



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

ESTUDIO *IN VITRO* E *IN VIVO* DE LA RELACIÓN  
ENTRE LAS PROTEÍNAS EIIA<sup>Ntr</sup> y RsmA DE  
*AZOTOBACTER VINELANDII*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A :

JÓSE PABLO OLACHE ÁLVAREZ

DIRECTOR DE TESIS:

Dra. ELDA GUADALUPE ESPÍN OCAMPO  
Ciudad Universitaria, CD. MX., 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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Hoja de Datos del Jurado**

1. Datos del alumno	1. Datos del alumno
Apellido paterno	Olache
Apellido materno	Álvarez
Nombre(s)	José Pablo
Teléfono	5551593402
Universidad Nacional Autónoma de México	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias	Facultad de Ciencias
Carrera	Biología
Número de cuenta	313133662
2. Datos del tutor	2. Datos del tutor
Grado	Dra
Nombre(s)	Elda Guadalupe
Apellido paterno	Espín
Apellido materno	Ocampo
3. Datos del sinodal 1	3. Datos del sinodal 1
Grado	Dr
Nombre(s)	José Luis
Apellido paterno	Puente
Apellido materno	García
4. Datos del sinodal 2	4. Datos del sinodal 2
Grado	Dra
Nombre(s)	Laura
Apellido paterno	Kawasaki
Apellido materno	Watanabe
5. Datos del sinodal 3	5. Datos del sinodal 3
Grado	Dr
Nombre(s)	Daniel Genaro
Apellido paterno	Segura
Apellido materno	González
6. Datos del sinodal 4	6. Datos del sinodal 4
Grado	Q
Nombre(s)	Viviana
Apellido paterno	Escobar
Apellido materno	Sánchez
7. Datos del trabajo escrito	7. Datos del trabajo escrito
Título	Estudio <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de la relación entre las proteínas EIIA <sup>Ntr</sup> y RsmA de <i>Azotobacter vinelandii</i>
Número de páginas	85
Año	2021

## **DEDICATORIA**

*A Yolanda Álvarez, Fernando Olache,  
Luis Olache y Yamili Vargas.*

## AGRADECIMIENTOS

A la **Universidad Nacional Autónoma de México**, por brindarme un espacio y un ambiente de conocimientos sin igual, de todos los ámbitos. Ser parte de la UNAM ha sido una de las más grandes experiencias de mi vida.

A **CONACyT** por el apoyo brindado mediante el donativo CB2015-255212-B a G. Espín. Y al apoyo económico PAPIIT IN212120.

A la **Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo**, por aceptarme como parte de su grupo de investigación, así como por ser una guía y una excelente tutora. Por su apoyo y atención que me fueron brindados en todo momento, sin los cuales no hubiese sido posible mi avance y culminación de este trabajo. Sin lugar a duda, una piedra angular en mi formación académica.

A los miembros de mi jurado, el **Dr. José Luis Puente García**, la **Dra. Laura Kawasaki Watanabe**, el **Dr. Daniel Genaro Segura González** y la **Q. Viviana Escobar Sánchez**, por su tiempo, conocimientos y consejos muy valiosos que me permitieron no sólo mejorar este trabajo, sino también mis aptitudes como estudiante.

A las técnicas académicas del laboratorio 6 del Instituto de Biotecnología, la **Biol. María Soledad Moreno León** y la **M. C. Josefina Guzmán Aparicio**, por su apoyo invaluable para cualquier duda o conflicto que se me presentara tanto dentro como fuera del laboratorio. Son excelentes personas que tienen mi eterna gratitud.

A todos los miembros del grupo Espín. Al **Dr. Daniel Genaro Segura González** y a la **Dra. Cinthia Ernestina Nuñez López**, por todos sus consejos y conocimiento que me brindaron durante los seminarios en donde presenté mi trabajo que me ayudaron a enriquecer y mejorar mi formación. A todos mis compañeros y amigos del laboratorio, quienes hicieron que la experiencia fuese más amena y divertida, en quienes encontré no sólo ayuda y consejos técnicos, sino también momentos agradables y amistades valiosas. Un agradecimiento especial a **Cristian Ortiz**, por guiarme, ayudarme y soportarme todos los días durante mi formación.

A mis amigos “tallerines”: César, Jonathan, Cony, Jime, Fer, Miguel, Armando, Lau, Cata, Aldo, Eira, Kenya, Colu, Isaí, María, Emily, Karen, Alan y Richi. Gracias por hacer de la vida de foráneo una experiencia más divertida con todo y sus tribulaciones, valoro mucho la amistad de cada uno de ustedes. De la misma forma, agradezco a mis amigos que conocí en la carrera Isaac, Gustavo, Isa, Ireri, Aida, Axel e Ichi, quienes me acompañaron en este largo trayecto y me brindaron su amistad en las buenas y las malas, gracias por estar siempre.

A mi mamá, **Yolanda Álvarez**, una mujer inspiradora que me ha enseñado a seguir adelante y a perseguir mis sueños siempre, su cariño y apoyo incondicionales me han acompañado toda mi vida y no podría haber llegado hasta aquí sin ello, gracias por hacerme saber que siempre puedo contar contigo, para todo. A mi papá, **Fernando Olache**, quien ha actuado como una guía a lo largo de mi vida y a quien admiro mucho, gracias por todos esos momentos en que nos has sacado una sonrisa y todos aquellos en que me has permitido ver el camino correcto a través de la confianza que me inspiras y los consejos invaluable que me has ofrecido. A ambos les debo todo.

A mi hermano, **Luis Olache**, quien, a pesar de nuestras diferencias y nuestras peleas, es una persona a quien quiero muchísimo y por quien lo daría todo y que sé que siempre estará cuando lo necesite. Por todos esos momentos invaluable y divertidos a lo largo de nuestra vida, nada sería lo mismo sin ti.

A **Yamili Vargas**, por todo el amor, cariño, confianza, compañía en todo momento y consejos que me han llevado adelante. Gracias por todos los momentos a tu lado y por ser la persona en quien puedo depositar mi total amor y confianza, siempre puedo saber con total certeza que, a tu lado, todo estará bien. Sigamos el camino.

## RESUMEN

*Azotobacter vinelandii* es una bacteria de interés industrial debido a su capacidad de producir compuestos con propiedades similares a distintos tipos de plásticos sintéticos como el polipropileno. Entre estos compuestos se encuentra el poli(3-hidroxi butirato) (PHB), un polímero compuesto por unidades de 3-hidroxi butirato producido en forma de gránulos intracelulares insolubles en periodos de limitación de nutrientes en el medio. La regulación de la síntesis de PHB es compleja, debido a que se encuentran involucrados distintos mecanismos reguladores. En este trabajo, se llevaron a cabo una serie de experimentos para dilucidar la relación que existe entre dos sistemas de regulación que intervienen en la síntesis de PHB en *A. vinelandii*, el Sistema de Fosfotransferasa Asociado a Nitrógeno (PTS<sup>Ntr</sup>) y el sistema de regulación de metabolismo secundario Rsm, específicamente, entre las proteínas EIIA<sup>Ntr</sup> y RsmA. EIIA<sup>Ntr</sup> es una proteína con capacidad reguladora cuyos efectos dependen de su estado de fosforilación. En relación con la síntesis de PHB, esta enzima es capaz de promover la degradación del factor sigma RpoS por medio del complejo chaperona-proteasa ClpAP cuando se encuentra en su estado no fosforilado, lo cual disminuye la síntesis de PHB debido a que RpoS es un activador transcripcional de genes involucrados en la ruta biosintética. Por otro lado, RsmA es una proteína de unión a RNA con afinidad por la secuencia Shine-Dalgarno de sus blancos, de los cuales reduce su tasa de traducción. En *A. vinelandii*, esta proteína posee como blanco los RNAs mensajeros de genes involucrados en la síntesis de PHB. En este trabajo, a pesar de que no fue posible establecer una relación de regulación entre las dos proteínas estudiadas, se encontró que no establecen interacciones proteína-proteína ni *in vitro*, mediante el método de *pull-down*, ni *in vivo*, empleando el método de doble híbrido. Adicionalmente, los resultados obtenidos por ensayo de doble híbrido, sugieren que la proteína EIIA<sup>Ntr</sup> es capaz de formar homodímeros dependiendo de su estado de fosforilación. Por último, se concluyó que los sRNAs *rsmZ1* y *rsmZ2* no son indirectamente regulados por EIIA<sup>Ntr</sup> por medio de su efecto inhibitorio sobre RpoS, a pesar de que su expresión se encuentra aumentada en dicha fase de crecimiento.

