



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas
Instituto de Biotecnología**

**Búsqueda de vías encabezadas por GacA que regulan
la síntesis de PHB en *Azotobacter vinelandii***

TESIS

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

**PRESENTA:
Mariana López Valdez**

**TUTOR PRINCIPAL
Dra. Elda Guadalupe Espin Ocampo
Instituto de Biotecnología**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:
Dra. Rosa Maria Gutierrez Rios
Instituto de Biotecnología**

**Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán
Instituto de Biotecnología**

Cuernavaca, Morelos. Noviembre, 2021



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El trabajo experimental para este proyecto 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. Elda Guadalupe Espín. El trabajo fue financiado por donativos del Consejo nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)(Proyecto).

Agradezco el apoyo económico financiado por el Consejo nacional de Ciencia y tecnología (CONACyT) con número de becario 886390. Así mismo agradezco al programa de Apoyo a los Estudiantes de Posgrado (PAEP) por el financiamiento para asistir a congresos nacionales donde se presentaron los resultados obtenidos en este proyecto.

“One does not become enlightened by imagining figures of light,
but by making the darkness conscious.”
— *Carl G. Jung*

“Déjame mostrarte.
No es que haya cosas que la ciencia no pueda explicar.
Buscas las reglas tras esas cosas.
La palabra “ciencia” expresa el esfuerzo
constante y molesto que se necesita para hacerlo.
Venceré a la fantasía con la ciencia”
-*Senku Ishigami*

Otro mundo existe que debo experimentar.
Debo inhalar el aire que ahí se respira y compartir ese mundo a toda costa.
-*Hideo Kojima*

Dedicatoria

A mis padres por su esfuerzo y su cariño. Gracias por haberme iniciado en el gratificante camino de la ciencia y la investigación, por enseñarme el mundo y por motivarme a volar alto.

A todos mis pequeños de cuatro patas: Chikis, Leonarda, Newton, Dana, Lili, Haru y Hiro, por hacer más cálida mi vida y por darme un lugar al cual regresar. El hogar es donde el pelo de perro se pega a todo menos al perro.

Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por su financiamiento con la beca recibida durante la maestría y su contribución en este proyecto

Expreso mi profundo agradecimiento a mi tutora la Dra. Elda Guadalupe Espín, Gracias por confiar en mi con este proyecto y abrirme las puertas de su laboratorio, gracias por siempre estar ahí no solo como tutora, por su amabilidad, su conocimiento y su guía durante este proyecto y esta etapa de mi vida.

A los miembros de mi comité tutorial: la Dra. Rosa María Gutierrez y el Dr. Victor Bustamante, por su crítica, sus comentarios y sugerencias hacia este trabajo. Gracias a ustedes este trabajo pudo crecer y ser lo que es hoy.

A la Dra. Cinthia Núñez y al Dr. Daniel Segura por las aportaciones y comentarios hacia mi proyecto.

A las técnicas de laboratorio M.C. Josefina Guzman Aparicio y Biol. Maria Soledad Moreno Leon. Gracias por compartir su conocimiento, por su amabilidad y paciencia. Gracias por todo el apoyo y aportación a este trabajo, no habría sido posible su realización sin la ayuda de ustedes dos.

A la M.C. Joselyn Cristina Chavez Fuentes, quiero agradecerle por su trabajo y colaboración con el análisis bioinformático para el proteoma realizado en este trabajo.

Al Laboratorio de Proteómica del CCG por su aportación a este trabajo con el procesamiento de muestras para el análisis de proteoma.

A mis amigos y compañeros de laboratorio. Gracias por hacer del laboratorio mi segundo hogar y de mi trabajo mi pasatiempo. Gracias por todos sus aportes, por compartir su conocimiento y experiencia conmigo, por la amistad y los momentos llenos de risas y memes.

Agradecimientos Personales

Gracias a las mujeres de mi laboratorio por la sororidad y cofradía que día a día creamos y fortalecimos. Gracias por todo su conocimiento y aporte a mi proyecto, por todas las risas, fiestas y por no ser solo amigas sino ser hermanas y estar ahí durante esta etapa de mi vida.

A la familia que escogí: Liz, Esbaide y Alfonso; y a mis amigos más cercanos. Gracias por volar a mi lado y enseñarme que hay flores que solo se ven cuando tomamos desvíos.

A Rodrigo. Gracias por enseñarme que donde reina la sabiduría no hay conflicto entre pensar y sentir.

Gracias a Marc Abrahams por crear *Ig Nobel prize*, por recordarme que estoy aquí porque me gusta pensar y que nunca debo olvidar reír. Por motivarme a amar la ciencia, a despertar mi curiosidad y que lo más importante es nunca olvidar divertirme con lo que hago.

Tabla de contenido

1.RESUMEN.....	8
2.INTRODUCCIÓN	9
2.1. Biosíntesis de polihidroxi butirato (PHB) en <i>Azotobacter vinelandii</i>	9
2.2.Regulación de la síntesis de PHB mediante el sistema de dos componentes (SDC) GacS/A	12
2.3.Regulación mediante el Sistema Gac-Rsm	12
2.4.Regulación mediante el sistema Gac-PTS ^{Ntr}	13
3.JUSTIFICACIÓN.....	17
4.HIPÓTESIS	19
5.OBJETIVOS.....	19
6.METODOLOGÍA	19
6.1.Cepas bacterianas empleadas.....	19
6.2.Condiciones de crecimiento	22
6.3.Construcción de plásmidos	23
6.4.Construcción de cepa triple mutante para los genes <i>rsmA</i> , <i>ptsN</i> y <i>gacA</i> (MTRP) derivada de la cepa OP.	27
6.5.Complementación de cepa triple mutante (MTRP) con pKgacA.....	28
6.6.Preparación de células para la determinación de los proteomas	29
7.RESULTADOS.....	30
7.1.Vía alterna a las vías Gac-rsmA y Gac-PTS ^{Ntr} encabezada por GacA regula la síntesis de PHB en la cepa OP	30
7.2.RpoS está disminuido en la cepa MTRP	33
7.3.La complementación de la cepa MTRP con <i>gacA</i> (MTRP/ <i>gacA</i>) restauró la síntesis de alquilresorcinoles	35
7.4.Proteoma comparativo de las cepas MTRP y MTRP/ <i>gacA</i>	37
7.5.Las enzimas de la síntesis de PHB.....	44
7.6.La vía de Entner-Doudoroff es afectada en la cepa MTRP.....	45
8.DISCUSIÓN.....	48
8.1.GacA regula la síntesis de PHB por medio de una vía independiente de PTS ^N y RsmA	48
8.2.Análisis comparativo de los proteomas de la cepa MTRP y MTRP/ <i>gacA</i>	49
9.CONCLUSIONES	53
10.PERSPECTIVAS	53

11.BIBLIOGRAFÍA 55

1.RESUMEN

Azotobacter vinelandii, es una bacteria Gram negativa del suelo fijadora de nitrógeno que posee la capacidad de sintetizar y acumular poli-β-hidroxibutirato (PHB). La expresión de los genes que codifican para las enzimas de la síntesis de este polímero está regulada principalmente por tres proteínas GacA, RsmA y EIIA^{Ntr}, donde GacA actúa por medio de las vías Gac-Rsm y Gac-PTS^{Ntr} como un regulador positivo contrarrestando los efectos de regulación negativa producidos por RsmA y EIIA^{Ntr} respectivamente, por lo tanto, la ausencia de GacA en la cepa OP de *A. vinelandii* suprime la síntesis de PHB. En este fondo (*gacA*⁻) se esperaría que la inactivación de RsmA y EIIA^{Ntr} restableciera la síntesis de PHB, sin embargo en este trabajo de Tesis encontramos que en una triple mutante OP*gacA-rsmA-ptsN* esto no sucede, lo cual nos sugiere la existencia de una vía alterna a las vías Gac-Rsm y Gac-PTS^{Ntr} que regula la síntesis de PHB, y encontramos evidencia de la existencia de otra vía de regulación de síntesis de PHB dependiente de GacA adicional a la vía PTS^{Ntr}, que afecta al activador transcripcional RpoS. Con el objetivo de identificar factores que participan en esta vía alterna controlada por GacA, en este trabajo se realizó un proteoma comparativo entre la cepa MTRP (OP*gacA-rsmA-ptsN*) y su derivada MTRP/*gacA* (OP*gacA-rsmA-ptsN/gacA*+) que fue complementada con una copia del gene *gacA* silvestre. Resultados preliminares del análisis de este proteoma sugieren que la vía de biosíntesis de PHB alterna a las vías GacA-Rsm y GacA-PTS^{Ntr}, involucra a las vías metabólicas de la síntesis del sustrato de la síntesis de PHB, acetyl-CoA.

2.INTRODUCCIÓN

2.1. Biosíntesis de polihidroxitirato (PHB) en *Azotobacter vinelandii*.

Azotobacter vinelandii, es una bacteria Gram negativa de suelo fijadora de nitrógeno que posee la capacidad de sintetizar y acumular polímeros de importancia comercial entre los cuales se encuentra el poli- β -hidroxibutirato (PHB) (Senior & Dawes, 1973; Stevenson & Socolofsky, 1965., Aldor & Keasling, 2003., Galindo *et al*; 2007).

En *A. vinelandii* el acetil-CoA es normalmente metabolizado por medio del ciclo de los ácido tricarboxílicos, generando un mecanismo que inhibe la síntesis de PHB, sin embargo cuando el organismo se encuentra en condiciones de crecimiento limitantes de nutrientes y exceso de carbono, la actividad de la enzima NADH oxidasa disminuye, aumentando la concentración de NADH que a su vez inhibe a la enzima citrato sintasa e isocitrato deshidrogenasa, causando que la concentración de acetil-CoA aumente al punto en que la acetil-CoA aciltransferasa es inhibida, lo que provoca una reacción de condensación del acetil-CoA catalizada por la enzima β -cetiolasas que forma acetoacetil-CoA dando inicio a la síntesis de PHB (Page & Knosp 1989; Jackson & Dawes 1976). Posterior a la formación de acetoacetil CoA, éste es reducido por la enzima dependiente de NADPH acetoacetil reductasa para producir D-B-hydroxybutyryl-CoA, el cual es polimerizado por la PHB sintasa para formar PHB (Manchak & Page, 1994).

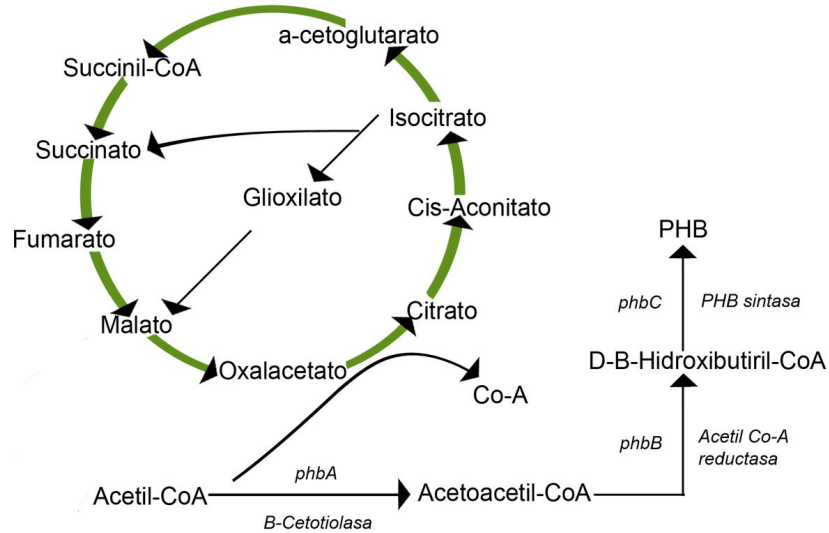


Fig.1. Vía de biosíntesis de PHB

Las tres enzimas: β -cetiolasas, acetil Co-A reductasa y PHB sintasa, involucradas en la síntesis de PHB, se encuentran codificadas en los genes *phbA*, *phbB* y *phbC* respectivamente (Segura *et al.* 2000), que a su vez están organizados en el operón *phbBAC* (Peralta-Gil *et al.* 2002). La transcripción de *phbBAC* se inicia a partir de dos promotores superpuestos P_{B1} y P_{B2} , donde P_{B1} se encuentran bajo el control del activador transcripcional PhbR; mientras que P_{B2} tiene una activación dependiente del factor sigma RpoS (Peralta-Gil *et al.* 2002, Hernández-Eligio *et al.* 2011). A su vez la transcripción del gen *phbR* se inicia a partir de dos promotores P_{R1} y P_{R2} (Peralta-Gil *et al.* 2002) cuya activación es dependiente de PhbR y RpoS (Peralta-Gil 2002, Hernández-Eligio *et al.* 2011) (Fig.2).

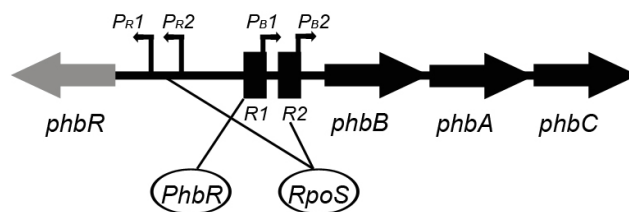


Fig.2. Representación esquemática del operón biosintético *phbBAC* y *phbR* con sus respectivos promotores P_{B1} , P_{B2} , y P_{R1} , P_{R2} y los sitios de unión para *phbR* R1-R2.

La síntesis de PHB en *A. vinelandii* esta regulada principalmente por dos vías: las vías Gac-Rsm y Gac-PTS^{Ntr}, que involucran tres proteínas principales que regulan el proceso: el regulador de respuesta global GacA, que regula de manera positiva la síntesis de PHB, y dos reguladores negativos RsmA y PtsN (Hernández-Eligio *et al.* 2011; Trejo *et al.* 2017)

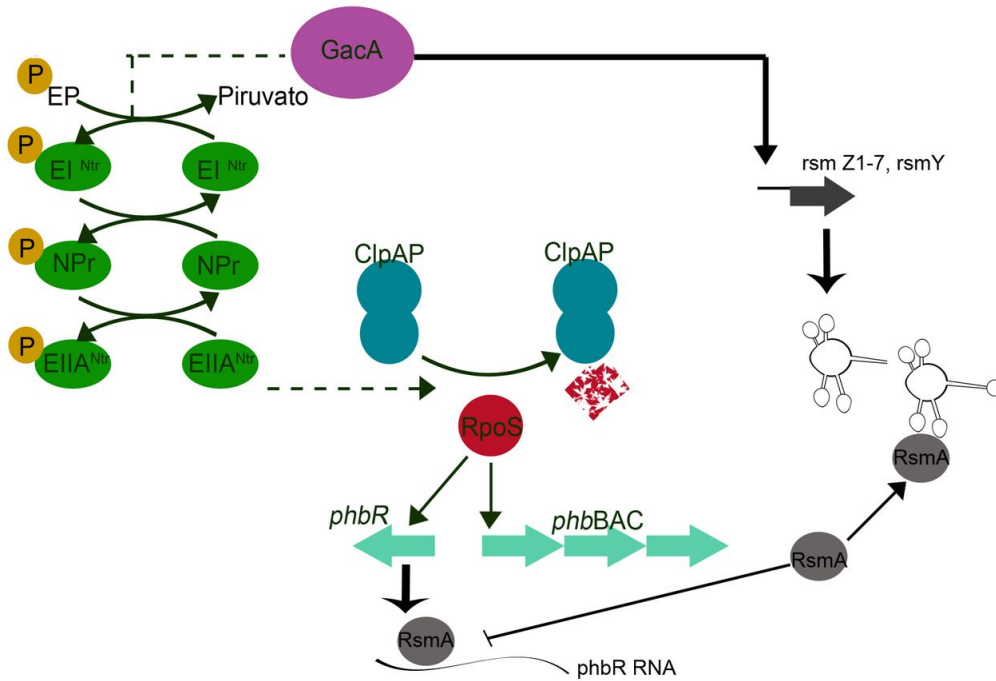


Fig.3. Vías Gac-Rsm y Gac-PTS^{Ntr} para la regulación de biosíntesis de PHB.

