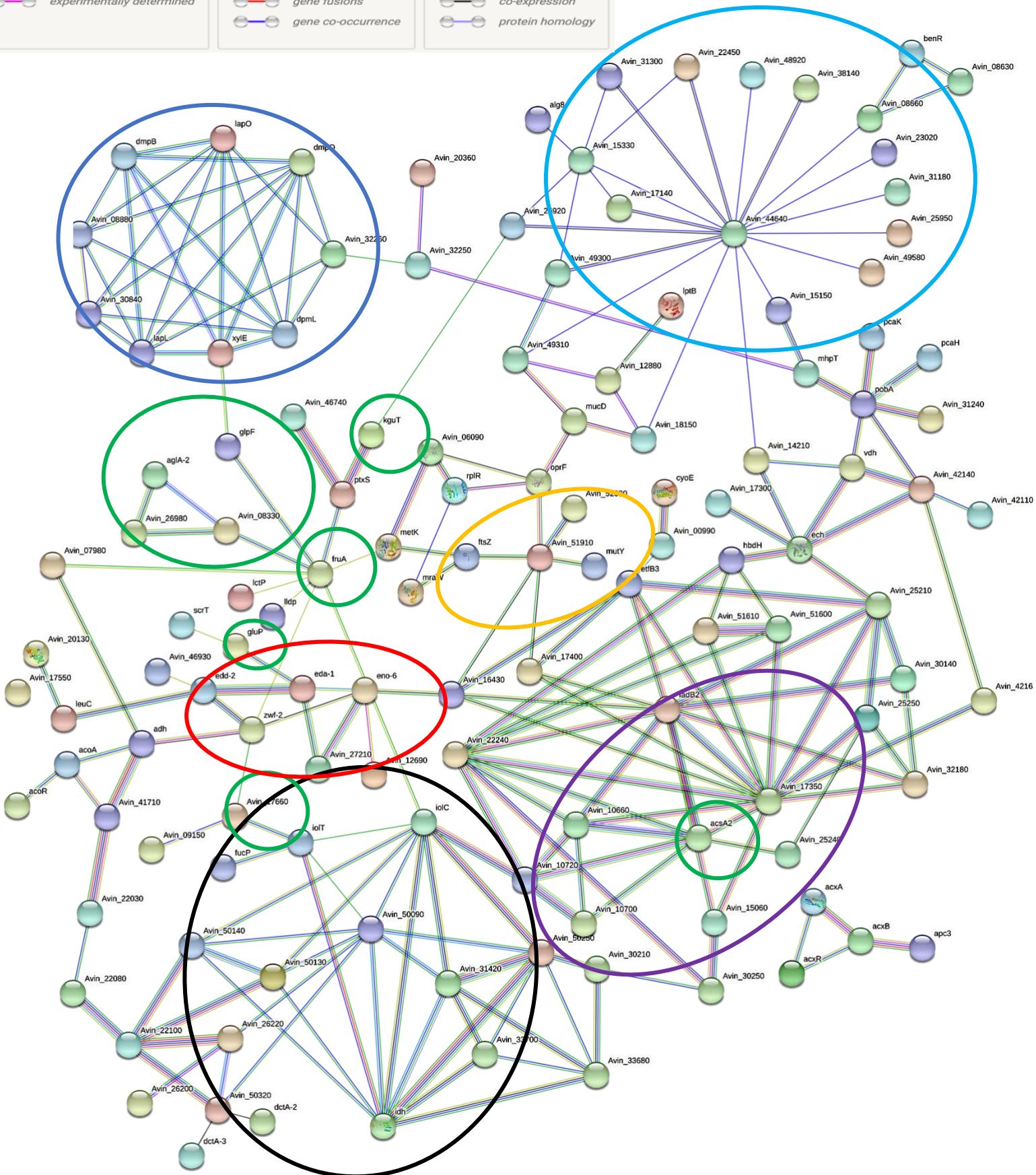
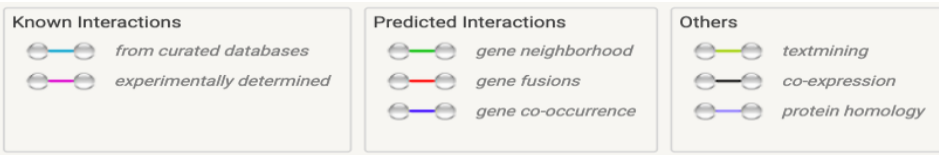
Tabla 2. Core de posibles blancos de regulación de Crc*								
<i>A. vinelandii</i>					<i>Pseudomonas</i>			
No	Proteína	Gen	ID Anterior	ID Actualizado	PAO1	PA14	Pf0-1	KT2440
1	Acetato CoA ligasa AcsA	<i>acsA2</i>	Avin_42750	AVIN_RS19645	4733	62630	4814	NM
2	Regulador transcripcional AcoR	<i>acoR</i>	Avin_41690	AVIN_RS19000	4147	10290	NM	NM
3	6-fosfogluconato deshidratasa	<i>edd-1</i>	Avin_15680	AVIN_RS07180	3194	22910	NM	NM
4	L-lactato permeasa	<i>lctP</i>	Avin_43070	AVIN_RS19730	4770	63080	0753	4735
5	Proteína de biosíntesis de alginato Alg8	<i>alg8</i>	Avin_10960	AVIN_RS04985	3541	18565	NM	NM
6	Enolasa	<i>eno-6</i>	Avin_38790	AVIN_RS17670	3635	17320	NM	NM
7	NAD(P) transhidrogenasa, subunidad beta	<i>pntB</i>	Avin_01840	AVIN_RS00905	0196	02470	0112	0155
8	Factor de elongación de la traducción Tu	<i>tuf</i>	Avin_06230	AVIN_RS02915	4277	08830	5081	0452
9	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	<i>zwf-2</i>	Avin_17630	AVIN_RS08090	3183	23070	4363	NM
10	Regulador transcripcional PtxS	<i>ptxS</i>	Avin_26870	AVIN_RS12295	2259	35370	2900	3380
11	Porina de la membrana externa bacteriana	<i>odpH</i>	Avin_15150	AVIN_RS06930	0755	54520	NM	NM
12	Proteína ribosomal 50S L18	<i>rplR</i>	Avin_06410	AVIN_RS03005	4247	09010	5063	0470

\*Blancos comunes de los posibles blancos de regulación de Crc entre *A. vinelandii* y diferentes especies de *Pseudomonas*. NM indica que el locus ortólogo no presenta un motivo rico en A en la región río arriba.

Con la finalidad de analizar los posibles blancos de Crc y su participación en la célula, se realizó la clasificación de acuerdo a su función. Los resultados se muestran en la Fig 25. Se destacan 56 proteínas involucradas en el metabolismo y transporte de carbohidratos, 31 relacionadas con el metabolismo y transporte de amino ácidos, 31 que solo están reportadas con funciones generales y no específicas (procesos celulares), 22 relacionadas en el metabolismo y transporte de lípidos, 20 involucradas en la producción y conversión de energía, 20 proteínas relacionadas en el metabolismo y transporte de iones inorgánicos, 18 que participan en la biosíntesis, transporte y catabolismo de metabolitos secundarios y 9 proteínas involucradas en el proceso de transcripción. De acuerdo a la clasificación, podemos observar que los resultados obtenidos son congruentes con lo reportado en la literatura para Crc, recordando que Crc participa en el proceso de represión catabólica regulando la asimilación de fuentes de carbonos secundarias y, como se mencionó en la sección de Introducción, los carbohidratos son una fuente de carbono secundaria, siendo preferidos los ácidos orgánicos, por tanto, en un medio con distintas fuentes de carbono es necesario regular la asimilación de las no preferidas para poder disponer de primera instancia las preferidas.



**Fig 25. Clasificación funcional del total de proteínas encontradas en el análisis *in silico*.** Clasificación de los posibles blancos de regulación de Crc en *A. vinelandii* basada en la ortología de sus dominios (Clusters of Orthologous Groups (COGs)).



**Fig 26. Red de Interacciones funcionales del regulón Crc-Hfq en *A. vinelandii*.** Se identifican los principales grupos de proteínas involucradas en el metabolismo central (círculo rojo), metabolismo y degradación de xenobióticos (círculo azul), catabolismo de aminoácidos (círculo 47  
naranja), degradación de ácidos grasos (círculo morado), transportadores (cyan).



Por otro lado, se analizó la posible interacción funcional entre las proteínas del regulón Crc mediante el programa STRING ([string-db.org](http://string-db.org)) para tener una idea más clara de las posibles funciones celulares bajo el control de este regulador. En la Fig 26 se muestra el resultado de interacción de las proteínas, así como los distintos grupos identificados. A continuación se describen en grandes rasgos los grupos de proteínas bajo el probable control de Crc:

*Proteínas de metabolismo central (círculo rojo).* Como era de esperarse, se identificó un grupo de genes cuyos productos participan en la vía Entner-Doudoroff y comprenden las proteínas Zwf (conversión de glucosa-6P a 6-fosfogluconato), Edd (convierte la 6-fosfogluconolactona a 2-ceto-3-desoxi-6-fosfogluconato, KDGP) y Eda (escinde a KDGP para la formación en piruvato y gliceraldehído 3-fosfato).

*Proteínas del metabolismo y degradación de xenobióticos (círculo azul).* Como el catecol 2,3 dioxigenasa (XylE), dioxigenasa de eliminación del anillo de extradiol (*dmpB*), la subunidad P1 y P4 del fenol hidroxilasa (*dpmL*, *dmpO* (respectivamente)), la subunidad gamma y beta del multicomponente fenol hidroxilasa (*lapO*, *lapL*, respectivamente), todos estos están involucrados en la degradación del cloro-ciclohexano, del clorobenceno, del benzoato, el xileno y del tolueno.

