



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Genes *Avin32720* y *Avin32710* de *Azotobacter vinelandii* y su papel en la degradación del factor sigma RpoS

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:

Biol. Karen Ameyally Rodríguez Martínez

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Gloria Soberón Chávez
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

Cuernavaca, Morelos. Septiembre, 2022



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.

Agradecimientos

A la Dra. Guadalupe Espín, por haberme aceptado en su grupo de investigación. Gracias por permitirme crecer profesional y personalmente bajo su tutoría, por enseñarme a descubrir lo hermoso de la ciencia, por brindarme su confianza y apoyo.

A el Dr. Luis Felipe Muriel Millán por apoyarme desde el inicio del proyecto aportando sus ideas para mejorar la calidad de los resultados. Eres un ejemplo que seguir, muchas gracias por tu amistad y por los consejos que me diste.

A la técnica académica Soledad Moreno, gracias por ser mi guía durante todo este proyecto. Por su infinita paciencia, por compartir su sabiduría y experiencia conmigo. No solo fue una maestra para mí, sino también se convirtió en una gran amiga, la quiero muchísimo.

A Josefina Guzmán y a los Drs. Daniel Segura y Cinthia Núñez, por sus comentarios y sugerencias durante los seminarios de grupo, los cuales llevaron a una mejora del presente proyecto.

A los miembros de mi comité tutor los Drs. Gloria Soberón y Víctor Bustamante, quienes me brindaron sugerencias y comentarios que contribuyeron a la realización del presente proyecto. Gracias a cada uno por tomar parte de su tiempo para la revisión de este trabajo.

A mis amigos Espines: Leonel, Fernando, Víctor, Alan, Pablo y Christian. Al Aquelarre vinelandii: Jessica, Andrea, Talia, Citlalli, Chantal, Mariana y Juliana. Muchas gracias a cada uno de ustedes por hacer mi estancia en el laboratorio la experiencia más divertida y enriquecedora, gracias por sus consejos, su apoyo y confianza, pero sobre todo gracias por su amistad. Los quiero mucho.

A mis Roomies Julieta y Alex, por su amistad sincera, muchas gracias por la compañía llena de historias divertidas y por los recuerdos de sus interesantes viajes.

A mis amixes Paulina, Betsy, Vane, Lu, Mario y Diego por su amistad duradera y por los días en los que coincidimos para salir a divertirnos.

A Lua Castañeda por ayudarme a conocerme, por darme herramientas para poder continuar y no perder la cordura en el camino, por las sesiones en las que me escuchaste y me brindaste tu apoyo.

Este proyecto fue realizado en el Instituto de Biotecnología en el Departamento de Microbiología Molecular, bajo la tutoría de la Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo y con el apoyo financiero del proyecto PAPIIT IN212120. Así mismo, al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada durante el periodo en el que curse mis estudios de maestría (CVU: 958411).

Dedicatoria

Para mis tías Nancy, Regina, Maribel y Carmen por su apoyo económico para que pudiera mudarme a Cuernavaca e iniciar mi posgrado. Gracias por su apoyo y por impulsarme a conseguir mi objetivo.

Para mis hermanos Mario y Giovanni cada uno de mis logros son inspirados en ustedes. Los amo mucho

Para mi mama hermosa Lupita Martínez por todo el esfuerzo que hiciste para apoyarme y continuar aun cuando estuve a punto de rendirme, te amo.

Para mi papá Oscar Vidal por tu apoyo aun cuando la distancia es parte de nuestra vida, gracias por tus palabras de aliento.

Para Rene por tu apoyo económico y tu impulso dar ese primer paso y continuar estudiando, por todas las llamadas infinitas, por tus palabras de aliento, por tus visitas y tu amor infinito. Gracias por ser el mejor equipo te amo.

Para Chanis, hoy ya no estás aquí y me hubiera encantado que veas todo lo que he logrado. Te mando un abrazo inmenso, gracias por tu apoyo y tu confianza.

ÍNDICE

Resumen.....	1
1 Introducción.....	2
1.1 Características generales de <i>Azotobacter vinelandii</i>	2
1.2 Características generales e importancia del poli- β -hidroxibutirato (PHB).....	3
1.2.1 Biosíntesis de PHB y su regulación genética.....	4
1.3 Sistema de fosfotransferasa asociado a nitrógeno (PTS ^{Ntr}).....	5
1.4 Complejos proteolíticos ClpP-Chaperona.....	7
1.5 Factor sigma RpoS.....	9
2 Antecedentes.....	10
3 Hipótesis.....	15
4 Objetivos.....	15
5 Materiales y métodos.....	16
5.1 Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados.....	16
5.2 Medios y Condiciones de Cultivo.....	19
5.3 Procedimiento con ácidos nucleicos.....	20
5.4 Extracción de DNA de plásmido (Técnica del Perclorato).....	20
5.5 Transformación de <i>E. coli</i>	20
5.6 Construcción de mutantes por inserción de casete de resistencia o eliminación en <i>rssB</i> (<i>Avin32720</i>), <i>rssC</i> (<i>Avin32710</i>) y <i>rssB/rssC</i> (<i>Avin32720-Avin32710</i>).....	20
5.7 Complementación de las mutaciones en los genes <i>rssB</i> , <i>rssC</i> y <i>rssB/rssC</i>	21
5.8 Cuantificación de PHB.....	22
5.9 Cuantificación de proteína.....	23
5.10 Curva de crecimiento.....	23
5.11 Determinación de niveles y estabilidad de RpoS por Western-blot.....	24
6 Resultados.....	25
6.1 Análisis de los genes <i>Avin32710</i> y <i>Avin32720</i>	25
6.2 Construcción de cepas mutantes en los genes <i>rssB-rssC</i>	26
6.3 Efecto de las mutaciones en los genes <i>rssB</i> , <i>rssC</i> y <i>rssB-rssC</i> sobre el crecimiento celular de las cepas UW136 y ptsN-H68A.....	28
6.4 Fenotipo de PHB.....	29

6.5	Detección de la proteína RpoS en las cepas mutantes en los genes <i>rssB</i> , <i>rssC</i> y <i>rssB/rssC</i>	31
7	Discusión.....	37
8	Conclusiones.....	41
9	Perspectivas	41
10	Bibliografía.....	42

Resumen

RpoS es un factor sigma clave para la adaptación al crecimiento en fase estacionaria, así como para la respuesta general a estrés. En *Escherichia coli*, la disponibilidad de RpoS en fase exponencial, se regula a través del complejo proteolítico ClpXP con la participación del adaptador RssB, un miembro de la familia de reguladores de respuesta que se encuentra conservada en bacterias. Por ejemplo, en *Pseudomonas aeruginosa* la proteína PA2798 es un homólogo estructural a RssB de *E. coli*.

En *Azotobacter vinelandii*, RpoS controla la expresión del operón *phbBAC* y su regulador *phbR*, involucrados en la síntesis de poli- β -hidroxibutirato (PHB), un biopolímero de interés industrial. Al igual que en *E. coli*, RpoS de *A. vinelandii* es degradado en fase exponencial por el complejo proteolítico ClpXP, y en fase estacionaria por el complejo proteolítico ClpAP, en presencia de la proteína EIIA^{Ntr} no fosforilada, provocando una disminución en la síntesis de PHB. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual RpoS es reconocido por ambos complejos proteolíticos.

A través de una búsqueda bioinformática, se encontró que el producto del gen *Avin32720* comparte una identidad del 79% con la proteína PA2798 de *P. aeruginosa*. Cabe mencionar que *Avin32720* se encuentra formando un posible operón con el gen *Avin32710* (que codifica para un factor anti-anti-sigma). Por lo tanto, en este trabajo se caracterizó la participación de los genes *Avin32720-Avin32710*, renombrados como *rssB* y *rssC* respectivamente, en la degradación del factor sigma RpoS.

Las mutaciones nulas de los genes *rssB* y *rssC* tuvieron un efecto positivo en la producción de PHB en la cepa UW136 silvestre. Por otro lado, en una cepa con un fondo genético con el alelo mutante *ptsN-H68A* (EIIA^{Ntr} en estado no fosforilado constitutivo) la ausencia de RssB y RssC promovió una restauración parcial de los niveles de PHB. Además, de manera interesante, se observó en ambas cepas un aumento en los niveles y estabilidad de RpoS durante la fase exponencial, sin embargo, no se observaron diferencias significativas durante la fase estacionaria. Esto sugiere que existe una vía adicional por la cual se lleva a cabo el reconocimiento de RpoS por el complejo ClpAP en presencia de EIIA^{Ntr} no fosforilada. Tomados en conjunto, nuestros resultados revelan un nuevo mecanismo, por el cual RssB y RssC participan en la degradación del factor sigma RpoS por el complejo ClpXP en *A. vinelandii*.

1 Introducción

1.1 Características generales de *Azotobacter vinelandii*

Azotobacter vinelandii es un organismo modelo para el estudio de la producción de biopolímeros, la fijación de nitrógeno aeróbica y la fisiología microbiana. Se clasifica como una bacteria Gram negativa de vida libre, perteneciente a la familia Pseudomonadaceae. Es aerobia estricta y quimiorganotrófica, es decir, puede utilizar una gran variedad de sustratos de carbono, incluidos alcoholes, ácidos orgánicos y azúcares (Noar y Barcena, 2018).

Bajo condiciones desfavorables de nutrientes, *A. vinelandii* sufre un proceso de diferenciación a través de cambios morfo-fisiológicos que resultan en la formación de quistes resistentes a la desecación, a la desintegración mecánica y a la radiación ultravioleta. Una vez que las condiciones son nuevamente favorables, los quistes pueden germinar iniciando un nuevo ciclo de vida (Sadoff, 1975).

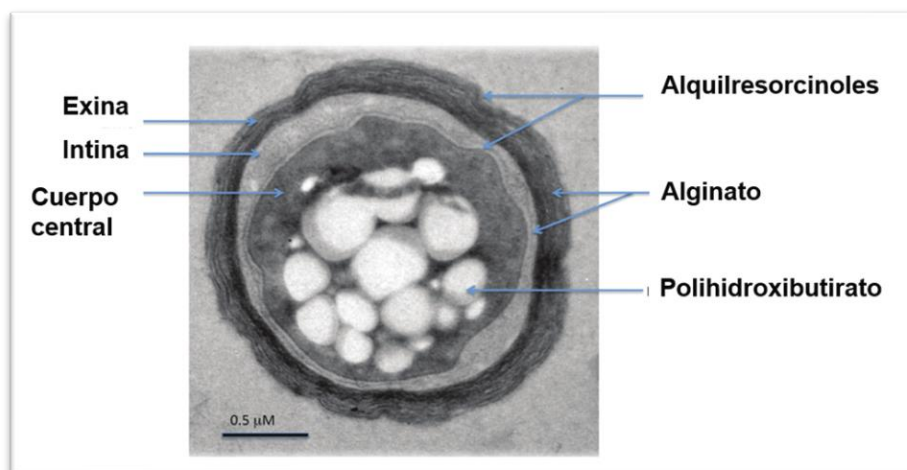


Fig. 1. Quiste maduro de *Azotobacter vinelandii*. Se muestra la organización de los componentes del quiste: polihidroxibutirato, alquilresorcinoles y alginato, así como las estructuras que lo componen: cuerpo central, capa interna (intina) y capa externa (exina) (Modificado de Espín, 2016).

La morfología del quiste (fig. 1) consiste en una célula ovalada llamada cuerpo central que contiene numerosos gránulos insolubles del polímero de reserva poli-β-hidroxibutirato (PHB). El cuerpo central está rodeado por una capsula compuesta por una capa interna llamada intina y una capa externa llamada exina, cuyo

componente principal es el exopolisacárido alginato. Por otra parte, los fosfolípidos de la membrana son reemplazados por los lípidos fenólicos alquilresorcinoles y alquilpironas. Estos lípidos fenólicos también son componentes de la capa de exina (Segura *et al.*, 2020).

1.2 Características generales e importancia del poli- β -hidroxibutirato (PHB)

El poli- β -hidroxibutirato (PHB) se clasifica dentro de la familia de los polihidroxicanoatos (PHAs), un grupo de biopolímeros sintetizados por una amplia gama de géneros bacterianos, tales como, *Alcaligenes*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Caulobacter*, *Pseudomonas*, *Ralstonia* y *Rhodobacter*, entre otros. Es un homopolímero compuesto de monómeros de 3-hidroxibutirato, en los que el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace éster con el grupo hidroxilo del monómero vecino. La masa molecular del PHB define sus propiedades mecánicas, y, por lo tanto, su aplicación final (Espín, 2001; González *et al.*, 2013).

En bacterias productoras de PHB, su acumulación se presenta en respuesta a una limitación del crecimiento, principalmente por la falta de algún nutriente, como nitrógeno, fósforo, magnesio u oxígeno, y en presencia de un exceso de la fuente de carbono y energía (Espín 2001; Jendrossek *et al.*, 2002).

El PHB tiene características similares a los plásticos convencionales como el polipropileno y el polietileno; sin embargo, presenta ventajas al ser un polímero biodegradable y biocompatible. Gracias a estas propiedades es utilizado para la producción de artículos de uso diario como envases, revestimientos, botellas y otros artículos desechables como navajas de afeitar, pañales, vasos, bolsas, tapas, entre otros. Además, se ha buscado darle una aplicación biomédica como su uso en dispositivos médicos (endoprótesis vascular, suturas, dispositivos cardiovasculares, dispositivos de reparación de nervios y vendajes para heridas), andamios de ingeniería de tejidos, sistemas de administración de fármacos, materiales dentales, etc. (Velázquez-Sánchez *et al.*, 2020).

A pesar de que la producción de PHB representa un beneficio para el medio ambiente, su producción a nivel industrial aun es limitada debido a los altos costos de producción relacionado con el precio de los sustratos utilizados y su procesamiento posterior, por lo que se necesita más investigación y desarrollo para convertirlo en un producto viable.

1.2.1 Biosíntesis de PHB y su regulación genética

La biosíntesis de PHB en *A. vinelandii* (fig. 2) se lleva a cabo durante la fase estacionaria de crecimiento como una desviación del metabolismo central del acetil-CoA, que en lugar de metabolizarse en el ciclo de Krebs se utiliza en la síntesis de PHB en tres etapas enzimáticas. La primera reacción es llevada a cabo por la enzima β -cetotiolasa (codificada por *phbA*) y consiste en la condensación de dos moléculas de acetil-CoA para generar acetoacetil-CoA. A continuación, el acetocetil-CoA se reduce mediante la acetoacetil-CoA reductasa (codificada por *phbB*) utilizando NADPH y produciendo 3-hidroxiacetil-CoA que finalmente se polimeriza por la actividad de la PHB sintasa (codificada por *phbC*) (Velázquez-Sánchez *et al.*, 2020).

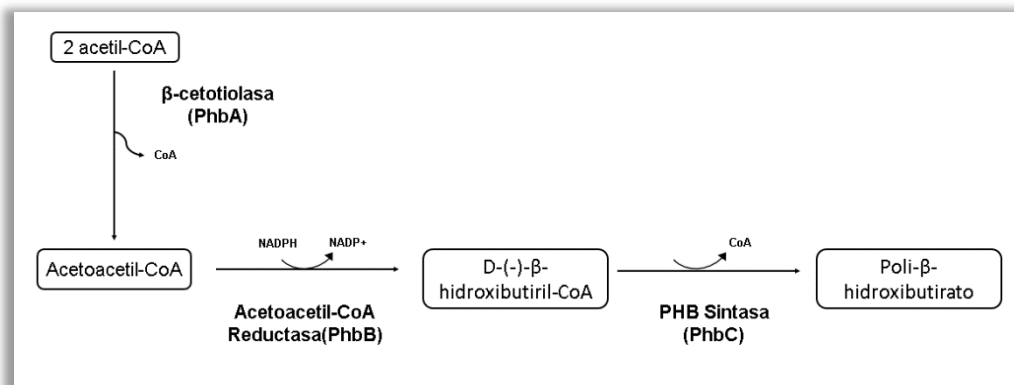


Fig. 2. Biosíntesis de polihidroxiacetil-CoA.