2.2.Regulación de la síntesis de PHB mediante el sistema de dos componentes (SDC) GacS/A

GacA pertenece al sistema de dos componentes GacS/A, este sistema de regulación global está conservado en una gran variedad de bacterias Gram negativas, ha sido extensamente estudiado en *Pseudomonas spp.* así como en diferentes tipos de enterobacterias, y gamma proteobacterias en las cuales se ha observado que controla la expresión de diversos genes (Castañeda *et al.* 2001; Lapouge *et al.* 2008; Castañeda *et al.* 2016), relacionados con la regulación para la síntesis de enzimas extracelulares y metabolitos secundarios involucrados con la patogenicidad en plantas y animales, fitness ecológico y tolerancia a estrés (Heeb & Dieter, 2001). En *Azotobacter vinelandii* además de regular la síntesis de PHB controla la regulación de síntesis de alginato y alquilresorcinoles (ARs), mediante el sistema de RNAs pequeños (sRNAs) denominado Rsm (Manzo *et al.* 2011; Romero *et al.* 2016). En *Pseudomonas aeruginosa* la regulación que tiene *gacA* sobre la mayoría de sus genes blanco se da mediante el sistema de sRNAs RsmY/Z y de forma directa se sabe que controla únicamente la transcripción de aquellos genes que codifican sRNAs del sistema de regulación Rsm/Csr (Brencic *et al.* 2009; Humair, *et al.* 2010)

2.3.Regulación mediante el Sistema Gac-Rsm

En *Azotobacter vinelandii* perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*, el sistema Gac-Rsm está constituido por 8 pequeños RNAs (RsmZ1-7 y RsmY), y la proteína RsmA (Manzo *et al.* 2011, Hernández-Eligio *et al.* 2012). En este sistema se ha observado que en ausencia de *gacA*, RsmA que es una proteína de unión a mRNA actúa como un represor traduccional de sus mRNA blancos (Castañeda *et al.* 2016). En el proceso de síntesis de PHB en *A. vinelandii* RsmA interactúa sobre los transcritos de *phbB*, y *phbR* uniéndose a sus extremos 5' evitando de este modo el inicio de la traducción (Hernández-Eligio 2012). Por otro lado GacA en su forma activa fosforilada promueve la transcripción de RsmZ1-7 y RsmY (Manzo *et al.* 2011, Hernández-Eligio *et al.* 2012), los cuales se unen y secuestran a RsmA contrarrestando de este modo su actividad represora (Fig.4) (Manzo *et al.* 2011, Hernández-Eligio 2012).

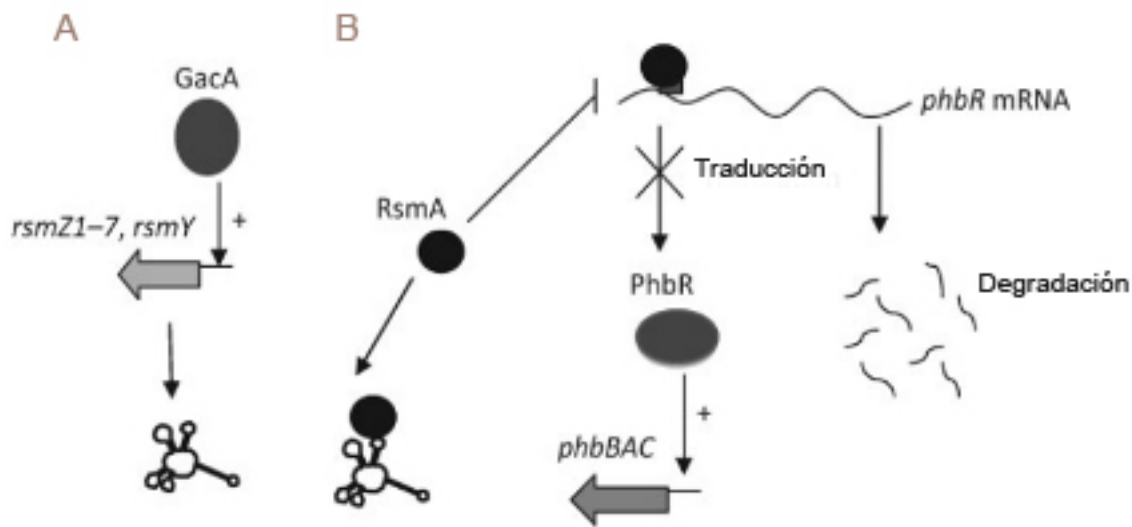


Fig.4. Modelo del control post-transcripcional de PhbR en el sistema Gac-Rsm. A) En *A. vinelandii* GacA activa la transcripción de sRNAs que interactúan con RsmA. Esta interacción previene que RsmA se una a los transcritos de *phbR*, permitiendo su traducción. B) En la ausencia de GacA, RsmA se une a los transcritos de *phbR* interviniendo con su traducción. (Editado de Hernández-Eligio *et al.* 2012)

2.4.Regulación mediante el sistema Gac-PTS^{Ntr}

El sistema de regulación de la expresión génica PTS^{Ntr} (sistema de fosfotransferasa regulado por nitrógeno) está presente en numerosas especies bacterianas y se ha descrito su participación en una gran variedad de procesos celulares tales como la virulencia y patogenicidad en *Legionella pneumophila* (Segal *et al.* 2013) y *Pseudomonas aeruginosa*, así como el control de la homeostasis de potasio y la síntesis de polisacáridos en *E. coli* (Lee *et al.* 2010). En *A. vinelandii* al igual que en otras bacterias, este sistema está conformado por las proteínas EI^{Ntr}, NPr^{Ntr} y EIIA^{Ntr}, codificadas por los genes *ptsP*, *ptsO* y *ptsN* respectivamente. Estas proteínas participan en una cascada de fosforilación donde EIIA^{Ntr} es el receptor final del grupo fosfato (Nóñez *et al.* 2008, Trejo *et al.* 2017).

En *A. vinelandii* las mutaciones en *ptsO* y *ptsP* del sistema PTS^{Ntr} afectan el estado de fosforilación de la proteína EIIA (Trejo *et al.* 2017) (Fig.5) y abaten la síntesis de PHB y de alquilresorcinolos (Nóñez *et al.* 2008, Muriel-Millan *et al.* 2015), indicando

que en su forma no fosforilada la proteína EIIA actúa como un efector negativo de la síntesis de estos polímeros. Esta inhibición es causada por la represión de la transcripción de *phbR* y *arpR* (Muriel-Millan *et al.* 2015).

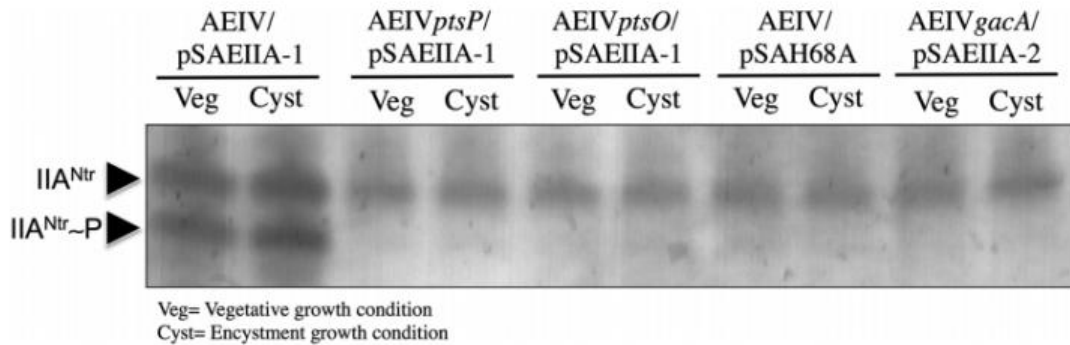


Fig.5. PAGE nativo en donde se identifica la proteína EIIA^{Ntr} fosforilada (IIA^{Ntr}~P) y no fosforilada (IIA^{Ntr}). Se observa una disminución significativa de la forma fosforilada en mutantes *ptsP ptsO* y *gacA* comparadas con la cepa silvestre. (Trejo *et al.* 2017).

El efecto negativo sobre la transcripción de el gene *phbR* observado en presencia de la proteína EIIA^{Ntr} no fosforilada es en parte consecuencia de que en su estado no fosforilado induce la degradación del factor sigma RpoS mediante un mecanismo que involucra el complejo proteolítico *ClpA/P* (Muriel-Millan *et al.*, 2017) (Fig.6).

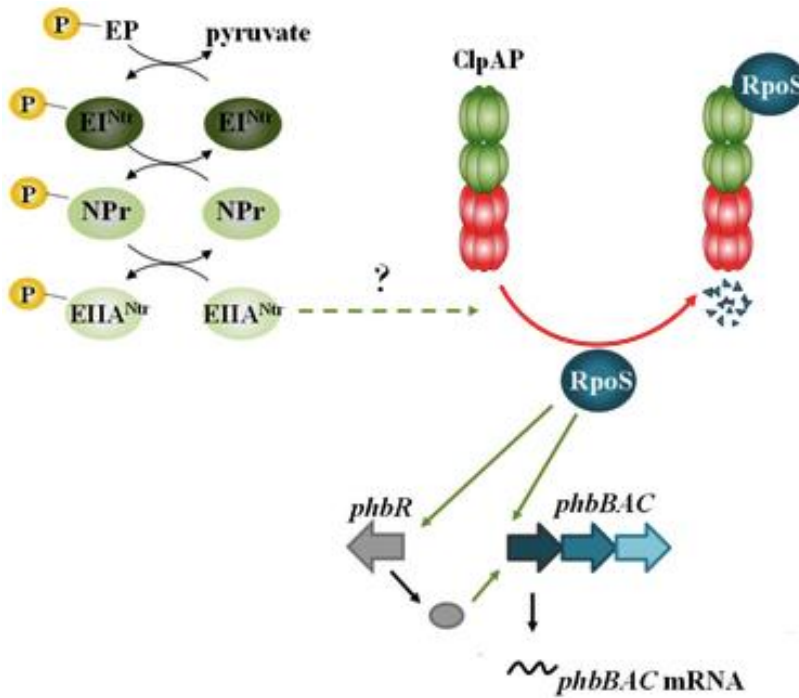


Fig.6. Modelo de regulación de síntesis de PHB por medio del sistema Gac-PTS^{Ntr}. En *A. vinelandii* el estado de EIIA desfosforilado induce la degradación de RpoS mediante un mecanismo que involucra el complejo proteolítico ClpA/P (Muriel-Millan *et al*, 2017)

En la actualidad no se ha detallado la manera en la cual el estado de fosforilación de EIIA^{Ntr} influye sobre el mecanismo por el cual el complejo ClpA/P degrada RpoS, sin embargo, se sabe que en ausencia de *ptsN* (EIIA^{Ntr}), al igual que en una mutante *clpA* o *clpP*; RpoS tiene mayor estabilidad (Fig.7) (Muriel-Millan *et al.* 2017), por lo que *A. vinelandii* es capaz de producir PHB en estas mutantes (Nóñez *et al.* 2008)

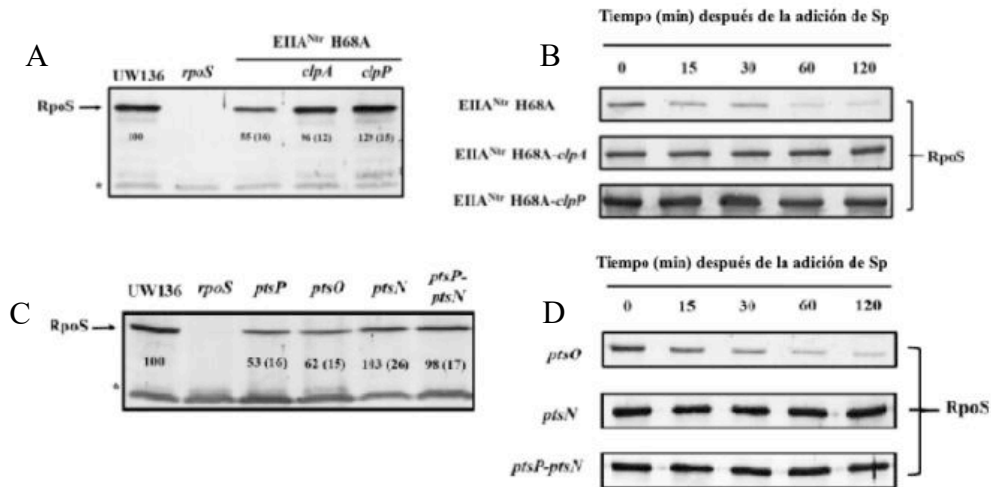


Fig.7. Detección de RpoS por Western Blot. El estado no fosforilado de EIIA^{Ntr} reduce los niveles y la estabilidad de RpoS, como se puede apreciar en A) donde se observa la cepa EIIA Ntr H68A (donde EIIA es incapaz de fosforilarse) y sus cepas derivadas con mutaciones en *clpP* o *clpA*, donde se reestablecen los niveles de RpoS. B) Estabilidad de RpoS en las cepas descritas en el panel A. C) RpoS detectado en cepas UW mutantes para *ptsP*, *ptsO*, *ptsN*, y *ptsN/ptsP*. D) Estabilidad de RpoS en las cepas descritas en el panel C. (Muriel-Millan *et al.* 2017)

Recientemente se ha reportado que GacA también afecta el estado de fosforilación de EIIA^{Ntr} ya que en una mutante *gacA* la proteína EIIA^{Ntr} se encuentra en su estado no fosforilada (Fig.5), por lo cual se propuso la existencia de una vía Gac-PTS^{Ntr} que controla la síntesis de PHB (Trejo *et al.* 2017).

3.JUSTIFICACIÓN

La inactivación de los genes *rsmA* y *ptsN* no contrarresta los efectos negativos en la síntesis de PHB producidos por la mutación de *gacA*.