## ABSTRACT

*Azotobacter vinelandii* is a bacterium of industrial interest because of its capacity to produce compounds with properties similar to different types of synthetic plastics such as polypropylene. Among these compounds, there is poly(3-hydroxybutyrate) (PHB), a polymer composed of 3-hydroxybutyrate units produced by *A. vinelandii* in the form of insoluble intracellular granules in periods of nutrient limitation in the medium. Regulation of PHB synthesis is complex, involving many regulatory mechanisms. In this work, a series of experiments were carried out to elucidate the relationship between two regulatory systems involved in PHB synthesis in *A. vinelandii*, the Nitrogen Associated Phosphotransferase System (PTS<sup>Ntr</sup>), and the Rsm secondary metabolism regulation system, specifically, between proteins EIIA<sup>Ntr</sup> and RsmA. EIIA<sup>Ntr</sup> is a protein with regulatory capacity, whose effects depend on its phosphorylation state. Concerning the synthesis of PHB, this enzyme can promote the degradation of the stationary phase sigma factor RpoS through the chaperone-protease complex ClpAP when it is in its non-phosphorylated state,

which decreases PHB synthesis due to RpoS being a transcriptional activator of genes involved in the biosynthetic route. On the other hand, RsmA is an RNA-binding protein that binds to the Shine-Dalgarno sequence of its targets, diminishing their translation rates; in *A. vinelandii*, this protein has the messenger RNAs of genes involved in PHB synthesis as its targets. In this work, it was not possible to establish a regulatory relationship between EIIA<sup>Ntr</sup> and RsmA; consistently, it was found that these proteins do not establish protein-protein interactions, as determined *in vitro* by the protein pull-down assay and *in vivo*, using a bacterial two-hybrid method. In contrast, the two-hybrid assay showed that EIIA<sup>Ntr</sup> protein could form homodimers in a phosphorylation-dependent manner. Finally, it was concluded that the sRNAs *rsmZ1* and *rsmZ2* are not indirectly regulated by EIIA<sup>Ntr</sup> through its inhibitory effect upon RpoS, even though their transcription is increased during the stationary phase.

## CONTENIDOS

### Índice General

1. Introducción .....	4
1.1. Características generales de <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	4
1.1.1. Fijación de nitrógeno.....	5
1.1.2. Enquistamiento .....	7
1.2. Producción de biopolímeros .....	9
1.2.1. Regulación genética y metabólica de la producción de PHB .....	11
1.3. Sistema de dos componentes GacS/GacA .....	15
1.4. Sistema de Fosfotransferasa Asociado a Nitrógeno (PTS <sup>Ntr</sup> ) .....	18
2. Antecedentes .....	20
1.1. Relación entre los sistemas Gac y PTS <sup>Ntr</sup> .....	20
1.2. EIIA <sup>Ntr</sup> promueve la degradación de RpoS mediada por el complejo de proteasa ClpAP .....	21
1.3. La pirofosfohidrolasa RppH tiene como blanco a RsmA en <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	23
1.4. La doble mutación <i>rppH/ptsN</i> provoca una reversión parcial en el fenotipo de producción de PHB en <i>A. vinelandii</i> .....	24
1.5. Relación de EIIA <sup>Glc</sup> con CsrA en <i>E. coli</i> .....	25
2. Justificación.....	27
3. Objetivos .....	27
4. Materiales y métodos.....	28
1.1. Medios y condiciones de cultivo.....	28



1.2.	Protocolos con DNA .....	29
1.3.	Extracción de plásmido por el método del perclorato .....	29
1.4.	Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> .....	29
1.5.	Transformación de <i>E. coli</i> .....	30
1.6.	Extracción de DNA cromosomal de <i>A. vinelandii</i> .....	30
1.7.	Cuantificación de proteína por el método de Lowry .....	31
1.8.	Sistema bacteriano de dos híbridos (BACTH) .....	32
1.9.	Medición cuantitativa de actividad de $\beta$ -galactosidasa .....	37
1.10.	Purificación de EIIA <sup>Ntr</sup> mediante columna de afinidad .....	38
1.11.	Ensayo de pull-down de interacción proteína-proteína .....	40
1.12.	Medición de actividad transcripcional de <i>rsmZ1</i> y <i>rsmZ2</i> por medio del gen reportero <i>gusA</i> .....	41
5.	Resultados y discusión .....	43
1.1.	Ensayo de doble híbrido .....	43
	.....	45
1.2.	Ensayo de pull-down .....	49
1.3.	Actividad transcripcional de <i>rsmZ1</i> y <i>rsmZ2</i> .....	52
6.	Conclusiones .....	58
7.	Anexos .....	60
8.	Referencias .....	75

## 1. Introducción

### 1.1. Características generales de *Azotobacter vinelandii*

*Azotobacter vinelandii* es una bacteria perteneciente a la familia *Pseudomonadaceae*, sobre la que se tiene interés en los campos de la biotecnología y la agricultura, debido a que presenta características distintivas tales como capacidad de fijar nitrógeno, su fisiología aeróbica, formación de quistes resistentes a la desecación y la producción de distintos polímeros como polihidroxibutirato (PHB), alginatos y alquilresorcinoles (ARs) (70, 80).

En el área de la agronomía, esta especie ha sido aprovechada debido a su producción de antibióticos, como el éster de ácido tetraénico alifático con actividad antifúngica reportado por Pridachina y colaboradores en 1982 (62), así como de compuestos que promueven el crecimiento vegetal; además del efecto antagonista que ejerce contra organismos patógenos (28). Adicionalmente, por su capacidad de fijar nitrógeno, ha sido ampliamente utilizado como biofertilizante (47).

Las células de *A. vinelandii* son ovoides, con un diámetro que varía entre 1.5 y 2  $\mu\text{m}$ ; suelen habitar en suelos y se pueden encontrar como células individuales, en pares, agregados y cadenas. Dado que pertenecen al grupo de bacterias Gram negativas, poseen una membrana externa que cuenta con lipopolisacáridos, así como peptidoglicano en el espacio periplásmico entre ambas membranas, que a su vez contiene ácido murámico y mureína (11). Mientras que el rango de pH óptimo para su crecimiento en condiciones de fijación de nitrógeno es de 7.0-7.5, el intervalo en que crecen cuando hay nitrógeno combinado en el ambiente es de 4.8-8.5 (12).

En cuanto a características genéticas, desde 1979, de acuerdo con lo descrito por Sadoff y colaboradores, se sabe que *A. vinelandii* es una bacteria poliploide que posee al menos 40 copias de su cromosoma (68). Del mismo modo, desde 1971, se sabe que los quistes de *A. vinelandii* contienen al menos 10 veces más cantidad de DNA que *E. coli*, obteniendo un cálculo de  $1.5 \times 10^{-13}$  g de DNA por célula durante la etapa exponencial, valor que disminuyó hasta  $3.4 \times 10^{-14}$  g de DNA por célula durante el enquistamiento (67).

Con el fin de dilucidar si la diferencia en la cantidad de DNA entre *A. vinelandii* y *E. coli*, cuya cantidad de DNA por célula es de aproximadamente  $3.5 \times 10^{-15}$  g, se debe a la presencia de un mayor número de cromosomas, se han realizado distintos experimentos a través de los años, como la determinación del tamaño del cromosoma de *A. vinelandii* mediante electroforesis en gel de campo pulsado, cuyo valor resultó de alrededor de 4,700 kb el cual es similar al de *E. coli*, que cuenta con un cromosoma de aproximadamente 5,000 kb (41). Por lo tanto, la mayor cantidad de DNA que presenta *A. vinelandii* en relación con otras bacterias como *E. coli*, se debe a un mayor número de copias de material cromosomal (63). En el 2009, se reportó la secuencia del genoma de *A. vinelandii* cepa DJ, donde se encontró que posee un solo cromosoma circular de 5,365,318 pb y no presenta DNA plasmídico (72).

### 1.1.1. Fijación de nitrógeno

La fijación de nitrógeno es la conversión reductiva de nitrógeno atmosférico ( $N_2$ ) en amonio. La fijación de nitrógeno biológica es un proceso exclusivo de bacterias denominadas diazótrofes, las cuales tienen en común características como la presencia y

utilización de la metaloenzima nitrogenasa que se encarga de la reducción de  $N_2$  a amonio. Existen distintas variedades de nitrogenasa, las cuales usualmente se clasifican de acuerdo con la composición de su sitio activo, el cual contiene, generalmente, Molibdeno, Vanadio o Hierro. En el caso del género *Azotobacter*, es de los pocos grupos que poseen las tres variedades de nitrogenasa. La familia de nitrogenasas más estudiada, presenta el cofactor denominado FeMo (26). Estas enzimas contienen dos proteínas, codificadas por los genes *nifDK* y *nifH*. La proteína NifDK presenta un cofactor de hierro-molibdeno y una estructura tetramérica; mientras que NifH es un homodímero con un agregado  $[F_4-S_4]$  que participa en la transferencia de electrones (65).