*Proteínas para el catabolismo de aminoácidos (círculo naranja).* Se identificaron proteínas involucradas en la degradación de la valina, leucina e isoleucina como la 3-hidroxi-isobutarato dehidrogenasa (Avin\_10700) y la metilmalonato-semialdehído deshidrogenasa (Avin\_10720), la primera utiliza al 3-hidroxi-isobutirato que mediante una reacción de óxido-reducción lo convierte en metilmalonado semialdehído y la segunda toma este compuesto como sustrato para convertirlo a propanoil-CoA que posteriormente es canalizado para la biosíntesis de macrólidos de 12, 14 y 16 miembros.

*Proteínas de la biosíntesis y degradación de ácidos grasos (círculo morado).* Se encontró la acil-CoA sintasa (Avin\_30140) (involucrada en la síntesis y degradación de ácidos grasos de cadena larga canalizando). También se identificó a la 3-hidroxiacil-CoA dehidrogenasa (Avin\_17350) que participa en la degradación de los ácidos grasos canalizando los precursores 3-hidroxi-(hexa, tetra, do)-

decanoil-CoA, 3-hidroxi-(decanoil, octanoil, hexanoil y butanoil)-CoA a sus respectivos productos 3-oxo-(hexa, tetra, do)-decanoil-CoA, 3-oxo(decanoil, octanoil, hexanoil)-CoA siendo el acetoacetyl-CoA el producto final de la biodegradación, el cual, es convertido a acetyl-CoA y canalizado al ciclo de Krebs.

*Transporte a través de membrana externa (círculo azul claro).* Como porinas de la familia OprD (Avin\_22450) que, en *Pseudomonas aeruginosa*, son específicas para el transporte de amino ácidos básicos (Tamber *et al.*, 2006) y transportadores del tipo ABC encargados del transporte de fosfolípidos (Avin\_12880) (Malinverni *et al.*, 2009).

*Proteínas para el metabolismo de inositol fosfato, así como en la biosíntesis de estreptomycin (círculo negro).* La myo-inositol 2-dehidrogenasa (idh) canaliza la conversión reversible del myo-inositol a scyllo-Inosose y posteriormente la 2-ceto-myoinositol isomerasa toma al scyllo-inosose como sustrato para convertirlo en 1-Keto-D-chiro-inositol en ambos procesos en los que se le ha visto involucrada y por último la inososa dehidrogenasa toma también al scyllo-inosose como sustrato generando así al 3D-3,5/4-trihidroxiciclohexano-1,2-dione, el cual, siguiendo un serie de reacciones llega hasta la conversión de Acetyl-CoA y gliceraldehido-3P, siendo canalizados hacia el ciclo de Krebs y la glucólisis, respectivamente. También se encuentra a la proteína de unión al sustrato del sistema de transporte de inositol (Avin\_50130) que es parte del transportador tipo ABC del inositol.

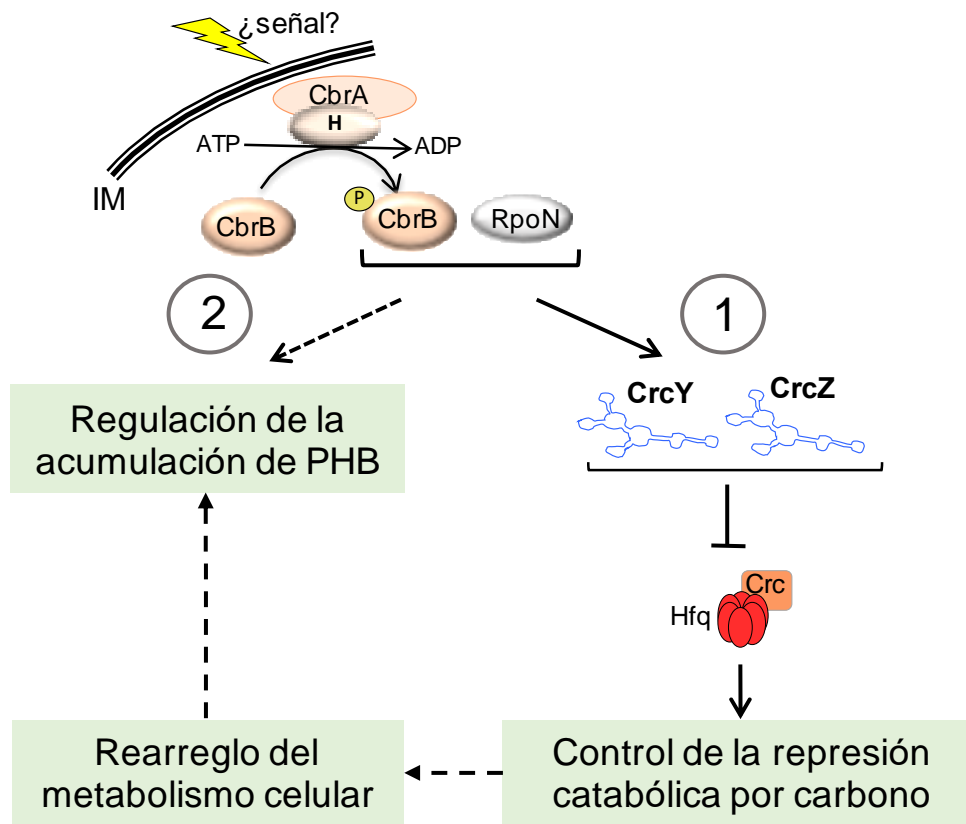
*Transportadores (círculo verde).* Se encuentran genes involucrados en la asimilación y/o metabolismo de fuentes de carbono, como *gluP* (Avin\_04150) que codifica para el transportador de glucosa GluP, *glpF* (Avin\_45700) que codifica para una proteína facilitadora de la asimilación del glicerol GlpF, *fruA* (Avin\_12210) que transcribe al componente IIBC del sistema de fructosa fosfotransferasa, la enzima glucoamilasa (Avin\_26980) que canaliza la conversión de almidón y dextina a D-glucosa, el gen *kguT* (Avin\_26900) que codifica para el transportador del 2-cetogluconato. Además, se encontró a la acetyl CoA-sintasa (Avin\_42750) que participa los procesos de glucólisis/gluconeogénesis, el metabolismo del glioxilato y dicarboxilato y metabolismo del piruvato en donde lleva a cabo la conversión del

acetato a acetil-CoA mediante una reacción de ligación. Teniendo la formación del acetil adenilato como un intermediario para el último proceso mencionado.

*Respuesta a estrés (círculo amarillo).* Se encuentran genes involucrados en la respuesta a estrés debido al cambio en las condiciones ambientales, entre los cuales está la proteína “stringent starvation protein A” (SspA, por sus siglas en inglés) (Avin\_13090) que, en *E. coli*, fue identificada como una proteína asociada a la RNA-polimerasa y su expresión es inducida por una condición limitante de nutrientes (Fulin *et al.*, 2020). También se encuentra el regulador de respuesta PhoB (Avin\_48520) involucrado en la respuesta por limitación de fosfato, siendo PhoR la histidina quinasa que transfiere su fosfato a PhoB (el regulador de respuesta) permitiendo así la asimilación de este en condiciones adversas.

En conjunto, la búsqueda de posibles blancos alternativos del complejo Crc-Hfq no arrojó algún gen relacionado con el metabolismo del PHB. Este hecho sugiere que el complejo Crc-Hfq no es el intermediario en la vía de regulación positiva del PHB por el Sistema de dos componentes CbrA/CbrB (Fig 27). Sin embargo, no podemos descartar que el rearrreglo en el metabolismo central que ejerce Crc-Hfq afecte la acumulación de precursores de PHB. En un estudio recientes se demostró que Crc/Hfq regula el flujo metabólico en *P. aeruginosa* (Corona *et al.*, 2018). Los resultados mostraron que 244 de los 2101 genes analizados son posibles blancos de regulación post-transcripcional de Crc. Dentro de los posibles blancos de regulación de Crc se encuentran la Glk, las enzimas involucradas en la vía ED ( Zwf, Pgl, Edd y Eda), de igual manera la gliceraldehído 3-P-deshidrogenasa (GapA), parte de la vía EMP, la fumarasa (presente en el ciclo TCA) y componentes del complejo piruvato deshidrogenasa (AceE) que cataliza la conversión de piruvato a acetil-CoA, las cuales aparentemente, presentan una regulación negativa por Crc/Hfq (Corona *et al.*, 2018). En conclusión, este estudio muestra que las proteínas Crc/Hfq poseen un marcado efecto en el metabolismo central lo que le permite jerarquizar la asimilación de las fuentes de carbono.

En especies de *Pseudomonas*, el Sistema CbrA/CbrB, además de regular la actividad del complejo Crc-Hfq, regula otros procesos celulares. En *P. putida*, por ejemplo, el regulador de respuesta CbrB reconoce y activa la transcripción de al menos 61 genes involucrados en el transporte, metabolismo central, traducción, así como genes con función desconocida (Barroso *et al.*, 2018). Sería interesante establecer el regulón CbrA/CbrB en *A. vinelandii* para tratar de definir el mecanismo por el cual regula el PHB. Sin embargo, con este sistema también es posible que ejerza un efecto pleiotrópico en la célula afectando el metabolismo central y reorganizando los flujos de carbono, favoreciendo la acumulación de PHB (Fig 27).



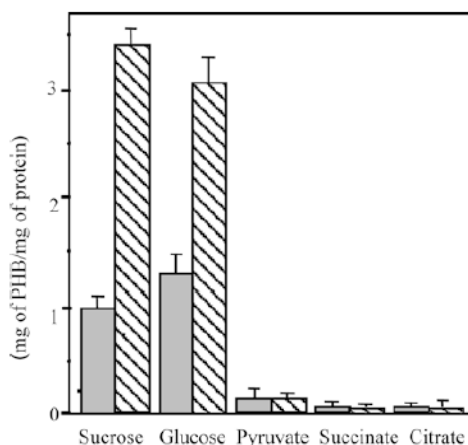
**Figura 27. Modelo de regulación del PHB por el sistema CbrA/B.** CbrA fosforila al regulador de respuesta CbrB que junto con el factor transcripcional RpoN activa la transcripción de los sARN's CrcZ y CrcY para el control de la actividad del complejo represor Hfq-Crc y la represión catabólica por carbono. Nuestros resultados sugieren que 1: Hfq-Crc regulan de manera indirecta la acumulación de PHB, probablemente derivado de la re-organización del metabolismo durante el control de la represión catabólica. Sin embargo, no podemos descartar que 2: CbrB active la expresión de otros genes que afecten de manera positiva la acumulación de PHB. La línea punteada denota una regulación que no ha sido comprobada experimentalmente.