La cepa silvestre UW136 no mucóide de *Azotobacter vinelandii* produce 916.59 mg de PHB por mg de proteína en medio PY (Peptone Yeast), la inactivación de *gacA* en UW136 reduce la síntesis de PHB hasta 15.99 mg de PHB por mg de proteína (Hernández-Eligio, *et al.* 2012), esta reducción se debe al efecto de regulación positiva que ejerce *gacA* ya que, por un lado en su ausencia no se transcriben los sRNAs RsmZ/Y, dejando de este modo libre a la proteína RsmA que afecta de modo negativo la traducción de los transcritos de *phbR* y *phbB*. Por otro lado, esta mutación provoca que EIIA^{Ntr} se encuentre en su estado no fosforilado ejerciendo su efecto negativo sobre la transcripción de *phbR* al degradarse RpoS; por lo tanto, los efectos negativos sobre la síntesis de PHB en ausencia de GacA son causados mediante la acción de RsmA y EIIA^{Ntr} no fosforilada. Como se describió previamente, GacA regula la síntesis de PHB de manera indirecta mediante la modulación de la estabilidad de RpoS mediado por EIIA^{Ntr}. La cepa UW136 no puede producir alquilresorcinolos de forma natural, pero se puede inducir su síntesis mediante su cultivo en medio BS n-butanol, por otro lado la cepa mucóide de *A. vinelandii* AEIV, a diferencia de UW136, tiene la capacidad de enquistarse y producir alquilresorcinolos sin necesidad de que este proceso sea inducido. En esta cepa RpoS regula el enquistamiento, así como la síntesis de otros componentes como los alquilresorcinolos (ARs) mediante el gen esencial para la síntesis de ARs *arpR* cuya transcripción es dependiente de RpoS (Romero *et al* 2013, Trejo *et al.* 2017). Dado que solo se conocen dos vías de acción de GacA: Gac-Rsm y Gac-PTS^{Ntr}, formulamos la hipótesis que el efecto negativo en la síntesis de PHB, ARs y enquistamiento observados en una mutante *gacA* sería contrarrestado mediante la inactivación de EIIA (*ptsN*), y RsmA (*rsmA*), sin embargo los fenotipos negativos de producción de alquilresorcinolos y formación de quistes son similares en la cepa AEIV triple mutante MTRP (*gacA/ptsN/rsmA*) y AEIV *gacA*(Fig.8) (Trejo *et al.* 2017), esto sugiere que el regulador GacA puede estar actuando mediante otra vía independiente de las vías Gac-Rsm y Gac-PTS^{Ntr}, en la síntesis de alquilresorcinolos mediada por RpoS, y dado que la síntesis de PHB también depende de RpoS es probable que también se vea afectada en este fondo genético. Adicionalmente la búsqueda de sitios de unión de GacA en el genoma de *A. vinelandii*, solo detecta sitios correspondientes a los sRNAs RsmZ/Y.

Es importante mencionar que la cepa AEIV de *A. vinelandii* ha sido utilizada para estudiar la genética molecular de la síntesis de AR y la formación de quistes, así como la síntesis del alginato, un polisacárido esencial para la formación de los quistes resistentes a la desecación (Cocotl-Yañez *et al.* 2014.). Por otro lado, la

cepa OP y su derivada resistente a rifampicina UW136 las cuales son incapaces de producir alginato, y por lo tanto también incapaces de formar quistes, han sido utilizadas en nuestro grupo para estudiar la genética molecular de la síntesis de PHB (Hernandez-Eligio *et al.* 2011; Hernandez-Eligio *et al.* 2012; Peralta-Gil *et al.* 2002; Segura *et al.* 2003; Segura & Espín 1998).

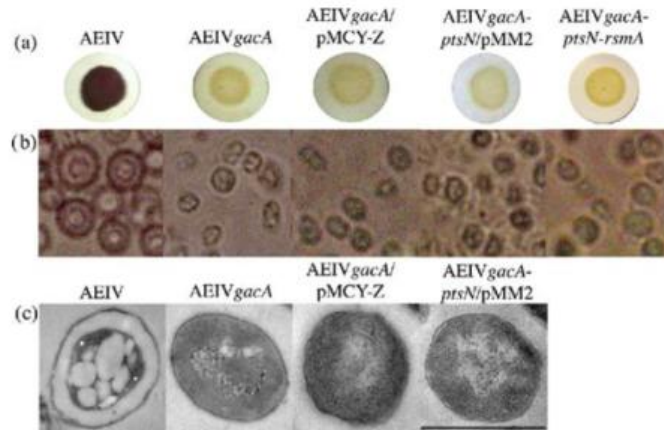


Fig.8. Inducción de enquistamiento de cepa AEIV de *Azotobacter vinelandii*. A) tinción de alquil resorcinoles cepas WT AEIV, AEIVgacA, AEIVgacA/pGyrZ con resistencia a kanamicina, AEIVgacA/pMM2 con pJB3Tet20 que acarrea el gen *rsmZ1* bajo el promotor lac B) Micrografías de contraste de fase de cepas teñidas inducidas para enquistamiento, C) Micrografías electrónicas. Barra de escala, 0,5 μ m. (Trejo *et al.* 2017)

Por lo anterior en este proyecto se abordaron las preguntas ¿La inactivación de *ptsN* y *rsmA* en una cepa derivada de la mutante OPgacA restaura la síntesis de PHB? Y en el caso de que no se restaure, surge la pregunta: ¿Por qué no hay restablecimiento de los fenotipos causados por la mutación *gacA* donde se han inactivado los reguladores negativos RsmA y EIIANtr?

4.HIPÓTESIS

GacA regula la síntesis de PHB por otra vía alterna a las vías canónicas Gac-Rsm y Gac-PTSNtr.

5.OBJETIVOS

General

Identificar vías de regulación encabezadas por GacA alternas a las vías RsmA y PTSNtr

Particulares

- Establecer en la cepa OP, la existencia de la vía alterna de regulación, dependiente de GacA (reportada en la cepa AEIV) que regula la síntesis de PHB.
- Identificar blancos de GacA que participan en la regulación de la síntesis de PHB por la vía(s) alterna a RsmA y PTSNtr
- Identificar proteínas afectadas en un fondo *rsmA/ptsN/gacA* vinculadas a la síntesis de PHB
- Proponer vías alternas de regulación de GacA

6.METODOLOGÍA

6.1.Cepas bacterianas empleadas

Las cepas utilizadas y construidas en este trabajo se resumen en la tabla 1 junto con sus características.

Tabla 1.

Cepa	Descripción	Referencia
Cepas de <i>Azotobacter vinelandii</i>		
OP	Wild type	J. A. Bush & P.W. Wilson (1991)
MTRP	Derivada de cepa OP <i>rsmA::sp</i> con mutación <i>ptsN::tet/gacA::gm</i>	Este trabajo
MTRP _{<i>gacA</i>}	Derivada de cepa MTRP complementada con el plasmido <i>pkgacA</i>	Este trabajo
OPNA	Derivada de la cepa OP <i>rsmA::sp</i> con mutación <i>ptsN::km</i>	García A. <i>et al.</i> (2014)
Op _{<i>ptsN</i>}	Derivada de cepa OP con mutación en <i>ptsN::tet</i>	Este trabajo
OP _{<i>ptsN rsmA</i>}	Derivada de cepa OP con mutación en <i>ptsN::tet</i> y <i>rsmA::sp</i>	Este trabajo
UW136 _{<i>gacA</i>}	Derivada de cepa UW136 con mutación en <i>gacA::gm</i>	Hernandez-Eligio <i>et al.</i> (2012)
UW136 _{<i>ptsP</i>}	Derivada de cepa UW136 con mutación en <i>ptsP::km</i>	Muriel-Millán <i>et al.</i> (2015)
UW136 _{<i>rsmA</i>}	Derivada de cepa UW136 con mutación en <i>rsmA::sp</i>	Hernandez-Eligio <i>et al.</i> (2012)
MTRP _{<i>Km</i>}	Derivada de cepa OP <i>rsmA::sp/ptsN::km</i> con mutación en <i>gacA::gm</i>	Este trabajo
Op _{<i>gacA</i>}	Derivada de cepa OP con mutación en <i>gacA::gm</i>	Este trabajo
OP _{<i>gacA/rsmA</i>}	Derivada de cepa OP con mutación en <i>gacA::gm/rsmA::sp</i>	Este trabajo

OP _{ptsN/gacA}	Derivada de cepa OP con mutación en <i>ptsN::tet/gacA::gm</i>	Este trabajo
OP _{clpA/gacA}	Derivada de cepa OP con mutación en <i>clpA::Km/gacA::gm</i>	Este trabajo
Cepas <i>E. coli</i>		
<i>E. coli pKgacA</i>	Derivada de <i>E. coli</i> Top10 que contiene al plásmido <i>pKgacA</i>	Este trabajo
Plásmidos		
pJET <i>gacA</i>	Plásmido derivado de pJET 1.2 con <i>gacA</i> WT con marcador de selección a tetraciclina	Este trabajo
p <i>kgacA</i>	Plásmido pk18mob con resistencia a kanamicina y copia del gen WT <i>gacA</i> bajo su propio promotor	Este trabajo
pJET <i>ptsN::tet</i>	Plásmido derivado de pJET <i>ptsN</i> con <i>ptsN::tet</i>	Este trabajo

6.2. Condiciones de crecimiento

Medio mínimo Burk-sacarosa (BS)

Las cepas de *Azotobacter vinelandii* fueron sembradas en medio mínimo (BS) con 0.79 mM de $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 0.83 μM de $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.018mM de $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.5mM de $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 1.3 mM Na_2SO_4 , 4.6 mM de K_2HPO_4 , 1.5 mM de KH_2PO_4 y sacarosa al 2%. Las cepas se incubaron 48 horas a 30 °C.

Para el crecimiento de las cepas de *A. vinelandii*, se adicionó al medio los antibióticos correspondientes en las siguientes concentraciones: kanamicina 1ug/mL y un máximo de 3 ug/mL para seleccionar mutantes, gentamicina 0.5 ug/mL y un máximo de 1 ug/mL, espectinomicina 100 ug/mL y tetraciclina 30 ug/mL.

Medio de competencia (CM)

Para la construcción de mutantes por transformación, *A. vinelandii* fue cultivada en medio CM para obtener células competentes. Dicho medio esta preparado con los mismos componentes que el medio BS sin la adición de $FeSO_4$ ni $NaMoO_4$ y sin antibióticos. El proceso para obtener competentes consta de dos siembras consecutivas de *A. vinelandii*, la primera por 48 horas y la segunda por 24 a 30 °C. Tras la obtención de células competentes de la segunda siembra, éstas fueron transformadas añadiendo DNA cromosomal o de el plásmido con la construcción de interés.

Medio agar peptona extracto de levadura (PY)

Para evaluar la producción de PHB las cepas de *A. vinelandii* fueron preinoculadas en medio Agar BS e incubadas a 30 °C por 48 horas, y posteriormente las cepas se sembraron en medio agar PY 2% sacarosa y se incubaron a 30 °C por 48 horas.

Medio líquido peptona extracto de levadura (PY)

Para la preparación de cultivos para la realización de proteoma comparativo, las cepas MTRP y MTRP/*gacA* de *A. vinelandii* fueron preinoculadas en medio PY líquido 2% sacarosa por 20 horas a 30 °C y posteriormente se inocularon de nuevo en medio PY 2% sacarosa por 36 horas a 30 °C.

Cepas de *E. coli*

Las cepas de *E. coli* empleadas en este trabajo fueron cultivadas en medio Luria Bertani (LB) líquido o sólido adicionado con antibióticos de selección e incubadas a 37 °C por 24 horas.

6.3.Construcción de plásmidos

Plásmido pJET*gacA*

Para la construcción de el plásmido pJET*gacA* se clonó *gacA* WT bajo su propio promotor en el plásmido pJET1.2. El fragmento de *gacA* WT se obtuvo a partir del producto de PCR para el cual se diseñaron los oligonucleótidos *Fw* 5' ATCAGGCAACTCTCCGCAAGG 3' y *Rv* 5' GGTGGTTTCGACTTGGGCTAT 3' que abarca la región reguladora, más 106 pb río arriba y 206 pb río abajo dando un producto total de 1313 pb (Fig.9). El producto obtenido fue clonado en el vector pJET 1.2 en el sitio EcoRV, y se comprobó la construcción mediante patrones de restricción con BglII (Fig.10B). Además la secuencia de *gacA* fue corroborada mediante secuenciación llevada a cabo por la unidad de secuenciación del instituto (Fig.11). Para tener un marcador de selección del plasmido, se procedió a clonar el cassette de tetraciclina (2000pb) en el sitio Scal de la construcción pJET*gacA*.

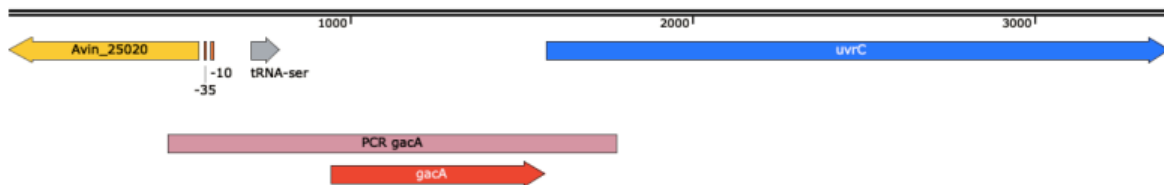


Fig.9. Contexto genómico de *gacA* en *A. vinelandii*. En rosa se muestra la región amplificada por PCR y en naranja los sitios -10 y -35.

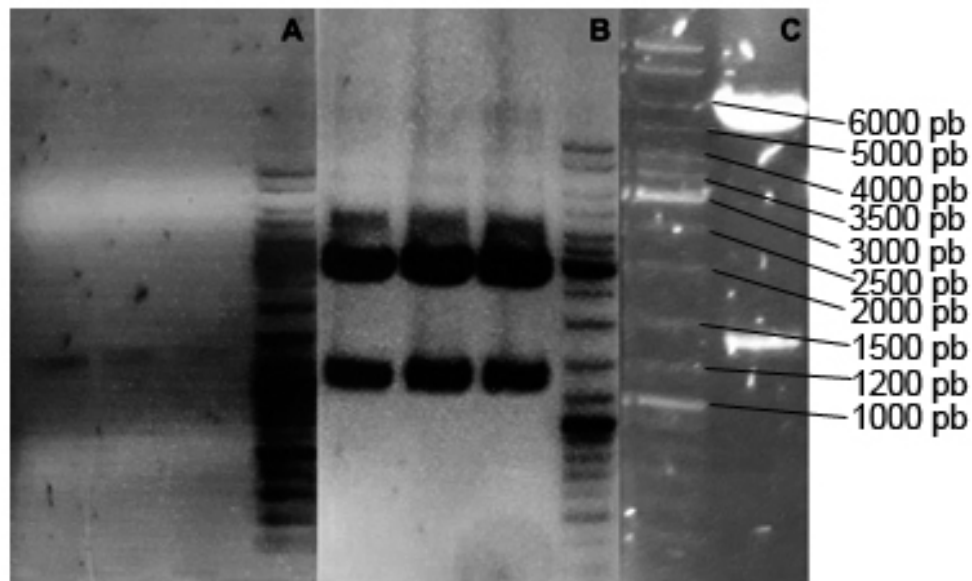


Fig.10. A) PCR de *gacA*. B) Digestión de pJET*gacA* con BglIII. C) Digestión de pJET*gacA*::*tet* con BglIII.

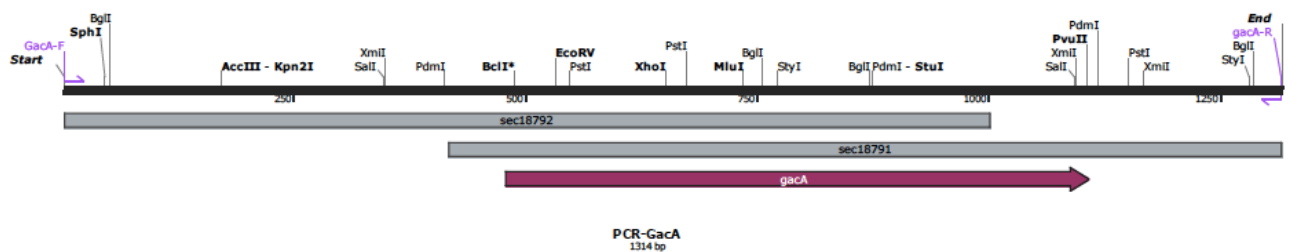


Fig.11. Emparejamiento de la secuencia de *gacA* con secuencia de fragmento amplificados por PCR.