Los agregados de los complejos de nitrogenasa pueden ser inactivados de manera irreversible en presencia de oxígeno y sus especies reactivas, debido a la oxidación del hierro presente en ellos, lo cual inhibe el crecimiento diazótrofo; por lo que los organismos fijadores de nitrógeno han desarrollado distintos métodos que previenen la inactivación de su respectiva nitrogenasa (50, 51).

Las especies pertenecientes al género *Azotobacter*, son capaces de fijar  $N_2$  en medios donde la concentración de  $O_2$  es alta, lo que logran gracias a distintas estrategias (32). De acuerdo con Espín, 2001; existen tres principales mecanismos de protección de la nitrogenasa en *A. vinelandii*: protección conformacional, protección respiratoria y autoprotección. En el primer mecanismo, ocurre una inactivación protegida de la nitrogenasa por la formación de un complejo por unión no covalente con una proteína denominada FeSII; la protección respiratoria consiste en el desacoplamiento de la cadena de flujo de electrones, lo que tiene como consecuencia un incremento en la tasa de respiración y, por ende, rápido consumo de

O<sub>2</sub>, lo que previene la entrada de O<sub>2</sub> y su posterior interacción con la nitrogenasa. Por último, en la autoprotección, participa la enzima nitrogenasa reductasa, la cual reduce el O<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (12, 74).

### 1.1.2. Enquistamiento

Las especies pertenecientes al género *Azotobacter* son capaces de llevar a cabo un proceso de diferenciación celular morfológica, fisiológica y metabólica, en el cual se forman quistes metabólicamente inactivos. Esta es una de las estrategias utilizadas por las bacterias con el fin de sobrevivir ante distintos tipos de estrés ambiental. Reduciendo su tasa metabólica, las células evitan la inanición, además de que se presenta la formación de estructuras celulares complejas que las protegen de condiciones adversas. Una vez que inicia el proceso de enquistamiento, se pueden distinguir ciertas características en las células, tales como, la pérdida de motilidad y el engrosamiento de la pared celular (6, 66).

El enquistamiento es un evento continuo, empezando con la inducción de células vegetativas, las cuales, gradualmente, adoptan una forma circular, mientras que el cuerpo central se cubre por capas gruesas (Fig. 1). Morfológicamente, los quistes son circulares, y contienen una capa externa, denominada exina, seguida de una cubierta interna más gruesa, conocida como intina la cual presenta una estructura bilaminar. Durante el proceso se observa la formación de protrusiones entre la célula y la cápsula, los cuales forman glóbulos que coalescen, generando estructuras aplanadas que producen la exina. Una vez que inicia el enquistamiento, existe síntesis continua de los componentes de la cápsula. Una de las maneras de inducir enquistamiento experimentalmente, consiste en sembrar las

colonias en medio Burks, adicionando n-butanol o hidroxibutirato como única fuente de carbono, en donde el quiste tarda entre 3 y 5 días en formarse; mientras que la presencia de glucosa en el medio antagoniza los efectos promotores de enquistamiento del  $\beta$ -hidroxibutirato (BHB) (13, 76, 81, 24, 38).

Los quistes son estructuras de resistencia, ya que pueden soportar condiciones que en su estado vegetativo no serían capaces de resistir, tales como altas temperaturas, tratamiento sónico, radiación ultravioleta y desecación; sin embargo, son susceptibles a agentes quelantes como el EDTA (82). En los ensayos donde se han sometido dichos quistes a radiación UV, estos requieren el doble de la dosis para ser inactivados en comparación con células vegetativas. Además, se ha observado que la resistencia a distintas condiciones está relacionada con la formación de la exina y la intina; asimismo, se ha registrado una pérdida de resistencia a radiación UV durante la germinación (77).

Las células que se encuentran en el proceso de enquistamiento sufren cambios en cuanto a su metabolismo, ya que se han registrado alteraciones en la actividad de ciertas enzimas durante la diferenciación. En un inicio, las actividades de la nitrogenasa y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa disminuyen, mientras que las reacciones dependientes de enzimas como la isocitrato deshidrogenasa, BHB deshidrogenasa y malato sintasa se encuentran elevadas a las tres horas después del inicio del enquistamiento. Por otro lado, la síntesis de ácidos nucleicos se detiene completamente hasta la decimosegunda hora y la síntesis proteica se mantiene a través de todo el proceso (25).

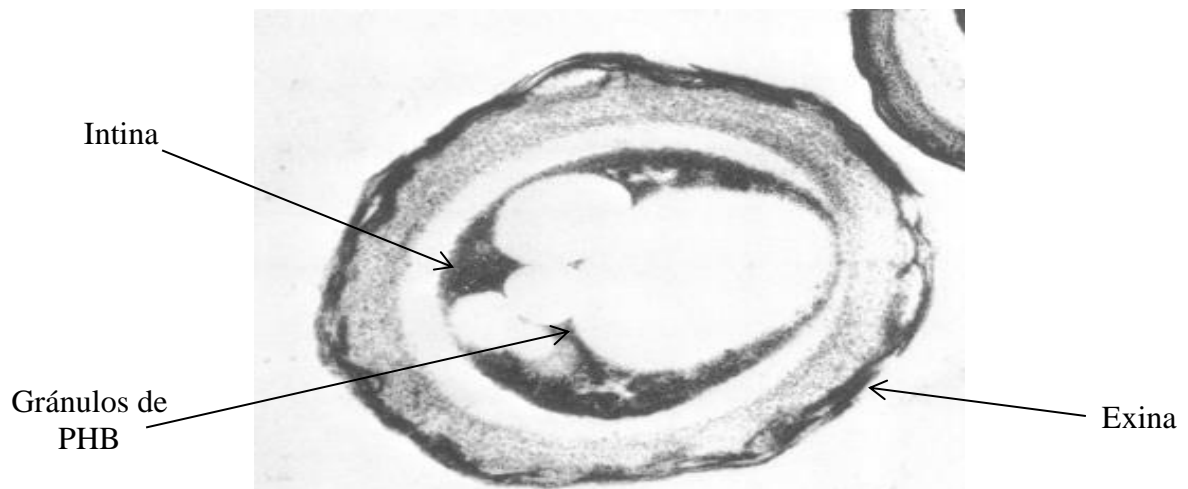


Figura 1. Quiste de *A. vinelandii*. Presenta gránulos de PHB en el cuerpo central y se encuentra rodeado por capas de intina y exina. Modificado de Wyss, 1969.

## 1.2. Producción de biopolímeros

La generación y demanda de plásticos aumenta con el paso del tiempo rápidamente; de acuerdo con el sitio World Economic Forum, en el 2015 se registró una manufactura aproximada de 320 millones de toneladas de plástico en el mundo, en comparación con el año 2000 donde el dato fue de aproximadamente 150 millones de toneladas manufacturadas (4). Estas altas cantidades de producción de plástico representan un gran problema ambiental debido al impacto negativo que tiene el plástico sobre el medio y su contribución a la contaminación. Es por esto por lo que la producción y utilización de materiales biodegradables resulta una estrategia más sustentable y necesaria en años recientes con el fin de reducir la huella de carbono. El objetivo a largo plazo es poder manufacturar e implementar este tipo de compuestos a nivel industrial en áreas de índole diversa, desde la agricultura hasta la industria automotriz (59). Los biopolímeros poseen características físicoquímicas similares a la de los materiales derivados del petróleo, sin embargo, estos

pueden ser degradados a dióxido de carbono y agua en condiciones aerobias o a metano en condiciones anaerobias (35).

*A. vinelandii* es capaz de producir, bajo ciertas condiciones, como la limitación de oxígeno o fósforo y un exceso de la fuente de carbono, polihidroxi butirato (PHB), un polímero de alto peso molecular. Este es un poliéster alifático intracelular parecido al polipropileno perteneciente a la familia de los polihidroxi alcanoatos (PHAs), el cual se encuentra involucrado en el almacenamiento de energía en una gran variedad de microorganismos. Este compuesto presenta una alta resistencia a radiación UV y su punto de fusión en su forma cristalina es de 175 °C (14). Los PHAs, de acuerdo con el número de átomos de carbono de los monómeros que los componen, pueden dividirse en dos grandes grupos, de cadena corta (3-5 carbonos) y de cadena larga (6-8 carbonos). Una característica relevante de estos compuestos es que son biodegradables y, adicionalmente, son compatibles con tejidos animales (30, 34).