Los genes *phbA*, *phbB* y *phbC* se encuentran organizados en el operón *phbBAC* que se transcribe a partir de dos promotores, pB1 y pB2, respectivamente (fig. 3). Corriente arriba de este operón y de manera opuesta, se encuentra el gen *phbR* cuyo producto (PhbR) activa de manera directa la transcripción del operón a partir

del promotor pB1, mientras que el promotor pB2 depende del factor sigma de fase estacionaria RpoS (σ^{38}). La transcripción del gen *phbR* está controlada a partir de dos promotores: pR1 y pR2. La proteína PhbR activa la expresión de su propio gen a partir del promotor pR1, por otra parte, el promotor pR2 es inducido por RpoS (Peralta-Gil, 2002; Hernández-Eligio 2011; Velázquez-Sánchez *et al.*, 2020).

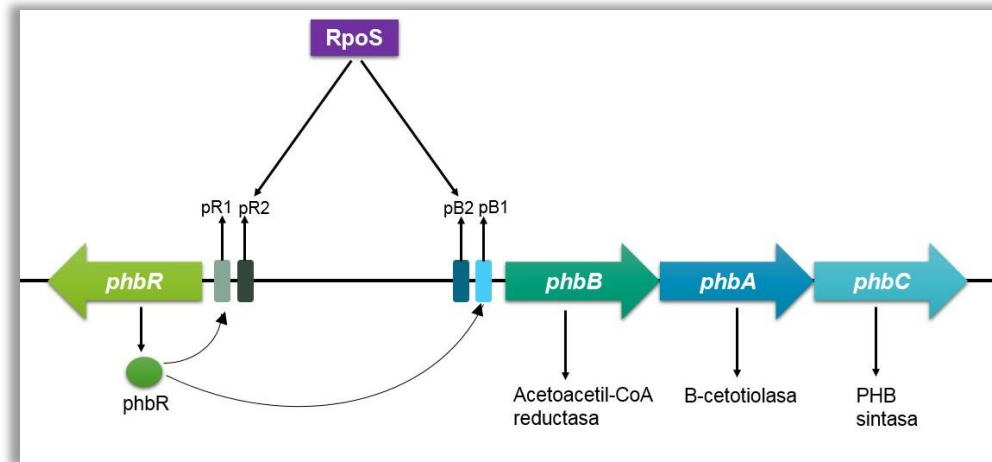


Fig. 3. Modelo de regulación genética del operón *phbBAC*.

1.3 Sistema de fosfotransferasa asociado a nitrógeno (PTS^{Ntr})

Un sistema de fosfotransferasa (Phosphotranspherase System, PTS) se define como un grupo de enzimas que transfieren un grupo fosfato procedente del fosfoenolpiruvato (PEP), de un miembro del sistema al siguiente, en un orden determinado (Pflüger-Grau y Görke, 2010). Se han identificado dos tipos generales de PTS, los cuales difieren en el número y función de sus integrantes.

El primer sistema caracterizado fue el PTS asociado a carbohidratos PTS^{azúcar} (fig. 4A), involucrado en el transporte y fosforilación de diferentes sustratos de azúcar (cetohexosas, aldohexosas, di y trisacáridos, y aminoazúcares) al interior de la célula.

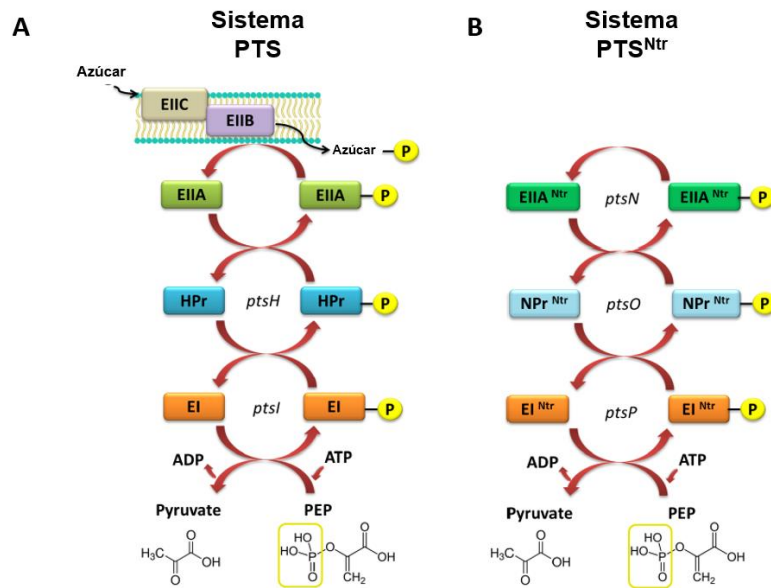


Fig. 4. Modelo de sistemas de fosfotransferasas. A) PTS clásico responsable del transporte de carbohidratos al interior de las células bacterianas. B) PTS^{Ntr} involucrado en funciones regulatorias en bacterias (Adaptado de Lipa *et al.*, 2020).

Se compone de cuatro proteínas citoplasmáticas (EI, HPr, EIIA y EIIB) y una proteína de membrana (EIIC). La proteína EI se autofosforila a partir de PEP e inicia el fosforrelevo al transferir el grupo fosfato a la proteína HPr, y esta a su vez, fosforila a la proteína EIIA. Posteriormente, EIIB recibe el grupo fosfato y finalmente lo transfiere al azúcar unido a EIIC. Además del transporte de carbohidratos, este sistema también participa en la regulación de procesos fisiológicos como la represión catabólica, la quimiotaxis, la formación de biopelículas, la virulencia y la transducción de señales (Deutscher *et al.*, 2014).

El segundo sistema PTS identificado está asociado al metabolismo de nitrógeno (PTS^{Ntr}) (fig. 4B) y está presente en diversas proteobacterias, pero también, en microorganismos de otros phylum, como espiroquetas y fusobacterias (Galiniier y Deutscher, 2017). Se conforma por las proteínas EI^{Ntr}, NPr^{Ntr} y EIIA^{Ntr}, las cuales están codificadas por los genes *ptsP*, *ptsO* y *ptsN*, respectivamente. En PTS^{Ntr} el fosforrelevo inicia con la autofosforilación de EI^{Ntr} a partir de PEP, a continuación, el grupo fosfato se transfiere a NPr^{Ntr}, por último, es recibido por la proteína EIIA^{Ntr}.

El sistema PTS^{Ntr} carece de las proteínas EIIB y EIIC presentes en el PTS^{azúcar}, por lo que se sugiere que está involucrado exclusivamente en funciones reguladoras (Pflüger-Grau y Görke, 2010), y en la mayoría de los casos, esta actividad es mediada a través del estado de fosforilación de la proteína EIIA^{Ntr}, considerada como el aceptor final del grupo fosfato y principal regulador entre los componentes de este sistema. Por ejemplo, el sistema PTS^{Ntr} participa en algunos procesos fundamentales como la fijación de nitrógeno, homeostasis del potasio y fosfato, utilización de carbono, producción de metabolitos secundarios y virulencia (Galinier y Deutscher, 2017).

1.4 Complejos proteolíticos ClpP-Chaperona

Las proteasas dependientes de ATP (AAA⁺, ATPases associated with cellular activities) evitan la acumulación de proteínas mal plegadas o agregadas asegurando la viabilidad celular. Además, juegan un papel crucial en la regulación del proteoma para dar respuesta a estímulos externos, lo cual permite una rápida adaptación celular.

Debido a que la proteólisis es un proceso irreversible, está sujeta a una estricta regulación. Por lo tanto, los sustratos dirigidos a degradación contienen secuencias de reconocimiento llamadas *degrons* presentes en los extremos N- o C- terminal, o bien, en una región interna que es expuesta debido a un estímulo (cambio conformacional, corte endoproteolítico, etc.) (Bittner *et al.*, 2016).

En bacterias Gram negativas se han descrito cinco diferentes proteasas AAA⁺, las cuales se dividen en dos tipos, complejos de dos componentes (heterosubunidades) y complejos de un componente (homosubunidades). Los complejos ClpXP, ClpAP y HslUV contienen el dominio de ATPasa y proteasa en polipéptidos separados, mientras que los dos dominios de ATPasa y proteasa de FtsH y Lon se encuentran en un solo polipéptido (Bittner *et al.*, 2016). El complejo proteolítico de dos componentes ClpP-chaperona está compuesto por una serina proteasa conocida como ClpP, organizada en dos anillos heptaméricos, que realiza la hidrólisis de sus proteínas blanco utilizando ATP, y una chaperona, ya sea ClpA (dos anillos

hexaméricos) o ClpX (un anillo hexamérico), que reconoce los sustratos, los desdobra y transloca al interior del canal proteolítico de ClpP para su degradación (Kirstein *et al.*, 2009).

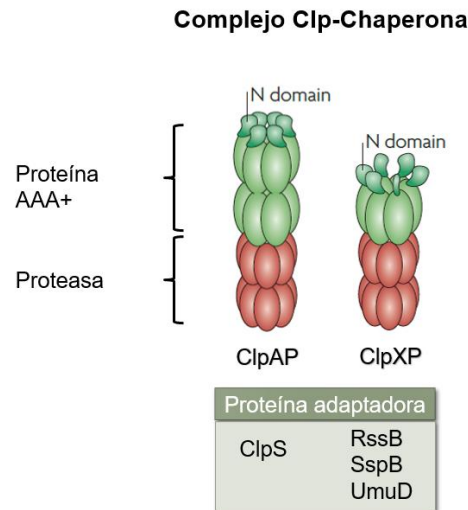


Fig. 5. Complejo Clp-Chaperona. En color verde se muestran las chaperonas ClpA y ClpX, mientras que en color rojo se muestra la proteasa ClpP (modificado de Kirstein *et al.*, 2009).

Además, existen proteínas adaptadoras que reconocen los sustratos, y posteriormente, los transfieren a los complejos ClpP-chaperona. Se han descrito tres proteínas adaptadoras para el complejo ClpXP: SspB, RssB y UmuD, mientras que para el complejo ClpAP solo se ha identificado el adaptador ClpS (fig. 5) (Kirstein *et al.*, 2009).

En la mayoría de las bacterias Gram negativas y positivas, los complejos ClpXP y ClpAP, participan en la proteólisis de los productos originados por el sistema de rescate de ribosomas, los cuales son marcados en su extremo C-terminal por el tmRNA SsrA, esto permite liberar a los ribosomas estancados en RNAm dañados y degradar proteínas anómalas (Kirstein *et al.*, 2009). Además, ambos complejos participan en diferentes procesos celulares como la virulencia, la esporulación, la división celular, la replicación, transición de fase de crecimiento, entre otros (Mahmoud y Chien, 2018).

1.5 Factor sigma RpoS

La adaptación celular ante diferentes señales ambientales como la disponibilidad de nutrientes, temperatura, osmolaridad o pH, se logra a través de la regulación de la expresión de genes para dar respuesta al estrés.

Este ajuste se da en gran medida por factores sigma, proteínas que se unen al núcleo de la RNA polimerasa y le permiten iniciar la transcripción en diferentes tipos de promotores. En proteobacterias, el factor sigma RpoS (σ^{38} o σ^s), es el principal coordinador de la respuesta general de estrés y de la fase estacionaria, cuando los nutrientes están limitados (Gottesman, 2019). RpoS controla aproximadamente del 10%-23% del genoma de *E. coli*, por lo que es importante para muchos procesos como la formación y maduración de biopelículas, la resistencia a antibióticos, virulencia, el daño a DNA, cambios morfológicos, daño oxidativo, cambios de osmolaridad, entre otros (Dorich *et al.*, 2019).

En *A. vinelandii*, RpoS controla la expresión de los genes involucrados en la síntesis de PHB y de alquilresorcinoles (ARs). Además, regula la expresión de los genes *algE1-7* y *eexDEF*, que codifican las epimerasas y el sistema de secreción de tipo I, responsables de controlar las proporciones adecuadas de residuos de glucuronato en el alginato presente en la cápsula del quiste (Moreno *et al.*, 2018). También regula la expresión de la proteína de choque térmico Hsp20, una de las proteínas más abundantes de los quistes y esencial para la resistencia a la desecación (Cocotl-Yanez *et al.*, 2014; Segura *et al.*, 2020).

Debido a que el regulón de RpoS es muy amplio, su expresión es controlada a nivel transcripcional y post-transcripcional; particularmente este último de manera negativa por proteínas que se unen y secuestran al factor sigma (anti-sigmas) y por proteólisis, regulando así su disponibilidad y estabilidad (Gottesman, 2019).

2 Antecedentes

En estudios anteriores se reportó que en cepas mutantes *ptsP* y *ptsO* de *A. vinelandii*, disminuye drásticamente la expresión de los genes *phbB* y *phbR*, y, por lo tanto, la producción de PHB (Noguez *et al.*, 2008). Este fenotipo se relaciona con la presencia de EIIA^{Ntr} en su estado no fosforilado, ya que de acuerdo con la cascada de fosforilación de PTS^{Ntr}, la mutación de los genes *ptsP* y *ptsO*, por interrupción de Tn5 y por casete de resistencia respectivamente, evitan la transferencia del grupo fosfato hacia EIIA^{Ntr} (fig. 6).

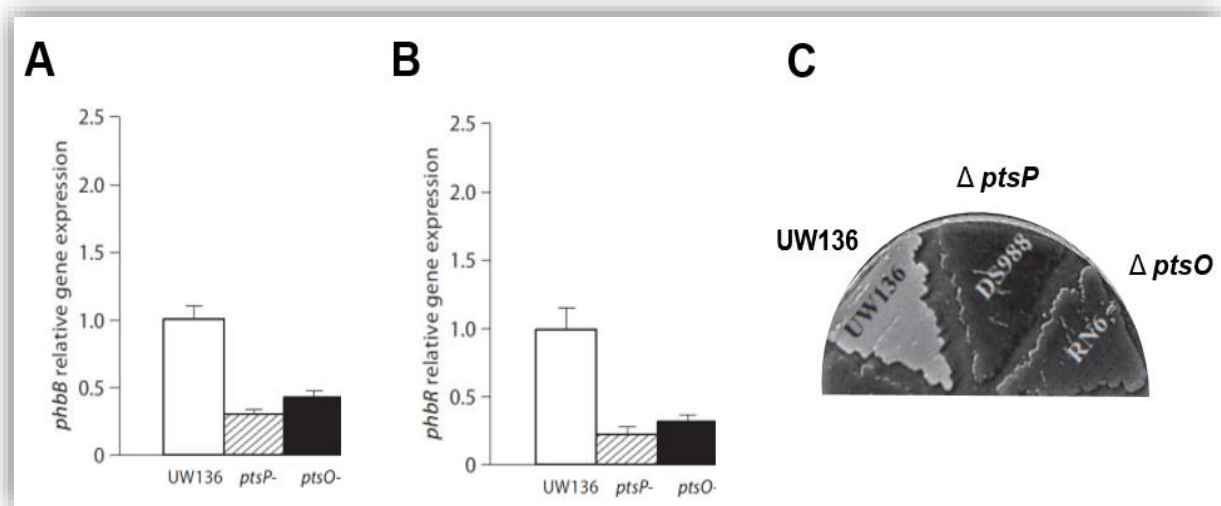


Fig. 6. Efecto de la inactivación de los genes *ptsP* y *ptsO*. Disminución de la expresión de los genes *phbB* (A) y *phbR* (B), así como la reducción drástica en la síntesis de PHB (C) (Modificado de Noguez *et al.*, 2008).