## 7.- COMENTARIOS FINALES

La represión catabólica es un mecanismo de respuesta natural presente en la mayoría de las bacterias ante los cambios del medio ambiente. Este proceso permite regular coordinadamente la asimilación de distintas fuentes de carbono, dependiendo de la preferencia por las mismas. Aproximadamente entre el 5-10% de los genes presentes en las bacterias están sujetos a CCR (Görke *et al.*, 2008). *A. vinelandii* presenta un mecanismo de represión catabólica mediada por el complejo represor Crc-Hfq, que regula la asimilación de distintas fuentes de carbono. La jerarquía en la asimilación de fuentes de carbono de esta bacteria es distinta al modelo de *E. coli* debido a las diferencias en su hábitat. Especies de la familia *Pseudomonadaceae* se pueden encontrar en el suelo o asociadas a la rizosfera, en donde la disponibilidad de fuentes de carbono como carbohidratos es muy limitada. Por tal razón, asimila de primera instancia los ácidos orgánicos y para que esto sea posible, ejerce una represión sobre las fuentes de carbono secundarias. Quiróz-Rocha *et al.*, 2017-a, demostró que el transportador de la glucosa en *A. vinelandii* GluP, está sujeto a represión catabólica por el complejo Crc-Hfq, inhibiendo su traducción en presencia de acetato, una fuente de carbono preferida. Estos resultados han dejado claro que la presencia de acetato en el medio es una condición de alta represión catabólica, la cual, se libera cuando el acetato ha sido consumido.

Dado que en ausencia del sistema de regulación de la represión catabólica en *A. vinelandii* (CbrA/CbrB) los niveles de PHB se abatían casi por completo, indicando con ello que se tiene una condición de alta represión catabólica, decidimos mimetizar esta condición a través de la sobre-expresión de la proteína Crc. Los niveles detectados de PHB en la cepa con la sobre-expresión de Crc en *trans* (Fig. 17 B), no fueron las esperadas, dado que se acumuló la misma cantidad de PHB a lo largo de la cinética descartando con ello la participación de Crc tanto en la producción de PHB como en la traducción del correspondiente operón biosintético (Fig. 19 B). Este resultado sugiere que Crc no reconoce al mRNA de *phbB*.

En relación a las cuantificaciones de PHB en medio sólido para las cepas con la sobre-expresión en *trans* y *cis* de Crc (Fig. 19 y 20) se observó un aumento considerable en la producción de PHB en ambos casos. Estos resultados fueron contrarios a lo esperado. Aún desconocemos la razón de estas diferencias asociadas al tipo de medio. En un reporte anterior en Segura *et al.*, 2004 caracterizaron la subunidad A de la piruvato carboxilasa (PYC), codificada por el gen *pycA*. La PYC es la enzima encargada de la conversión de piruvato a oxaloacetato mediante una reacción de carboxilación dependiente de ATP. En este trabajo, se observa que cuando la mutante *pycA* se crece en un medio rico adicionado de sacarosa o glucosa como fuente de carbono, existe un incremento en la producción de PHB con respecto a la cepa silvestre, sólo en medio sólido, pero no en medio líquido. Así mismo, se observó que esta cepa fue incapaz de crecer en medio mínimo en presencia de sacarosa o glucosa, pero sí en succinato o citrato. Estos resultados revelaron que en medio sólido la actividad de la enzima PYC es la única vía anaplerótica que suministra oxaloacetato al TCA. Al no estar presente este compuesto no es posible llevar a cabo la formación de citrato a partir de su condensación con el acetyl-CoA, incrementando su concentración y entonces su canalización hacia la síntesis de PHB (Segura *et al.*, 2004) (Fig. 28).



**Fig 28.** Cuantificación de PHB en la cepa WT (gris) y mutante *pycA* (franjas) crecidas en medio sólido. Las cepas fueron cultivadas en medio rico PY adicionado con distintas fuentes de carbono. D. Segura y G. Espín 2004.

Debido a lo anterior, es posible que la sobre-expresión de Crc provoque en medio sólido el mismo efecto que la ausencia de la PYC, disminuyendo el TCA y favoreciendo la acumulación de PHB. Sin embargo, en el análisis *in silico* del regulón Crc no se identificó a PycA como posible blanco de Crc-Hfq, por lo que esta es una propuesta que debe probarse experimentalmente.

Con respecto al análisis *in silico*, se obtuvieron más de 100 blancos posibles de reconocimiento de Crc. Entre los cuales se encuentran genes relacionados con el metabolismo y transporte de carbohidratos (una fuente de carbono secundaria), así como, de aminoácidos, lípidos y metabolitos secundarios. Estos resultados estarían confirmando que Crc en *A. vinelandii* juega un papel importante en la regulación metabólica. Dentro de los genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos se encuentran los genes de la vía ED (*zwf*, *edd* y *eda*), la cual se encarga de la asimilación de la glucosa. El producto final de esta vía es el piruvato y gliceraldehído 3-fosfato. El piruvato es canalizado hacia el TCA para la formación del citrato por medio de la reacción con el oxaloacetato y gliceraldehído 3-fosfato, derivado de un par de reacciones más y el cual es también canalizado hacia el TCA. También, se encontraron enzimas que participan en la degradación de ácidos grasos, como la 3-hidroxiacil-CoA dehidrogenasa cuyo producto final es el acetoacetyl-CoA, el cual, pudiera ser un precursor para la síntesis de PHB. Colectivamente, estos resultados revelan que el complejo Crc-Hfq junto con el sistema CbrA/CbrB pueden ejercer un efecto pleiotrópico en el metabolismo celular y causar una reorganización de sus flujos de carbono, lo que probablemente afecte la acumulación de PHB. Alternativamente, es posible que el sistema de dos componentes CbrA/B en *A. vinelandii* regule la acumulación de PHB de una manera independiente al complejo Crc-Hfq.

El regulador de respuesta CbrB es un regulador transcripcional de la familia NtrC, la cual activa promotores tipo  $\sigma^{54}$ . En el 2018, Barroso y colaboradores, determinaron de manera *in vivo*, mediante ensayos de Chip-seq, genes directamente bajo el control de CbrB en *P. putida* reportando que, además de activar la transcripción de los sRNAs CrcZ y CrcY, promueve la transcripción de al menos 59 genes. El 20% de estos están involucrados en funciones regulatorias, como el gen que codifica el propio factor  $\sigma^{54}$  necesario para la asimilación de nitrógeno. Otro 20% son porinas o transportadores, como OprD (relacionadas con la asimilación de nutrientes en especies de *Pseudomonas*) (Tamber *et al.* 2006) y transportadores de la familia NCS1 (relacionados con el transporte de iones/cationes). Un 16% son

enzimas metabólicas, como la glicógeno sintasa (*glgA*) (implicada en el metabolismo del almidón y la sacarosa) o la GDP manosa 6-dehidrogenasa (*algD*) para la síntesis de alginato. Un 5% son genes con actividades relacionadas con la traducción de proteínas, como el alanil tRNA ligasa (*alaS*) (relacionada con la biosíntesis de aminoacil-tRNA). Un 1% que corresponde al gen *flgB* (relacionado con el ensamblaje flagelar) y el 38% restante, están descritos con función desconocida. Dada la presencia de genes reguladores (al menos 12) bajo el control de CbrB, se sugiere que el sistema CbrA/B ejerce un control más amplio en el metabolismo celular. Este estudio también reveló que CbrB reconoce 2 o 3 secuencias no palindrómicas (F1, TGTTAC y R1, GTAACA) espaciadas entre 12-16 nucleótidos. Sin embargo, debido a la variabilidad de estas secuencias de DNA, no fue posible determinar una secuencia consenso para el reconocimiento de CbrB.

Tomando en cuenta los criterios necesarios del mecanismo de activación por CbrB en *P. putida* y considerando que estos criterios están conservados en *A. vinelandii*, (Quiroz-Rocha *et al.*, 2017), tratamos de identificar genes bajo el control de CbrB en esta bacteria. Para tal fin, recurrimos a la predicción de promotores  $\sigma^{54}$  en *A. vinelandii* realizada en el laboratorio del Dr. Enrique Merino del IBt, UNAM (Maricela Carrera, datos no publicados). Este análisis arrojó un total de 20 genes, la mayoría relacionados con la asimilación de nitrógeno; también se encontraron genes involucrados en la homeostasis, en la generación de poder reductor, transportadores de membrana, entre otros (Apéndice, Tabla 2). De los genes obtenidos, se analizaron sus regiones reguladoras en busca de sitios probables de unión de CbrB (sitios F1 y R1) pero no fue posible localizar blancos potenciales del regulador de respuesta CbrB, debido a la falta de un consenso de sus sitios de reconocimiento. Esto sugiere que la participación del sistema CbrA/CbrB sobre la producción del PHB es indirecto. Es posible proponer su participación en la reorganización del metabolismo central a través de la regulación de los flujos de carbono.



## 8.- CONCLUSIONES

1. El efecto de la sobre-expresión de la proteína Crc sobre la acumulación de PHB fue distinto en medio líquido y sólido. Sólo en medio sólido se observó un efecto de mayor acumulación en la cepa Crc+.
2. No se detectó un efecto directo de Crc sobre la traducción del mRNA de *phbB* que pudiera explicar la falta de PHB en ausencia del sistema de dos componentes CbrA/B.
3. Se estableció, mediante un análisis *in silico*, el regulón de Crc confirmando su probable función en varios procesos celulares como metabolismo y transporte de carbohidratos, catabolismo de xenobióticos, etc.
4. En el análisis *in silico*, no se identificaron genes del metabolismo de PHB directamente bajo el control del complejo Crc-Hfq.
5. Los resultados de este trabajo en conjunto, indican fuertemente que el complejo Crc-Hfq no regula directamente la producción de PHB. Es posible que el efecto del sistema CbrA/CbrB sobre el alginato derive de la re-organización del metabolismo central durante el control de la represión catabólica por carbono.