Sin embargo, la producción de PHAs a gran escala es un tanto problemática, principalmente, debido al costo del sustrato, el proceso de fermentación y a las técnicas de extracción del polímero en cuestión desde dentro de las células. La utilización de glucosa como sustrato es una estrategia ineficiente, ya que se requiere de tres toneladas de este compuesto para producir una tonelada de PHB (56). Se ha reportado que aproximadamente un 40% de los costos de producción de este polímero se debe al sustrato o materia prima, por lo que es crucial la búsqueda e implementación de nuevas estrategias que permitan el uso de fuentes de carbono menos costosas, disminuyendo el costo de la producción (2). Por



todo lo anterior, *A. vinelandii* es un organismo con un gran potencial para ser utilizado en la producción de PHB a nivel industrial (47).

### *1.2.1. Regulación genética y metabólica de la producción de PHB*

La síntesis de PHB se puede inducir al limitar nutrientes esenciales como nitrógeno, fosfato, magnesio o potasio; tras lo cual, los organismos lo acumulan paulatinamente en forma de gránulos (52).

A concentraciones bajas de oxígeno, los agentes oxidantes, que actuarían como aceptores terminales de electrones, son empleados en la ruta biosintética de PHB, cuyo inicio está señalizado debido al incremento en la proporción de NADH/NAD, en donde la síntesis de PHB actúa como un sumidero de electrones (27). El precursor para la síntesis del polímero es la acetil coenzima A (Ac-CoA), la cual es sintetizada a partir de glucosa mediante la vía de glucólisis (17). Bajo la condición de concentraciones bajas de oxígeno, existe una reducción de la tasa del ciclo de Krebs debido a que, al no haber oxígeno disponible, el  $\text{NAD}^+$  no puede ser regenerado a partir de NADH, lo que tiene como consecuencia que no puedan llevarse a cabo las reacciones de oxidación dependientes de  $\text{NAD}^+$  del ciclo de Krebs. Por esto, al generarse Ac-CoA, se favorecerá la actividad de la primer enzima involucrada en la ruta biosintética de PHB, la  $\beta$ -cetotiolasa; cuyo papel es catalizar la condensación reversible de dos moléculas de Ac-CoA, lo que da lugar a la formación de acetoacetyl-CoA (54).

La actividad de la  $\beta$ -cetotiolasa se encuentra regulada por las concentraciones de Ac-CoA y de CoA libre; se ha reportado inhibición de dicha enzima a altas concentraciones de CoA libre; por lo que el flujo de Ac-CoA se inclina hacia el ciclo de Krebs; mientras que se favorece la actividad de la misma cuando existe una alta concentración de Ac-CoA, es decir, en condiciones de ausencia o en cantidades limitantes de un nutriente como el nitrógeno, aumenta la concentración de piruvato y, por ende, la de Ac-CoA, lo que promueve la actividad de la  $\beta$ -cetotiolasa (71).

Posteriormente, el acetoacetyl-CoA sufre una reacción de reducción catalizada por la enzima acetoacetyl-CoA reductasa, donde el NAD(P)H actúa como donador de electrones, y cuyo producto es 3-hidroxi-butiril-CoA, que es el precursor inmediato del PHB. La acetoacetyl-CoA reductasa cuenta con un mecanismo de protección contra oxígeno por grupos tiol y el pH óptimo para su actividad catalítica es de 7.5 (20, 64).

Una vez formados los monómeros de PHB, una tercer enzima se encarga de condensar y polimerizar dichas unidades para obtener dicho polímero, la cual recibe el nombre de PHB sintasa. Esta enzima ha sido encontrada en dos formas; asociada a gránulos o soluble, sin embargo, en condiciones limitantes de carbono, se ha encontrado que la forma principal es la soluble; mientras que, al limitar progresivamente el nitrógeno, la sintasa asociada a gránulos comienza a aumentar con respecto a la soluble. La forma en que actúa esta enzima al sintetizar el polímero provoca una variedad en la longitud de los monómeros que lo componen y el peso molecular del mismo, lo que tiene como resultado la formación de PHAs de cadena corta, mediana y larga, dependiendo de la longitud de los monómeros (1).

Uno de los modelos propuestos para describir la actividad de la PHB sintasa consiste en una transición donde participan dos grupos tiol de la enzima en cuestión, uno de ellos localiza a los monómeros conforme se van sintetizando, mientras que el otro se encarga de localizar al polímero creciente (Fig. 2) (3).

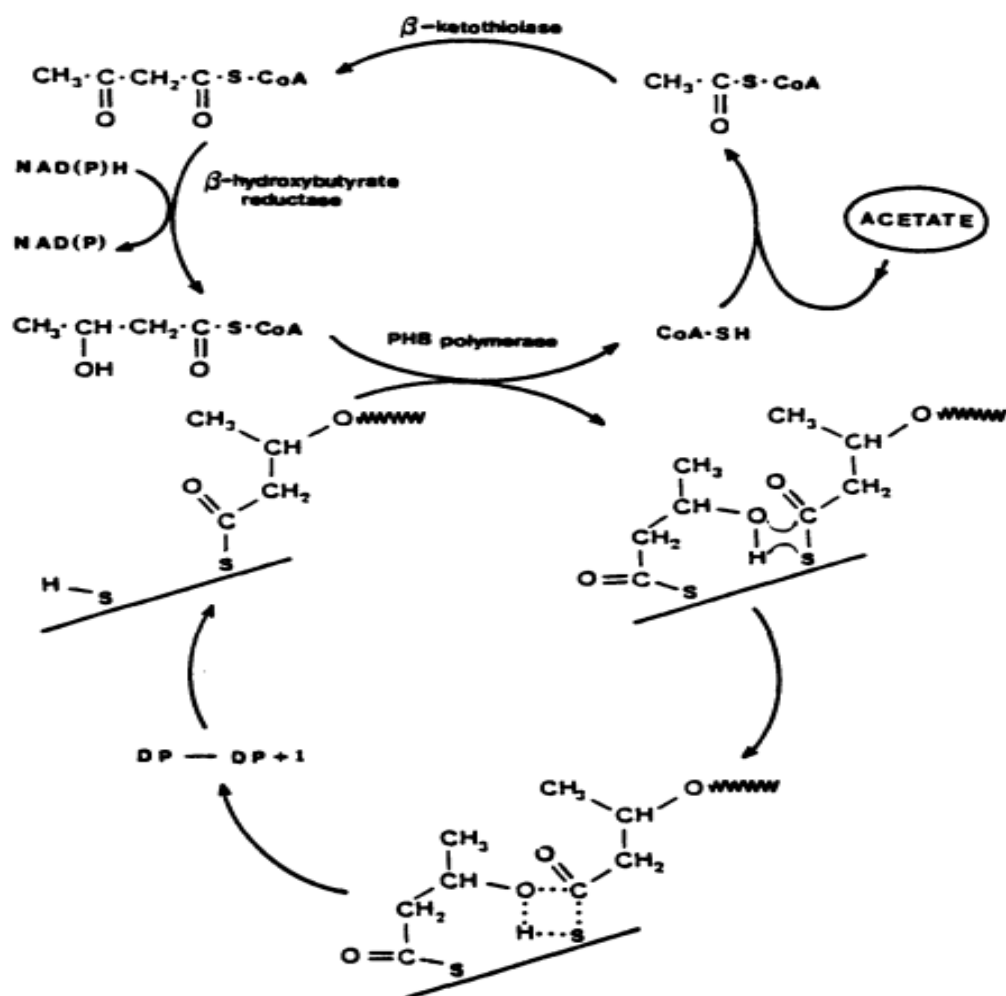


Figura 2. Esquema de la síntesis de PHB, en donde se observan las tres enzimas clave del proceso ( $\beta$ -cetotilasa,  $\beta$ -hidroxibutirato reductasa/acetoacetyl-CoA reductasa, PHB polimerasa/PHB sintasa), así como la estructura de los compuestos intermedios resultantes de las reacciones químicas involucradas en la ruta biosintética. Modificado de Ballard & Holmes, 1987.

Las tres enzimas principales involucradas en la síntesis de PHB se encuentran codificadas en un operón, denominado *phbBAC* (Fig. 3), constituido por los genes *phbB*, *phbA* y *phbC*, que codifican, respectivamente, para acetoacetil-CoA reductasa,  $\beta$ -cetotilasa y PHB sintasa (58). Este operón se transcribe desde dos promotores: P<sub>B2</sub>, activado por el activador transcripcional PhbR; mientras que el otro, P<sub>B1</sub>, es un promotor dependiente del factor sigma RpoS, cuya actividad incrementa durante la fase estacionaria de crecimiento (12).