El efecto del estado de fosforilación de la proteína EIIA^{Ntr} sobre el PHB se confirmó mediante la construcción de una cepa que expresa a la proteína EIIA^{Ntr} no fosforilable, la cual presenta un cambio en la histidina 68 por una alanina (H68A). La cepa con el alelo *ptsN*-H68A presenta un fenotipo negativo de síntesis de PHB (fig. 7), lo cual confirma que EIIA^{Ntr} no fosforilada afecta de manera negativa la síntesis de PHB (Noguez *et al.*, 2008). Debido a que la proteína EIIA^{Ntr} no presenta dominios de unión a DNA, se propuso que su efecto negativo sobre la expresión de los genes *phbB* y *phbR* es de manera indirecta, involucrando al menos un intermediario.

En estudios posteriores, se identificó que la proteína EIIA^{Ntr} no fosforilada, afecta la transcripción de *phbR* y *phbBAC* mediante la inducción de la degradación de RpoS por el complejo proteolítico ClpAP (Muriel-Millán *et al.*, 2017), el cual se conforma por la serina proteasa ClpP y la chaperona ClpA, que reconoce los sustratos y los transloca al interior de ClpP para su degradación (Kirstein *et al.*, 2009).

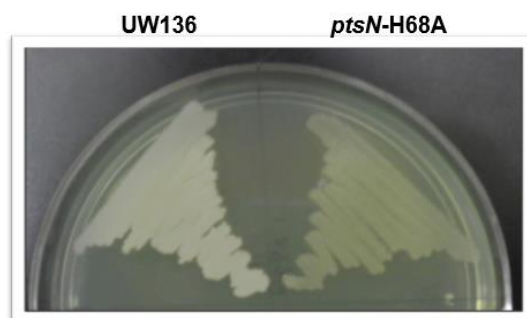


Fig. 7. Fenotipo de producción de PHB de la cepa mutante *ptsN-H68A*. Las cepas se crecieron en medio PY sacarosa al 2% durante 72 h a °C. La opacidad de la estría está relacionada con la producción de PHB (Modificado de Muriel-Millán, 2015).

Ensayos tipo Western blot, mostraron que en la cepa con el alelo mutante *ptsN-H68A* (EIIA^{Ntr} no fosforilada, presente) los niveles de RpoS así como su estabilidad se reducen. Sin embargo, se observó que una mutación por inserción de casete de resistencia en los genes *clpP* o *clpA*, promueve un aumento en los niveles y estabilidad de RpoS en comparación con la cepa parental (*ptsN-H68A*) (fig. 8). Cabe mencionar que a través de ensayos qRT-PCR se determinó que los niveles de RNAm de *rpoS* se mantuvieron estables en la cepa silvestre, lo cual sugiere que la reducción de los niveles de proteína RpoS fue causada solo por su proteólisis a través del complejo ClpAP y no por una reducción en su transcripción.

Los datos anteriores indican que en fase estacionaria y en presencia de EIIA^{Ntr} en su forma no fosforilada, los niveles de RpoS se reducen por una proteólisis mediada por ClpAP, que a su vez disminuye la transcripción de los genes implicados en la síntesis de PHB (Muriel-Millán *et al.*, 2017). En nuestro conocimiento, el trabajo realizado por Muriel-Millán *et al.*, 2017, es el primer estudio en el que se ha reportado la actividad de la chaperona ClpA en la degradación de RpoS.

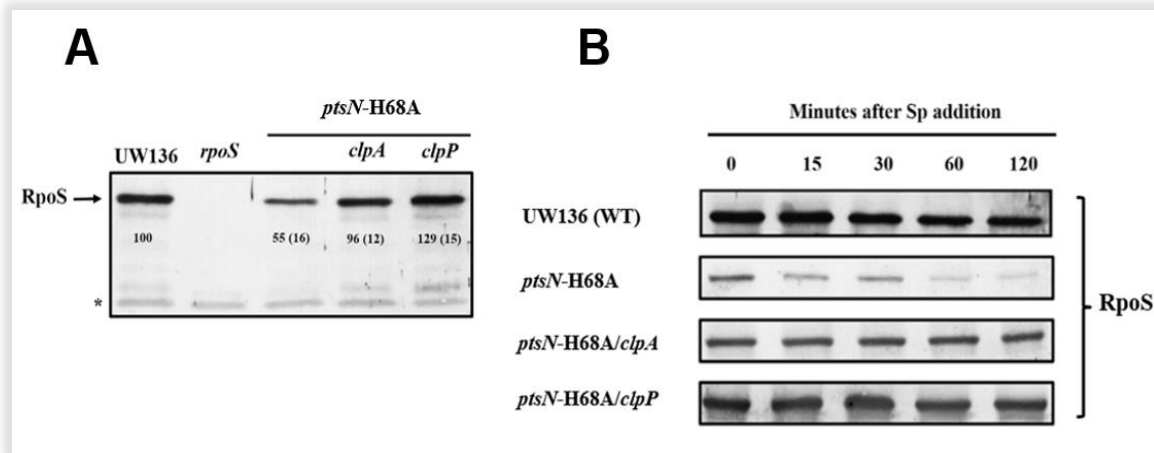


Fig. 8. Los niveles y estabilidad de RpoS están reducidos en la cepa *ptsN-H68A*. A) Detección de RpoS por Western blot usando antisuero policlonal anti-RpoS, en células cultivadas en medio PY durante 48 h a 30°C. Una interacción inespecífica de antisuero con una proteína que migra más bajo que RpoS se muestra como el control de carga (*). B). Determinación de la estabilidad de RpoS en cepas cultivadas en medio líquido PY durante 48 h a 30°C (Modificado de Muriel-Millan *et al.*, 2017).

Existe una variedad de chaperonas que interactúan con ClpP (Kirstein *et al.*, 2009). En *E. coli*, ClpX, pero no ClpA, ha sido reportada como la chaperona responsable del reconocimiento y presentación de RpoS a la proteasa ClpP en fase exponencial (Battesti *et al.*, 2011). En *A. vinelandii*, el complejo ClpXP también degrada a RpoS durante fase exponencial (fig. 9) (Muriel-Millán *et al.*, 2017).

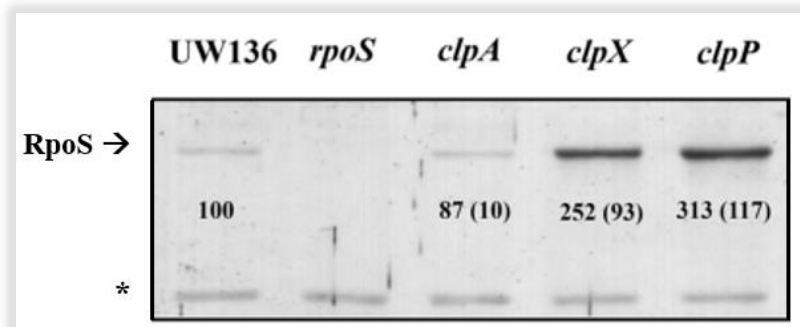


Fig. 9. Mutaciones en *clpX* y *clpP* aumentan los niveles de RpoS en la cepa UW136 durante la fase exponencial. Detección de RpoS por Western blot usando antisuero policlonal anti-RpoS, en células cultivadas en medio PY durante 8 h a 30°C. Una interacción inespecífica de antisuero con una proteína que migra más bajo que RpoS se muestra como el control de carga (*) (Modificado de Muriel-Millan *et al.*, 2017).

En general, los complejos ClpP-Chaperona requieren una proteína adaptadora que confiera especificidad sobre sus proteínas blanco. ClpS es una proteína pequeña que trabaja como un adaptador del complejo ClpAP, uniéndose específicamente a

sus sustratos y presentándolos a ClpA (Kirstein *et al.*, 2009). En *A. vinelandii*, una mutación en el gen *clpS* no restauró la síntesis de PHB en la cepa mutante *ptsP* (fig. 10), lo que indica que el adaptador ClpS no participa en el reconocimiento de RpoS por ClpAP (Muriel-Millán *et al.*, 2017).

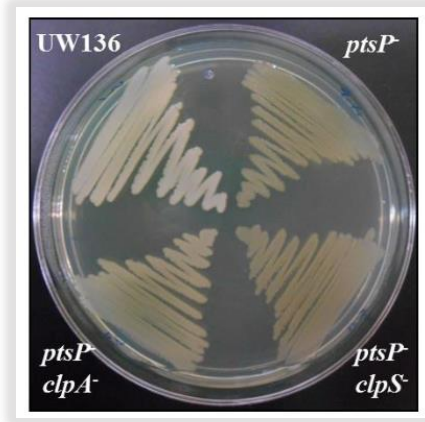


Fig. 10. La mutación en *clpS* no restaura la síntesis de PHB en la cepa *ptsP* de *A. vinelandii*. Las cepas se crecieron en medio PY sacarosa 2% durante 72 h a 30°C (Modificado de Muriel-Millán, 2015).

Debido a lo anterior, se propuso que EIIA^{Ntr} podría actuar como un adaptador que reconoce a RpoS para su degradación por ClpAP; sin embargo, mediante el sistema bacteriano de dos híbridos basado en la reconstitución de la adenilato ciclasa (BACTH), no se observó interacción entre EIIA^{Ntr} y el factor sigma RpoS, sugiriendo que podría haber alguna otra proteína que funcione como adaptador (Muriel-Millán *et al.*, 2017).

En *E. coli*, la proteína adaptadora RssB se une a RpoS y permite su reconocimiento por la chaperona ClpX y su subsecuente degradación por ClpP durante la fase exponencial (Battesti *et al.*, 2011). En *P. aeruginosa*, también se ha reportado que ClpXP degrada a RpoS en fase exponencial (Bertani *et al.*, 2003). En un estudio se identificó que el gen PA2798 codifica para una proteína con una estructura similar a la de RssB de *E. coli* (Battesti *et al.*, 2013), compartiendo una identidad del 28%. De manera interesante, en *A. vinelandii* el producto del gen *Avin32720* presenta una identidad de 79% con la proteína PA2798 de *P. aeruginosa* y del 26% con la proteína RssB de *E. coli*. PA2798 y *Avin32720* tienen un contexto genómico similar, ya que

se encuentran formando un posible operón con un gen que codifica para un anti-anti-sigma, PA2797 y *Avin32710*, respectivamente. Cabe mencionar que en ambos casos el ATG del primer gen se sobrelapa con el codón de paro del siguiente gen, y, por lo tanto, podrían participar en la misma actividad (fig. 11).

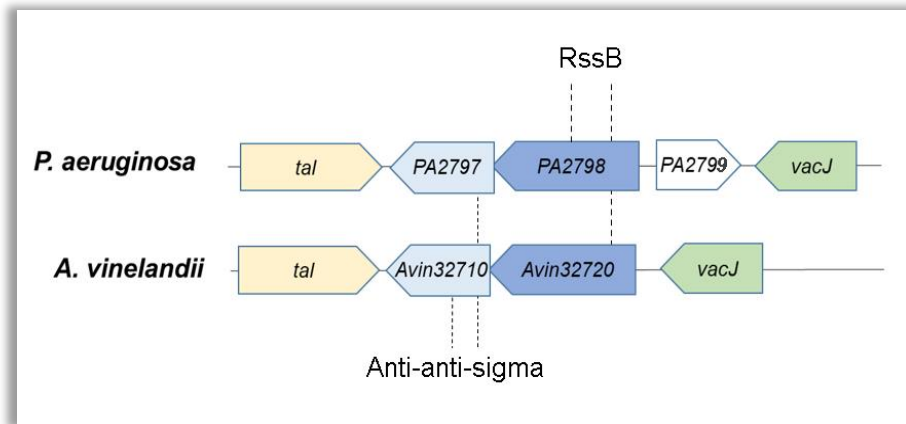


Fig. 11. Contexto genómico de los genes PA2798-PA2797 de *P. aeruginosa* y Avin32720-Avin32710 de *A. vinelandii*.

3 Hipótesis

En *A. vinelandii*, las proteínas codificadas por los genes *Avin32720* y *Avin32710*, participan en el reconocimiento de RpoS y su degradación por los complejos ClpXP y/o ClpAP (fig. 12).

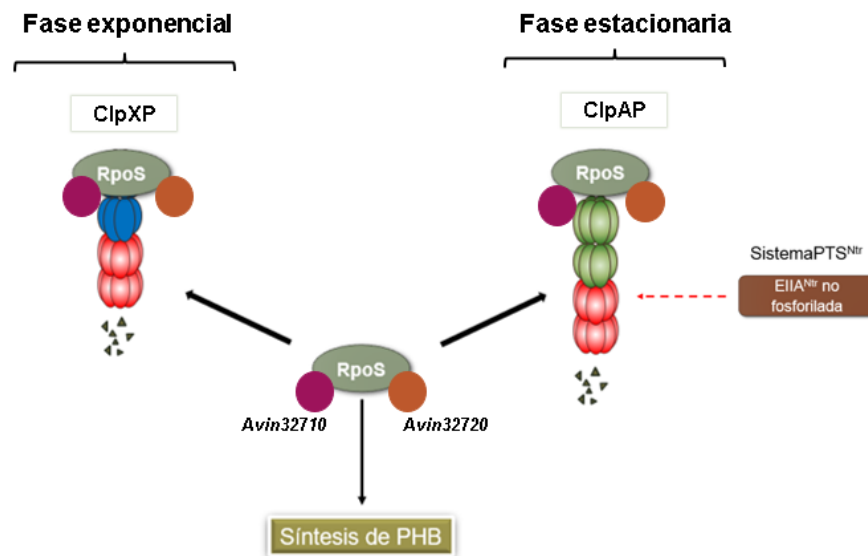


Fig. 12. Modelo hipotético de la degradación de RpoS a través de las proteínas Avin32720 y Avin32710 con la participación de las proteasas ClpXP (Izquierda) y ClpAP (Derecha). ClpP se representa de color rojo, ClpX de color azul y ClpA de color verde.

4 Objetivos

4.1 Objetivo General

- Determinar la participación de las proteínas Avin32720-Avin32710 en la degradación del factor sigma RpoS por los complejos ClpXP y/o ClpAP.

4.2 Objetivos Particulares

1. Inactivar los genes *Avin32720* y *Avin32710* en las cepas UW136 y ptsN-H68A de *A. vinelandii*.
2. Determinar el efecto de la mutación en los genes *Avin32720* y *Avin32710* sobre la producción de PHB en las cepas UW136 y ptsN-H68A.

- Determinar el efecto de la mutación en los genes *Avin32720* y *Avin32710* sobre los niveles y estabilidad de la proteína RpoS en fase exponencial y estacionaria en las cepas UW136 y ptsN-H68A.

5 Materiales y métodos

5.1 Cepas bacterianas, plásmidos y oligonucleótidos utilizados.

Las cepas utilizadas de *A. vinelandii* y *E. coli*, así como los plásmidos y oligonucleótidos utilizados en este trabajo se describen en la tabla 1, 2 y 3, respectivamente.