## 8.- PERSPECTIVAS

- 1.- Establecer, mediante RNAseq, el regulón de CbrA/B en *A. vinelandii*.
- 2.- Identificar los posibles blancos de regulación que estén implicados en la biosíntesis y/o degradación de PHB.
- 3.- Establecer el mecanismo molecular por el cual el sistema CbrA/B ejerce un efecto positivo sobre la acumulación de PHB.

## 9.- REFERENCIA

1. Anantharaman V, Koonin EV, Aravind L (2001). Regulatory potential, phyletic distribution and evolution of ancient, intracellular small-molecule-binding domains. *Journal of Molecular Biology*. 2001;307:1271–1292.
2. Anderson AJ, Dawes EA (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*. 54: 450-472.
3. Aravind L, Ponting CP (1997). The GAF domain: an evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends in Biochemical Sciences*. 1997;22:458–459.
4. Bandyra KJ, Sinha D, Syrjanen J, Luisi BF, De Lay NR RNA. (2016). The ribonuclease polynucleotide phosphorylase can interact with small regulatory RNAs in both protective and degradative modes. *RNA* 22(3):360-372.
5. Barrios Rafael Victor Vicente (2019). Efecto de los distintos grados de represión catabólica por carbono sobre la producción de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de licenciatura. UAEM.
6. Barroso R, García-Mauriño SM, Tomás-Gallardo L, Andújar E, Pérez-Alegre M, Santero E, *et al.*, (2018) The CbrB Regulon: Promoter dissection reveals novel insights into the CbrA/B expression network in *Pseudomonas putida*. *PLoS ONE* 13(12): e0209191.
7. Bedoya-Pérez, L. P., Muriel-Millán, L. F., Moreno, S., Quiroz-Rocha, E., Rivera-Gómez, N., and Espín, G. (2018). The pyrophosphohydrolase RppH is involved in the control of RsmA/CsrA expression in *Azotobacter vinelandii* and *Escherichia coli*. *Microbiological Research*. 214, 91–100.
8. Cameron TA, De Lay NR *J Bacteriol.* (2016). The phosphorolytic exoribonucleases polynucleotide phosphorylase and RNase PH stabilize sRNAs and facilitate regulation of their mRNA targets. *Journal of Bacteriology*. 198:3309-3317.
9. Castañeda, M., Guzmán, J., Moreno, S., and Espín, G. (2000). The GacS sensor kinase regulates alginate and poly-beta-hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 182: 2624-2628.
10. Collier, D. N., Hager, P. W., and Pihbs, P. V. (1996). Catabolite repression control in the *Pseudomonads*. *Research in Microbiology*, 147(6-7), 551–561.
11. Conway, T. (1992). The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS Microbiological Reviews*. 103: 1-27.
12. Corona Fernando, Reales-Calderón Jose Antonio, Gil2 Concha and Martínez José Luis. (2018). The development of a new parameter for tracking posttranscriptional regulation allows the detailed map of the *Pseudomonas aeruginosa* Crc regulon. *Scientific Reports*. 8:16793.
13. Chen GQ. (2009). A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews*. Aug;38(8):2434-46.
14. De Eugenio, L.I., Galán, B., Escapa, I.F., Maestro, B., Sanz, J.M., García, J.L., and Prieto, M.A. (2010) The PhaD regulator controls the simultaneous expression of the PHA genes involved in polyhydroxyalkanoate metabolism and turnover in *Pseudomonas putida* KT2442. *Environmental Microbiology*. 12: 1591–1603.

15. del Castillo Teresa, Ramos Juan L., Rodríguez-Herva José J., Fuhrer Tobias, Sauer Uwe, and Duque Estrella. (2007). Convergent peripheral pathways catalyze initial glucose catabolism in *Pseudomonas putida*: genomic and flux analysis. *Journal of Bacteriology*. 189(14);5142–5152.
16. Deutscher J, Francke C and Postma PW (2006) How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 70(4); 939-1031.
17. D. Segura . G. Espín (2004). Inactivation of *pycA*, encoding pyruvate carboxylase activity, increases poly- $\beta$ -hydroxybutyrate accumulation in *Azotobacter vinelandii* on solid medium. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology* 65: 414–418.
18. Escolar L, Perez-Martin J, De Lorenzo V (1999) Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *Journal of Bacteriology*. 181(20): 6223–6229
19. Galindo, E., Peña, C., Núñez, C., Segura, D., and Espín, G. (2007). Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and poly-hydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories*, 6: 7.
20. García, A., Segura, D., Espín, G., Galindo, E., Castillo, T., and Peña, C. (2014). High production of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) by an *Azotobacter vinelandii* mutant altered in PHB regulation using a fed-batch fermentation process. *Biochemical Engineering Journal*. 82, 117–123.
21. García, A., Pérez, D., Castro, M., Urtuvia, V., Castillo, T., Díaz-Barrera, A., *et al.*, (2019). Production and recovery of poly-3-hydroxybutyrate [P(3HB)] of ultrahigh molecular weight using fed-batch cultures of *Azotobacter vinelandii* OPNA strain. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 94, 1853–1860.
22. Ghisla Sandro and Thorpe Colin. (2004). Acyl-CoA dehydrogenases a mechanistic overview. *European Journal of Biochemistry*. 271, 494–508.
23. Görke, B. and Stülke, J. (2008). Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nature Reviews Microbiology*. 6, 613-624.
24. Gonzaga Pérez Miriam Citlalli (2019). Efecto del Sistema CbrA/CbrB sobre la expresión del operón biosintético de Poly- $\beta$ -hidroxibutirato, *phbBAC*, en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de licenciatura. UAEM.
25. Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*. 166:557–580.
26. Hernández-Eligio, A., Moreno, S., Castellanos, M., Castañeda, M., Nuñez, C., Muriel-Millan, L., and Espín, G. (2012). RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology* 158: 1953–1963.
27. Jesse D. Noar and Jose M. Bruno-B\_arcena (2018). *Azotobacter vinelandii*: the source of 100 years of discoveries and many more to come. *Microbiology Society*. 164(4).
28. Juliana C. Malinverni and Thomas J. Silhavy. (2009). An ABC transport system that maintains lipid asymmetry in the Gram-negative outer membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(19), 8009–8014.
29. Jung, Y. S., and Kwon, Y. M. (2008). Small RNA ArrF regulates the expression of *sodB* and *feSII* genes in *Azotobacter vinelandii*. *Current Microbiology*. 57, 593–597.

30. Kennedy, C., P. Rudnick, T. MacDonald, and T. Melton. (2005). Genus *Azotobacter*. In G. M. Garrity (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2; 384–401, part B. Springer-Verlag, New York, NY.
31. Khan, S. R., Gaines, J., Roop, R. M. 2nd and Farrand, S. K. (2008). Broad-host-range expression vectors with tightly regulated promoters and their use to examine the influence of TraR and TraM expression on Ti plasmid quorum sensing. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(16), 5053–5062.
32. La Rosa Ruggero, de la Peña Fernando, Axiliadora Prieto María and Rojo Fernando. (2014). The Crc protein inhibits the production of polyhydroxyalkanoates in *Pseudomonas putida* under balanced carbon/nitrogen growth conditions. *Environmental Microbiology* 16(1), 278–290.
33. Lee, C.-R., Park, Y.-H., Kim, M., Kim, Y.-R., Park, S., Peterkofsky, A., & Seok, Y.-J. (2013). Reciprocal regulation of the autophosphorylation of enzyme INtr by glutamine and  $\alpha$ -ketoglutarate in *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 88(3), 473–485.
34. Manchak, J., and Page, W. J. (1994). Control of poly-hydroxyalkanoate synthesis in *Azotobacter vinelandii* strain UWD. *Microbiology* 140, 953–963.
35. Martínez-Valenzuela, M. Guzmán, J Moreno, S Ahumada-Manuel, C. Espín, G Núñez, C. (2018). Expression of the sRNAs CrcZ and CrcY modulate the strength of carbon catabolite repression under diazotrophic or non-diazotrophic growing conditions in *Azotobacter vinelandii*. *PLoS ONE* 13: e0208975.
36. Moreno, R., Hernández-Arranz, S., La Rosa, R., Yuste, L., Madhushani, A., Shingler, V. (2015). The Crc and Hfq proteins of *Pseudomonas putida* cooperate in catabolite repression and formation of ribonucleic acid complexes with specific target motifs. *Environmental Microbiology*. 17, 105-118.
37. Moreno R, Marzi S, Romby P, Rojo F. (2009). The Crc global regulator binds to an unpaired A-rich motif at the *Pseudomonas putida alkS* mRNA coding sequence and inhibits translation initiation. *Nucleic Acids Research*. 37:7678-7690.
38. Muriel-Millán, L. F., Castellanos, M., Hernandez-Eligio, J. A., Moreno, S., and Espín, G. (2014). Posttranscriptional regulation of PhbR, the transcriptional activator of polyhydroxybutyrate synthesis, by iron and the sRNA ArrF in *Azotobacter vinelandii*. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology*. 98, 2173–2182.
39. Muriel-Millán, L. F., Moreno, S., Gallegos-Monterrosa, R., and Espín, G. (2017). Unphosphorylated EIIANtr induces ClpAP-mediated degradation of RpoS in *Azotobacter vinelandii*. *Molecular Microbiology*. 104, 197–211.
40. Nikel P.I., Martínez-García E. y de Lorenzo V. (2014). Biotechnological domestication of pseudomonads using synthetic biology, *Nature Reviews Microbiology*. 12, 368–379.
41. Noguez, R., Segura, D., Moreno, S., Hernández, A., Juárez, K., and Espín, G. (2008). Enzyme Intr, NPr and IANtr are involved in regulation of the poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 15(4): 244–254.
42. Ojumu, T.V.1\*, Yu, J.2 and Solomon, B.O. (2004). Production of polyhydroxyalkanoates, a bacterial biodegradable polymer. *African Journal of Biotechnology*. 3(1), 18-24.