Plásmido pJET*ptsN*::*tet*

Se construyó el plásmido pJET*ptsN*::*tet* a partir del plásmido pJET*ptsN* WT (pJET*ptsN*), en el cual se hicieron digestiones parciales en los sitios *Clal* y se clonó el cassette de resistencia a tetraciclina. Ya que pJET*ptsN* contiene dos sitios *clal*, para comprobar que el cassette de tetraciclina fuese clonado en el sitio *Clal* de *ptsN* y no en el sitio *Clal* del vector pJET, se realizó un patrón de restricción in silico con *HindIII* de los posibles plásmidos resultantes, tanto los que tenían el cassette en el sitio *Clal* de pJET como en el sitio *Clal* de *ptsN* y se probaron distintas candidatas resistentes a tetraciclina obtenidas (Fig.12 y 13).

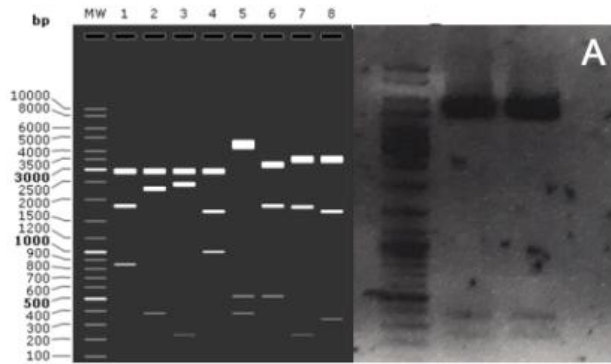


Fig.12. Patrón de restricción predicho para candidatas resistentes a tetraciclina de pJET*ptsN*. Los carriles 1-4 muestran el patrón de restricción predicho para la construcción donde *ptsN* no está interrumpido por el cassette de tetraciclina, los carriles 5-8 muestran el patrón de restricción predicho para la construcción donde *ptsN* está interrumpido por el cassette de tetraciclina. A) Muestra el patrón de restricción obtenido experimentalmente y que corresponde al patrón predicho del carril 5 de la construcción donde *ptsN* está interrumpido por el cassette de tetraciclina.

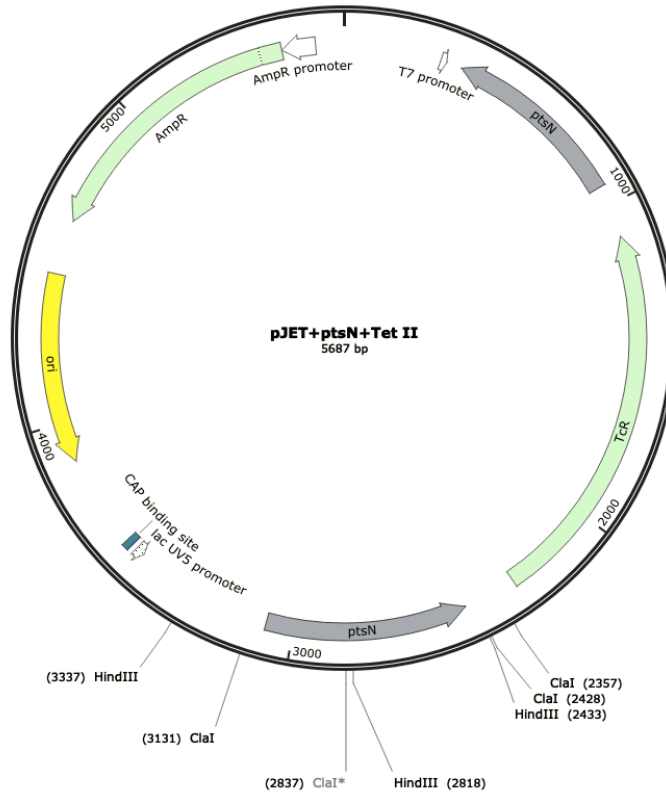


Fig.13. Construcción de plásmidos correspondiente de acuerdo al patrón de restricción observado con HindIII.

Plásmido pKgacA

Para la construcción del plásmido pKgacA se clonó el fragmento de *gacA*, extraído del plásmido pJET*gacA* con BglII, en el sitio de restricción BamHI del plásmido pk18mob con marcador de selección para kanamicina. Una vez obtenidas colonias candidatas resistentes a kanamicina se procedió a digerir con SacI y se realizó una predicción de patrón de restricción (Fig.14) para comprobar la inserción de *gacA* dentro del plásmido.

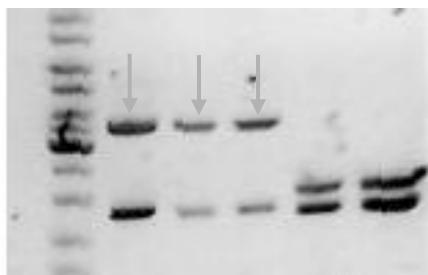


Fig.14. Patrones de restricción predichos por SNAPgene con *SacI* para los plásmidos pK18 mob *gacA* con *gacA* WT clonado. Las flechas indican los patrones de restricción donde *gacA* fue clonado en la manera esperada.

6.4. Construcción de cepa triple mutante para los genes *rsmA*, *ptsN* y *gacA* (MTRP) derivada de la cepa OP.

Con el objeto de establecer la existencia de la vía alterna de regulación, dependiente de GacA en la cepa OP y su papel en la regulación de la síntesis de PHB, se realizó la construcción de una cepa triple mutante MTRP (*OPrsmA-ptsN-gacA*). La construcción se comenzó a partir de la cepa mutante OP *rsmA::sp*, la cual se transformó con el plásmido pJET *ptsN::tet* y posteriormente transformada con DNA cromosomal de la cepa UW *gacA*⁻, obteniendo así la cepa *rsmA*⁻ /*ptsN*⁻ /*gacA*⁻ (MTRP). Las mutaciones fueron comprobadas por PCR (Fig.15.).

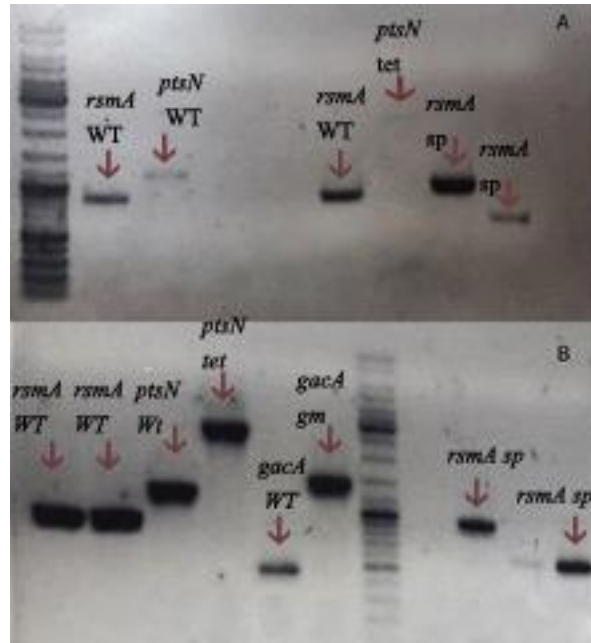


Fig.15. a) PCR de cepa WT y cepa OPNA (*rsmA*⁻ /*ptsN*⁻) b) PCR de cepa WT y cepa MTRP (*rsmA*⁻ /*ptsN*⁻ /*gacA*⁻)

6.5. Complementación de cepa triple mutante (MTRP) con pKgacA

La complementación de la cepa MTRP con pKgacA se llevó a cabo por medio de un proceso de cruce triparental usando la cepa MTRP como receptora, *E. coli* pKgacA como donadora y la cepa DH5α2013 *helper*, dando como resultado la cepa MTRP/*gacA*. La complementación en MTRP/*gacA* fue comprobada mediante PCR (Fig.16.).

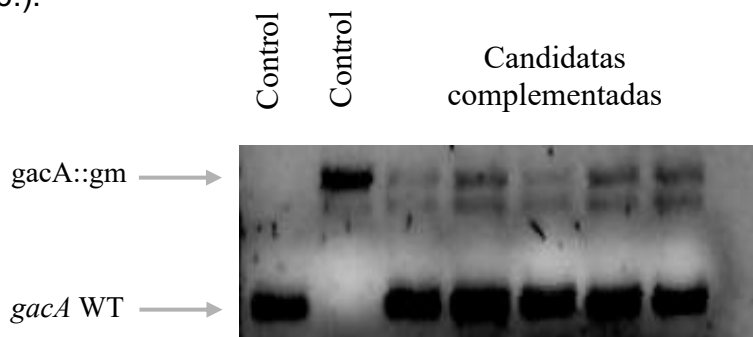


Fig.16. Comprobación por PCR de cepa MTRP complementada con pKgacA

6.6.Preparación de células para la determinación de los proteomas

Un total de 6 cultivos incubados durante 36 h en medio PY (cepa MTRP y MTRP/*gacA* con sus respectivos triplicados) se utilizaron para la realización del proteoma, los cuales se centrifugaron por 10 min a 1150 rpm a 4 °C, seguido de 10min a 4-10 °C 2200 rpm. Posteriormente se descartó el sobrenadante y la pastilla de células fue resuspendida en 5 mL de la solución amortiguadora para lisis Tris HCl 100 mM pH 8.6, SDS 4%, DTT 10 mM, glicerol 10%, adicionada con una tableta cOmplete de inhibidores de proteasa usada para un total de 70 mL de preparación de la solución.

Las muestras resuspendidas en la solución amortiguadora para lisis, fueron sonicadas en 5 ciclos de 30 segundos por 1 min de reposo en hielo. La determinación del nivel de proteínas de cada muestra se estimó siguiendo el protocolo de Bradford (1976).

Las muestras fueron procesadas y analizadas por el Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM. Las proteínas se redujeron y alquilaron, precipitaron con 9 volúmenes de etanol frío durante toda la noche a -20°C. El sedimento se lavó tres veces con una solución de etanol al 90%. La muestra se solubilizó en 50 mM de bicarbonato de amonio, deoxicolato de sodio al 0,5%. Se digirieron con tripsina a una relación de 1:50 (enzima: sustrato) incubando durante 16 horas a 37°C. Se eliminó el deoxicolato mediante extracción con acetato de etilo en condiciones ácidas (se añadió 1 volumen de acetato de etilo a la muestra), se agregó TFA a una concentración final de 0,5%). Después de agitación vigorosa y centrifugación 10 min a 10,000 xg, la fase orgánica se desechó. Se realizó una de extracción adicional con un volumen de acetato de etilo sin TFA. Finalmente, la mezcla de péptidos se desala mediante cromatografía de fase reversa (C18 seppak). Los péptidos se evaporan en speed vac y se almacenan a -80° C hasta su análisis mediante LC-MS / MS. Los péptidos se resuspendieron y se separaron en un cromatógrafo Dionex Ultimate 3000, RSLC Nano UHPLC acoplado a un espectrómetro de masas de alta resolución Q-Exactive Plus (Thermo Fisher Scientific). 2 ug de péptidos fueron inyectados, pasados por una precolumna (C18 PepMap 100, 5 µm, 100 A, 300 µm de diámetro interno x 5 mm), luego se separaron siguiendo un gradiente de elución de 130 minutos utilizando una columna capilar a 250 nl / min (EASY Spray Column,

PepMap RSLC, C18, 3 μ n, 100A, 75 μ m x 150 mm) Las fases móviles utilizadas fueron las siguientes: fase A, 0,1% de ácido fórmico en agua y fase B, 90:10 (v / v) acetonitrilo: agua, 0,1% de ácido fórmico. La adquisición dependiente de datos se realizó en modo positivo, el rango completo de MS de 300 a 2,000 m z. Los 10 iones más intensos se aislaron en el cuadrupolo y se fragmentaron con una energía de colisión normalizada del 27%. Los iones precursores se midieron a una resolución de 70,000 (a 200 m/z), y los fragmentos a una resolución de 17,500. Solo los iones con estados de carga 2 o más fueron fragmentados con una ventana de aislamiento de 2 Th. Los datos generados fueron analizados utilizando la plataforma de análisis Max Quant.

Los datos generados por Max Quant fueron procesados mediante la plataforma ProteoMM, con el cual se realizó un análisis de expresión diferencial de los múltiples grupos de datos de manera simultánea para ser filtrados de acuerdo con el nivel *fold-change* y un valor único de P, P=0.005.

7.RESULTADOS

7.1.Vía alterna a las vías Gac-rsmA y Gac-PTS_{Ntr} encabezada por GacA regula la síntesis de PHB en la cepa OP

En la cepa AEIV*gacA* derivada de la cepa silvestre AEIV productora de alginato, se observaron fenotipos negativos de producción de ARs y formación de quistes al igual que en una triple mutante AEIV*gacA/ptsN/rsmA*, esto nos sugirió que *gacA* puede estar involucrado en ambos procesos mediante algún mecanismo independiente de las vías Gac-Rsm y Gac-PTS_{Ntr} y dado que la síntesis de PHB depende de RpoS al igual que la síntesis de ARs, formulamos la hipótesis de que una cepa OP*gacA-rsmA-ptsN* (que llamamos MTRP) (Fig.17) era incapaz de sintetizar PHB. Como se observa en las Fig. 18 y 19, el fenotipo de producción de PHB observado en la cepa MTRP crecida 48 h en medio sólido PY (2% glucosa) es similar al de la mutante sencilla Op *gacA*, es decir las mutaciones *ptsN* y *rsmA* no restauran la capacidad de producir PHB en la mutante *gacA*. Este resultado sugiere que en la cepa OP está presente la vía alterna a las vías GacA-PtsN y GacA-Rsm y que esta vía también controla la síntesis de PHB.

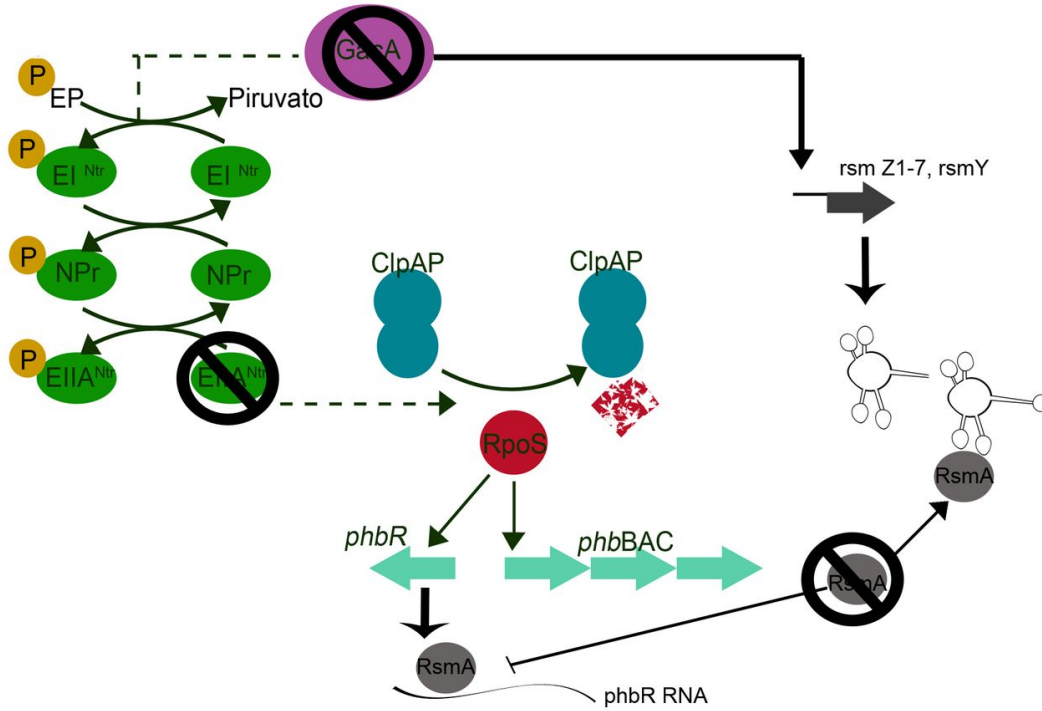


Fig.17. En la cepa mutante MTRP la vía Gac-Rsm y Gac-PTS^{Ntr} están inactivadas.