Tabla 1. Cepas de *A. vinelandii* y *E. coli*, utilizadas en el presente trabajo.

Cepa	Descripción	Referencia
UW136	Mutación natural en <i>algU</i> , Rif ^r .	Colección del laboratorio
UW136::pALA8a (ptsN-H68A)	Plásmido cointegrado en el cromosoma, expresando a EIIA ^{Ntr} no fosforilable H68A, Km ^r .	Noguez <i>et al.</i> , 2008
LMW35 (UW136 ClpP)	UW136 con mutación en el gen <i>clpP</i> .	Muriel <i>et al.</i> ; 2017.
LMW38 (<i>ptsN</i> -H68A ClpP)	<i>ptsN</i> -H68A con mutación en el gen <i>clpP</i>	Muriel <i>et al.</i> ; 2017.
UW RssB	UW136 con mutación en el gen <i>Avin32720</i> ::Gm ^r , orientación no polar.	Este trabajo
ptsN-H68A RssB	ptsN-H68A con mutación en el gen <i>Avin32720</i> ::Gm ^r , orientación no polar.	Este trabajo
UW RssC	UW136 con mutación en el gen <i>Avin32710</i> , Gm ^r , orientación no polar.	Este trabajo
ptsN-H68A RssC	ptsN-H68A con mutación en el gen <i>Avin32710</i> , Gm ^r , orientación no polar.	Este trabajo

UW RssB/RssC	UW136 con mutación en los genes <i>Avin32720-Avin32710</i> , Gm ^r , orientación no polar.	Este trabajo
ptsN-H68A RssB/RssC	ptsN-H68A con mutación en los genes <i>Avin32720-Avin32710</i> , Gm ^r , orientación no polar.	Este trabajo
UW RssB-B ⁺	UW RssB con una copia del gen <i>Avin32720</i> integrado en el gen <i>melA</i> .	Este trabajo
UW RssC-C ⁺	UW RssC con una copia del gen <i>Avin32710</i> integrado en el gen <i>melA</i> .	Este trabajo
UW RssB/ RssC-BC ⁺	UW RssB/RssC con una copia de los genes <i>Avin32720-Avin32710</i> integrado en el gen <i>melA</i> .	Este trabajo
ptsN-H68A RssB-B ⁺	ptsN-H68A RssB con una copia del gen <i>Avin32720</i> integrado en el gen <i>melA</i> .	Este trabajo
ptsN-H68A RssC-C ⁺	ptsN-H68A RssC con una copia del gen <i>Avin32710</i> integrado en el gen <i>melA</i> .	Este trabajo
ptsN-H68A RssB/RssC-BC ⁺	ptsN-H68A RssB/RssC con una copia de los genes <i>Avin32720-Avin32710</i> integrado en el gen <i>melA</i> .	Este trabajo
<i>E. coli DH5α</i>	endA1 hsdR17 supE44 thi-1λ-recA1 gyrA96 relAΔlacU169φ80 (ΔlacZ ΔM15).	Colección del laboratorio

Tabla 2. Plásmidos utilizados en el presente trabajo.

Plásmidos	Descripción	Referencia
pJET 1.2	Vector de clonación.	Thermo Scientific
pBSL141	Fuente del casete Gm ^r	Alexyev <i>et al.</i> , 1995

pJET PgyrA	pJET con región promotora del gen <i>gyrA</i> sin Shine Dalgarno.	Colección laboratorio
pUMA Tc	Plásmido usado para la integración del DNA dentro del locus <i>melA</i> de <i>A. vinelandii</i> , Tc ^r .	Cocotl-Yáñez <i>et al.</i> , 2014
pJET FragRssB-RssC	pJET con región codificante de los genes <i>Avin32720</i> y <i>Avin32710</i> .	Este trabajo
pJET RssB	pJET con el gen <i>Avin32720</i> interrumpido con casete de resistencia a Gm, orientación no polar.	Este trabajo
pJET RssC	pJET con deleción parcial del gen <i>Avin32710</i> e inserción de casete de resistencia a Gm, orientación no polar.	Este trabajo
pJET RssB/RssC	pJET con deleción parcial del operón <i>Avin32720-Avin32710</i> e inserción de casete de resistencia a Gm, orientación no polar.	Este trabajo
pJET RssB-Comp	pJET con región codificante del gen <i>Avin32720</i> .	Este trabajo
pJET RssC-Comp	pJET con región codificante del gen <i>Avin32710</i> .	Este trabajo
pJET PgyrA-RssC	pJET PgyrA con región codificante del gen <i>Avin32710</i> .	Este trabajo
pUMA RssB	pUMA Tc con región codificante del gen <i>Avin32720</i> .	Este trabajo
pUMA RssC	pUMA Tc con región codificante del gen <i>Avin327210</i> .	Este trabajo
pUMA RssB/RssC	pUMA Tc con región codificante de los genes <i>Avin327210</i> y <i>Avin32720</i> .	Este trabajo

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en el presente trabajo.

Oligonucleótidos	Secuencia 5' a 3'	Referencia
FragFw-RssB	TTC ATT CGC AAC GCC TAC	Este trabajo
FragRv-RssB	GGG CAG ATC GAA CAA CTG G	Este trabajo
MutRssC-RV	CTG TCG ATG CTC TGA GTT TC	Este trabajo
MutDoble-FW	CAA GGC CAA GGT GCT GGA AG	Este trabajo
MutDoble-RV	AAC CGC TGT CCT CCA GGT AG	Este trabajo
RssBRv-Comp	GAA CAC AAG GTC AGC CGG ATT TC	Este trabajo
BamHI-RssC Comp-Fw	GGATCC GAG GTA CTC TGG ATG GAT TG	Este trabajo
MeIAL-F	GGC CTT CTA CCT GTC CTT C	Este trabajo
MeIAL-R	TGG CGC TTG ATG AAC CAG G	Este trabajo

5.2 Medios y Condiciones de Cultivo

Las cepas de *A. vinelandii* se crecieron en medio mínimo Burk-Sacarosa (BS), cuya composición es la siguiente (g/L): MgCl₂·6 H₂O, 160; NaMoO₄·2 H₂O, 0.2; FeSO₄·7 H₂O, 5; CaCl₂·2 H₂O, 7.3; Na₂SO₄·18.3; K₂HPO₄, 8; KH₂PO₄, 2; Sacarosa, 200. El pH se ajustó a un valor de 7.2. Se agregó agar bacteriológico 15 (g/L) para solidificar el medio. Además, se crecieron medio Peptone-Yeast (PY), cuya composición es la siguiente: 5 (g/L) de Peptona y 3 (g/L) de levadura, suplementado con 2% de sacarosa.

Los cultivos de *E. coli* se crecieron 24 h a 37°C en medio Luria-Bertani (LB) cuya composición es la siguiente (g/L): peptona de caseína, 10; extracto de levadura, 5; NaCl, 5. En medio líquido se creció a 37°C con una velocidad de agitación de 200 rpm.

Los antibióticos usados fueron: gentamicina 1 y 10 µg/ml (Gm); kanamicina 1 y 10 µg/ml (Km); espectinomicina 100 µg/ml (Sp); ampicilina 100 µg/ml (Amp); rifampicina 10 µg/ml (Rif) para *A. vinelandii* y *E. coli*, respectivamente.

5.3 Procedimiento con ácidos nucleicos

La extracción de DNA de plásmido se realizó con el kit de purificación GeneJET Plasmid Miniprep, mientras que la purificación de productos de PCR se llevó a cabo con el kit GeneJET Gel Extraction Kit, ambos de Thermo Scientific. Para las amplificaciones de los genes de interés por PCR, se utilizó DNA cromosomal de *A. vinelandii*, y DNA de plásmido de *E. coli*. Las enzimas utilizadas fueron Taq DNA Polimerasa y DNA Polimerasa Phusion High-Fidelity de Thermo Scientific.

5.4 Extracción de DNA de plásmido (Técnica del Perclorato)

Se creció a *E. coli* en 10 ml de medio LB durante 24 hrs. Se centrifugó 1.5 ml de cultivo y se recuperaron las células. Se resuspendió la pastilla en 175 µl de TES (15% Sacarosa, 50mM TRIS pH 8.5, 50mM EDTA pH 8.0), se añadieron 25 µl de lisozima (10mg/ml) y se incubó en hielo durante 20 minutos. Se añadieron 400 µl de agua helada y se incubó durante 15 minutos a 73°C. Se centrifugó y se descartó el pellet con un palillo. Se añadieron 60 µl de NaClO₄ 5M y 600 µl de isopropanol, se mezcló y se centrifugó durante 15 minutos. Se lavó el pellet con 1ml de etanol al 70% y se centrifugó a 12, 000 r.p.m. Se secó en savant durante 15 minutos a 60°C. La pastilla se resuspendió en 50 µl de RNAsa (20 µg/ml).

5.5 Transformación de *E. coli*

Se utilizaron 200 µl de células competentes químicas por cloruro de calcio de *E. coli* DH5α y se incubaron en hielo durante 30 minutos. Se dio un shock de calor durante 2 minutos a 42°C. Se agregó 1 ml de medio LB líquido sin antibiótico y se incubó durante una hora a 37°C con agitación. Se platearon 100 µl y 200 µl en medio LB con Amp.

5.6 Construcción de mutantes por inserción de casete de resistencia o eliminación en *rssB* (*Avin32720*), *rssC* (*Avin 32710*) y *rssB/rssC* (*Avin32720-Avin32710*)

Para la construcción de mutantes nulas en los genes *rssB*, *rssC* y *rssB/rssC*, se utilizaron los oligonucleótidos FragFwRssB y FragRvRssB para amplificar un

fragmento que contuviera a ambos genes debido a que no hay una región intergénica entre ellos, usando como templado DNA cromosomal de la cepa WT. El producto de 2315 pb se ligó en el vector pJET 1.2 y el plásmido resultante se nombró pJET FragRssB-RssC. El gen de resistencia a gentamicina se obtuvo del plásmido pBSL141 (Alexyev,1995) y fue insertado en un sitio único *SaI* dentro del gen *rssB* en la orientación no polar, resultando en el plásmido pJET *rssB*. La mutación en los genes *rssC* y *rssB/rssC*, se realizó por delección parcial del gen a través de una PCR inversa, en la que se utilizó el plásmido pJET FragRssB-AAS como templado. Los oligonucleótidos MutRssC-RV y MutDoble-FW eliminaron una sección de 207 pb del gen *rssC*, mientras que los oligonucleótidos MutAAS-RV y MutDoble-FW, eliminaron una sección de 1476 pb del operón *rssB/rssC*. Posteriormente, cada producto fue ligado al casete de resistencia a gentamicina dando origen a los plásmidos pJET RssC y pJET RssB/RssC. Los plásmidos construidos se linealizaron con la enzima *Pdml* y se transformó a las cepas UW136 (WT) y ptsN-H68A de *A. vinelandii*.

5.7 Complementación de las mutaciones en los genes *rssB*, *rssC* y *rssB/rssC*

El gen *rssB* se amplificó con los oligonucleótidos FragFw-RssB y RssBRv-Comp, el producto de 1609 pb se clono en el vector pJET 1.2 resultando en el plásmido pJET RssB-Comp. Los plásmidos pJET RssB-Comp y pJET FragRssB-RssC fueron digeridos con la enzima *Bgl*II y las bandas obtenidas con las regiones reguladoras y codificantes de los genes *rssB* y *rssB/rssC* se ligaron al vector pUMA Tc, previamente digerido con la enzima *Bam*HI, resultando en los plásmidos pUMA RssB y pUMA RssB/RssC, donde cada gen queda bajo el control de su propio promotor. El vector pUMA Tc contiene el gen *meIA* (locus neutro del genoma de *A. vinelandii*) interrumpido por un casete de resistencia a Tc. Los plásmidos resultantes fueron linearizados con la enzima *Nde*I y usados para transformar a las cepas mutantes de los genes *rssB* y *rssB/rssC*, resultando en las cepas complementadas UW RssB-B⁺, ptsN-H68A RssB-B⁺, UW RssB/RssC-BC⁺, ptsN-H68A RssB/RssC-BC⁺.

Los oligonucleótidos BamHI-RssC-Comp-Fw y FragRv-RssB se utilizaron para amplificar un fragmento de 895 pb, para clonar al gen *rssC* (sin su región reguladora) en el vector pJET 1.2, resultando en el plásmido pJET RssC-Comp. Posteriormente, fue digerido con las enzimas *Bam*HI y *Xba*I, y la banda de interés fue clonada en el vector pJET PgyrA corriente abajo y en el mismo sentido que el promotor de *gyrA*, el plásmido resultante se nombró pJET PgyrA-RssC. Posteriormente, el plásmido fue digerido con la enzima *Bgl*II y la banda de interés se ligó al vector pUMA Tc, previamente digerido con la enzima *Bam*HI, resultando en el plásmido pUMA RssC. El plásmido resultante se digirió con la enzima *Nde*I y se usó para transformar a las cepas mutantes del gen *rssC*, dando origen a las cepas complementadas UW RssC-C⁺ y ptsN-H68A RssC-C⁺.

5.8 Cuantificación de PHB

La cuantificación de PHB se realizó por el método de Law y Slepecky (1961), basado en la conversión de PHB a ácido crotonico por tratamiento con ácido sulfúrico concentrado. Las células fueron cosechadas de medio solido PY suplementado con sacarosa al 2% a las 72 h de incubación y resuspendidas en 1 ml de MgSO₄ 10mM.

Las muestras se centrifugaron y se desechó el sobrenadante, posteriormente se resuspendió en 1 ml de hipoclorito de sodio al 30% y se incubaron a 37°C durante una hora. Las muestras se centrifugaron 13000 rpm por 7 minutos, lavadas con 1ml de agua y centrifugadas nuevamente. Se hicieron dos lavados posteriores con etanol absoluto y acetona. Una vez secas las pastillas de PHB, fueron resuspendidas en 1 ml de ácido sulfúrico concentrado y calentados durante 10 minutos a 95°C. La densidad óptica de las muestras se determinó a una longitud de onda de 235 nm. Los resultados de la cuantificación de PHB se obtuvieron con la ecuación de Lambert-Beer (Alonso *et al.*, 2009):

$$A = \Sigma C l$$

donde:

A= absorbancia

C= concentración($\mu\text{g/mL}$)

Σ = coeficiente de extinción molar del ácido crotónico ($15600\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

l= longitud de la celda(1cm)

5.9 Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína de las cepas utilizadas para la determinación de PHB se realizó por el método de Lowry *et al.*, (1951). Los ensayos se realizaron por triplicado. El procedimiento fue el siguiente: se tomó 1 ml de medio de cultivo y se centrifugó a 13,000 rpm durante 5 min para obtener el paquete celular, el cual se resuspendió en 1 ml de MgSO_4 10mM. Se tomaron 20 μl de células resuspendidas y se llevó a 200 μl con H_2O . Se añadió 1 ml de solución reactiva, se agitó y se dejó reposar 10 min. Se añadió 0.1 ml de reactivo de Folin diluido con 1 volumen de H_2O y se dejó reposar 30 min. Por último, se leyó absorbancia a 625 nm en el espectrofotómetro. Simultáneamente se analizó una curva patrón con las siguientes concentraciones en $\mu\text{g/ml}$ de albumina: 25, 50, 100, 200, 400.