A su vez, la transcripción del activador transcripcional PhbR inicia de dos promotores, pR1 y pR2, siendo el segundo también dependiente de RpoS. Por esto, junto con el control ejercido por el flujo de energía y las concentraciones de agentes reductores y de Ac-CoA, existe una regulación a nivel transcripcional dependiente de la etapa de crecimiento en que se encuentre la bacteria, debido a los genes dependientes del factor sigma RpoS, lo que provoca un aumento en su transcripción y, por lo tanto, en la síntesis de PHB, durante la fase estacionaria (16).

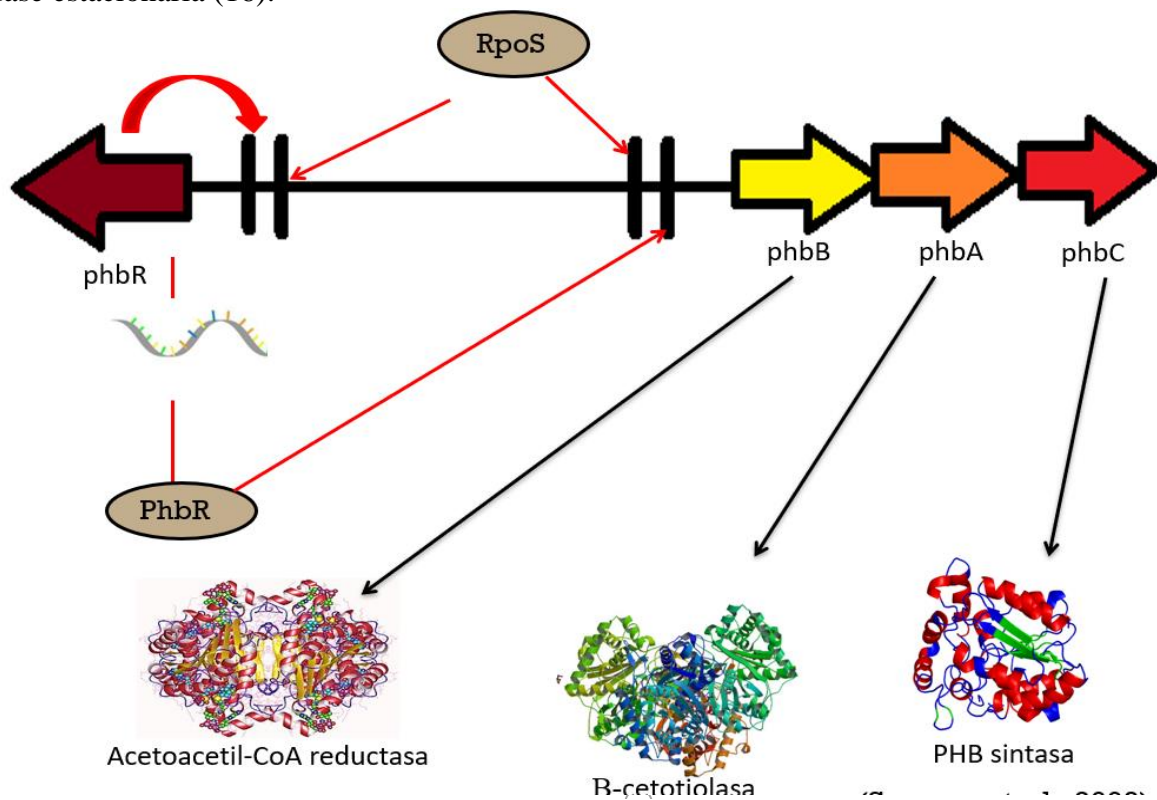


Figura 3. Representación de la regulación transcripcional del operón *phbBAC* en *A. vinelandii*. Las flechas rojas indican activación o regulación positiva.

De acuerdo con el trabajo reportado por Segura y colaboradores en el 2003, mutaciones sobre el operón biosintético *phbBAC* que inhiben la síntesis de PHB, no afectan la capacidad de formar quistes. El fenotipo observado debido a dichas mutaciones son cambios en el flujo del metabolismo hacia la síntesis de alquilresorcinoles y alginato debido al incremento en la disponibilidad de Ac-CoA (69).

### *1.3. Sistema de dos componentes GacS/GacA*

Los sistemas de dos componentes son una familia diversa y conservada de proteínas involucradas en la transducción de señales; en el caso de las bacterias, estas proteínas regulan la expresión de una gran cantidad de genes en respuesta a cambios en su entorno. Esto se lleva a cabo debido a la autofosforilación de una histidín cinasa sensora y posterior fosforilación de su respectiva proteína reguladora de respuesta, la cual presenta distintas actividades como regulador transcripcional, reacciones enzimáticas, unión a RNA o interacción proteína-proteína (10).

Las histidín cinasas son generalmente proteínas integrales de membrana homodiméricas, las cuales contienen un dominio sensor que en la mayoría de los casos se encuentra fuera de la membrana y un dominio catalítico de unión a ATP en su extremo carboxilo. Los dominios de hélices transmembranales están involucrados en la dimerización, junto con el dominio de dimerización y fosforilación (DHp). Las señales externas que recibe el dominio sensor son transferidas al dominio de cinasa mediante cambios conformacionales que afectan a la proteína completa (75).

Se ha reportado que existen RNAs pequeños no codificantes (sRNAs) que participan en vías de regulación de sistemas de dos componentes. Estos pueden ejercer un control negativo o positivo sobre los sRNAs también puede ser activada o inhibida por la unión de un regulador de respuesta a su región promotora. Los sRNAs son capaces, a su vez, de alterar la expresión génica a nivel post-transcripcional, actuando sobre distintos transcritos por complementariedad de bases, o a nivel post-traducciona, al titular ciertas proteínas, alterando su actividad y viabilidad (42, 18).

GacS y GacA conforman un par de cinasa sensora y su regulador de respuesta respectivo, respectivamente, formando un sistema de dos componentes al cual se le ha atribuido el control de funciones relacionadas con virulencia, síntesis de metabolitos secundarios, expresión de enzimas como proteasas y fosfolipasa C, entre otras. En bacterias pertenecientes a la familia Pseudomonadaceae, este sistema ejerce un control positivo sobre la expresión de sRNAs pertenecientes a las familias RsmX, RsmY y RsmZ, los cuales presentan una secuencia activadora río arriba (UAS) a la que se une el regulador de respuesta GacA.

Estos sRNAs se unen a proteínas de la familia RsmA /CsrA, evitando la represión a nivel traducciona que se le atribuye a dichas proteínas, las cuales se unen a secuencias consenso en las regiones Shine-Dalgarno de sus mRNAs blanco, lo que impide el acceso del ribosoma y la iniciación de la traducción. Esto tiene como resultado un aumento en la susceptibilidad de los mRNAs a ser degradados en presencia de RsmA/CsrA. El sistema Rsm se encuentra involucrado en la regulación de distintos procesos tales como formación de biopelículas, percepción de quórum y estrés oxidativo (21, 33, 46).

En el caso de *A. vinelandii*, el sistema GacS/GacA controla la producción de PHB, alginato y alquilresorcinoles (Fig. 4). Se ha reportado que este organismo posee ocho sRNAs de la familia Rsm, de los cuales, siete pertenecen a la familia RsmZ, y uno a la RsmY; estos sRNAs promueven la síntesis de los polímeros anteriormente mencionados, a través de su interacción con RsmA, impidiendo, a su vez, la unión de este con los mRNAs de *algD*, *phbR* y *arpR* (43). De acuerdo con lo reportado por Hernández-Eligio en el 2012, la transcripción de *rsmZ1-Z7* y *rsmY* es dependiente de GacA y dicha expresión ocurre principalmente en la fase estacionaria de crecimiento. Adicionalmente, demostró que la estabilidad de los transcritos de *phbR* y *phbB* se encuentra disminuida en ausencia de GacA y aumentada en ausencia de RsmA, confirmando que RsmA ejerce un control negativo post-transcripcional sobre dichos genes (Hérendez-Eligio, Moreno, Castellanos, Castañeda, Nuñez, & Espín, 2012)(23).

El factor sigma RpoS de respuesta a estrés también se encuentra regulado por el sistema Gac/Rsm, ya que, en cepas de *A. vinelandii* que contienen mutaciones en *gacA*, se observa una disminución del transcrito de *rpoS* (8).