43. Peña, C., Castillo, T., García, A., Millán, M., and Segura, D. (2014). Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work. *Microbial Biotechnology*. 7, 278-293.
44. Peralta-Gil M, Segura D, Guzmán J, Servin-Gonzalez L, Espin G (2002). Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *Journal Bacteriology*. 184: 5672-5677.
45. Prieto, M. A., Eugenio, L. I. de, Galán, B., Luengo, J. M., & Witholt, B. (2007). Synthesis and Degradation of Polyhydroxyalkanoates. *Pseudomonas*, 397–428.
46. Quiroz-Rocha, E. Moreno, R. Hernández-Ortíz, A. Fragoso-Jiménez, J. Muriel-Millán, L. Guzmán, J. Espín, G. Rojo, R. Núñez, C. (2017-a). Glucose uptake in *Azotobacter vinelandii* occurs through a GluP transporter that is under the control of the CbrA/CbrB and Hfq-Crc systems. *Scientific Reports*. 7, 858.
47. Quiroz-Rocha, E. (2017-b). Estudio de la función del sistema de dos componentes CbrA/CbrB en la síntesis de alginato y represión catabólica por carbono en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de doctorado. UNAM.
48. Quiroz-Rocha E. , Fernando Bonilla-Badía, Valentina García-Aguilar, Liliana López-Pliego, Jade Serrano-Román, Miguel Cocotl-Yañez, Josefina Guzmán, Carlos L. Ahumada-Manuel, Luis Felipe Muriel-Millán, Miguel Castañeda, Guadalupe Espín and Cinthia Nuñez. (2017-c). Two-component system CbrA/CbrB controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*. 163:1105–1115.
49. Rai, R., Keshavarz, T., Roether, J. A., Boccaccini, A. R., and Roy, I. (2011). Medium chain length polyhydroxyalkanoates, promising new biomedical materials for the future. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 72(3), 29–47.
50. Rojo, F. (2010). Carbon catabolite repression in *Pseudomonas*: optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiological Reviews*. 34; 1–27.
51. Romero Y, Moreno S, Guzmán J, Espín G, Segura D (2013). Sigma factor RpoS controls alkylresorcinol synthesis through ArpR, a LysR-type regulatory protein, during encystment of *Azotobacter vinelandii*. *Journal Bacteriology*. 195: 1834–1844.
52. Scales, B. S., Dickson, R. P., LiPuma, J. J., and Huffnagle, G. B. (2014). Microbiology, genomics, and clinical significance of the *Pseudomonas fluorescens* species complex, an unappreciated colonizer of humans. *Clinical Microbiology Reviews*. 27(4); 927–948.
53. Segura D., Núñez C. and Espín G. (2020). *Azotobacter* Cysts, p. a0000295.pub2. *In*: John Wiley and Sons Ltd, eLS. John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK.
54. Senior, P. J., Beech, G. A., Ritchie, G. A., and Dawes, E. A. (1972). The role of oxygen limitation in the formation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. *Biochemical Journal*. 128(5); 1193-1201.
55. Senior, P. J., and Dawes, E. A. (1973). The regulation of poly  $\beta$  hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochemical. Journal*. 134; 225–238.
56. Sharma Parveen K., Riffat I. Munir, Warren Blunt, Chris Dartiailh, Juijun Cheng, Trevor C. Charles and David B. Levin. (2017). Synthesis and physical properties of polyhydroxyalkanoate polymers with different monomer compositions by recombinant

*Pseudomonas putida* LS46 expressing a novel PHA synthase (PhaC116) enzyme. Applied Sciences. 7(3); 242.

57. Simon R (1984). High frequency mobilization of Gram-negative bacterial replicons by the *in vitro* constructed Tn5-Mob transposon. Molecular and General Genetics MGG volume. 196:413–420
58. Tamber Sandeep, Martina M. Ochs, and Robert E. W. Hancock. (2006). Role of the novel OprD family of porins in nutrient uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Bacteriology. 188(1); 45–54.
59. Tauchert, K., Jahn, A., and Oelze, J. (1990). Control of diauxic growth of *Azotobacter vinelandii* on acetate and glucose. Journal Bacteriology. 172(11); 6447-6451.
60. Trejo, A., Moreno, S., Cocotl-Yañez, M., and Espín, G. (2017). GacA regulates the PTSNtr-dependent control of cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. FEMS Microbiology Letters. 364(2); fnw278.
61. Velázquez-Sánchez C. (2010). Caracterización del gen *hexR1* como posible regulador de la vía Entner-Doudorof y su papel en la síntesis de alginato en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de maestría UNAM.
62. Velázquez-Sánchez Claudia, Espín Guadalupe, Peña Carlos and Segura Daniel. (2020). The modification of regulatory circuits involved in the control of Polyhydroxyalkanoates metabolism to improve their production. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology. 8:386.
63. Wu G, Moir AJ, Sawers G, Hill S, Poole RK. (2001). Biosynthesis of polybeta-hydroxybutyrate (PHB) is controlled by CydR (Fnr) in the obligate aerobe *Azotobacter vinelandii*. FEMS Microbiology Letters. 194: 215-220.

## 10.- APÉNDICE

Tabla 1. Lista de Genes blanco de Crc-Hfq en *A. vinelandii*

ID ANTERIOR	ID ACTUAL	GEN	start	end	Secuencia	weight	Pval	Función
Avin_00940	AVIN_RS00495		42	56	GACAAGAACGACGAC	7	9.40E-05	proteína protoheme IX farnesiltransferasa
Avin_00990	AVIN_RS00520		55	69	AAGGAGAAGAACGAT	7.6	6.30E-05	citocromo C oxidasa, subunidad III
Avin_01750	AVIN_RS00860		57	71	AACAACAACAAATCA	8.8	2.60E-05	proteína hipotética conservada
Avin_01840	AVIN_RS00905		36	50	AAGAAGAAAACGGCG	9.8	1.10E-05	NAD(P) transhidrogenasa, subunidad beta
Avin_02470	AVIN_RS01220	<i>aglA-2</i>	54	68	AAGAACAGGAAGCCC	7.2	8.20E-05	Alfa-glucosidasa
Avin_02690	AVIN_RS01305	<i>pcaK</i>	47	61	GACAACAACGACAAG	8.4	3.50E-05	Transportador de 4-hidroxibenzoato PcaK
Avin_03250	AVIN_RS01575		58	72	AAGGAGAAAAACCAT	7.1	8.70E-05	Proteína similar a la Ycel
Avin_03600	AVIN_RS01735	<i>fucP</i>	31	45	AAAAATAATTCACAA	7.6	6.30E-05	L-fucosa: permeasa
Avin_03650	AVIN_RS01760	<i>dctP</i>	52	66	AACAAGAAAGGTAAC	9.2	1.90E-05	TRAP subunidad del transportador de dicarboxilato-receptor de solutos periplásmico; DctP
Avin_04150	AVIN_RS01975	<i>gluP</i>	50	64	CACAACAAGAGGAAA	6.9	9.90E-05	proteína transportadora de glucosa/galactosa
Avin_04530	AVIN_RS02145	<i>mutY</i>	7	21	AAGAAAAACTCGGCG	7.5	6.80E-05	Adenina glicosilasa específica A/G
Avin_05530	AVIN_RS02590	<i>metK</i>	53	67	AACAACAGGAACCGA	7.3	7.70E-05	S-adenosilmetionina sintetasa
Avin_06230	AVIN_RS02915	<i>tuf</i>	27	41	AAAAACAAGGTTGAT	8.2	4.20E-05	factor de elongación de la traducción Tu
Avin_06410	AVIN_RS03005	<i>rplR</i>	49	63	AAGAAAAAGTAGGGC	10.3	6.20E-06	proteína ribosomal 50S L18
Avin_07320	AVIN_RS03415		48	62	AACAACGAGTAGAGG	7.5	6.80E-05	Transportador ABC de aminoácidos, proteína de unión periplásmica
Avin_07980	AVIN_RS03710		39	53	AAAAACAAGACAAA	10.8	3.40E-06	Alcohol deshidrogenasa que contiene hierro
Avin_08020	AVIN_RS03720		43	57	GACAACAATGACAAT	7.3	8.20E-05	Activador transcripcional dependiente de Sigma54
Avin_08330	AVIN_RS03850		35	49	AACAACAAGAACCCA	11.3	1.70E-06	sacarosa isomerasa
Avin_08570	AVIN_RS03955	<i>benR</i>	44	58	AAAAACAATACCGAG	11.7	8.60E-07	activador transcripcional, BenR (familia AraC)
Avin_08630	AVIN_RS03980		49	63	AACAACAACAGAGAT	9.6	1.30E-05	transportador de benzoato
Avin_08660	AVIN_RS03985		50	64	AATAACAACAAGAGA	10.8	3.40E-06	porina de la membrana externa específica del benzoato
Avin_08720	AVIN_RS04015	<i>xylE</i>	52	66	AAAAACAATAGGTGT	8.5	3.30E-05	Catecol 2,3 dioxigenasa, XylE
Avin_08800	AVIN_RS04055	<i>dmpB</i>	48	62	AACAAAAACAAAGGA	8.6	3.10E-05	Dioxigenasa de eliminación del anillo de extradiol
Avin_08820	AVIN_RS04065	<i>dmpO</i>	50	64	AACAAGAAAAAGGAC	12	4.80E-07	Subunidad P4 de la fenol hidroxilasa
Avin_08850	AVIN_RS04080	<i>dpmL</i>	46	60	AACAACAATACGGT	12	4.80E-07	Subunidad P1 de la fenol hidroxilasa