Solución reactiva:

Solución A: Na_2CO_3 2% en NaOH 0.1 N

Solución B: Tartrato de Na y K 2%

Solución C: CuSO_4 1%

Se mezcló 0.5 ml de solución C + 0.5 ml de solución B + 49 ml de solución C

5.10 Curva de crecimiento

Las cepas se crecieron en medio BS líquido durante 24 h. Se tomo 1 ml de cultivo y se cuantifico proteína por el método de Lowry, posteriormente se inocularon 300 μg de proteína por cada cepa en matraces con 50 ml de medio BS líquido. Se

tomaron muestras a las 0, 8, 12, 18, 24, 36, 48, 60 y 72 h. La curva de crecimiento se determinó por cuantificación de proteína por el método de Lowry.

5.11 Determinación de niveles y estabilidad de RpoS por Western-blot

Las cepas se crecieron en medio PY líquido, se centrifugó el cultivo y se cuantificó proteína por el método de Lowry. Posteriormente 30 µg de proteína total fueron mezclados con el buffer de carga para SDS-PAGE y calentados a 95°C por 10 min. Las proteínas fueron separadas en geles SDS-PAGE al 10% y transferidas a membranas de PVDF. La proteína RpoS fue detectada usando el antisero policlonal RpoS-6His a una dilución 1:2000 en PBST, seguido por un anticuerpo anti-conejo IgG a una dilución 1:10000 en PBST. Las membranas fueron reveladas mediante 1-Step NBT/BCIP de Thermo Scientific.

Para la determinación de la estabilidad *in vivo* de RpoS, las cepas fueron crecidas en medio líquido PY durante 8 h y 48 h. La síntesis de proteínas fue bloqueada mediante la adición de espectinomicina a una concentración final de 1mg/ml. Se tomaron muestras a 0, 15, 30, 60 y 120 minutos luego de la adición del antibiótico y se trataron como se describió anteriormente. Los niveles relativos de RpoS se calcularon por densitometría utilizando el programa ImageJ (Schneider *et al.*, 2012).

6 Resultados

6.1 Análisis de los genes *Avin32710* y *Avin32720*

En *A. vinelandii* el producto del gen *Avin32720* codifica para un posible homólogo funcional del adaptador RssB de *E. coli*, y río abajo de este se encuentra el gen *Avin32710*. De acuerdo con su contexto genético, ambos genes se encuentran formando un posible operón de 1664 pb ya que no existe una región intergénica entre ellos (fig. 13). A partir de esta información y para fines prácticos, se decidió renombrar al gen *Avin32720* como *rssB* y al gen *Avin32710* como *rssC*.

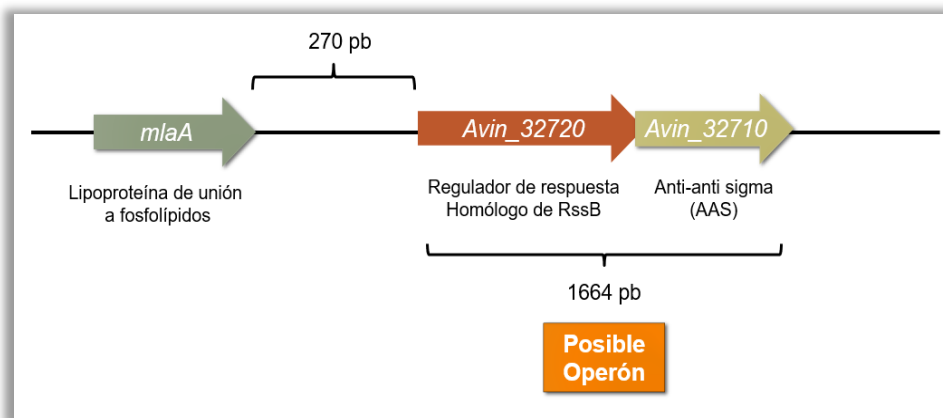


Fig. 13. Contexto genético de los genes *Avin32720* y *Avin32710*.

La proteína RssB de *A. vinelandii* se conforma de 394 aminoácidos y presenta una identidad del 79% con su homólogo PA2798 presente en *P. aeruginosa*. Se encuentra anotado en el genoma (KEGG) como un regulador de respuesta, ya que posee en su extremo N-terminal un dominio receptor (REC) y en el extremo C-terminal un dominio efector de la familia PP2C que se ha visto asociado a fosfatasas de serina/treonina (fig. 14A). Sin embargo, dentro de su contexto genético no se localiza una proteína histidina cinasa por lo que se considera un regulador de respuesta huérfano. Por otro lado, RssC se conforma de 160 aminoácidos, posee una identidad del 89% con PA2797 de *P. aeruginosa*, contiene un dominio STAS (sulfate transport and anti-sigma factor antagonist) por lo que se considera un probable factor anti-anti-sigma (AAS) (fig. 14B).

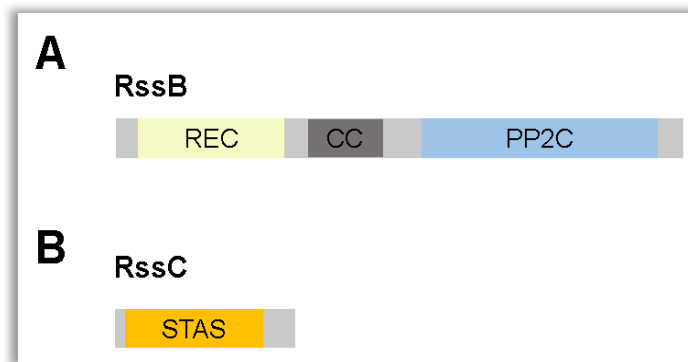


Fig 14. Representación de los dominios presentes en las proteínas A) RssB y B) RssC de *A. vinelandii*.

6.2 Construcción de cepas mutantes en los genes *rssB-rssC*

Para determinar el papel de *rssB-rssC* sobre la degradación de RpoS, se generaron mutaciones de estos genes en las cepas UW136 y ptsN-H68A. Como se describe en la sección de materiales y métodos, la mutación en *rssB* se realizó a través de la inserción de un casete de resistencia a gentamicina en un sitio único *SalI* del gen (fig. 15B), mientras que la mutación en *rssC* (fig. 15C) y en el operón *rssB-rssC* (fig.15D) se generó por deleción parcial a través de una PCR inversa, en la que se eliminaron 207 pb y 1476 pb de los genes, respectivamente.

Posteriormente se insertó el casete de resistencia a gentamicina. Las mutaciones generadas se confirmaron mediante PCR. Se observó un fragmento de 2315 pb al utilizar como templado el DNA de la cepa silvestre. Por otra parte, el fragmento obtenido de las cepas mutantes *rssB*, *rssC* y *rssB-rssC* fue de 3206 pb (fig. 16A), 3033 pb (fig. 16B) y 1764 pb (fig.16C), respectivamente.

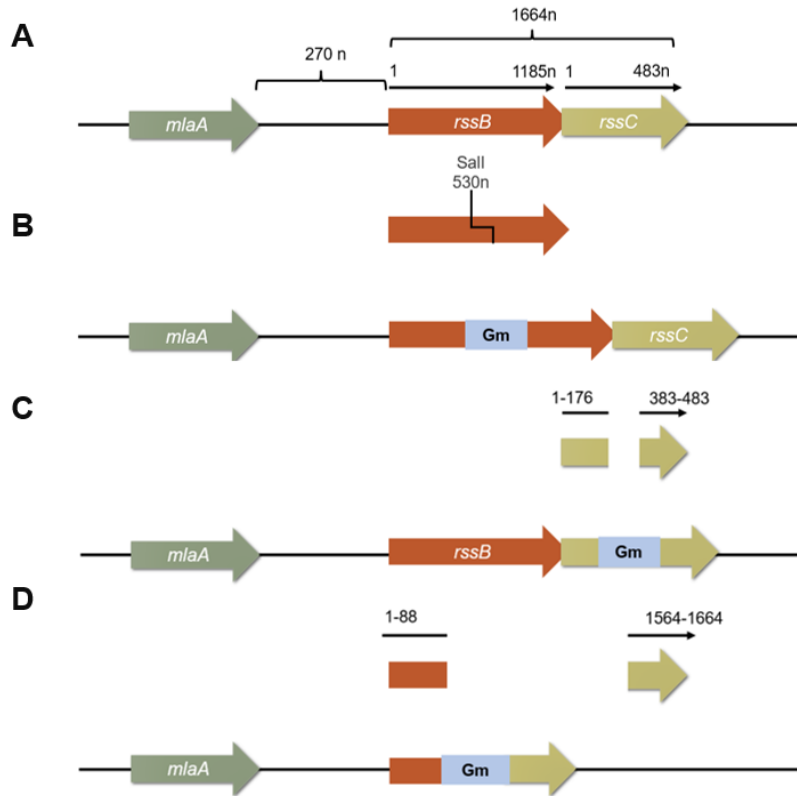


Fig. 15. Mapa físico de la región cromosomal *mlaA*, *rssB* y *rssC* de *A. vinelandii* A) UW136 (WT). B) Mutación del gen *rssB* por interrupción con casete de resistencia a Gm. C) Mutación por deleción parcial del gen *rssC*. D) Mutación por deleción parcial del operón *rssB-rssC*.

Se observó la presencia de bandas inespecíficas, sin embargo, no se observó la presencia de bandas silvestres en las clonas verificadas, por lo que se corrobora la correcta mutación de los genes.

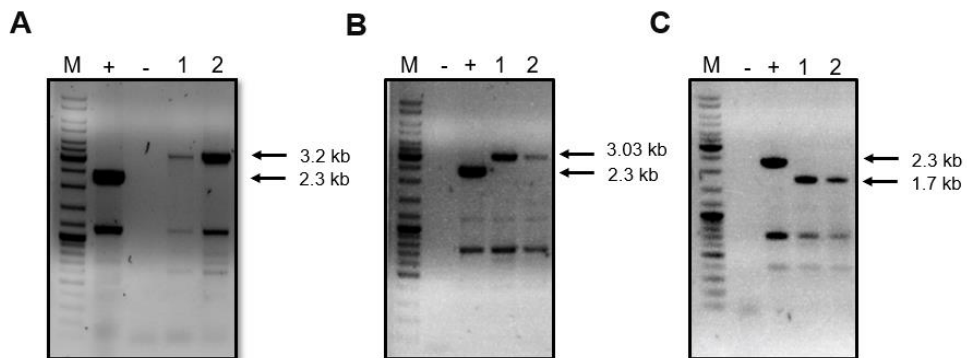


Fig. 16. Electroforesis en gel de agarosa 1% del producto de PCR de la mutación del gen A) *rssB*, B) *rssC* y C) *rssB-rssC* en las cepas 1) UW136 y 2) ptsN-H68A. M marcador de peso molecular, (-) control negativo (H₂O) y (+) control positivo (DNA de la cepa WT).

6.3 Efecto de las mutaciones en los genes *rssB*, *rssC* y *rssB-rssC* sobre el crecimiento celular de las cepas UW136 y ptsN-H68A

Con el propósito de caracterizar el efecto de la inactivación de los genes *rssB*, *rssC* y *rssB-rssC*, se realizó una cinética de crecimiento en las cepas mutantes generadas.

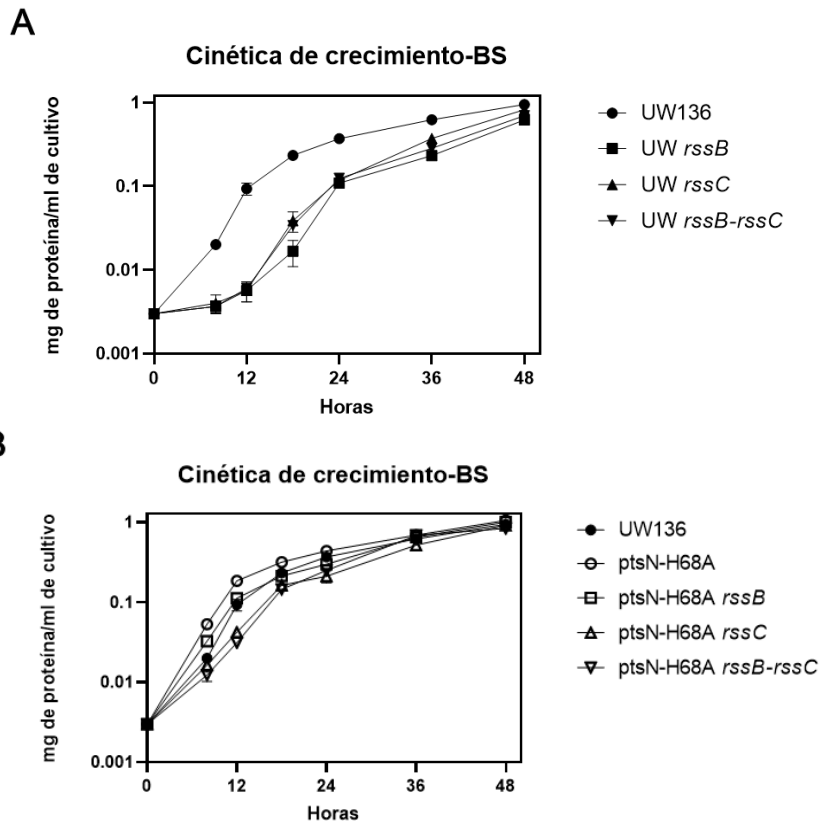


Fig 17. Cinética de crecimiento. Efecto de la inactivación de los genes *rssB*, *rssC* y *rssB-rssC* en las cepas A) UW136 y B) ptsN-H68A. Las células se crecieron en medio BS-líquido a 30°C durante 48h.

Como se observa en la fig. 17A, a partir de las 8 h (en fase exponencial), las cepas UW *rssB*, UW *rssC* y UW *rssB-rssC*, presentan una fase lag más extendida que la cepa silvestre. Sin embargo, producen la misma cantidad de biomasa que la cepa silvestre al final de la fase estacionaria (48 h). De manera interesante, se puede notar que la cepa ptsN-H68A *rssB* presenta un fenotipo similar a su parental, mientras que en las cepas ptsN-H68A *rssC* y ptsN-H68A *rssB-rssC* se observa una ligera diferencia en la fase lag del crecimiento celular (fig. 17B). Esto sugiere que la

mutación de los genes *rssB-rssC* tienen un efecto en la regulación de proteínas involucradas en el crecimiento celular en fase exponencial.

6.4 Fenotipo de PHB

A continuación, las cepas mutantes fueron evaluadas en su capacidad para sintetizar PHB. Dado que proponemos que RssB y RssC participan en la presentación de RpoS para su degradación ante los complejos ClpXP y ClpAP, predecimos que los niveles de este factor sigma aumenten en un fondo genético con mutaciones nulas en *rssB-rssC*. En ausencia de estos genes, la acumulación de RpoS promovería la expresión del operón biosintético *phbBAC* y la acumulación de PHB desde etapas tempranas, a diferencia de lo que ocurre en la cepa silvestre.