Para comprobar que el fenotipo negativo de síntesis de PHB en la cepa MTRP es causado por la mutación *gacA*, se realizó la complementación de esta cepa con un gene *gacA* silvestre dando origen a la cepa MTRP/*gacA* la cual como se muestra en las Fig. 18 y 19, tiene un fenotipo de producción de PHB similar al de la cepa silvestre.

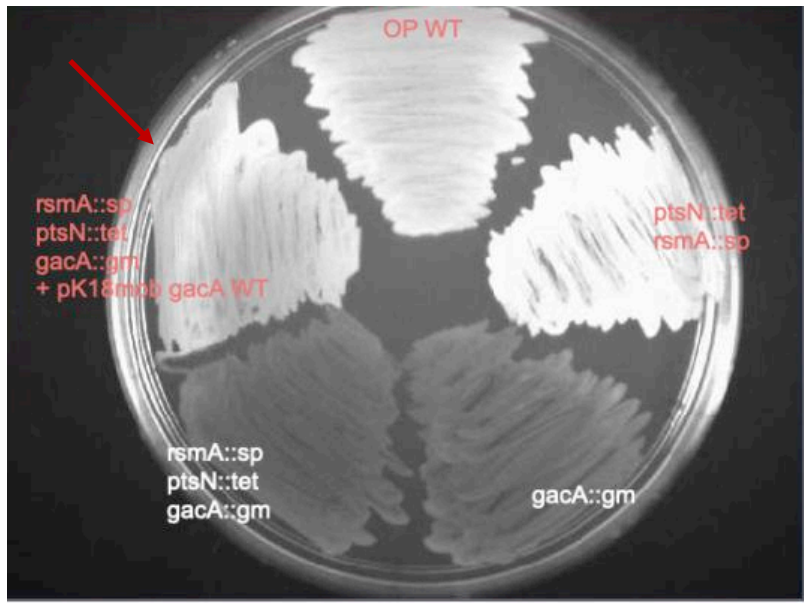


Fig.18. Complementación de cepas de de *A. vinelandii* en medio sólido PY. La cepa MTRP complementada esta señalada en rojo.

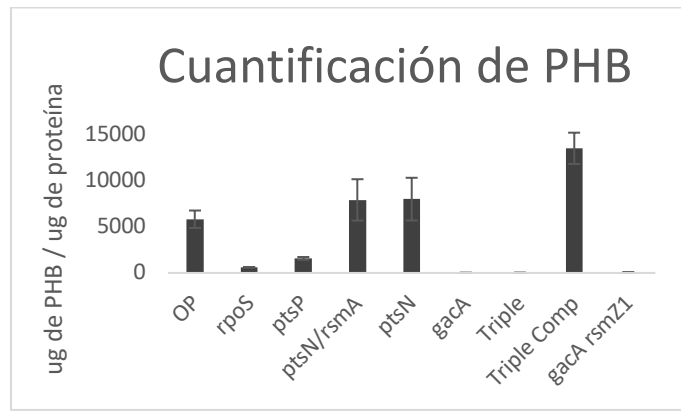


Fig.19. Gráfica de cuantificación de PHB

7.2.RpoS está disminuido en la cepa MTRP

La activación de los genes *phbR* y *phbBAC* para la síntesis de PHB dependen del factor de transcripción σ RpoS, el cual es degradado por el complejo ClpPA cuando la proteína EIIA^{Ntr} se encuentra en su forma no fosforilada, como es el caso en las cepas mutantes AEIV*gacA* (Trejo *et al.* 2017) o AEIV*ptsP* (Muriel Millan *et al.* 2017). Cuando se inactiva el gene *ptsN* (EIIA^{Ntr}) en la cepa mutante *ptsP* se restauran los niveles de RpoS, además la mutante *ptsN* (que elimina a la proteína EIIA^{Ntr} fosforilada y no fosforilada) aumenta el nivel de este factor de transcripción. Basado en los datos mencionados, se formuló la hipótesis que la inactivación de *ptsN* en la mutante MTRP podría restaurar niveles de RpoS ya que se estaría eliminando a la proteína EIIA^{Ntr} no fosforilada. Para probar esta hipótesis, se realizó un ensayo de Western Blot para determinar los niveles de RpoS en la mutante MTRP crecida en medio PY por 48 hrs siguiendo el protocolo de Muriel-Millan *et al.* (2017). Los resultados obtenidos muestran que en la cepa MTRP los niveles de RpoS están disminuidos de manera similar a los mostrados en las cepas UW*ptsP* y UW*gacA* y que la complementación de la cepa MTRP con un gene *gacA* silvestre, restaura el nivel de RpoS al nivel observado en la cepa silvestre (Fig.20). Estos resultados sugieren que la ausencia de GacA tiene un efecto negativo sobre RpoS que es adicional al efecto que involucra a la proteína EIIA^{Ntr} no fosforilada.

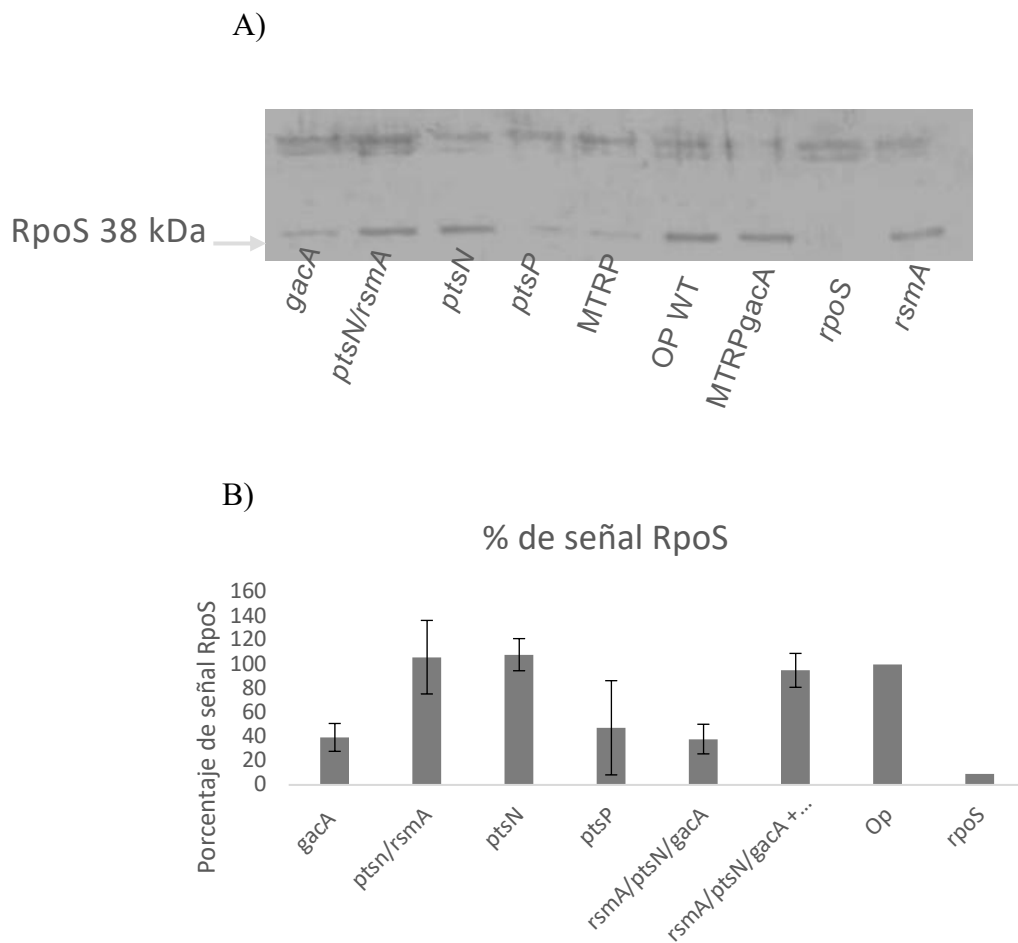


Fig.20. A)Western Blot que muestra la concentración de RpoS, B) Cuantificación de la señal de Western Blot de RpoS por medio del software *Image Studio™ Lite* a partir de tres replicas de western blot.

7.3.La complementación de la cepa MTRP con *gacA* (MTRP/*gacA*) restauró la síntesis de alquilresorcinoles

En *A. vinelandii* para la síntesis de alquilresorcinoles, RpoS es requerido para la transcripción de *arpR*, que codifica para el activador transcripcional del operon biosintético *arsABCD* (Romero *et al.* 2013; Muriel-Millán *et al.* 2015). La síntesis de estos lípidos fenólicos, de manera similar a la síntesis de PHB, esta bajo el control de las vías Gac-Rsm y Gac-PTS^{Ntr}. En un trabajo anterior Trejo *et al.* (2017) propuso que existe una vía alterna a las vías canónicas GacA-Rsm y GacA-PTS^{Ntr} para la síntesis de alquilresorcinoles GacA-ArsA (Fig.21) en la cepa mucoide AEIV, nuestros resultados sugieren que esta misma vía controla la síntesis de PHB. Por lo anterior proponemos que la vía adicional de control por GacA propuesta por Trejo *et al.* (2017), es la misma que la propuesta en este estudio para la regulación de PHB en la cepa OP, ya que tanto en la síntesis de PHB como de alquilresorcinoles está implicado RpoS. Como se muestra en la Fig.19. La cepa MTRP no sintetiza alquilresorcinoles y la complementación con *gacA* la restauró. (Fig.22). Este resultado por tanto es concordante con la propuesta de una vía alterna común.

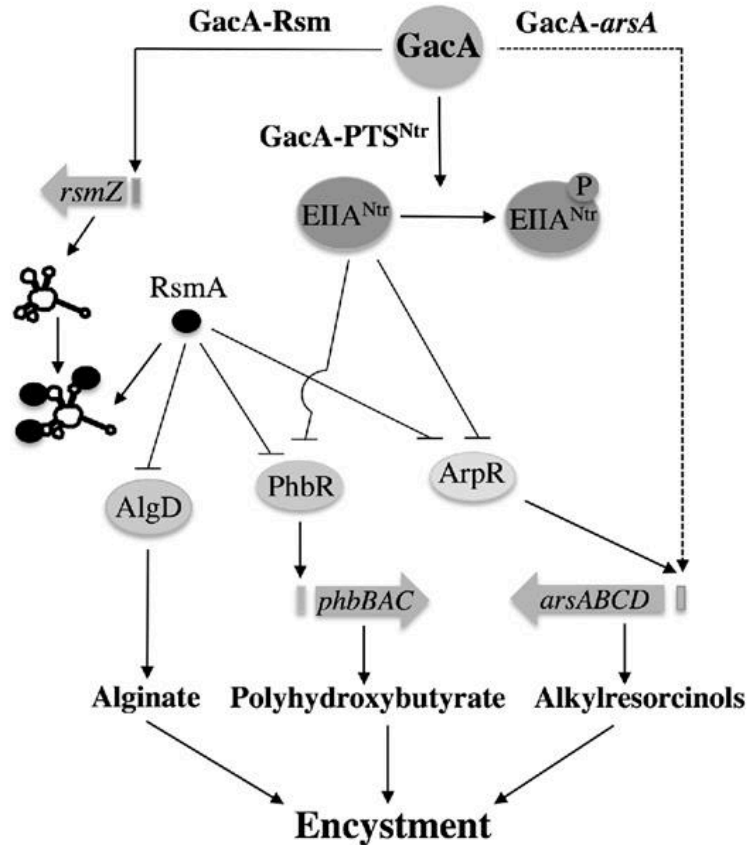


Fig.21. Modelo de las vías que regula GacA para enquistamiento. EIIA no fosforilado y RsmA funcionan como reguladores negativos. RsmA afecta la expresión de AlgD, PhbR y ArpR reprimiendo la traducción de los mRNAs de *algD*, *phbR* y *arpR*. EIIA^{Ntr} no fosforilado afecta la transcripción de *phbR* y *arpR*. En la vía GacA-PTS^{Ntr}, GacA se requiere para la fosforilación de EIIA^{Ntr}; en la vía GacA-RsmA, GacA activa la transcripción de los sRNAs Rsm que secuestran a RsmA actuando como antirrepresores. GacA también es requerido para la transcripción de *arsA* mediante una vía aún no descrita (GacA-arsA).

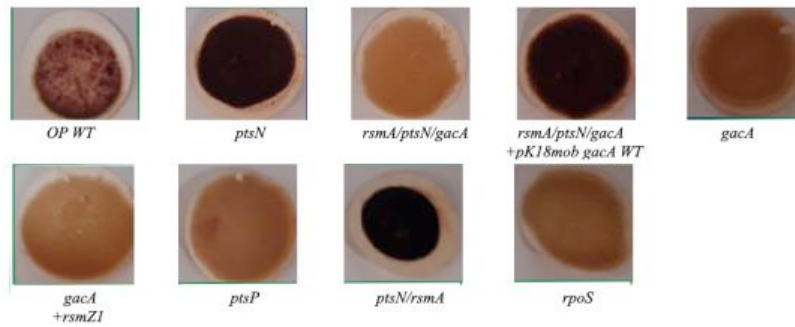


Fig. 22. Producción de alquilresorcinoles mediada por RpoS. Cepas incubadas a 30° C en medio Burk butanol por 4 días para inducción de enquistamiento. La coloración roja indica la presencia de alquilresorcinoles

7.4. Proteoma comparativo de las cepas MTRP y MTRP/*gacA*.

Con el objeto de iniciar la búsqueda de elementos que participan en la vía GacA alterna que regula la síntesis de PHB, se realizó un proteoma comparativo entre las cepas MTRP y MTRP/*gacA*. Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 2. Se identificaron un total de 235 proteínas diferencialmente expresadas de las cuales 225 fueron más abundantes (*Up regulated*) y 10 menos abundantes (*Down regulated*) en la cepa complementada (MTRP/*gacA*).

Tabla 2: Análisis comparativo cepa MTRP/*gacA* respecto a la cepa MTRP.