Avin_08880	AVIN_RS04090		52	66	AAAAATAAAAAGGTA	8.5	3.30E-05	proteína activadora dependiente de sigma54, familia XylR/DmpR
Avin_09150	AVIN_RS04195		58	72	AATAAAAAGAAGGAT	9.8	1.10E-05	RhaT I-rhamnose-proton symport 2
Avin_09360	AVIN_RS04290		26	40	AATAACAATTCTCAT	9	2.20E-05	2,4-dihept-2-ene-1,7-dioic acid aldolase, familia HpcH/Hpal
Avin_09460	AVIN_RS04325	<i>dctA-2</i>	64	78	AACAACAATGACAAT	10.3	6.20E-06	Proteína transportadora de C4-dicarboxilato
Avin_09700	AVIN_RS04420		53	67	AAGAAAAAATGGAG	8.1	4.50E-05	enzima modificadora de lantibióticos
Avin_10240	AVIN_RS04655		6	20	AAGAACAATACCAG	12.4	2.00E-07	proteína hipotética
Avin_10350	AVIN_RS04710	<i>madL</i>	64	78	AATAACAATGATCAT	8.5	3.30E-05	transportador de malonato, subunidad MadL
Avin_10660	AVIN_RS04835		48	62	AACAACAATAGAGAG	10.8	3.40E-06	acetil-CoA sintetasa
Avin_10700	AVIN_RS04855		48	62	AACAAGAACAAGAGG	11.5	1.20E-06	3-hidroxiisobutirato deshidrogenasa
Avin_10720	AVIN_RS04865		37	51	AACAACAACAATGCC	10.5	5.00E-06	metilmalonato-semialdehído deshidrogenasa
Avin_10960	AVIN_RS04985	<i>alg8</i>	61	75	AAGAAGAATTATGGA	8.6	3.10E-05	proteína de biosíntesis de alginato Alg8
Avin_11210	AVIN_RS05090		53	67	GACAACAAGGAAAGA	7	9.90E-05	amidohidrolasa
Avin_11390	AVIN_RS05165	<i>apc3</i>	49	63	GAGAACAACGAGGAG	7.7	5.90E-05	acetofenona carboxilasa
Avin_12210	AVIN_RS05545	<i>fruA</i>	11	25	AACAAGAAAAGAGGT	8.9	2.60E-05	Componente del sistema de fosfotransferasa de fructosa IIBC
Avin_12690	AVIN_RS05755		14	28	AACGACAATGACAAG	7.4	7.70E-05	Ribonucleasa E/G
Avin_12800	AVIN_RS05810	<i>lptB</i>	39	53	AAAAAGAAACAGCAG	8.8	2.60E-05	proteína de transporte de LPS LptB
Avin_12880	AVIN_RS05850		41	55	AAGAAGAATAGTTAC	8.7	2.80E-05	Ttransportador de eflujo ABC, componente auxiliar
Avin_13170	AVIN_RS05995	<i>mraW</i>	19	33	AACAACAACCCGGAG	9.1	2.00E-05	S-adenosil-metiltransferasa MraW
Avin_13300	AVIN_RS06060	<i>ftsZ</i>	51	65	AAAAAGAAAGGAGAG	7.7	5.90E-05	proteína de división celular FtsZ
Avin_13730	AVIN_RS06250	<i>mucD</i>	31	45	AAGGACAAGTCAGGC	7.2	8.20E-05	HtrA serina proteasa
Avin_13910	AVIN_RS06330		46	60	AACAAAATAACAAA	10.2	7.00E-06	permeasa de membrana integral/familia GntP/transportador de citrato
Avin_14210	AVIN_RS06485		48	62	AAGAACAATAAAGGT	11.5	1.20E-06	Porina de la membrana externa bacteriana
Avin_14230	AVIN_RS06495	<i>ech</i>	46	60	AACAACAACCTCGAAG	11.3	1.70E-06	p-hidroxicinamoil CoA hidratasa/liasa
Avin_14240	AVIN_RS06500	<i>vdh</i>	48	62	AACGACAAGACAAGG	8.2	4.20E-05	vainillina:NAD+ oxidoreductasa
Avin_14390	AVIN_RS06575	<i>pobA</i>	64	78	AACAACAATGAAGAC	10.3	6.20E-06	4-hidroxibenzoato hidroxilasa, pobA
Avin_15060	AVIN_RS06890		64	78	AACAACAATGAACTC	7.5	6.80E-05	oxidoreductasa
Avin_15140	AVIN_RS06925	<i>mhpT</i>	64	78	AACAATAATGACGAC	9.4	1.50E-05	Transportador de ácido 3-hidroxifenilpropiónico
Avin_15150	AVIN_RS06930		42	56	AACAAGAACAATAAA	10.8	3.40E-06	Porina de la membrana externa de las bacterias
Avin_15330	AVIN_RS07010		6	20	AACAACAACAATGCC	10.5	5.00E-06	proteína hipotética conservada



Avin_16390	AVIN_RS07535	<i>fadB2</i>	50	64	AAGAACAACCTGGAG	7.7	5.90E-05	complejo de oxidación de ácidos grasos subunidad alfa FadB
Avin_16410	AVIN_RS07545	<i>etfB3</i>	20	34	GACAACAAGAGAGAG	8	5.10E-05	subunidad beta de la flavoproteína de transferencia de electrones
Avin_16430	AVIN_RS07555		44	58	AACAACAAGATCGAG	11.1	2.60E-06	flavoproteína de transferencia de electrones-ubiquinona oxidorreductasa
Avin_16500	AVIN_RS07595		32	46	AAAAATAATTAATGC	7.1	8.70E-05	proteína hipotética
Avin_16650	AVIN_RS07660		64	78	AAAAACAATGAAGAA	8.7	2.80E-05	Porina de tipo LamB
Avin_16830	AVIN_RS26425		49	63	AAGAAGAAGGAGGGA	9.2	1.90E-05	proteína hipotética conservada
Avin_17120	AVIN_RS07860		46	60	AAAAACAATCACGAG	9.2	1.90E-05	Transportador de citrato
Avin_17140	AVIN_RS07865		15	29	AACAAGAACAAATGA	7.9	5.10E-05	Porina de la membrana externa bacteriana
Avin_17300	AVIN_RS07940		51	65	AATAAAAAAAGGCAT	7.2	8.20E-05	Transportador de la superfamilia del facilitador mayor
Avin_17350	AVIN_RS07965		56	70	AACAACAATGCTTAT	7.9	5.10E-05	3-hidroxiacil-CoA deshidrogenasa
Avin_17400	AVIN_RS07990		44	58	AACAACAAGATCGAG	11.1	2.60E-06	Ubiquinona oxidorreductasa, una flavoproteína que transfiere electrones
Avin_17550	AVIN_RS08055		48	62	AACAATAAGGAAGGA	8.7	2.80E-05	proteína de la familia de las metalobetolactamasas
Avin_17630	AVIN_RS08090	<i>zwf-2</i>	55	69	AAAAAGAACAAGCAT	10.1	7.80E-06	Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
Avin_17660	AVIN_RS08105		44	58	GAAAACAATTCCAAG	7.4	7.20E-05	fucosa permeasa
Avin_18150	AVIN_RS08315		16	30	AACAACAAGACAGAA	11.5	1.20E-06	porina de la membrana externa
Avin_19040	AVIN_RS08715		58	72	AAGGAGAAAAAGCAT	7	9.40E-05	Dienelactona hidrolasa
Avin_19380	AVIN_RS08895		38	52	AATAAGAAAATAGAC	9.6	1.30E-05	proteína hipotética no conservada
Avin_20130	AVIN_RS09245		29	43	AAAAAAAACGACTAC	7.6	6.30E-05	proteína hipotética conservada
Avin_20330	AVIN_RS09330		23	37	AACAATAAACGCGG	9.8	1.10E-05	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta SDR
Avin_20360	AVIN_RS09345		34	48	AATAAAAAAATGAGC	7.1	8.70E-05	permeasa de la superfamilia de facilitadores principales (MFS)
Avin_20500	AVIN_RS09420		58	72	AAGGAGAAAAACCAT	7.1	8.70E-05	Fago integrasa
Avin_20910	AVIN_RS09600	<i>acxA</i>	52	66	AACAACAACGGAGAA	7.7	5.90E-05	Subunidad beta de la acetona carboxilasa; AcxA
Avin_20920	AVIN_RS09605	<i>acxB</i>	39	53	GACAATAAATAAAAG	8	4.80E-05	subunidad alfa de la acetona carboxilasa; AcxB
Avin_20940	AVIN_RS09615	<i>acxR</i>	44	58	AACAATAACAATCAA	9.4	1.50E-05	proteína activadora dependiente de sigma54; AcxR
Avin_21080	AVIN_RS09630	<i>cysE3</i>	45	59	AACGACAATAAGAAC	9.2	1.90E-05	Serina O-acetiltransferasa
Avin_22010	AVIN_RS10085		1	15	AATAAAAAAATGAA	7.9	5.40E-05	Porina tipo LamB
Avin_22030	AVIN_RS10090		63	77	AACAACAATGGAGA	8.6	3.10E-05	Superfamilia de alcoholes deshidrogenados que contienen zinc
Avin_22080	AVIN_RS10115		46	60	AAAGACAATAATAAA	8	5.10E-05	proteína periplásmica de unión a azúcares