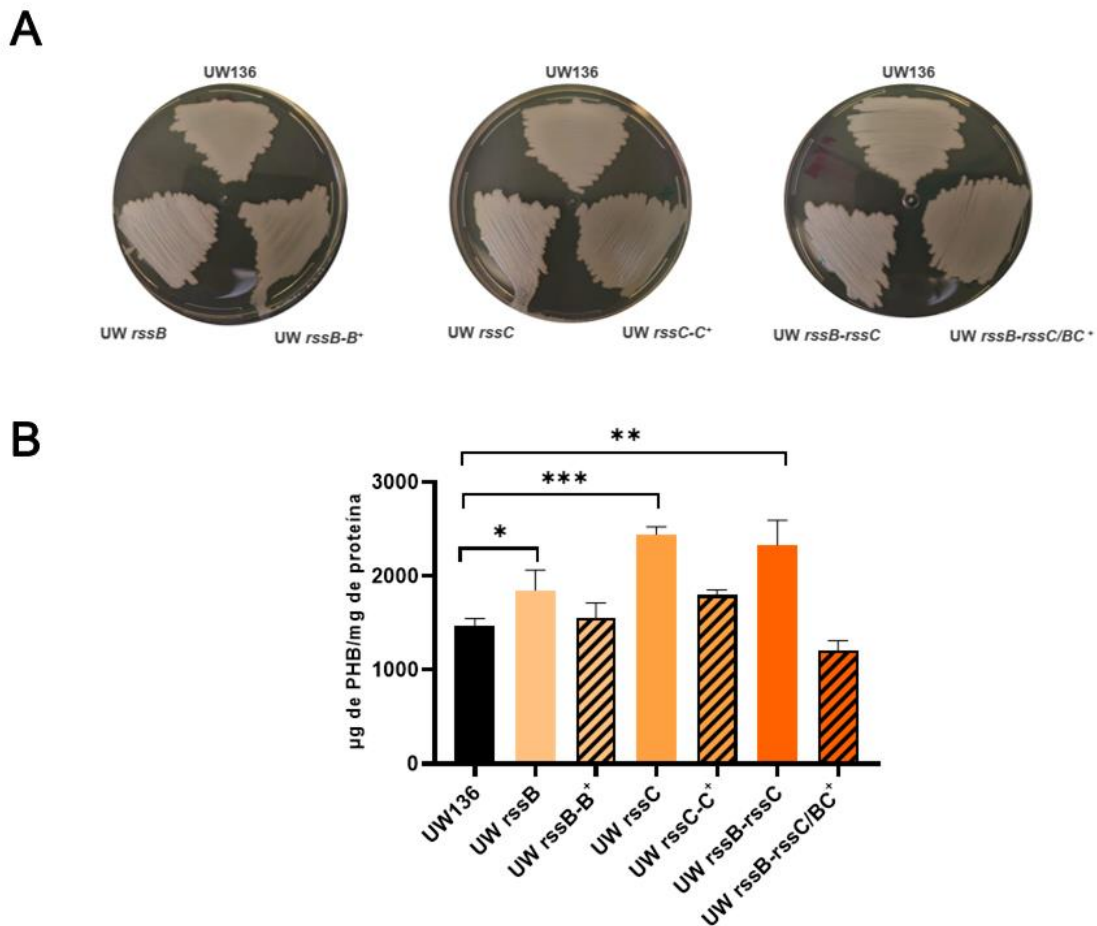
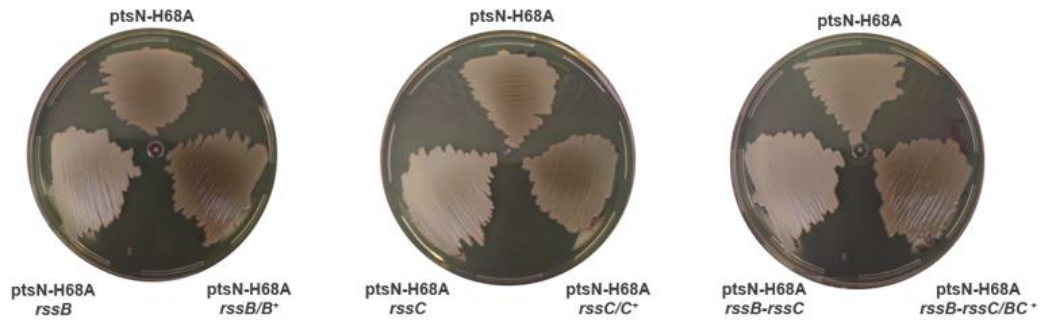


Fig. 18 Fenotipo de síntesis de PHB. Se observa el efecto de la inactivación de los genes *rssB*, *rssC* y *rssB-rssC* en la cepa UW sobre el fenotipo A) y acumulación B) de PHB. Las células se crecieron en medio sólido PY sacarosa 2% durante 72 h a 30°C. La diferencia significativa fue analizada mediante *t*-test y se encuentra indicada (* denota valor $P < 0.01$, ** denota valor $P < 0.001$, *** denota valor $P < 0.0001$).

Como se observa en la fig. 18B, la cepa UW *rssB* presentó un aumento en la producción de PHB del 26% en comparación con la cepa UW136, mientras que en las cepas UW *rssC* y UW *rssB-rssC*, se observó un aumento del 66% y 59%, respectivamente.

A



B

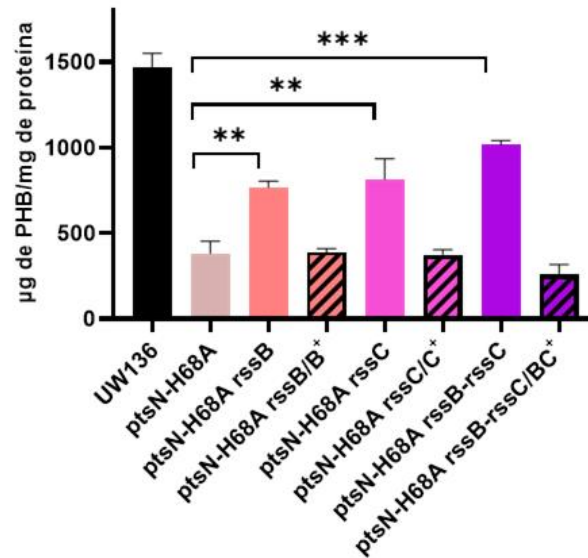


Fig. 19. Fenotipo de síntesis de PHB. Se observa el efecto de la inactivación de los genes *rssB*, *rssC* y *rssB-rssC* en la cepa ptsN-H68A sobre el fenotipo A) y acumulación B) de PHB. Las células se crecieron en medio sólido PY sacarosa 2% durante 72 h a 30°C. La diferencia significativa fue analizada mediante *t*-test y se encuentra indicada (** denota valor $P < 0.001$, *** denota valor $P < 0.0001$).

La cepa ptsN-H68A presentó una disminución de PHB del 74% (fig.19B), lo que concuerda con los antecedentes presentados, en donde se menciona que en presencia de la proteína EIIA^{Ntr} no fosforilada, se afecta la transcripción de *phbR* y *phbBAC* mediante la inducción de la degradación de RpoS por el complejo proteolítico ClpAP (Muriel-Millán *et al.*, 2017).

Similar a la inactivación de *clpP* y *clpA* (Muriel-Millán *et al.*, 2017), la mutación de los genes *rssB-rssC* restauró de manera parcial la capacidad de síntesis de PHB en la cepa ptsN-H68A con respecto a lo acumulado por la cepa silvestre UW136 (fig. 19). Se observó un aumento en los niveles de PHB del 90% y 113% en las cepas ptsN-H68A *rssB* y ptsN-H68A *rssC*, respectivamente. De manera interesante, se observó un efecto acumulativo en la síntesis de PHB en la cepa ptsN-H68A *rssB-rssC* con un aumento del 165%.

Para confirmar que el efecto que ejercen las mutaciones en los genes *rssB*, *rssC* y *rssB-rssC* sobre la síntesis de PHB no es causado por efectos polares o mutaciones no deseadas, se complementó a las cepas mutantes con los plásmidos pUMA RssB, pUMA RssC y pUMA RssB-RssC, estos permiten insertar una copia complementaria del gen correspondiente en un locus neutro del genoma de *A. vinelandii* nombrado *meIA* (Cocotl-Yañez *et al.*, 2014., Muriel-Millán *et al.*, 2015), a través de un evento de doble recombinación.

Como se esperaba, la complementación de cada una de las cepas redujo los niveles de PHB similares a los mostrados por las cepas parentales UW136 y ptsN-H68A (fig. 18 y fig. 19). Estos resultados confirman que los genes *rssB-rssC* están asociados con el efecto observado sobre la producción de PHB.

6.5 Detección de la proteína RpoS en las cepas mutantes en los genes *rssB*, *rssC* y *rssB/rssC*

Previamente se demostró que en *A. vinelandii* el factor sigma RpoS es degradado en fase exponencial (8 h de crecimiento) por el complejo proteolítico ClpXP (Muriel-Millán *et al.*, 2017). Nuestra hipótesis propone que las proteínas RssB y RssC actúan como un adaptador de RpoS, por lo que en su ausencia, los niveles del factor sigma aumentarían desde la fase exponencial debido a la falta de su proteólisis por ClpXP.

Por medio de ensayos Western blot, se determinó que los niveles de RpoS aumentaron en doble proporción durante la fase exponencial en las cepas mutantes UW *rssB*, UW *rssC* y UW *rssB/rssC*, en comparación con la cepa UW136 (fig. 20).

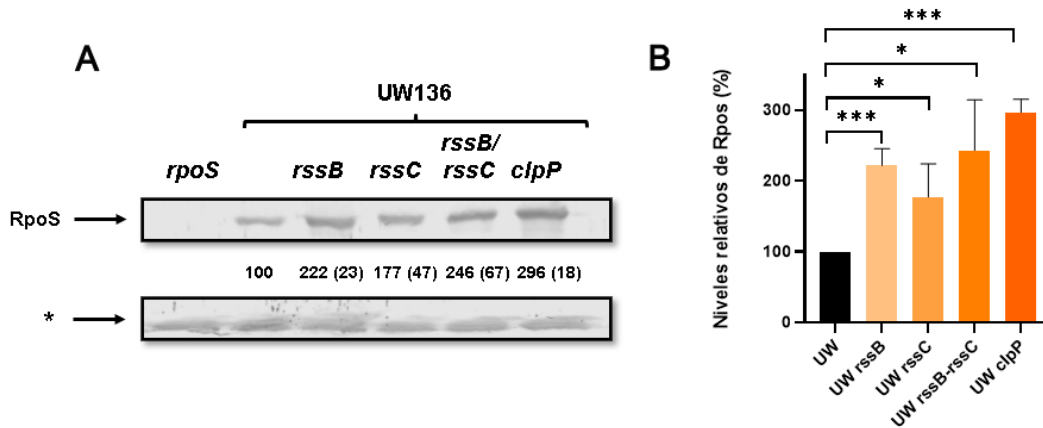


Fig. 20. Mutaciones en *rssB-rssC* afectan los niveles de RpoS en la cepa UW136 en fase exponencial. A) Detección de RpoS por Western blot de las cepas UW136, UW *rpoS*, UW *rssB*, UW *rssC*, UW *rssB-rssC* y UW *clpP* (los números entre paréntesis representan la desviación estándar). Las cepas se crecieron en medio PY sacarosa 2% durante 8 h a 30°C. Para cada muestra, se utilizaron 20 µg de proteína total. La proteína RpoS fue detectada utilizando un antisuero policlonal anti-RpoS. Una interacción inespecífica del antisuero con una proteína que migra más bajo que RpoS se muestra como el control de carga (*). B) Densitometría del experimento en el panel A, la densidad de los niveles de RpoS en la cepa UW136 fue asumida como 100%. La diferencia significativa fue analizada mediante *t-test* y se encuentra indicada (* denota valor $P < 0.01$, *** denota valor $P < 0.0001$).

Adicionalmente se determinó la estabilidad *in vivo* de RpoS en fase exponencial. La síntesis de proteínas se inhibió con la adición de espectinomicina (1 mg/ml concentración final). Se demostró que en la cepa UW136, la vida media de RpoS fue de <30 minutos. Como se esperaba, RpoS presentó una vida media mayor a 120 minutos en las cepas UW *rssB*, UW *rssC* y UW *rssB-rssC* (fig. 21). En conjunto estos resultados sugieren fuertemente que RssB y RssC promueven la degradación de RpoS en fase exponencial.

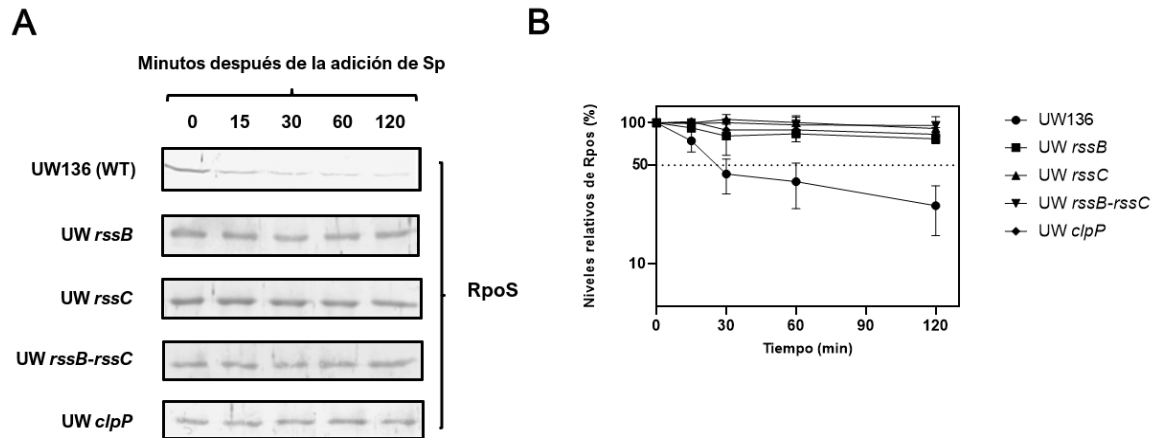


Fig. 21. Mutaciones en *rssB-rssC* afectan la estabilidad de RpoS en la cepa UW136 en fase exponencial. A) Determinación de la estabilidad de RpoS en cepas cultivadas en medio líquido PY durante 8 h a 30°C. La síntesis de proteínas se detuvo mediante la adición de 1 mg/ml de espectinomicina. RpoS fue detectado por Western blot. B) Densitometría del experimento en el panel A, la densidad de los niveles de RpoS en el tiempo 0 fue asumida a ser el 100%. Se presenta el promedio de tres experimentos independientes.

De acuerdo con lo reportado, la cepa *ptsN-H68A* presentó niveles menores de RpoS que la cepa UW136 (fig. 22). Por otro lado, se observó un aumento de aproximadamente tres veces en los niveles de RpoS, en las cepas *ptsN-H68A rssB*, *ptsN-H68A rssC* y *ptsN-H68A rssB-rssC* en comparación con su parental *ptsN-H68A*, sin embargo, los niveles no se restauraron a valores silvestres.

Observamos que la estabilidad de Rpos en la cepa *ptsN-H68A* presentó una vida media de <15 minutos. Por otra parte, la estabilidad de RpoS tuvo una vida media de aproximadamente 50 minutos en las cepas *ptsN-H68A rssB* y *ptsN-H68A rssB-rssC*, mientras que en la cepa *ptsN-H68A rssC* fue de aproximadamente 70 minutos (fig. 23).