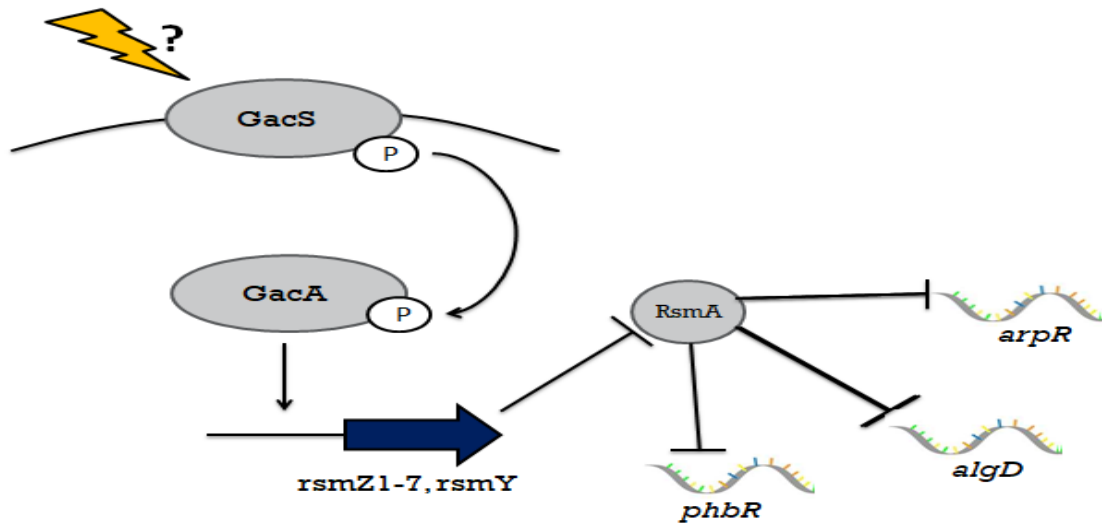


Figura 4. Sistema GacS/GacA en *Azotobacter vinelandii*. El regulador de respuesta GacA promueve la transcripción de los sRNAs *rsmZ-7*, *rsmY*; éstos presentan una alta afinidad por RsmA, uniéndose al mismo, inhibiendo su actividad reguladora sobre los transcritos de *arpR*, *algD* y *phbR*.

#### 1.4. Sistema de Fosfotransferasa Asociado a Nitrógeno ( $PTS^{Ntr}$ )

En las bacterias existe una gran diversidad de regulación y versatilidad metabólica, lo cual se debe, en parte, a los distintos sistemas de transducción de las señales del entorno. Un tipo de estos sistemas es el de fosfotransferasa (PTS), el cual consiste en la transferencia de grupos fosforilo entre distintas proteínas a partir de fosfoenolpiruvato. Este tipo de sistema se encuentra involucrado en la regulación de distintos procesos metabólicos, y existen dos principales clases; el sistema PT de carbohidratos y el sistema asociado a nitrógeno ( $PTS^{Ntr}$ ) (61).

De los dos sistemas mencionados, el más estudiado es el de carbohidratos, en el cual intervienen tres componentes principales; la enzima I (EI), HPr y la enzima II (EII). Por otro lado, el sistema  $PTS^{Ntr}$  (Fig. 5), está involucrado en la regulación del metabolismo de nitrógeno, así como en otros procesos como la regulación de la síntesis de



lipopolisacáridos, transporte de potasio mediado por TrkA y por KdpE, mantenimiento de la membrana celular, entre otros. Las proteínas involucradas en este sistema son homólogas a las que componen al sistema de carbohidratos; las cuales han sido designadas como EI<sup>Ntr</sup>, NPr y EIIA<sup>Ntr</sup>, codificadas por los genes *ptsP*, *ptsO* y *ptsN*, respectivamente. En este caso, así como en el sistema de carbohidratos, se utiliza fosfoenolpiruvato (PEP) como sustrato, el cual dona su grupo fosfato a EI<sup>Ntr</sup> (22).

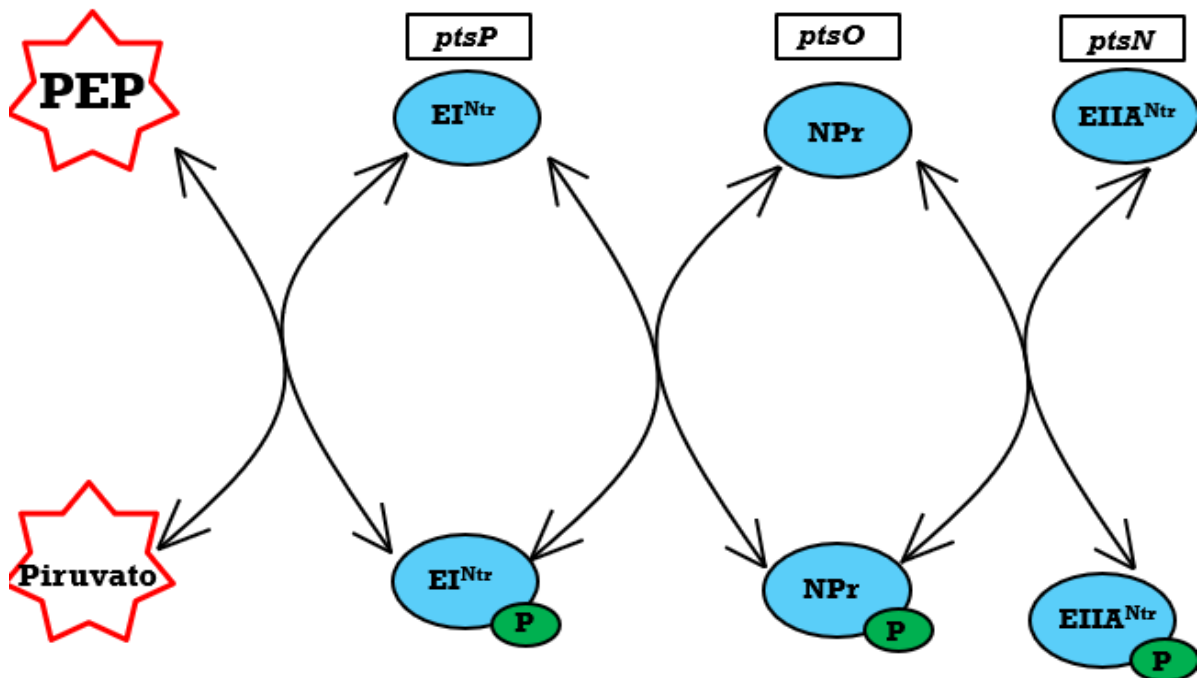


Figura 5. Representación esquemática del Sistema de Fosfotransferasa Asociado a Nitrógeno (PTS<sup>Ntr</sup>). En la parte superior de cada una de las proteínas que forman parte del sistema, se encuentran escritos los genes que codifican para cada una de ellas.

En bacterias que poseen ambos sistemas, se ha reportado comunicación entre los dos, ya que se han encontrado casos en donde cinasas HPr son capaces de fosforilar a NPr. El sistema PTS<sup>Ntr</sup> está relacionado con la regulación varios procesos tales como el transporte de potasio, regulación del ciclo de Krebs y virulencia. En muchos de estos casos, el estado

de fosforilación de EIIA<sup>Ntr</sup> es un factor importante debido a que se ha demostrado que dicha proteína es capaz de unirse a distintos blancos dependiendo de la presencia o ausencia de un grupo fosfato (9).

En *A. vinelandii*, el sistema PTS<sup>Ntr</sup> está relacionado con distintos procesos fisiológicos y metabólicos, ya que, en cepas que presentan mutaciones deletéreas en *ptsP*, se inhibe la ruta de fijación de nitrógeno y se reduce la acumulación del polímero PHB. Se ha demostrado que dicho fenotipo se debe a la presencia y acción de la proteína EIIA<sup>Ntr</sup> en su estado no fosforilado, al carecer dichas cepas de la proteína EI. Lo mismo sucede en mutantes NPr, pues estas dos proteínas forman parte de la cascada de fosforilación. La inactivación de *ptsN* (que codifica para la proteína EIIA<sup>Ntr</sup>) en estas cepas mutantes restablece el fenotipo silvestre de acumulación de PHB (53).

## 2. Antecedentes

### 1.1. Relación entre los sistemas Gac y PTS<sup>Ntr</sup>

Una vez establecido que, tanto el sistema Gac/Rsm como PTS<sup>Ntr</sup> se encuentran involucrados en la producción de PHB y en el enquistamiento, se procedió a dilucidar si el mecanismo de regulación de estos sistemas está relacionado, de manera que uno de ellos ejerce un control sobre el otro. Esto debido a que se demostró que la disminución en la acumulación de PHB mediada por alteraciones en el sistema PTS<sup>Ntr</sup> depende del estado de fosforilación de EIIA<sup>Ntr</sup>, y que se observó un fenotipo similar en cepas mutantes en *gacA*; Trejo, et. al., 2016, encontraron que, en la mutante *gacA*, EIIA<sup>Ntr</sup> se encuentra en su estado no fosforilado, al igual que en cepas mutantes en *ptsP* y/o *ptsO*. Este resultado sugiere que

GacA puede modificar la cascada de fosforilación de  $PTS^{Ntr}$ , estableciendo una conexión entre los sistemas de regulación Gac y  $PTS^{Ntr}$ , lo cual afecta procesos como la producción y acumulación de PHB, mediante la proteína efectora  $EIIA^{Ntr}$ , controlando el estado de fosforilación de la misma (79).