Gene	Veces de cambio	Ortología KEGG
AvCA6_47540	6.314769	AlgP histon-like Avin47540
AvCA6_51560	5.483608	multidrug efflux pump
rraA	5.232423	regulator of ribonuclease activity A
eda-1	5.088478	2-dehydro-3-deoxyphosphogluconate aldolase / (4S)-4-hydroxy-2-oxoglutarate aldolase
AvCA6_10630	5.065282	biopolymer transport protein ExbB
nifF	4.979933	
pgi2	4.947358	glucose-6-phosphate isomerase

Q44535_AZOVI	4.884844	NA
pepN	4.804832	aminopeptidase N
ccoN	4.517774	cytochrome c oxidase cbb3-type subunit I
AvCA6_41140	4.483213	NA
petA	4.461595	ubiquinol-cytochrome c reductase iron-sulfur subunit
acpP	4.408615	acyl carrier protein
cysE2	4.339618	Serin-acetyl transferase
AvCA6_47570	4.222432	HemY protein
secB	4.149323	preprotein translocase subunit SecB
AvCA6_12560	4.124753	two-component system, response regulator RegA
clpP2	4.080795	ATP-dependent Clp protease, protease subunit
speC	4.051371	ornithine decarboxylase
AvCA6_18600	4.025598	NA
htpX	3.965797	heat shock protein HtpX
AvCA6_01360	3.936008	NA
hflC	3.935766	membrane protease subunit HflC
AvCA6_03530	3.85482	zinc protease
maeB	3.848962	malate dehydrogenase (oxaloacetate-decarboxylating)(NADP+)
mosA	3.846845	molybdenum storage protein
AvCA6_47330	3.827064	Xaa-Pro aminopeptidase
AvCA6_06660	3.801398	NA
oprI	3.789767	NA
AvCA6_51570	3.781963	outer membrane protein, multidrug efflux system
AvCA6_35210	3.755897	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase FklB
oprL	3.744459	peptidoglycan-associated lipoprotein
AvCA6_36820	3.71432	arsenate reductase (glutaredoxin)
aceF	3.68397	pyruvate dehydrogenase E2 component (dihydrolipoamide acetyltransferase)
ddl	3.66262	D-alanine-D-alanine ligase
mvaT	3.651149	HN-S like protein
hemL	3.642641	glutamate-1-semialdehyde 2,1-aminomutase
AvCA6_13410	3.597781	cyclic-di-GMP-binding protein
trxA	3.592289	thioredoxin 1
sthA	3.572402	Soluble pyridine nucleotide transhydrogenase
AvCA6_17680	3.556704	NA
clpA	3.549033	ATP-dependent Clp protease ATP-binding subunit ClpA
tldE	3.521886	PmbA metalloprotease

HupB	3.510836	DNA-binding protein HU-beta
yajC	3.494069	preprotein translocase subunit YajC
AvCA6_12880	3.481066	phospholipid transport system substrate-binding protein
oprF	3.452691	OmpA-OmpF porin, OOP family
aceE	3.451697	pyruvate dehydrogenase E1 component
bfr	3.41391	
argH	3.409958	argininosuccinate lyase
proA	3.392336	glutamate-5-semialdehyde dehydrogenase
metZ	3.391153	O-succinylhomoserine sulfhydrylase
dapD	3.368608	2,3,4,5-tetrahydropyridine-2,6-dicarboxylate N-succinyltransferase
mosB	3.339956	molybdenum storage protein
proS	3.338877	prolyl-tRNA synthetase
ppiD	3.318792	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase D
glyS	3.308515	glycyl-tRNA synthetase beta chain
rplK	3.302267	large subunit ribosomal protein L11
ilvC	3.299458	ketol-acid reductoisomerase
AvCA6_18650	3.298003	NA
AvCA6_05510	3.297635	acetoacetyl-[acyl-carrier protein] synthase
pykA-1	3.290753	pyruvate kinase
gatB	3.277909	aspartyl-tRNA(Asn)/glutamyl-tRNA(Gln) amidotransferase subunit B
lysS	3.277292	lysyl-tRNA synthetase, class II
glnB	3.242928	nitrogen regulatory protein P-II 2
AvCA6_16040	3.234333	HP
zwf-1	3.234168	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
pgm-2	3.233124	2,3-bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase
AvCA6_51550	3.221803	membrane fusion protein, multidrug efflux system
tatA	3.220571	sec-independent protein translocase protein Tata
hisC	3.212497	NA
hslU	3.208444	ATP-dependent HslUV protease ATP-binding subunit HslU
gcvT3	3.185005	Aminomethyltransferase
fruB	3.175545	NA
edd-2	3.162288	phosphogluconate dehydratase
secA	3.15875	preprotein translocase subunit SecA
AvCA6_15420	3.138663	alanine-synthesizing transaminase
ileS	3.120705	isoleucyl-tRNA synthetase
atpF	3.115612	F-type H ⁺ -transporting ATPase subunit b

DLDH_AZOVI	3.101104	
purF	3.088687	Amidophosphoribosyltransferase
AvCA6_17670	3.076513	Fructokinase
phoU	3.029263	phosphate transport system protein
eno-1	3.022518	Enolase
gyrA	3.022056	DNA gyrase subunit A
ppa	3.0102	inorganic pyrophosphatase
rpml	3.001932	large subunit ribosomal protein L35
AvCA6_06540	2.999772	single-strand DNA-binding protein
rph	2.979175	ribonuclease PH
coq7	2.96277	3-demethoxyubiquinol 3-hydroxylase
glfA	2.944784	citrate synthase
valS	2.938465	valyl-tRNA synthetase
minC	2.920392	septum site-determining protein MinC
rpsE	2.913321	small subunit ribosomal protein S5
prs	2.885251	ribose-phosphate pyrophosphokinase
ppsA	2.885242	pyruvate, water dikinase
infC	2.882784	translation initiation factor IF-3
proC	2.879062	pyrroline-5-carboxylate reductase
grpE	2.877564	molecular chaperone GrpE
icd	2.863422	
argB	2.853431	acetylglutamate kinase
purA	2.842243	NA
dapB	2.800671	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate reductase
ndh	2.78973	NADH dehydrogenase
rpsL	2.770992	small subunit ribosomal protein S12
AvCA6_40270	2.734723	YfgM periplasmic chaperone
eftA2	2.728811	electron transfer flavoprotein alpha subunit
metF	2.726086	methylenetetrahydrofolate reductase (NADPH)
ettA	2.709934	NA
sdhB	2.677565	succinate dehydrogenase / fumarate reductase, iron-sulfur subunit
AvCA6_50820	2.674205	type VI secretion system secreted protein Hcp
groS	2.663278	chaperonin GroES
cspA	2.639019	cold shock protein (beta-ribbon, CspA family)
zwf-2	2.630533	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase
ndk	2.621748	nucleoside-diphosphate kinase
AvCA6_27210	2.602404	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP+)
AvCA6_41320	2.58824	uncharacterized lipoprotein

accA	2.576666	acetyl-CoA carboxylase carboxyl transferase subunit alpha
dacA	2.573502	serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase (penicillin-binding protein 5/6)
argG	2.551556	argininosuccinate synthase
nifS	2.548584	cysteine desulfurase
sucB	2.547928	
accC	2.546048	acetyl-CoA carboxylase, biotin carboxylase subunit
rpsB	2.540992	small subunit ribosomal protein S2
pykA-6	2.538185	pyruvate kinase
rne	2.500021	ribonuclease E
AvCA6_26320	2.493094	alkyl hydroperoxide reductase subunit F
AvCA6_13630	2.47991	antitoxin CptB
rfbC	2.459408	dTDP-4-dehydrorhamnose 3,5-epimerase
hisD	2.450877	histidinol dehydrogenase
eno	2.448112	Enolase
nusA	2.444857	N utilization substance protein A
erpA	2.444263	iron-sulfur cluster insertion protein
atpC	2.441442	F-type H ⁺ -transporting ATPase subunit epsilon
ribH	2.439274	6,7-dimethyl-8-ribityllumazine synthase
AvCA6_31830	2.435438	NA
ilvD	2.430351	dihydroxy-acid dehydratase
groL	2.429427	chaperonin GroEL
sdhD	2.427447	succinate dehydrogenase / fumarate reductase, membrane anchor subunit
glyA	2.402461	glycine hydroxymethyltransferase
rplT	2.397374	
ribA	2.388455	GTP cyclohydrolase II
AvCA6_40870	2.387006	NA
atpH	2.385292	F-type H ⁺ -transporting ATPase subunit delta
pycA	2.379837	pyruvate carboxylase subunit A
efp	2.379544	elongation factor P
atpA	2.36988	F-type H ⁺ /Na ⁺ -transporting ATPase subunit alpha
fabD	2.369649	[acyl-carrier-protein] S-malonyltransferase
pgl	2.369049	6-phosphogluconolactonase
ribB	2.356539	3,4-dihydroxy 2-butanone 4-phosphate synthase / GTP cyclohydrolase II
gltB	2.35118	glutamate synthase (NADPH) large chain
AvCA6_12870	2.34775	phospholipid/cholesterol/gamma-HCH transport system substrate-binding protein
pepS16	2.344134	ATP-dependent Lon protease

cysK	2.338874	cysteine synthase
AvCA6_09850	2.334977	tellurite resistance protein TerB
AvCA6_23510	2.326713	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B (cyclophilin B)
nqrA	2.321074	Na ⁺ -transporting NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A
etfB2	2.315399	electron transfer flavoprotein beta subunit
aqpZ	2.298276	aquaporin Z
actP2	2.28382	cation/acetate symporter
rpoA	2.279877	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha
AvCA6_17990	2.275127	HNH endonuclease domain protein
rpsN	2.256573	small subunit ribosomal protein S14
AvCA6_11800	2.245117	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SlpA
cysD	2.243976	sulfate adenylyltransferase subunit 2
pgk	2.242383	phosphoglycerate kinase
fesII	2.233886	
lysA	2.230898	diaminopimelate decarboxylase
nifM	2.226936	peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C
rplP	2.226037	large subunit ribosomal protein L16
AvCA6_06390	2.212876	small subunit ribosomal protein S8
pyrG	2.186069	CTP synthase
tsf	2.185465	elongation factor Ts
rpsT	2.170499	small subunit ribosomal protein S20
fabI	2.16942	enoyl-[acyl-carrier protein] reductase I
cysM	2.155349	S-sulfo-L-cysteine synthase (O-acetyl-L-serine-dependent)
ftsA	2.143423	cell division protein FtsA
glmM	2.129393	phosphoglucosamine mutase
rplV	2.127664	large subunit ribosomal protein L22
carA	2.12306	carbamoyl-phosphate synthase small subunit
sucA	2.12183	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component
rplY	2.108857	large subunit ribosomal protein L25
pnp	2.085826	polyribonucleotide nucleotidyltransferase
ppx	2.066394	exopolyphosphatase / guanosine-5'-triphosphate,3'-diphosphate pyrophosphatase
prkA	2.048281	serine protein kinase
AvCA6_20770	2.03324	farnesyl-diphosphate farnesyltransferase
mgo2	2.02943	malate dehydrogenase (quinone)
ilvI	2.013336	acetolactate synthase I/II/III large subunit
cydA	2.008841	
ahcY	1.98691	Adenosylhomocysteinase

tig	1.96678	trigger factor
AvCA6_35040	1.952915	en operon con symporter
aldA	1.952594	aldehyde dehydrogenase
nifU	1.912913	NifU-like protein
rplW	1.890788	large subunit ribosomal protein L23
pckA	1.850996	phosphoenolpyruvate carboxykinase (ATP)
argJ	1.850144	glutamate N-acetyltransferase / amino-acid N-acetyltransferase
modG	1.829992	molybdate transport system regulatory protein
glnA	1.808321	glutamine synthetase
nrdB	1.804174	ribonucleoside-diphosphate reductase beta chain
dapA	1.796962	4-hydroxy-tetrahydrodipicolinate synthase
fusA	1.79269	elongation factor G
AvCA6_41110	1.791792	FKBP-type peptidyl-prolyl cis-trans isomerase SlyD
serA	1.788722	D-3-phosphoglycerate dehydrogenase / 2-oxoglutarate reductase
rpmA	1.781718	large subunit ribosomal protein L27
rplQ	1.771754	large subunit ribosomal protein L17
AvCA6_09040	1.771096	magnesium and cobalt transporter
leuC	1.761675	3-isopropylmalate/(R)-2-methylmalate dehydratase large subunit
dnaJ	1.742483	molecular chaperone DnaJ
guaB	1.72995	IMP dehydrogenase
serS	1.728643	seryl-tRNA synthetase
rplB	1.652611	large subunit ribosomal protein L2
dnaK	1.645231	molecular chaperone DnaK
rplL	1.629215	large subunit ribosomal protein L7/L12
infB	1.620413	translation initiation factor IF-2
rplM	1.597902	large subunit ribosomal protein L13
tyrB	1.57653	aromatic-amino-acid transaminase
rpsD	1.563798	small subunit ribosomal protein S4
hfq	1.556371	host factor-I protein
fabG2	1.546129	3-oxoacyl-[acyl-carrier protein] reductase
lysC	1.537735	aspartate kinase
rplC	1.52865	large subunit ribosomal protein L3
rplN	1.517126	large subunit ribosomal protein L14
atpD	1.50321	F-type H ⁺ /Na ⁺ -transporting ATPase subunit beta
suhB	-1.506995	myo-inositol-1(or 4)-monophosphatase
rpsK	-1.598849	small subunit ribosomal protein S11
guaA	-1.626444	GMP synthase (glutamine-hydrolysing)

tyrS	-1.68869	tyrosyl-tRNA synthetase
AvCA6_02840	-1.993901	En operon con guanylate cyclase
rpmB	-2.3272	large subunit ribosomal protein L28
rfaE	-2.576404	D-beta-D-heptose 7-phosphate kinase / D-beta-D-heptose 1-phosphate adenosyltransferase
purD	-2.875442	NA
AvCA6_37810	-2.908758	NA
sucC	-3.087514	succinyl-CoA synthetase alpha subunit

Una clasificación preeliminar de la participación de las proteínas de la Tabla 2 en procesos celulares se muestra en la Fig.23 e indica que casi la mitad de las proteínas (45%), cuya concentración o expresión aumentó en la cepa complementada participan en el metabolismo celular.

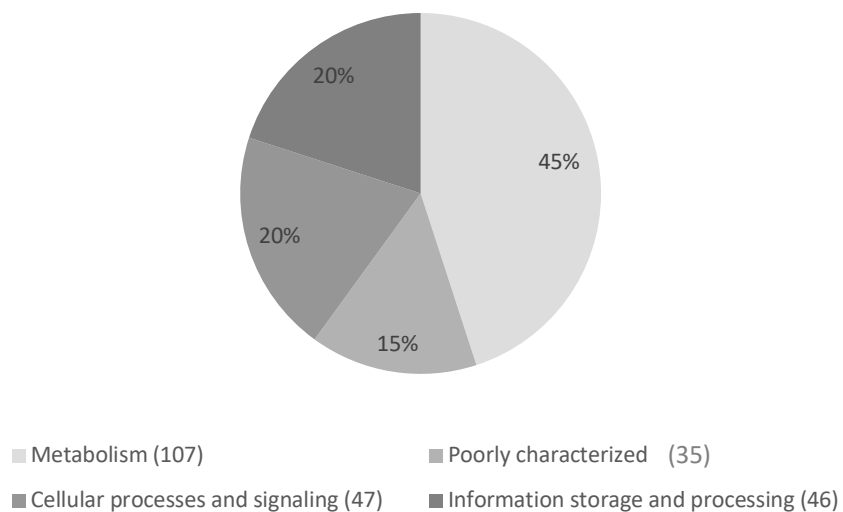


Fig.23. Clasificación de las proteínas encontradas en el proteoma comparativo.

7.5.Las enzimas de la síntesis de PHB

La resolución del proteoma que se realizó, inesperadamente fue limitada, y como se observa en la Tabla 2, no se detectaron proteínas que forman parte de la regulación de la síntesis de PHB como PhbR o en las enzimas de la biosíntesis PhbB, PhbA, y PhbC entre la cepa que no produce PHB MTRP y la MTPR/*gacA* que sintetiza este polímero. Este resultado sugiere que la incapacidad de sintetizar PHB en la cepa MTPR no es causado por la falta de expresión de los genes biosintéticos de PHB. Si este fuera los niveles de los transcritos *phbR* y *phbB* en estas mutantes deberían ser similares a los de la cepa silvestre.