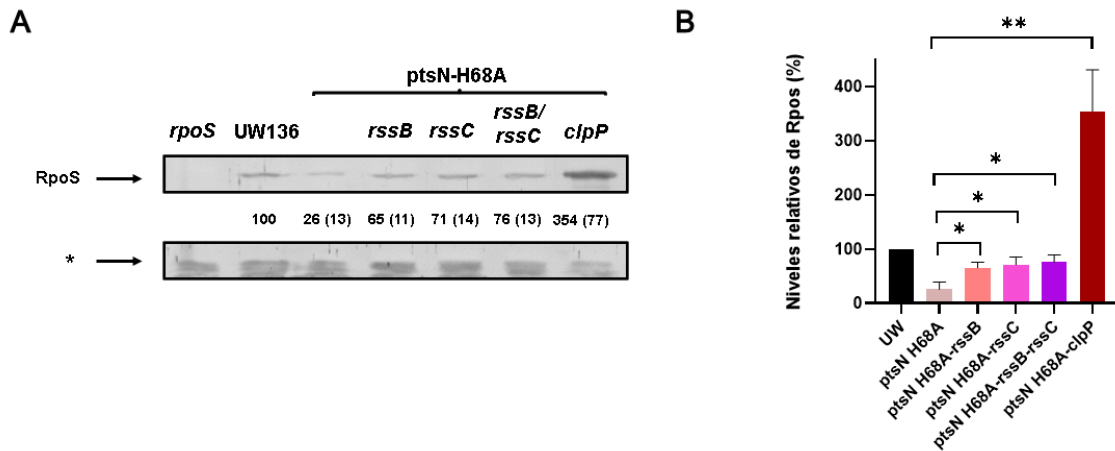


Fig. 22. Mutaciones en *rssB-rssC* afectan los niveles de RpoS en la cepa *ptsN-H68A* en fase exponencial. A) Detección de RpoS por Western blot de las cepas UW136, UW *rpoS*, *ptsN-H68A* *rssB*, *ptsN-H68A* *rssC*, *ptsN-H68A* *rssB-rssC* y *ptsN-H68A* *clpP* (los números entre paréntesis representan la desviación estándar). Las cepas se crecieron en medio PY sacarosa 2% durante 8 h a 30°C. Para cada muestra, se utilizaron 20 µg de proteína total. La proteína RpoS fue detectada utilizando un antisuero policlonal anti-RpoS. Una interacción inespecífica del antisuero con una proteína que migra más bajo que RpoS se muestra como el control de carga (*). B) Densitometría del experimento en el panel A, la densidad de los niveles de RpoS en la cepa UW136 fue asumida como 100%. La diferencia significativa fue analizada mediante *t*-test y se encuentra indicada (* denota valor $P < 0.01$, ** denota valor $P < 0.001$).

En conjunto, estos resultados sugieren que las proteínas RssB y RssC podrían participar en la presentación de RpoS para su degradación por el complejo ClpXP en fase exponencial en condiciones silvestres y en presencia de la proteína EIIA^{Ntr} en su estado no fosforilado.

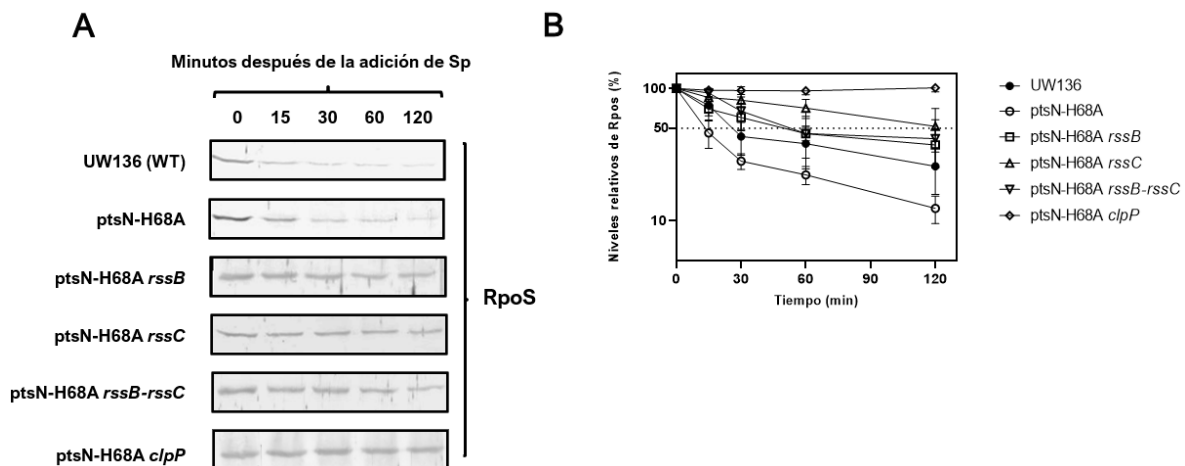


Fig. 23. Mutaciones en *rssB-rssC* afectan la estabilidad de RpoS en la cepa *ptsN-H68A* en fase exponencial. A) Determinación de la estabilidad de RpoS en cepas cultivadas en medio líquido PY durante 8 h a 30°C. La síntesis de proteínas se detuvo mediante la adición de 1 mg/ml de espectinomicina. RpoS fue detectado por Western blot. B) Densitometría del experimento en el panel A, la densidad de los niveles de RpoS en el tiempo 0 fue asumido a ser el 100%. Se presenta el promedio de tres experimentos independientes.

Muriel *et al.* 2017 reportó que los niveles y estabilidad de RpoS disminuyen en la cepa ptsN-H68A durante la fase estacionaria debido a su degradación por la actividad del complejo proteolítico ClpAP. Por lo tanto, se decidió determinar si los niveles de RpoS son afectados por las proteínas RssB y RssC en la cepa ptsN-H68A en fase estacionaria.

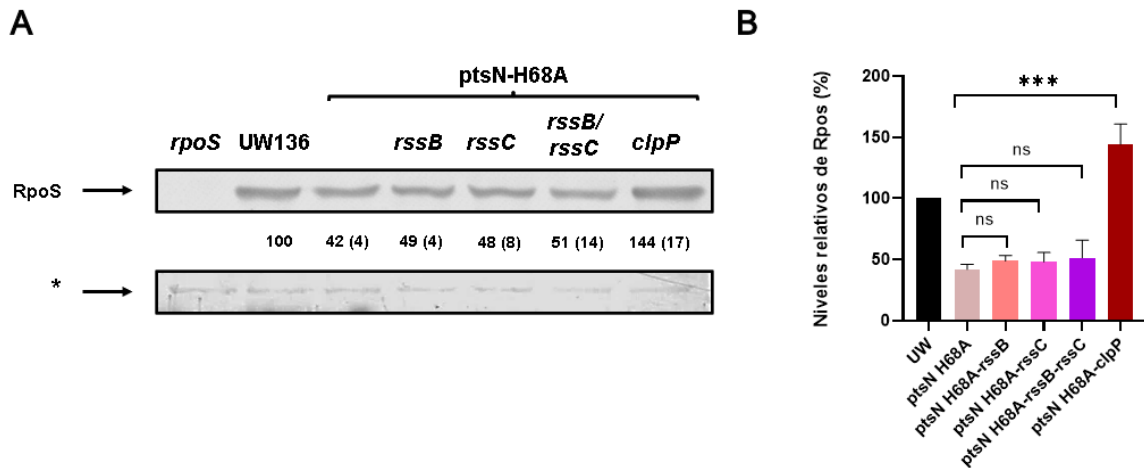
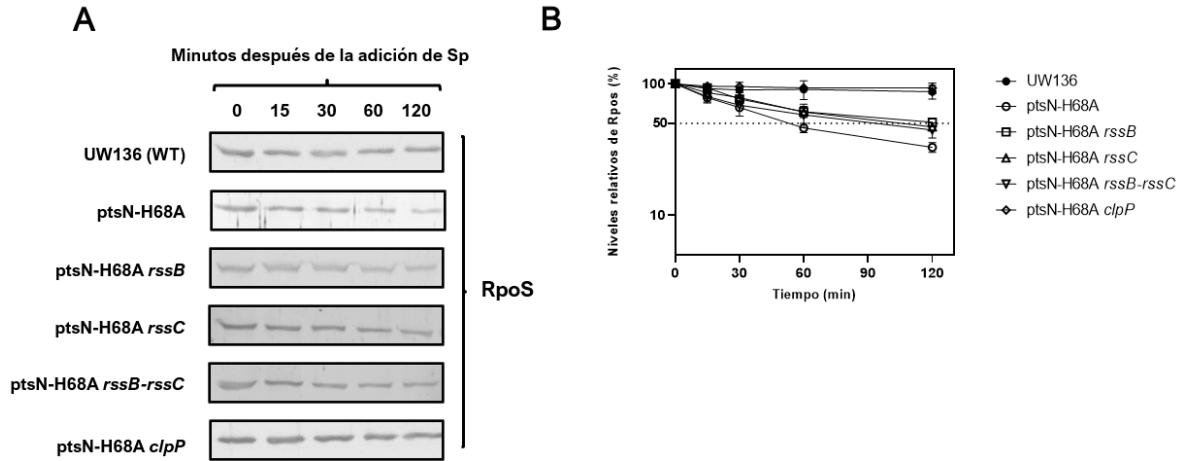


Fig. 24. Mutaciones en *rssB-rssC* afectan los niveles de RpoS en la cepa ptsN-H68A en fase estacionaria. A) Detección de RpoS por Western blot de las cepas UW136, UW *rpoS*, ptsN-H68A *rssB*, ptsN-H68A *rssC*, ptsN-H68A *rssB-rssC* y ptsN-H68A *clpP* (los números entre paréntesis representan la desviación estándar). Las cepas se crecieron en medio PY sacarosa 2% durante 8 h a 30°C. Para cada muestra, se utilizaron 20 µg de proteína total. La proteína RpoS fue detectada utilizando un antisuero policlonal anti-RpoS. Una interacción inespecífica del antisuero con una proteína que migra más bajo que RpoS se muestra como el control de carga (*). B) Densitometría del experimento en el panel A, la densidad de los niveles de RpoS en la cepa UW136 fue asumida como 100%. La diferencia significativa fue analizada mediante *t*-test y se encuentra indicada (***) denota valor $P < 0.0001$, NS denota No significativo).

Como se muestra en la fig. 24, no se observaron diferencias significativas en los niveles de RpoS en las diferentes cepas mutantes comparadas con su parental ptsN-H68A. Esto sugiere que en fase estacionaria y en presencia de la proteína EIIA^{Ntr} en estado no fosforilado, existe una vía independiente a RssB-RssC por la cual se presenta a RpoS al complejo proteolítico ClpAP.



A continuación se determinó la estabilidad de RpoS en la cepa ptsN-H68A, la cual presentó una vida media de 53 minutos aproximadamente, similar a lo reportado previamente por Muriel-Millán *et al.* 2017, la cual fue de 45 minutos, y menor a la determinada en la cepa silvestre (>120 minutos) (fig. 25). Las mutaciones en *rssB* y *rssC* en la cepa ptsN-H68A aumentaron la vida media de RpoS a 90 minutos aproximadamente (fig. 25). Estos resultados sugieren, que en fase estacionaria y en presencia de EIIA^{Ntr} en su estado no fosforilado, existe un ligero aumento en la estabilidad de RpoS pero este no tiene un efecto significativo en los niveles de la proteína, por lo que es probable que exista una vía independiente de RssB por la cual se presenta RpoS al complejo ClpAP en esta condición.

Fig. 25. Mutaciones en *rssB-rssC* afectan la estabilidad de RpoS en la cepa ptsN-H68A en fase estacionaria. A) Determinación de la estabilidad de RpoS en cepas cultivadas en medio líquido PY durante 8 h a 30°C. La síntesis de proteínas se detuvo mediante la adición de 1 mg/ml de espectinomicina. RpoS fue detectado por Western blot. B) Densitometría del experimento en el panel A, la densidad de los niveles de RpoS en el tiempo 0 fue asumido a ser el 100%. Se presenta el promedio de tres experimentos independientes.

7 Discusión

RpoS es un factor sigma fundamental en la respuesta general a estrés durante la fase estacionaria. *E. coli* es el modelo de investigación en el que se han descrito la mayoría de los estudios sobre el papel de RpoS así como los mecanismos que regulan su actividad. Por ejemplo, se ha reportado que durante la fase exponencial de crecimiento es reconocido por el adaptador RssB y es entregado posteriormente al complejo proteolítico ClpXP para su degradación. En otras especies como *P. aeruginosa* y *A. vinelandii* también se ha descrito este mecanismo de regulación de RpoS, sin embargo, hasta el momento no se ha identificado una proteína adaptadora que lo presente a ClpXP. En este trabajo se logró demostrar evidencias que proponen la participación de las proteínas RssB y RssC en la degradación de RpoS por ClpXP en *A. vinelandii*.

La inactivación de los genes *rssB*, *rssC* y *rssB-rssC* sobre el fondo genético de la cepa UW136 produjo una extensión en la fase lag de crecimiento (fig. 17-A), fenotipo similar al reportado en la cepa UW *clpP* (Muriel-Millán *et al.*, 2017). Por otro lado, se observó en menor magnitud el efecto sobre la fase lag del crecimiento en las cepas donde se encuentra la proteína EIIA^{Ntr} en su estado no fosforilado (fig. 17-B), debido probablemente a que los niveles de RpoS fueron similares a los de la cepa silvestre. En un estudio publicado por Nyström, T. 2004, se menciona que el crecimiento y la supervivencia celular están regulados por la competición de los factores sigma por la adquisición de la RNA polimerasa, debido a que su disponibilidad está limitada en la célula. Además, esta competencia está regulada por la alarmona ppGpp y por la disponibilidad de nutrientes en el ambiente. Por lo tanto, es probable que el fenotipo observado en el crecimiento de las cepas mutantes esté relacionado con la presencia del factor sigma RpoS desde una etapa temprana, debido a la ausencia del sistema que lleva a cabo su degradación (RssBC-ClpXP), de manera que podría favorecer su competencia con el factor $\sigma 70$ por el core de la RNA polimerasa, afectando la activación de sus genes blanco involucrados en el crecimiento celular ocasionando un desbalance en la bacteria.

Además, se observó un aumento de la síntesis de PHB en las cepas UW RssB, UW RssC y UW RssB-RssC (fig. 18), lo cual podría deberse a un aumento en la transcripción del operón *phbBAC* debido a que uno de sus promotores es dependiente de RpoS (Hernández-Eligio *et al.*, 2011). Por otro lado, estas mutaciones restauraron de manera parcial el fenotipo de PHB en las cepas derivadas de *ptsN-H68A* (fig. 19). Anteriormente se reportó que mutaciones en los genes *clpA* o *clpP* recuperaron de manera parcial la producción de PHB en la cepa mutante *ptsP*. Aunque los niveles de RpoS y la transcripción del operón *phbBAC* se recuperaron completamente, la proteína EIIA^{Ntr} en su estado no fosforilado también ejerce un efecto negativo a nivel postranscripcional en la expresión del operón (Muriel *et al.*, 2017). Por lo tanto, son necesarios experimentos adicionales para determinar si en las cepas estudiadas se ve afectada la expresión del operón *phbBAC* a nivel transcripcional y postranscripcional. Además, sería interesante realizar una cinética de acumulación de PHB y así determinar si hay una mayor producción del polímero a partir de la fase exponencial en las mutantes *rssB* y *rssC*.