Avin_22100	AVIN_RS10125		40	54	CAGAACAAGAACCAA	8.2	4.20E-05	Proteína transportadora ABC
Avin_22240	AVIN_RS10175		47	61	GACAACAACACAGAG	8.9	2.40E-05	Proteína tiolasa
Avin_22450	AVIN_RS10265		64	78	AACAATAATGAAAAA	8	4.80E-05	Porina de la membrana externa de la familia OprD
Avin_23020	AVIN_RS10505		70	84	AATGACAACAAGAAG	7.9	5.10E-05	Proteína transglicosilasa lítica
Avin_23120	AVIN_RS10550		40	54	AAAAATAAGACAAGA	9	2.20E-05	proteína hipotética conservada
Avin_23330	AVIN_RS10645	<i>oprF</i>	14	28	AAAAACAAGTTTGAG	9.7	1.20E-05	principal porina de la membrana externa OprF
Avin_25020	AVIN_RS11435		61	75	AAGAATAACAATGAT	9.2	1.90E-05	proteína hipotética de la familia DUF461
Avin_25210	AVIN_RS11555		50	64	GACAAGAAAACGAGG	7.8	5.50E-05	acil-CoA deshidrogenasa
Avin_25240	AVIN_RS11570		47	61	AACAACAACAATCCG	10.5	5.00E-06	proteína de la familia DUF485
Avin_25250	AVIN_RS11575		40	54	AATAAGAACAATCAG	10.4	5.50E-06	enzima activadora de acil
Avin_25950	AVIN_RS11885		52	66	AAAAACAAGAGTGAA	9.3	1.70E-05	Porina de la membrana externa similar a OprE
Avin_26040	AVIN_RS11920	<i>sdaA</i>	15	29	AAAAAGAAATACCCG	10	9.40E-06	L-serina deshidratada
Avin_26140	AVIN_RS11960		50	64	AATAACAAGGAGCTT	8	4.80E-05	Proteína de unión al sustrato del transportador ABC
Avin_26200	AVIN_RS11985		43	57	AACAAAAACAAACGC	8.8	2.60E-05	Proteína deshidrogenasa/reductasa de cadena corta
Avin_26220	AVIN_RS11995		47	61	AATAAGAACAATCAG	10.4	5.50E-06	Proteína de unión periplásmica/proteína reguladora transcripcional LacI
Avin_26540	AVIN_RS12135		6	20	AACAACAACAACATA	10.1	7.80E-06	Proteína hipotética conservada
Avin_26820	AVIN_RS12270		46	60	GACAACAAATAATAT	7.5	7.20E-05	transportador facilitador mayor
Avin_26870	AVIN_RS12295	<i>ptxS</i>	43	57	AATACCAAGAACAAG	7.5	6.80E-05	regulador transcripcional PtxS
Avin_26900	AVIN_RS12310	<i>kguT</i>	45	59	AAAAACAACAAGCTC	9	2.20E-05	Transportador de 2-cetogluconato
Avin_26920	AVIN_RS12320		64	78	AACAACAATGCACAA	8.7	2.80E-05	Porina de la membrana externa de la familia OprD
Avin_26940	AVIN_RS12325		64	78	AAAAACAATGAAGAA	8.7	2.80E-05	Porina de tipo LamB
Avin_26980	AVIN_RS12335		52	66	AAGAAAAAGAGAAGG	7.9	5.10E-05	glucano 1,4-alfa-glucosidasa
Avin_27200	AVIN_RS12425		49	63	AACAATAAGAATTGG	8.9	2.40E-05	Porina de tipo LamB
Avin_27210	AVIN_RS12430		46	60	CACAACAACGAGGAC	7.5	6.80E-05	gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
Avin_27250	AVIN_RS12445	<i>eda-1</i>	35	49	AACAACAAACCGGCC	8.3	4.20E-05	KDPG aldolasa
Avin_27280	AVIN_RS12460	<i>edd-2</i>	37	51	AAAAACAATATACC	11.2	2.00E-06	6-fosfogluconato deshidratasa
Avin_27400	AVIN_RS12515	<i>mtlE</i>	23	37	AAAGATAAGAACGGG	7.4	7.20E-05	proteína periplásmica de unión al manitol del transportador ABC del manitol
Avin_27570	AVIN_RS12580		50	64	AATAACAATAACTAC	12	4.80E-07	fructosa-2,6-bifosfatasa
Avin_27950	AVIN_RS12755		35	49	GATAACAACGAGGGG	7.2	8.20E-05	cheY; regulador de la respuesta CheY
Avin_30140	AVIN_RS13765		29	43	AATAAGAACTCAACC	8.7	3.10E-05	Acil-CoA sintetasa
Avin_30210	AVIN_RS13790		51	65	AACAACAAGAGGACG	10.7	3.90E-06	proteína oxidorreductasa

Avin_30250	AVIN_RS13810		7	21	AAAAACAAAAACGG	11	2.60E-06	Familia de la flavoproteína fumarato reductasa/succinato deshidrogenasa
Avin_30720	AVIN_RS14050	<i>lapO</i>	52	66	AACAAGAAGGAGCAC	10.7	3.90E-06	Fenol hidoxilasa multicomponente, subunidad gamma; LapO
Avin_30750	AVIN_RS14065	<i>lapL</i>	20	34	AACGACAAGAAAGGC	8.1	4.50E-05	Fenol hidoxilasa multicomponente, subunidad beta; LapL
Avin_30840	AVIN_RS14100		44	58	AAAAATAAAATCAGG	8.5	3.30E-05	Proteína hipotética conservada
Avin_30910	AVIN_RS14135		1	15	AAGAACAAGCCGGCC	7.9	5.10E-05	Transportador ABC, proteína de unión a ATP
Avin_31180	AVIN_RS14250		49	63	AACAACAAGAAGGTG	11	2.60E-06	Porina de la membrana externa similar a OprE
Avin_31210	AVIN_RS14265	<i>dctA-3</i>	51	65	AACAATAATTCCGGAG	9.5	1.40E-05	Proteína transportadora de C4-dicarboxilato
Avin_31240	AVIN_RS14280		49	63	AACAACAATGTGAGG	8.8	2.80E-05	Proteína de la superfamilia del facilitador mayor
Avin_31300	AVIN_RS14310		73	87	GACAACAACAATGAA	7.5	7.20E-05	Porina de la membrana externa de la familia OprD
Avin_31420	AVIN_RS14365		46	60	AACGACAAGAACAAG	9.8	1.10E-05	mio-inositol 2-dehidrogenasa
Avin_32180	AVIN_RS14680		46	60	AAAAACAACACTACTA	9	2.20E-05	proteína acil-CoA deshidrogenasa
Avin_32250	AVIN_RS25175		48	62	AAAAACAACGAAAAG	10	8.60E-06	Transportador MFS
Avin_32260	AVIN_RS25180		42	56	AACAAGAAAAATAAT	11.1	2.30E-06	proteína péptido señal
Avin_32660	AVIN_RS14850		5	19	GACAACAAGTATAAG	10.7	3.90E-06	proteína hipotética
Avin_33680	AVIN_RS15305		64	78	AACAACAATGATGAA	8.8	2.60E-05	proteína hipotética
Avin_33700	AVIN_RS15315		64	78	AAAAACAATGAAACT	8.6	3.10E-05	proteína hipotética conservada
Avin_34280	AVIN_RS15570	<i>leuC</i>	44	58	CAGAACAAAACCTGAT	7	9.90E-05	Subunidad grande de la 3-isopropilmalato deshidratasa LeuC
Avin_35890	AVIN_RS16335		9	23	AAGAAAAAGTAGGCT	9.8	1.10E-05	Proteína reguladora, familia LysR
Avin_38070	AVIN_RS17340	<i>aroQ2</i>	52	66	AATAACAATGGAGAA	7	9.40E-05	3-Dehidroquinato sintasa
Avin_38140	AVIN_RS17365		58	72	AAAAACAATGAGAAT	9.5	1.50E-05	Porina de la membrana externa bacteriana, familia OprD
Avin_38260	AVIN_RS17425	<i>pcaH</i>	53	67	AACAACAAGGAGCCT	10.2	7.00E-06	Protocatecato 3,4-dioxigenasa, subunidad beta
Avin_38790	AVIN_RS17670	<i>eno-6</i>	64	78	AACAACAATGGCAAA	8	5.10E-05	Enolasa
Avin_39520	AVIN_RS18020		18	32	AACAACAAAATCCCG	9.3	1.70E-05	Proteína similar a la acil-CoA tioester hidrolasa
Avin_39930	AVIN_RS18210		61	75	GAGAAGAAGAATGAC	7.8	5.50E-05	proteína hipotética conservada
Avin_39970	AVIN_RS18230	<i>acoK</i>	27	41	GACAACAAGAACAGG	10.1	7.80E-06	proteína reguladora de la transcripción AcoK, familia LuxR
Avin_41200	AVIN_RS18760		49	63	AAGAAAAAGAGGCGC	7.3	7.70E-05	proteína hipotética conservada
Avin_41690	AVIN_RS19000	<i>acoR</i>	39	53	AACAACAACAAGACC	11.6	9.00E-07	Proteína activadora transcripcional dependiente de Sigma54, AcoR