7.6. La vía de Entner-Doudoroff es afectada en la cepa MTRP

Dentro del grupo de proteínas que participan en reacciones del metabolismo celular se observan, enzimas involucradas con el metabolismo de carbohidratos (Tabla 3), que incluyen la vía Entner-Doudoroff en la que glucosa es metabolizada a piruvato. En bacterias es una ruta alternativa al proceso de glucólisis (Chavarría *et al.* 2013), provee energía a través de la fosforilación a nivel de sustrato y tanto esta vía como la vía glucolítica Embden-Meyerhof-Parnas proporcionan los precursores metabólicos necesarios para la biosíntesis. En unos pocos organismos la vía Entner-Doudoroff se emplea en una dirección estrictamente catabólica, se expresa constitutivamente y forma el núcleo del metabolismo central. En la mayoría de las bacterias pertenecientes a la familia *Pseudomonadaceae* a la cual pertenece *Azotobacter vinelandii*, la vía de Entner-Doudoroff forma el núcleo del metabolismo central de los carbohidratos (Conway, 1992). Como se observa en la Fig. 24 algunas de las enzimas que participan en metabolismo de carbohidratos cuya expresión aumentó en la cepa complementada MTRP/*gacA* participan en la vía Entner-Doudoroff y en la vía glicolítica responsables de la síntesis de acetyl-CoA, el sustrato para la síntesis de PHB.

Tabla 3

Proteína	Veces de cambio en MTRP/ <i>gacA</i>	Descripción
----------	--------------------------------------	-------------

Eda-1	5.08	2-ceto-3-deoxy-6-fosfogluconato aldolasa
Zwf-1	3.23	Glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa
Zwf-2	2.6	Glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa
Pgi-2	4.94	Glucosa-6-fosfatp isomerasa
Pgk	2.24	3-fosfoglicerato cinasa
Pgm-2	3.23	Fosfoglicerato mutasa (BPG-independiente, superfamilia AlkP)
Pgl	2.36	6- fosfogluconolactonasa / glucosamina-6-fosfato isomerasa / desaminasa
Edd-2	3.16	Dihidroxiácido deshidratasa / fosfogluconato deshidratasa
Eno	2.44	Enolasa
Eno-1	3.02	Enolasa
PykA-1	3.29	Piruvato cinasa
PykA-6	2.53	Piruvato cinasa
AceF	3.68	Piruvato/2-oxoglutarato complejo deshidrogenasa, dihidrolipoamida dacyltransferasa componente(E2)
AceE	3.45	Piruvato deshidrogenasa complejo, deshidrogenasa componente (E1)
MaeB	3.8	Enzima Málica
PpsA	2.88	Fosfoenol piruvato sintasa
SdhB	2.67	Succinato deshidrogenasa/fumarato reductasa, proteína de subunidad Fe-S
glmM	2.12	Fosfoglucosamine mutase
Avin17670	3.07	Fructokinase
GltA	2.94	Cirate sintase
Avin27210	2.60	Gliceraldehido 3P deshidrogenasa
SucB	2.54	
sdhD	2.42	Succinato deshidrogenasa
pycA	2.37	Piruvato carboxilasa
SucA	2.12	2-oxoglutarato deshidrogenasa El component
Mqo2	2.02	Malto deshidrogenasa

PckA	1.85	Fosfoenolpiruvato carboxilasa
SucC	-3.08	Succinil-CoA sintetasa subunidad alfa

En la Fig. 21, se muestran las vías donde participan las enzimas de metabolismo de carbohidratos que aumentaron o disminuyeron su expresión en la cepa MTRP/*gacA* comparada con la cepa MTRP, estas incluyen a las de la vía Entner-Doudoroff, las cuales se encuentran sobre expresadas en MTRP/*gacA*, se ha sugerido que esta vía ha surgido como una respuesta para la formación de piruvato rápida y directa (Conway, 1992), por lo cual su interrupción pudiera resultar en un decremento de la síntesis de piruvato, afectando de este modo la síntesis de PHB.

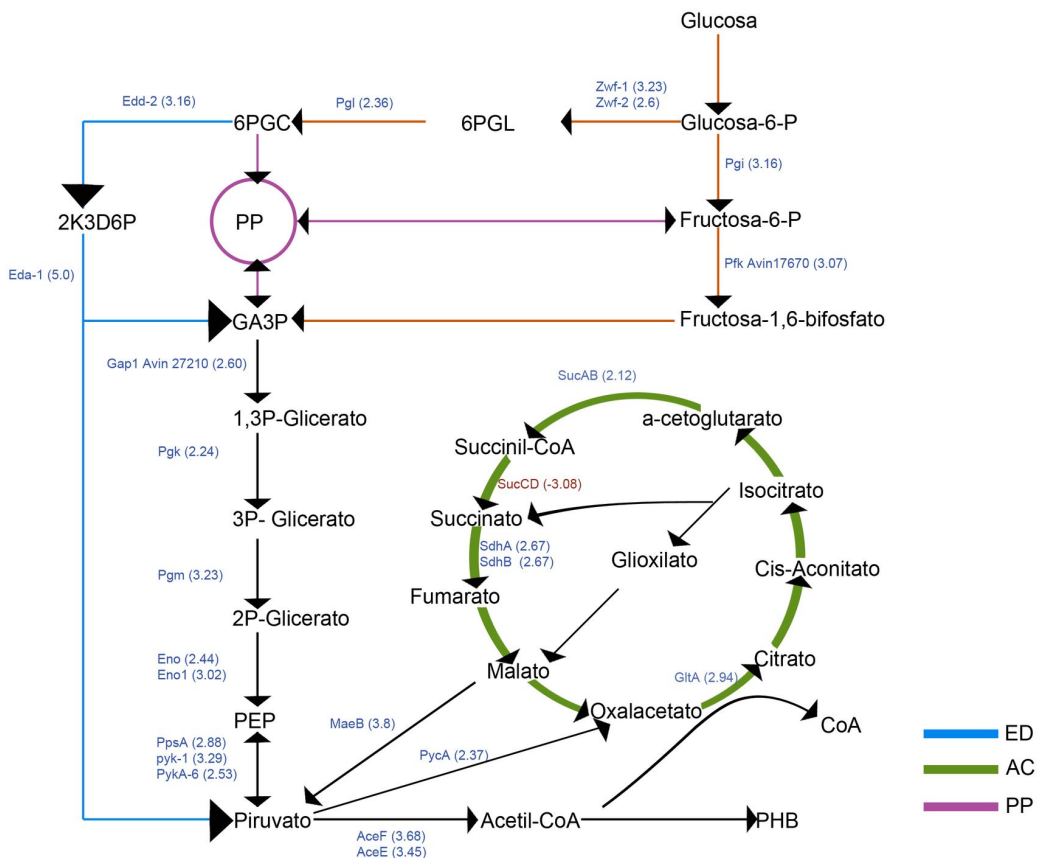


Fig.24. Esquema de rutas metabólicas que se ven afectadas en MTRP/*gacA*. Las proteínas en azul se encuentran sobre expresadas y en rojo las sub expresadas en MTRP/*gacA*. Se muestran las vías de Entner-Doudoroff (ED azul), Pentosas fosfato (PP rosa) y Ciclo del ácido cítrico (AC verde). Las abreviaciones usadas representan los siguientes componentes: 6PGC, 6 fosfogluconato; 6PGL, 6 6fosfogluconolactona; 2K3D6P, 2-ceto-3-deoxy-6-fosfogluconato; GA3P, gliceraldehido-3-fosfato; PEP, fosfoenol piruvato; PHB, polihidroxitbutirato.

8.DISCUSIÓN

8.1.GacA regula la síntesis de PHB por medio de una vía independiente de PTSN y RsmA

La síntesis de PHB y alquilresorcinoles en *A. vineladii* está regulada por tres proteínas principales: RsmA, EIIA^{Ntr} y GacA. RsmA y EIIA^{Ntr} funcionan como reguladores negativos, mientras que GacA funciona como un regulador positivo que afecta de manera negativa la actividad de las proteínas RsmA y EIIA mediante las vías Gac-RsmA y Gac-PTS^{Ntr} respectivamente. En ausencia de GacA no se transcriben los RNAs RsmZ1-7 y RsmY, que al interactuar con RsmA, impiden su actividad como represor de la traducción de los transcritos *phbR* y *arpR*, los cuales codifican para los activadores transcripcionales de los operones biosintéticos para la síntesis de estos compuestos. Adicionalmente, en mutantes *gacA* derivadas de la cepa AEIV, se ha reportado que la proteína EIIA^{Ntr} se encuentra en su forma no fosforilada (Trejo *et al.* 2017), lo que promueve la degradación del factor sigma RpoS necesario para la transcripción de *phbR*, *phbB* y *arpR*. Debido a esto se esperaba que la inactivación de los genes *rsmA* y *ptsN* en una cepa mutante *gacA* podría restaurar la síntesis de ambos polímeros; sin embargo, la inactivación de estos dos genes en una cepa AEIV *gacA* no restauró la síntesis de ARs.

En este trabajo se realizó la construcción de la cepa MTRP (derivada de la cepa OP con mutaciones en los genes: *gacA/rsmA/ptsN*) la cual es incapaz de sintetizar PHB al igual que la cepa OP*gacA*. Este resultado nos sugirió que GacA puede estar involucrado en la regulación de síntesis de PHB y ARs mediante al menos otra vía alterna a las vías GacA-Rsm y GacA-PTS-Ntr. La complementación de la cepa MTRP con el gen silvestre de *gacA* restableció la síntesis de PHB y la concentración de RpoS medida por Western blot (Fig.20), implicando la existencia de esta vía de regulación alterna dependiente de GacA (Fig.25).

8.2. Análisis comparativo de los proteomas de la cepa MTRP y MTRP/*gacA*.

Como parte de los objetivos de este trabajo se propuso iniciar la identificación de los elementos y el mecanismo involucrado en la regulación de la síntesis de PHB mediada por GacA e independiente de RsmA y EIIA^{Ntr}. Esto se llevó a cabo a través de determinar y comparar los proteomas de las cepas MTRP y MTRP/*gacA* mediante dos enfoques distintos. Por un lado, se consideró el análisis comparativo y la expresión diferencial de las proteínas que estuvieran involucradas con la síntesis de PHB o que su contexto genómico estuviese relacionado con la síntesis de este polímero, y por otro se consideraron los grupos funcionales a los que pertenecen las proteínas de acuerdo con los procesos biológicos, rutas metabólicas y regulación de la expresión génica en los que participan y su posible participación en la regulación y o la síntesis de PHB.

En *A. vinelandii* RpoS y PhbR, regulan el inicio de transcripción de los genes involucrados en la síntesis de PHB (Peralta-Gil *et al.* 2002, Hernández-Eligio *et al.* 2011), en el caso de RpoS se sabe que es degradado por medio de un mecanismo que involucra al complejo proteasa-chaperona ClpA/P cuando EIIA^{Ntr} está en su estado no fosforilado, ya que en ausencia de *ptsN* (EIIA^{Ntr}), RpoS no es degradado por el complejo ClpAP y es más estable (Muriel-Millan *et al.* 2017), esto sugiere que la degradación de RpoS por medio del complejo ClpA/P depende únicamente del estado de fosforilación de EIIA^{Ntr} ya que la inactivación de *ptsN* es suficiente para evitar la degradación. Sin embargo, en la cepa MTRP, donde EIIA^{Ntr} está ausente, los niveles de RpoS son similares a los niveles en las cepas donde se sabe que hay degradación de este factor. Esto sugiere que RpoS es regulado por GacA mediante otro mecanismo independiente del estado de fosforilación de EIIA^{Ntr} además el análisis comparativo de los proteomas de las cepas MTRP y MTRP/*gacA*, muestra que tanto ClpA como ClpP están sobre expresados en MTRP/*gacA* lo que sugiere que bajo estas condiciones RpoS es regulado mediante un mecanismo dependiente de GacA que es independiente de la degradación por el complejo ClpAP. Un ejemplo de un sistema de regulación parecido donde ClpAP y GacA regulan la expresión de forma independiente de un mismo proceso se da en *Pseudomonas fluorescens*. En este sistema ClpAP regula la biosíntesis de massetólidos, lipopéptidos cíclicos implicados en la motilidad de enjambre, formación de biopelículas y actividad antimicrobiana. Esto lo logra afectando la expresión del activador transcripcional *luxR* que regula al operón biosintético *massABC*. Lo notable de este sistema es que tanto *luxR* como *massABC* también

son regulados por el sistema de dos componentes GacA/S de forma independiente de ClpAP (de Bruijn, I., & Raaijmakers, J. M. 2009).

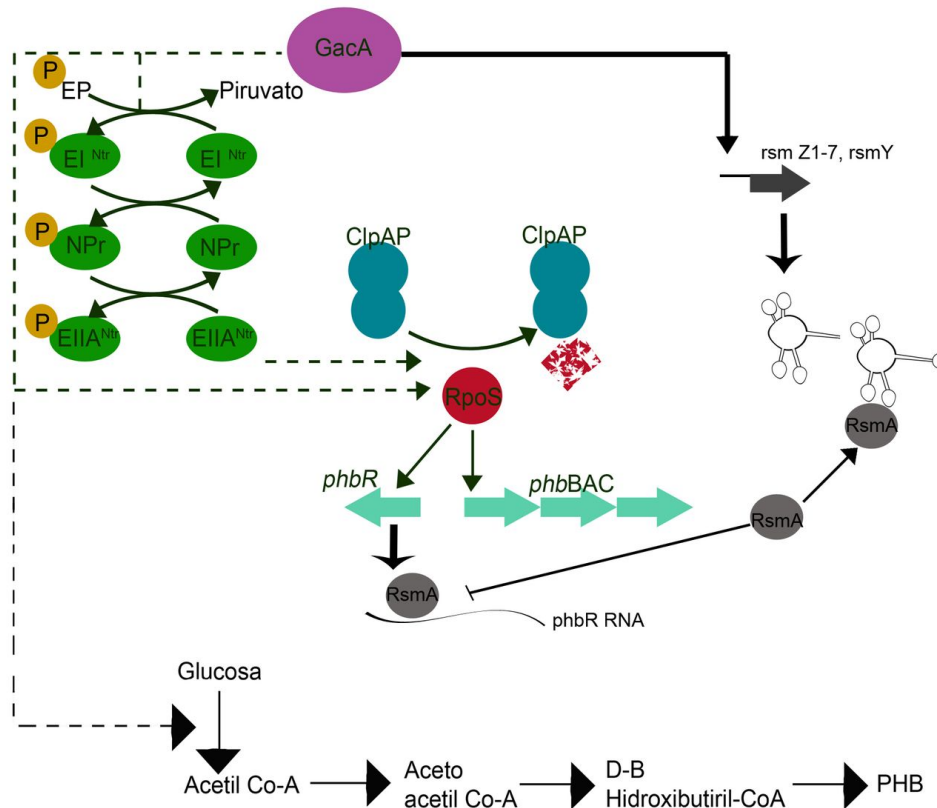


Fig.25. Modelo propuesto de regulación de RpoS por medio de GacA.

En procariontes la proximidad de genes en el cromosoma puede indicar co-regulación de genes, independiente de la orientación, o participación de estos en los mismos procesos celulares (Korbel, *et al.* 2004). En el análisis comparativo de expresión diferenciada se hallaron diversas proteínas de interés por el contexto genómico y proximidad cromosomal de los genes que las codifican con genes relacionados con la síntesis de PHB como se muestra en la Fig.26. Entre ellas, hupB que expresa una proteína (HU) de unión al ADN similar a la histona y que junto con los genes de la proteasa PepS16 y la petidil isomerasa ppiD se encuentran ubicadas entre *clpP* y el operón biosintético para PHB *phbBAC*. Asimismo, el factor desencadenante *tig* se encuentra río arriba de *clpP*, en el mismo sentido (Fig. 26), cabe mencionar que estos genes (*tig*, *pepS16*, *hupB* y *ppiD*), se encuentran sobre expresados en la cepa MTRP/*gacA*. Si estos genes están relacionados con la síntesis de PHB en la cepa complementada, es algo que se puede investigar en un futuro.