### *1.2 $EIIA^{Ntr}$ promueve la degradación de RpoS mediada por el complejo de proteasa ClpAP*

Las proteasas dependientes de ATP están involucradas en una gran variedad de vías de regulación, al degradar proteínas que se encuentran dañadas o desnaturalizadas tanto en condiciones normales de crecimiento o bajo algún tipo de estrés. En bacterias como *E. coli*, se encuentra la proteasa ClpP, que es una enzima modular que se puede asociar con distintas subunidades reguladoras ATPasas como ClpA y ClpX, las cuales le confieren especificidad en su actividad proteolítica (29).

De acuerdo con lo reportado en el 2017 por Muriel-Millán, et. al., el complejo proteolítico ClpAP tiene como blanco al factor sigma RpoS en *A. vinelandii* (Fig. 6). Dicha degradación es promovida o inducida por  $EIIA^{Ntr}$  en su estado no fosforilado, lo cual tiene como consecuencia una disminución en la transcripción de genes dependientes de RpoS, entre los que se encuentran *phbR* y *phbB*. Esto fue confirmado al realizar ensayos de estabilidad de RpoS en distintas cepas mutantes, en donde se observó que dicha estabilidad se encontraba reducida al inactivar genes como *ptsP* y *ptsO*, con respecto a la cepa silvestre. Al encontrarse inactivados dichos genes,  $EIIA^{Ntr}$  se encuentra únicamente en su estado no fosforilado.

Por otro lado, la estabilidad de RpoS se recuperó al inactivar los genes que codifican para el complejo proteolítico *clpA* y *clpP*, así como a *ptsN*. Adicionalmente, realizaron ensayos de actividad transcripcional y traduccional de *phbR* y *phbB* (cuya expresión depende parcialmente de RpoS) en las cepas mencionadas anteriormente, confirmando que los niveles de transcripción de dichos genes disminuyeron con respecto a la cepa silvestre al inactivar *ptsP*, y se recuperaron en dobles mutantes *ptsP/clpA* y *ptsP/clpP*, donde EIIA<sup>Ntr</sup> se encontraría en su estado no fosforilado. Sin embargo, en el caso de ensayos de traducción de esos mismos genes, no se observó una recuperación total con respecto a la cepa silvestre, lo que sugiere la existencia de un mecanismo de regulación post-transcripcional en el que se encuentra involucrada EIIA<sup>Ntr</sup> y que, de la misma manera, depende de su estado de fosforilación (49).

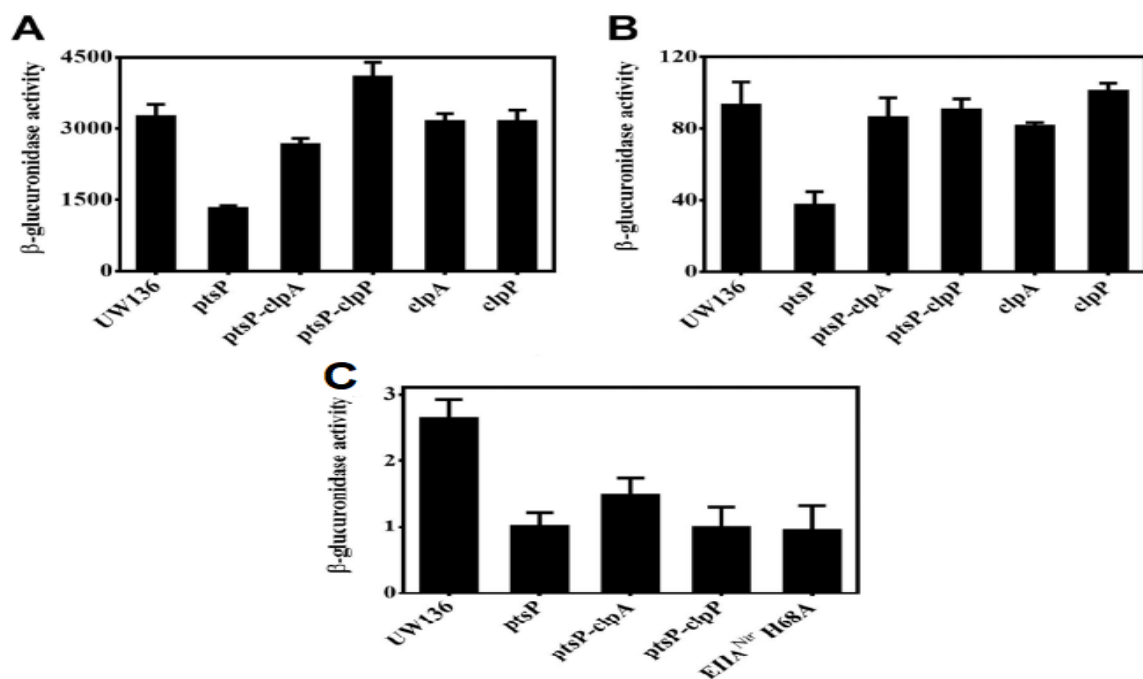


Figura 6. Ensayos de actividad transcripcional y traduccional de *phbB* y *phbR* en distintas cepas. A-B. Actividad transcripcional de  $\beta$ -glucuronidasa en cepas con fusiones transcripcionales (A) *phbB-gusA* y (B) *phbR-gusA*. C. Actividad traduccional de  $\beta$ -glucuronidasa en cepas con fusiones traduccionales *pgyA-phbB-gusA*. Modificado de Muriel-Millán, 2017.

### *1.3. La pirofosfohidrolasa RppH tiene como blanco a RsmA en Azotobacter vinelandii*

Uno de los mecanismos de regulación que interviene en la síntesis de PHB, es el control negativo que tiene RsmA sobre los transcritos de genes de la ruta biosintética como *phbR* y *phbB*. A su vez, RsmA se encuentra regulada a nivel post-transcripcional por un miembro de la superfamilia de proteínas Nudix que se encuentra conservada a lo largo de los tres dominios taxonómicos; incluso en virus. La mayoría de las proteínas agrupadas dentro de esta familia son pirofosfohidrolasas, que son enzimas que catalizan la hidrólisis de pirofosfatos, entre los que se encuentran nucleósidos di- y trifosfatados y caps en el extremo 5' de moléculas de RNA. Los sustratos de RNA sobre los que actúan estas enzimas presentan un nucleósido difosfato unido a un motivo X; entre los que se encuentran dNTPs y polifosfatos dinucleósido. La actividad catalítica de estas proteínas depende del motivo Nudix conformado por 23 aminoácidos conservados (45).

El procesamiento de RNA en bacterias es un proceso importante para la regulación génica, el cual se consideraba no específico; sin embargo, la degradación de RNA mediada por ribonucleasas como la RNasa E, depende del contenido de nucleótidos y/o la presencia de grupos fosfato en su extremo 5', donde, la conversión de un extremo trifosforilado a monofosforilado determina la longevidad de las moléculas de RNA. La enzima Nudix RppH cataliza remoción del pirofosfato de moléculas de RNA trifosforiladas en su extremo 5', lo cual inicia el procesamiento mediado por ribonucleasas de dicho RNA, por lo que RppH participa en su decaimiento (31).

En *A. vinelandii*, RppH se encuentra involucrada en la regulación de la síntesis de PHB, ya que dicha enzima tiene como blanco el transcrito del regulador negativo post-transcripcional, RsmA. De esta manera, RppH participa en la degradación del mRNA de RsmA mediada por la RNasa E al convertir el tri o difosfato de su mRNA en monofosfato. Por lo tanto, RppH actúa como un regulador positivo de la síntesis de PHB (Fig. 7) (5).