La participación de RssB en la degradación de RpoS se describió por primera vez en *E. coli* (Pratt & Silhavy, 1996). Posteriormente, se reportó la estructura de una proteína homóloga de RssB en *P. aeruginosa* nombrada PA2798 (PDB-3EQ2), compartiendo 23% de identidad con RssB de *E. coli* (Battesti *et al.*, 2013). Sin embargo, existen diferentes referencias que mencionan que estas proteínas no son funcionalmente equivalentes. Por ejemplo, a pesar de que ambas proteínas se clasifican como reguladores de respuesta y poseen un dominio efector fosfatasa del tipo PP2C Ser/Thr, en *E. coli* este dominio no es funcional, ya que carece de algunos de los aspartatos catalíticos críticos de unión a Mn²⁺, y, por lo tanto, no tiene actividad. Por otro lado, en PA2798 los residuos clave de unión a metales están conservados, por lo que se considera que el sitio activo es funcional (Galperin, 2006). Cabe mencionar que estos residuos también están presentes en RssB de *A. vinelandii*. Otro punto para considerar es su estructura, a pesar de que en RssB de *E. coli* y *P. aeruginosa*, el dominio receptor y el dominio efector están unidos por un linker, en *E. coli* está formado por una α hélice que contiene un motivo de ácidos glutámicos (EEEE) que le confieren flexibilidad, de manera que, en su forma activa,

podría ajustarse para lograr múltiples conformaciones, permitiendo interacciones ajustables con histidina cinasas, RpoS, ClpX y anti-adaptadores. Por el contrario, en PA2798 y en RssB de *A. vinelandii* este motivo está ausente, por lo que el linker es más rígido y no podría sustituir funcionalmente a RssB de *E. coli* (Dorich *et al.*, 2019).

De manera interesante, en la última parte de este trabajo se logró determinar a través de ensayos Western blot, que la mutación de *rssB* aumenta los niveles y estabilidad de RpoS en las cepas UW136 y ptsN-H68A durante la fase exponencial (figs. 20-23), similar a lo reportado (Gottesman, 2019). Además, esta red de regulación involucra a RssC, ya que se observó el mismo efecto sobre RpoS en las cepas mutantes del gen (figs. 20-23). Estos datos sugieren que RssB y RssC participan conjuntamente en la degradación del factor sigma RpoS por el complejo ClpXP.

Adicionalmente, se evaluó la participación de RssB y RssC en la degradación de RpoS en la cepa ptsN-H68A (EIIA^{Ntr} no fosforilada) durante la fase estacionaria. Como se observa en la fig. 24, no hubo cambios significativos en los niveles del factor sigma en las cepas que tiene mutaciones en *rssB* o *rssC*, pero si un ligero aumento en la estabilidad de RpoS (fig. 25). Por lo que, en esta condición, la degradación de RpoS por el complejo ClpAP es independiente de RssB-RssC, y, por lo tanto, existe un adaptador o vía adicional que lleva a cabo el reconocimiento del factor sigma y su presentación al complejo proteolítico.

Anteriormente se mencionó que RssC presenta un 89% de identidad con la proteína PA2797 de *P. aeruginosa*, ambas poseen un dominio STAS (Sulfate transport and anti-sigma factor antagonist) el cual es regulado por la fosforilación del primer residuo de serina dentro de un motivo DSSG. Las proteínas que poseen este dominio están involucradas en un mecanismo de regulación nombrado Partner-Switching System (PSS), el cual controla la disponibilidad de un factor sigma objetivo de acuerdo con las necesidades celulares, a través de la interacción proteína-proteína. En este sistema participan 4 elementos: un factor anti-sigma con

actividad serina cinasa (dominio HATPasa), una proteína anti-anti-sigma (dominio STAS fosforilable), una proteína serina fosfatasa (dominio PP2C) y un factor sigma objetivo. En un PSS típico el factor anti-sigma fosforila al anti-anti-sigma para unirse al factor σ objetivo inhibiendo su unión con la RNA polimerasa. En presencia de una señal inductora, la fosfatasa PP2C se activa y desfosforila al anti-anti-sigma, el cual es reconocido por el anti-sigma ya que tiene una mayor afinidad por su estado no fosforilado, lo que permite la liberación del factor σ , y, por lo tanto, la transcripción de sus genes blanco (Bouillet *et al.*, 2018).

Se ha sugerido que en *P. aeruginosa* las proteínas PA2798 (dominio PP2C) y PA2797 (dominio STAS) forman parte de un PSS que lleva a cabo la regulación del factor sigma RpoS, debido a que poseen dominios funcionales necesarios para este tipo de regulación, y, además, por las diferencias estructurales entre PA2798 y RssB de *E. coli* (Gottesman, 2019). Sin embargo, no hay evidencia que demuestre esta hipótesis. Por otro lado, dada la alta identidad de las proteínas RssB-RssC de *A. vinelandii* con las proteínas PA2798-PA2797 de *P. aeruginosa*, se espera que en esta última especie estas proteínas también estén involucradas en la degradación de RpoS.

A pesar de que RssB (dominio PP2C) y RssC (dominio STAS) tienen dominios funcionales necesarios para la actividad de un posible PSS, nuestros datos sugieren que ambos genes participan en la degradación proteolítica del factor sigma RpoS, lo que nos permite proponer un nuevo modelo de regulación (fig. 26) En nuestro modelo proponemos que en la fase exponencial de crecimiento, las proteínas RssB y RssC inducen la degradación de RpoS por el complejo proteolítico ClpXP. Dado que la inactivación de estos genes produce el mismo efecto sobre los niveles y estabilidad de RpoS, estas proteínas podrían estar interaccionando entre ellas para llevar a cabo su función,

Este evento también ocurre en presencia de la proteína EIIA^{Ntr} en su estado no fosforilado. Sin embargo, en esta condición, pero en fase estacionaria, RssB y

RssC, no participan en la degradación del factor sigma RpoS por el complejo proteolítico ClpAP, por lo que existe una vía independiente que regula este proceso.

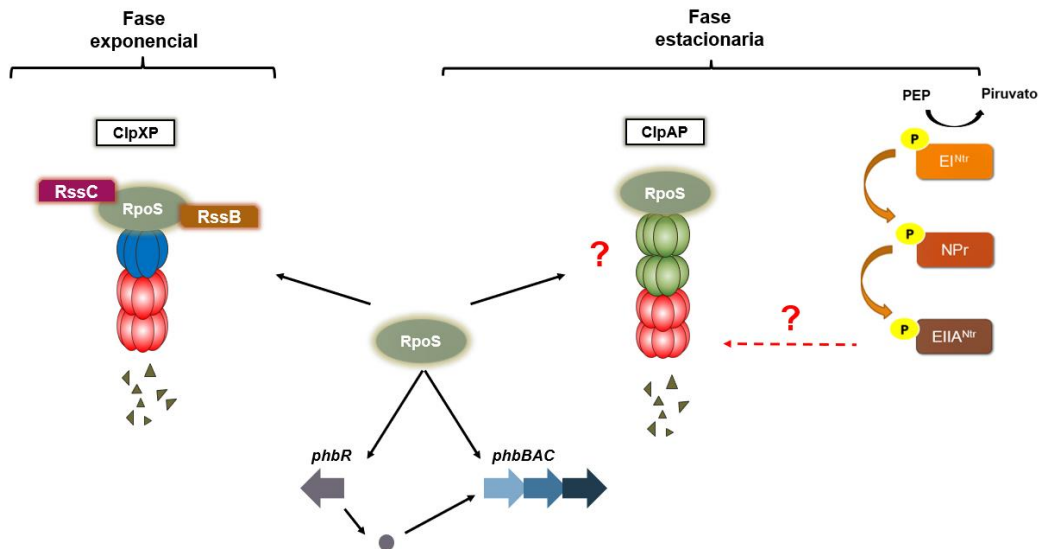


Fig. 26. Modelo propuesto para la degradación de RpoS por los complejos proteolíticos ClpXP y ClpAP en *A. vinelandii*.

8 Conclusiones

- La mutación de los genes *rssB-rssC* tiene un efecto positivo y acumulativo sobre la producción de PHB en las cepas UW136 y ptsN H68A.
- Durante la fase exponencial de crecimiento de *A. vinelandii*, las proteínas RssB y RssC promueven la degradación del factor sigma RpoS a través del complejo ClpXP.
- Existe una vía alterna por la cual se presenta RpoS al complejo proteolítico ClpAP para su degradación en fase estacionaria en presencia de la proteína EII^{Ntr} no fosforilada.

9 Perspectivas

- Caracterizar a nivel transcripcional y postranscripcional la expresión del operon *phbBAC* en las cepas mutantes de los genes *rssB*, *rssC* y *rssB-rssC*.
- Determinar a través de ensayos de doble híbrido la interacción de las proteínas RssB-RssC con RpoS y el complejo ClpXP.
- Determinar si en *P. aeruginosa* las proteínas PA2798-PA2797 están involucradas en la degradación de RpoS.

10 Bibliografía

- Alexyev M., Shokolento I., & Croughan T. (1995) Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for Escherichia coli vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene* 160(1):63-67.
- Alonso, I., Ruiz, S., Quintanilla, D., & Zarcero, S. (2009). Análisis Instrumental. *Netbiblo*, 33–64
- Battesti, A., Hoskins, R., Tong, S., Milanesio, P., Mann, J., Kravats, A., Tsegaye, Y., Bougdour, A., Wickner, S & Gottesman, S. (2013) Anti-adaptors provide multiple modes for regulation of the RssB adaptor protein. *Genes & Dev.* 2013. 27: 2722-2735
- Battesti, A., Majdalani, N., & Gottesman, S. (2011) The RpoS-Mediated General Stress Response in Escherichia coli. *Annu. Rev. Microbiol.* 65:189–213.
- Bertani, I., Sevo, M., Kojic, M., & Venturi, V. (2003) Role of GacA, LasI, RhII, Ppk, PsrA, Vfr and ClpXP in the regulation of the stationary-phase sigma factor rpoS/RpoS in Pseudomonas. *Arch Microbiol* 180: 264–271.
- Bittner, L.-M., Arends, J. & Narberhaus, F. (2016) Mini review: ATP-dependent proteases in bacteria. *Biopolymers*, 105: 505-517.
- Bouillet S, Arabet D, Jourlin-Castelli C, Méjean V, Iobbi-Nivol C. (2018) Regulation of σ factors by conserved partner switches controlled by divergent signalling systems. *Environ Microbiol Rep.* 10(2):127-139.
- Cocotl-Yañez M, *et al.* (2014) A small heat-shock protein (Hsp20) regulated by RpoS is essential for cyst desiccation resistance in Azotobacter vinelandii. *Microbiol* 160(Pt 3):479-487.
- Deutscher, J., Ake, F.M., Derkaoui, M., Zebre, A.C., Cao, T.N., Bouraoui, H., *et al.* (2014) The bacterial phosphoenolpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system: regulation by protein phosphorylation and phosphorylation dependent protein-protein interactions. *Microbiol Mol Biol Rev* 78: 231–256.

- Dorich V, Brugger C, Tripathi A, Hoskins JR, Tong S, Suhanovsky MM, Sastry A, Wickner S, Gottesman S, Deaconescu AM. (2019) Structural basis for inhibition of a response regulator of σ S stability by a ClpXP antiadaptor. *Genes Dev.* 33(11-12):718-732.
- Espín, G. (2001) *Biología de Azotobacter vinelandii* en *Microbios en Línea*. Martínez Romero, E. y Martínez Romero, J. Editores. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Espín, G. (2016) Genes Involved in the Formation of Desiccation- Resistant Cysts in *Azotobacter Vinelandii*. In *Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria*, F.J. de Bruijn (Ed.).
- Galinier, A., & Deutscher, J. (2017) Sophisticated Regulation of Transcriptional Factors by the Bacterial Phosphoenolpyruvate: Sugar Phosphotransferase System. *J Mol Biol*- 429, 773–789.
- Galperin MY. (2006) Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domain combinations. *J Bacteriol.* 188(12):4169-82. PMID: 16740923; PMCID: PMC1482966
- González, Y., Meza, J., González., Córdova, J. (2013) Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: Plásticos de origen microbiano. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 29 (1) 77-115.
- Gottesman S. (2019) Trouble is coming: Signaling pathways that regulate general stress responses in bacteria. *The Journal of biological chemistry*, 294(31), 11685–11700.
- Gur, E., Biran, D & Ron, E. (2011) Regulated proteolysis in Gramnegative bacteria — how and when?. *Nature Reviews: Microbiology*. Vol. 25: 839-848.
- Hernández-Eligio, A., Castellanos, M., Moreno, S., & Espín, G. (2011) Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes phbBAC by PhbR and RpoS. *Microbiol.* 157(11):10.
- Jendrossek, D., Handrick, R. (2002) Microbial degradation of polihidroxicanoatos. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:403–32

- Kirstein, J., Moliere, N., Dougan, D.A., & Turgay, K. (2009) Adapting the machine: adaptor proteins for Hsp100/Clp and AAA1 proteases. *Nat Rev Microbiol* 7: 589–599.
- Law, J.H., & Slepecky, R.A. (1961) Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. *J Bacteriol* 82: 33–36.
- Lipa P, Janczarek M. (2020) Phosphorylation systems in symbiotic nitrogen-fixing bacteria and their role in bacterial adaptation to various environmental stresses. PMID: 32095335; PMCID: PMC7020829.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193(1):265-275.
- Mahmoud, S., & Chien, P. (2018) Regulated Proteolysis in Bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 2018. 87:677–96.
- Muriel-Millán, L. (2015) El sistema de fosfotransferasa asociado a nitrógeno (PTS^{Ntr}) y su papel en la regulación de la síntesis de poli- β -hidroxibutirato y alquilresorcinoles en *Azotobacter vinelandii*. Universidad Autónoma de México.
- Muriel-Millán, L., Moreno, S., & Espín, G. (2017) Unphosphorylated EIIA^{Ntr} induces ClpAP-mediated degradation of RpoS in *Azotobacter vinelandii*. *Molecular Microbiology* 104(2), 197–211.
- Nyström, T. (2004), MicroReview: Growth versus maintenance: a trade-off dictated by RNA polymerase availability and sigma factor competition?. *Molecular Microbiology*, 54: 855-862.
- Noar JD, Bruno-Bárcena JM. (2018) *Azotobacter vinelandii*: the source of 100 years of discoveries and many more to come. *Microbiology (Reading)*. 164(4):421-436.
- Noguez, R., Segura, D., Moreno, S., Hernández, A., Juárez, K., & Espín, G. (2008) Enzyme I^{Ntr}, NPr and IIA^{Ntr} are involved in regulation of the poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *J Mol Microbiol Biotechnol* 15: 244–254.

- Peralta-Gil, M., Segura, D., Gúzman, 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 transcriptional activator phbR. *J. Bacteriol.* 184:5672-5677.
- Pflüger-Grau, K., & Görke, B. (2010) Regulatory roles of the bacterial nitrogen-related phosphotransferase system. *Trends Microbiol* 18: 205–214.
- Pratt LA, Silhavy TJ. (1996) The response regulator SprE controls the stability of RpoS. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93(6):2488-92. doi: 10.1073/pnas.93.6.2488. PMID: 8637901; PMCID: PMC39824.
- Sadoff, H. L. (1975). Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 39 (4):516-39.
- Schneider, C.A., Rasband, W.S., & Eliceiri, K.W. (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Meth* 9: 671–675.
- Segura, D., Cruz, T., & Espín, G. (2003) Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly- β -hydroxybutyrate synthesis. *Archives of Microbiology* 179: 437–443.
- Segura, Daniel; Núñez, Cinthia; & Espín, Guadalupe. (2020) *Azotobacter* Cysts. In: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
- Velázquez-Sánchez C, Espín G, Peña C & Segura D. (2020) The Modification of Regulatory Circuits Involved in the Control of Polyhydroxyalkanoates Metabolism to Improve Their Production. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8:386.