Tig(1.96) clpP(4.08) clpX pepS16(2.34) hupB(3.51) ppiD(3.31) phbC phbA phbB phbR phbP

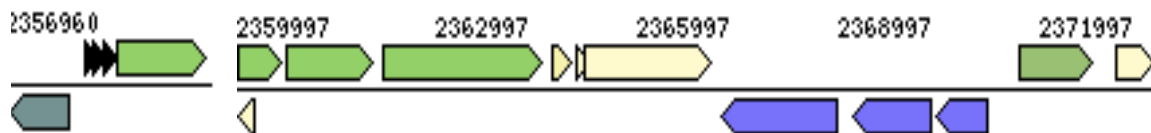


Fig.26. Contexto genómico de algunos genes sobre expresados en cepa MTRP/*gacA* vecinos a al operon biosintético de PHB *phbBAC* y a *phbR*

Similar a la síntesis de PHB, la síntesis de ARs esta regulada por el sistema PTS^{Ntr} que regula la expresión del operón *arsABCD* por medio del activador transcripcional *ArpR*. En este sistema el estado de fosforilación de EIIA^{Ntr} influye en la transcripción de *arsA* y *arpR* a través de RpoS, ya que este factor sigma es necesario para la transcripción de *arpR*. Adicionalmente se ha observado que EIIA^{Ntr} también parece controlar *arpR* a nivel postranscripcional mediante un mecanismo desconocido (Muriel-Millan *et al.* 2015). Nuestros resultados muestran que tanto los niveles bajos de RpoS, como el abatimiento de síntesis de alquilresorcinoles en la mutante MTPR se restauraron en la cepa complementada MTRP/*gacA* lo que apoya la hipótesis de que la vía alterna involucra la expresión del RpoS.

En *A. vinelandii* el 45.6% de genes totales involucrados en el metabolismo de carbohidratos son genes duplicados, estos pueden encontrarse en diferentes contextos genómicos así como en diferentes grupos de operones y se considera que son importantes para la adaptación a ambientes de nutrientes escasos pero diversos, ya que puede significar una ventaja para la utilización de fuentes de carbono disponible al presentar mayor flexibilidad y eficiencia para usar de manera simultanea diferentes fuentes de carbono, esto es especialmente útil para especies que habitan el suelo (Mærk, *et al.* 2014). Varias de las proteínas que se modifican en el proteoma de la cepa MTRP/*gacA* corresponden a genes que se encuentran repetidos en *A. vinelandii* (Fig.24), y que son parte del metabolismo central de carbohidratos. El proceso de síntesis de PHB requiere de intermediario del metabolismo acetil-CoA para dar inicio, el cual es un derivado del catabolismo de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos; dado que varios intermediarios del metabolismo de carbohidratos se ven afectados, es posible que la síntesis de acetil-CoA también se vea afectada además de que tanto *aceF* como *aceE* que codifican

para las subunidades uno y dos de la piruvato deshidrogenasa también se ven afectadas en MTRP.

Finalmente, el aumento en la cepa complementada MTP/*gacA* (capaz de sintetizar PHB) de las enzimas que sintetizan acetil-CoA, el sustrato para la síntesis de este polímero, con respecto a la triple mutante MTRP (que no sintetiza PHB) sugiere que la vía alterna por la que *GacA* es requerido para la síntesis de PHB esta implicada la expresión de las enzimas que sintetizan el sustrato.

Inesperadamente a pesar de que la cepa complementada se restauró la síntesis de PHB no se detectaron cambios en los niveles de las enzimas de la biosíntesis de PHB; *phbB*, *phbA* y *PhbC*, ni en el activador transcripcional *PhbR*. Este resultado podría deberse a un problema en la extracción de estas proteínas en la cepa complementada, o alternativamente a que estas se expresan en la triple mutante (están presentes) en la cepa no complementada, pero no hay síntesis de PHB debido a una limitación de sustrato u algún otro limitante.

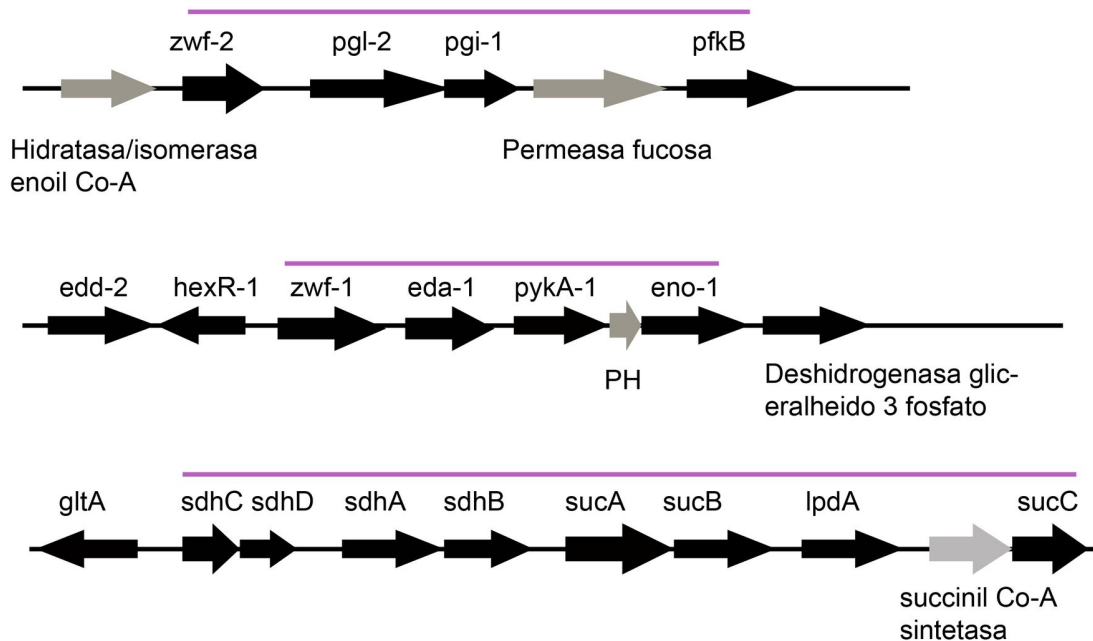


Fig.27. Genes de metabolismo de carbohidratos duplicados. Los genes marcados en negro corresponden a los genes repetidos en *A. vinelandi*. Las líneas rosas indican los genes que se encuentran en operones.

9.CONCLUSIONES

- Las mutaciones en *rsmA* y *ptsN* no reestablecen la síntesis de PHB en una cepa OP*gacA*.
- Existe una vía de regulación en la cepa OP dependiente de GacA alternativa a las vías Gac-Rsm y Gac-PtsN.
- RpoS es regulado mediante un mecanismo posiblemente dependiente de GacA que es independiente del estado de fosforilación de EIIA^{Ntr}.
- La mutante MTRP afecta diversos genes cuyo contexto genómico los localiza cerca de los genes involucrados en la síntesis de PHB.
- La mutante MTRP afecta a genes que se encuentran repetidos en *A. vinelandii*, y que son parte del metabolismo central de carbohidratos.
- Los intermediarios del metabolismo de acetil-CoA necesarios para la síntesis de PHB se ven afectados en la mutante MTRP.

10.PERSPECTIVAS

Realizar ensayos de estabilidad de RpoS en la cepa *MTRP* para determinar si el efecto de disminución observado es debido a que su estabilidad se ve afectada.

Realizar ensayos de estabilidad del transcrito de RpoS en la cepa *MTRP* para determinar si el efecto de disminución observado es debido a que hay regulación postranscripcional.

Construir mutantes *MTRP/ClpA*, *MTRP/ClpP* para determinar si RpoS es regulado por GacA mediante un proceso independiente a la degradación del complejo ClpA/P.

Monitorear la transcripción y traducción de *phbR* y *phbBAC* en las cepas *MTPR* y *MTPR/gacA* para determinar si GacA afecta su expresión.

Determinar la función de los genes afectados en la cepa MTRP que se encuentran en un contexto genómico cercano a los genes de síntesis de PHB y si tienen alguna relación con este proceso.

Monitorear la transcripción y traducción de los genes que codifican para la producción de metabolitos e intermediarios que se ven afectados en las cepas MTPR para determinar si GacA afecta su expresión.

11.BIBLIOGRAFÍA

Aldor & Keasling JD. (2003) Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. *Curr Opin Biotechnol.* 2003 Oct;14(5):475-83.

Castaneda,M., Sanchez,J., Moreno,S., Nunez,C., Espin,G. (2001) The Global Regulators GacA and sigma(S) Form Part of a Cascade That Controls Alginate Production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 183 (23), 6787-6793.

Castañeda M., López Pliego L., & Espin G. (2016) *Azotobacter vinelandii* Small RNAs: Their roles in the formation of cysts and other processes

Chavarría M, Nikel PI, Pérez-Pantoja D, de Lorenzo V. The Entner-Doudoroff pathway empowers *Pseudomonas putida* KT2440 with a high tolerance to oxidative stress. *Environ Microbiol.* 2013 Jun;15(6):1772-85. doi: 10.1111/1462-2920.12069. Epub 2013 Jan 10. PMID: 23301697.

Conway T. The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS Microbiol Rev.* 1992 Sep;9(1):1-27. doi: 10.1111/j.1574-6968.1992.tb05822.x. PMID: 1389313.

de Bruijn, I., & Raaijmakers, J. M. (2009). Regulation of cyclic lipopeptide biosynthesis in *Pseudomonas fluorescens* by the ClpP protease. *Journal of bacteriology*, 191(6), 1910–1923. <https://doi.org/10.1128/JB.01558-08>

Galindo E., Carlos Peña, Cinthia Núñez, Daniel Segura & Guadalupe Espín (2007) Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories*20076:7

García A, Segura D, Espín G, Galindo E, Castillo T, Pena C.(2014) High production of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) by an *Azotobacter vinelandii* mutant altered in PHB regulation using a fed-batch fermentation process. *Biochem Eng J.* 2014;82:117–123.

Heeb S. & Dieter (2001) D.Regulatory roles of the GacS/GacA two-component system in plant-associated and other gram-negative bacteria. *Mol Plant Microbe Interact.* 2001 Dec;14(12):1351-63.

Hernandez-Eligio A., Castellanos M, Moreno S., Espín G.(2011) Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes

phbBAC by PhbR and RpoS. *Microbiology*. 2011 Nov;157(Pt 11):3014-23. doi: 10.1099/mic.0.051649-0. Epub 2011 Jul 21.

Hernandez-Eligio,A., Moreno,S., Castellanos,M., Castaneda,M., Nunez,C., Muriel-Millan,L.F., Espin,G. (2012) RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*, 158 (8), 1953-1963.

Korbel JO, Jensen LJ, von Mering C, Bork P. (2004) Analysis of genomic context: prediction of functional associations from conserved bidirectionally transcribed gene pairs. *Nat Biotechnol*. 2004 Jul;22(7):911-7. doi: 10.1038/nbt988. PMID: 15229555.

Lee CR, Cho SH, Kim HJ, Kim M, Peterkofsky A, Seok YJ. Potassium mediates *Escherichia coli* enzyme IIA(Ntr) -dependent regulation of sigma factor selectivity. *Mol Microbiol*. 2010 Dec;78(6):1468-83. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07419.x. Epub 2010 Oct 15. PMID: 21143318.

Mærk, M., Johansen, J., Ertesvåg, H., Drabløs, F., & Valla, S. (2014). Safety in numbers: multiple occurrences of highly similar homologs among *Azotobacter vinelandii* carbohydrate metabolism proteins probably confer adaptive benefits. *BMC genomics*, 15(1), 192. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-192>

Manchak Janet & William J. Page (1994) Control of polyhydroxyalkanoate synthesis in *Azotobacter vinelandii* strain UWD. *Microbiology* 140,953-963. Great Britain.

Manzo J., Cocotl-Yañez M, Tzontecomani T, Martínez VM, Bustillos R, Velásquez C, Goiz Y, Solís Y, López L, Fuentes LE, Nuñez C, Segura D, Espín G, Castañeda M. (2011) Post-transcriptional regulation of the alginate biosynthetic gene *algD* by the Gac/Rsm system in *Azotobacter vinelandii*. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2011;21(3-4):147-59. doi: 10.1159/000334244. Epub 2012 Jan 31.

Muriel-Millan,L.F., Moreno,S., Romero,Y., Bedoya-Perez,L.P., Castaneda,M., Segura,D., Espin,G.(2015) The Unphosphorylated EIIANtr Protein Represses the Synthesis of Alkylresorcinols in *Azotobacter vinelandii*. *PLoS ONE*, 10 (2), e0117184.

Muriel-Millán L.F., Moreno S., Gallegos-Monterrosa R., Espín G. (2017) Unphosphorylated EIIANtr induces ClpAP-mediated degradation of RpoS in *Azotobacter vinelandii*. *Mol Microbiol*. 2017 Apr; 104(2):197-211. doi: 10.1111/mmi.13621. Epub 2017 Feb 6.

Noguez R., Segura D., Moreno S., Hernandez A., Juarez K., Espín G. (2008) Enzyme I NPr, NPr and IIA Ntr are involved in regulation of the poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2008;15(4):244-54. Epub 2007 Sep 20.

Peralta-Gil, M., Segura, D., Guzmán, J., Servín-González, L., & Espín, G. (2002). Expression of the *Azotobacter vinelandii* Poly- β -Hydroxybutyrate Biosynthetic *phbBAC* Operon Is Driven by Two Overlapping Promoters and Is Dependent on the Transcriptional Activator *PhbR*. *Journal of Bacteriology*, 184(20), 5672–5677. <http://doi.org/10.1128/JB.184.20.5672-5677.2002>

Romero, Y., Moreno, S., Guzman, J., Espin, G., Segura, D. (2013) The Sigma Factor *RpoS* Controls Alkylresorcinol Synthesis Through *ArpR*, a LysR-Type Regulatory Protein During Encystment of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 195 (8), 1834-1844.

Romero, Y., Guzman, J., Moreno, S., Cocotl-Yanez, M., Vences-Guzman, M.A., Castaneda, M., Espin, G., Segura, D. (2016) The *GacS/A-RsmA* Signal Transduction Pathway Controls the Synthesis of Alkylresorcinol Lipids that Replace Membrane Phospholipids during Encystment of *Azotobacter vinelandii* SW136. *PLoS ONE*, 11 (4), e0153266.

Segal G. 2013. The *Legionella pneumophila* two-component regulatory systems that participate in the regulation of *Icm/Dot* effectors. *Curr Top Microbiol Immunol* 376:35–52. https://doi.org/10.1007/82_2013_346.

Segura D., Vargas E., Espín G. (2000) Beta-ketothiolase genes in *Azotobacter vinelandii*. *Gene*. 2000 Dec 30;260(1-2):113-20.

Senior, P. J., & Dawes, E. A. (1973). The regulation of poly- β -hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochemical Journal*, 134(1), 225–238.

Stevenson, L. H., & Socolofsky, M. D. (1966). Cyst Formation and Poly- β -Hydroxybutyric Acid Accumulation in *Azotobacter*. *Journal of Bacteriology*, 91(1), 304–310.

Trejo A., Moreno S, Cocotl-Yañez M, Espín G. (2017) *GacA* regulates the PTSNtr-dependent control of cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiol Lett*. 2017 Jan;364(2). pii: fnw278. doi: 10.1093/femsle/fnw278. Epub 2016 Dec 8

Wilson, K.J., Sessitsch, A., Corbo, J.C., Giller, K.E., Akkermans, A.D.L., and Jefferson, R.A. (1995) *b-Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria*. *Microbiology* 141: 1691–1705.