Avin_41710	AVIN_RS19005		50	64	AACAACAAGCACAGG	10.6	4.40E-06	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta SDR
Avin_41730	AVIN_RS19015	<i>acoA</i>	64	78	AACAACAATGACCAC	10.7	4.40E-06	acetoina:2,6-diclorofenolindofenol oxidorreductasa subunidad alfa, AcoA
Avin_41760	AVIN_RS19030	<i>adh</i>	64	78	AACAACAATGACAAC	11.1	2.30E-06	2,3-butanediol deshidrogenasa
Avin_41800	AVIN_RS19040		21	35	AAAAACAATGAAAAC	9.7	1.30E-05	proteína hipotética conservada
Avin_42110	AVIN_RS19170		42	56	AACAACAATCATCAG	8.9	2.40E-05	proteína de la superfamilia del facilitador mayor
Avin_42140	AVIN_RS19180		18	32	AAAAACAACATACGA	8.5	3.30E-05	sintetasa y ligasa dependiente de AMP
Avin_42160	AVIN_RS19485		42	56	AACGACAAGAAACGA	7.1	8.70E-05	Dioxigenasa similar a la 2-nitropropano
Avin_42750	AVIN_RS19645	<i>acsA2</i>	54	68	AAAAACAAGGAACCG	9.7	1.20E-05	Acetato CoA ligasa AcsA
Avin_43070	AVIN_RS19730	<i>lctP</i>	47	61	AAGAACAATCAAGGG	8.5	3.30E-05	L-lactato permeasa
Avin_43260	AVIN_RS20350	<i>lldp</i>	48	62	AATAAGAACAAGAGA	9.9	9.40E-06	L-lactato permeasa, Lldp
Avin_44640	AVIN_RS20850		20	34	AAAGACAATAAAGGG	8.1	4.50E-05	proteína hipotética conservada
Avin_45700	AVIN_RS20900	<i>glpF</i>	40	54	GATAACAACACTACAAA	8.6	3.10E-05	proteína facilitadora de la captación de glicerol
Avin_45810	AVIN_RS21340		41	55	AAGAACAAGAACAAG	13.2	1.70E-08	proteína hipotética conservada
Avin_46740	AVIN_RS21430		53	67	AAAAACAAGGAAACT	9.8	1.20E-05	Proteína de la superfamilia de facilitadores mayores
Avin_46930	AVIN_RS21750		58	72	AAGAAAAACGACAGT	8	4.80E-05	Proteína de dominio rodanésico
Avin_47570	AVIN_RS21770		48	62	AAGAAGAAGGAGGGC	9.8	1.10E-05	proteína similar a la HemY
Avin_48480	AVIN_RS22190	<i>hupA</i>	43	57	AACAACAAGAAACAT	12	4.80E-07	proteína bacteriana de unión al ADN similar a la histona
Avin_48520	AVIN_RS22375	<i>phoB</i>	48	62	AACAACAACGGGACA	7.8	5.50E-05	Regulador de la respuesta al fosfato; PhoB
Avin_48920	AVIN_RS22415		45	59	AAAAATAAGAACGGA	9.8	1.10E-05	Porina de la membrana externa bacteriana
Avin_49260	AVIN_RS22540		47	61	AACAACAACACTGGAGA	8.6	3.10E-05	transportador de la familia de los facilitadores principales
Avin_49300	AVIN_RS22545		45	59	AACAACAATCCGCGT	7.2	8.70E-05	Porina de la membrana externa de la familia OprD
Avin_49310	AVIN_RS22555		45	59	AACAACAATCCGCGT	7.3	7.70E-05	Porina de la membrana externa bacteriana
Avin_49330	AVIN_RS22610		40	54	AACCACAAGAACAGG	7.5	6.80E-05	Simpatizante de sodio:dicarboxilato
Avin_49460	AVIN_RS22665	<i>tctC</i>	41	55	AACAAGAACAACAGT	11.4	1.40E-06	proteína receptora periplásmica del transportador tripartito de tricarboxilato
Avin_49580	AVIN_RS22885		24	38	GACAACAAGAAACAC	9.7	1.20E-05	porina de la membrana externa similar a OprE
Avin_50040	AVIN_RS22870		45	59	GACAAGAACACACAA	6.9	9.90E-05	proteína del catabolismo del mio-inositol lolC
Avin_50070	AVIN_RS22895	<i>iolT</i>	46	60	AAGAACAACAACCAG	12.3	2.50E-07	transportador de mio-inositol
Avin_50090	AVIN_RS22905		62	76	AACAACAAGATGACC	10.1	7.80E-06	proteína del catabolismo del mio-inositol
Avin_50110	AVIN_RS22915	<i>idh</i>	38	52	AATAACAACAGCCAT	9.2	1.90E-05	Mio-inositol 2-dehidrogenasa

Avin_50130	AVIN_RS22920		47	61	AACAACAACAAGCGG	11.7	8.60E-07	Proteína periplásmica de unión a sustrato del transportador ABC de azúcares
Avin_50140	AVIN_RS22945		47	61	AACAATAAAAAAGGA	9.6	1.30E-05	Proteína periplásmica de unión a sustrato del transportador ABC de azúcares
Avin_50190	AVIN_RS22955	<i>fahA</i>	51	65	AACAACAGGAAGACC	8.3	3.80E-05	Fumarilacetoacetasa
Avin_50210	AVIN_RS22975		46	60	AACAACAATAACAAG	13.5	4.00E-09	Porina de tipo LamB
Avin_50250	AVIN_RS22985		46	60	AACAACAATCCTCGC	7	9.40E-05	proteína hipotética conservada
Avin_50270	AVIN_RS23005		45	59	AACAATAAGAAAGTA	9	2.20E-05	Porina de tipo LamB
Avin_50320	AVIN_RS23265		47	61	AACAAAAATAAGCAA	9.6	1.30E-05	Proteína de unión al sustrato del transportador ABC
Avin_50870	AVIN_RS23425		6	20	AACAAGAAAGAAGTC	7.7	5.90E-05	Proteína Vgr del elemento Rhs
Avin_51240	AVIN_RS23445		47	61	AACGACAATACGAGG	8.2	4.20E-05	Proteína de unión al calcio
Avin_51300	AVIN_RS23480		51	65	CACAACAAGAGGAAT	7.1	8.70E-05	permeasa de la superfamilia de facilitadores principales (MFS)
Avin_51390	AVIN_RS23500		49	63	AACAATAAGAATCGG	10.1	7.80E-06	Porina de tipo LamB
Avin_51430	AVIN_RS23535		45	59	AAAAACAACGAGTCC	8.1	4.50E-05	Simpatizante de protones/azúcares
Avin_51510	AVIN_RS23565	<i>scrY-2</i>	49	63	AAAAACAAGAAGAGA	11.2	2.00E-06	porina de la sacarosa
Avin_51580	AVIN_RS23580	<i>hbdH</i>	48	62	AACAACAAAAACGGA	11.4	1.40E-06	hidroxibutiril-CoA deshidrogenasa
Avin_51600	AVIN_RS23575		52	66	CAGAACAAGAGAGAC	6.9	9.90E-05	Subunidad B de la 3-oxoácido CoA-transferasa
Avin_51610	AVIN_RS23595		49	63	AACAACAAAGAGGCA	9.8	1.10E-05	3-oxoácido CoA-transferasa
Avin_51680	AVIN_RS23665		21	35	GAAAACAAGGAGACC	7.4	7.20E-05	proteína hipotética
Avin_51800	AVIN_RS23710	<i>scrT</i>	48	62	AATAAAAACAAGAGG	9.7	1.20E-05	transportador de protones/sacarosa
Avin_51910	AVIN_RS23720		48	62	CAAAAGAAATAGGAT	7	9.40E-05	Anquirina
Avin_51930	AVIN_RS23900		57	71	AAGAAGAAAGCTGCA	6.9	9.90E-05	Receptor de sideróforos dependiente de TonB
Avin_52330	AVIN_RS23915		51	65	AACAAGAATGAGGGG	9.6	1.30E-05	Enzima de restricción de tipo III, subunidad res

<b>Tabla 2. Posibles blancos del factor <math>\sigma^{54}</math> en <i>A. vinelandii</i>*</b>			
<b>ID</b>	<b>Nombre</b>	<b>Función</b>	<b>Secuencia**</b>
Avin_01300	<i>modA2</i>	Proteína periplásmica de unión a molibdato, ModA2	CCATGGCACGGAGCTTGCCTT
Avin_01370	-	Proteína hipotética conservada	TTTCGGCACACTTATTGCAATA
Avin_01380	<i>nifH</i>	Proteína de hierro de la nitrogenasa	TGCTGGCACAGACGCTGCATTA
Avin_01610	<i>iscAnif</i>	Proteína de ensamblaje del clúster Fe-S de fijación de nitrógeno IscAnif	GCGTGGCATGCCGGTTGCAGCA
Avin_05650	-	Proteína hipotética conservada	CTTTGGCATGAAGCCTGCTATT
Avin_08860	<i>dmpK</i>	Subunidad de fenol hidroxilasa DmpK	TACCGGCATAGCCCTTGCTCAA
Avin_11410	<i>apc1</i>	Acetofenona carboxilasa	AACTGGCACAGCCGTTGCGATA
Avin_12790	<i>rpoN</i>	Factor sigma-54 de la ARN polimerasa	ATCAGGCATAGAATTTGCTTTA
Avin_30860	-	Receptor de sideróforos dependiente de TonB	GACTGGCACACCCCTTGCCCCA
Avin_37690	-	Proteína hipotética conservada	TACCGGCCGGCCTGTGCCCGG
Avin_41710	-	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta SDR	CTTTGGCACCGCCCTTGCTCTG
Avin_42690	<i>pcnB</i>	Polinucleótido adeniltransferasa; PcnB (CrcZ)	TTCTGGCACGACATCTGCTCTT
Avin_45090	-	Antiportador de cationes/hidrógeno, proteína tipo NhaP	CCTTGGCACGACCGATGCATAT
Avin_45850	<i>glnA</i>	Glutamina sintetasa, tipo I; GlnA	TAGTGGCATGAAACTTGCTCCC
Avin_46580	-	Proteína hipotética conservada	GGTTGGCAAGCCCTGTGCTTAT
Avin_46870	<i>prkA</i>	Proteína quinasa de serina; PrkA	AGCCGGCACACGGCTTGCTATT
Avin_49000	<i>anfH</i>	Proteína de hierro de la nitrogenasa	AACTGGCACATGCATTTGCTTTA
Avin_50680	<i>modE</i>	Regulación del Mo, homeostasis del procesamiento del Mo	ACTTGGCATGTGAATTGCTTTA
Avin_50700	-	Componente de unión al ATP del transportador ABC	GGATGGCATGGGGCGTGCTTGC
Avin_60570	-	ARNt-Cys	AATTGGCATAGGGGTTGCCAAG

\*Análisis *in silico* de los blancos de regulación del factor  $\sigma^{54}$  mediante predicción computacional de las regiones reguladoras de los genes codificantes en *A. vinelandii*. \*\* En rojo los sitios -12 y -24 del promotor  $\sigma^{54}$ . El nombre de los genes aún no identificados se denota con un guión medio. Maricela Carrera y Enrique Merino, 2021, datos no publicados.