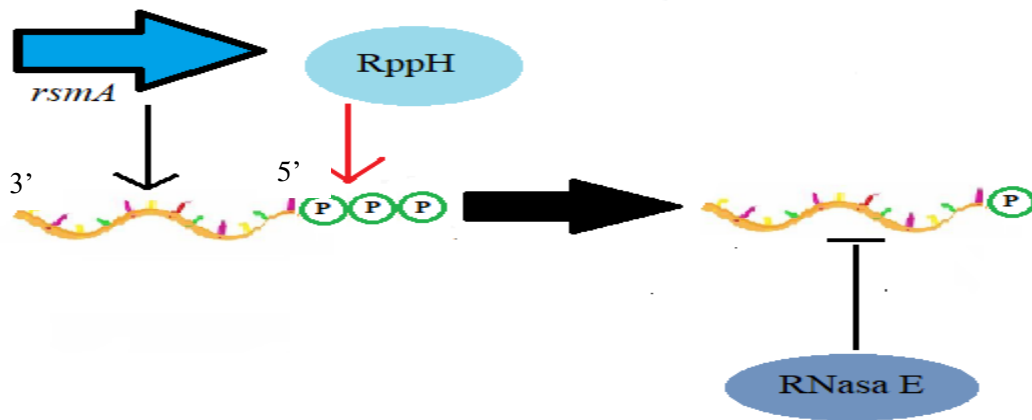


Figura 7. Regulación de *rsmA* mediada por RppH. La enzima RppH promueve la degradación del transcrito de *rsmA* al convertir el tri o difosfato de su extremo 5' en monofosfato, induciendo así la acción de la RNasa E sobre dicho transcrito.

#### 1.4. La doble mutación *rppH/ptsN* provoca una reversión parcial en el fenotipo de producción de PHB en *A. vinelandii*

Como fue mencionado anteriormente, RppH tiene como blanco al transcrito de RsmA en *A. vinelandii*, por lo que antagoniza el efecto negativo post-transcripcional que tiene ésta última sobre genes como *phbB* y *phbR*. En cepas mutantes donde se ha inactivado a *rppH*, de acuerdo con lo esperado, la producción de PHB se ve reducida con respecto a una cepa silvestre (Fig. 8). De la misma manera, como se esperaría, al inactivar a *rsmA*, en la mutante *rppH* se observa una recuperación en la producción de PHB al comparar con la cepa en donde se inactivó únicamente a *rppH*.

Sin embargo, una observación particular resultó al inactivar a *ptsN* en la cepa mutante *rppH* al igual que en la cepa *rppH/rsmA* se observa cierta recuperación en la producción de PHB. Considerando que el efecto negativo de la inactivación de *rppH* sobre la síntesis de PHB es causado por un aumento en RsmA, este resultado sugiere que *ptsN* podría tener un efecto sobre *rsmA*, ya sea en su expresión y/o en su actividad (55).

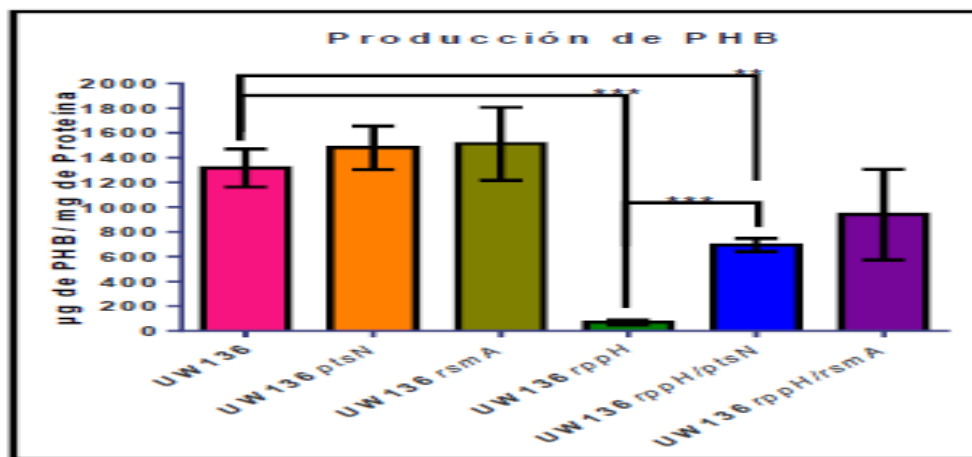


Figura 8. Cuantificación de la producción de PHB en µg de PHB/mg de proteína (A); % de producción de PHB (B) en distintas cepas de *A. vinelandii*. Se puede observar que, como se esperaba, al inactivar a *rsmA*, la producción de PHB aumenta con respecto a la cepa silvestre UW136, mientras que al inactivar a *rppH*, ésta disminuye. Sin embargo, en la doble mutante *rppH/ptsN*, se observa una recuperación parcial del fenotipo. Modificado de Ortiz, 2019.

### 1.5. Relación de *EIIA<sup>Glc</sup>* con *CsrA* en *E. coli*

En *E. coli*, el sistema de fosfotransferencia de carbohidratos está relacionado con el sistema de regulación del metabolismo Csr/Rsm. Los sRNAs *csrB/C* son homólogos a los pequeños RNAs pertenecientes a la familia *rsmZ* encontrados en *A. vinelandii*; los cuales, de la misma manera, actúan como antagonistas de la actividad de CsrA. La enzima *EIIA<sup>Glc</sup>*

pertenece al sistema de fosfotransferencia de carbohidratos y es un regulador del metabolismo del carbono, cuya actividad depende de su estado de fosforilación.

De acuerdo con lo reportado por Leng, et. al., una de las funciones reguladoras de EIIA<sup>Glc</sup> se debe a su interacción con la proteína CsrD, la cual posee dominios GGDEF y EAL, a pesar de que no se ha reportado que posea actividad de síntesis ni de degradación de c-di-GMP. Esta interacción promueve el decaimiento de los sRNAs CsrB/C mediado por la RNasa E; lo que tiene como consecuencia el aumento en la concentración de CsrA libre. La interacción EIIA<sup>Glc</sup>-CsrD ocurre únicamente cuando la primera se encuentra en su estado no fosforilado; lo cual implica que EIIA<sup>Glc</sup> promueve la actividad de CsrA al participar en la degradación de los sRNAs que antagonizan a dicha proteína (36).

En *A. vinelandii* no existe un gen homólogo a *csrD*, sin embargo, al carecer este organismo de un sistema de fosfotransferencia de carbohidratos como el que posee *E. coli*, no es posible descartar que el sistema asociado a nitrógeno, con su respectiva proteína efectora EIIA<sup>Ntr</sup>, ejerza un control similar sobre la actividad de RsmA, por medio de la regulación de la estabilidad de sRNAs.

En este trabajo, a partir de los antecedentes descritos, se investigó la forma en que se encuentran relacionadas las proteínas EIIA<sup>Ntr</sup> y RsmA, con el fin de aportar al conocimiento actual que se tiene sobre las vías de regulación de síntesis de PHB en *A. vinelandii*. Con dicho fin, se propuso analizar la posible interacción proteína-proteína entre ambas, así como vías indirectas como la regulación de los sRNAs *rsmZ1* y *rsmZ2* mediada por EIIA<sup>Ntr</sup>, lo cual afectaría la actividad de RsmA.



## 2. Justificación

*Azotobacter vinelandii* es una bacteria que produce el polímero PHB lo cual la convierte en un modelo de estudio interesante debido al problema ambiental actual que representa el consumo y producción desmedidos de termoplásticos no biodegradables a nivel global. La ruta biosintética de éstos no se encuentra completamente caracterizada, por lo que, para complementar el conocimiento actual sobre la regulación de la expresión de genes involucrados en la síntesis de este polímero, este estudio tiene como objetivo determinar si existe una la relación entre dos proteínas reguladoras de la síntesis de PHB participantes: EIIA<sup>Ntr</sup> y RsmA.

### Hipótesis

EIIA<sup>Ntr</sup> actúa como un regulador de la actividad o expresión de RsmA mediante una interacción directa con ésta, o a través de la regulación de la expresión y/o actividad de los sRNAs *rsmZ1-2*.

## 3. Objetivos

### Objetivo general

Encontrar la relación que existe entre la proteína EIIA<sup>Ntr</sup>, involucrada en el Sistema de Fosfotransferencia Asociado a Nitrógeno (PTS<sup>Ntr</sup>), y la proteína RsmA que actúa como represor de la traducción de los genes *phbR* y *phbB* involucrados en la síntesis de PHB.

## Objetivos Particulares

- Determinar si existe interacción proteína-proteína entre EIIA<sup>Ntr</sup> y RsmA.
- Establecer si EIIA<sup>Ntr</sup> se encuentra involucrada en la transcripción de los sRNAs *rsmZ1-2*.
- Determinar si existe un efecto de EIIA<sup>Ntr</sup> sobre la expresión de RsmA.

## 4. Materiales y métodos

### 1.1. Medios y condiciones de cultivo

Las cepas de *A. vinelandii* fueron incubadas en medio mínimo Burks-Sacarosa (BS), cuya composición, en g/L, es de: K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 8; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 8; CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 7.3; NaMoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O, 0.2; MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 160; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 5; NaSO<sub>4</sub>, 18.3; Sacarosa, 200. Con el fin de solidificar el medio, se agregó agar 15 g/L. En el caso de cultivos líquidos, se empleó el mismo medio BS, sin agar y se incubó con una agitación de 200 rpm, a 30 °C al igual que en el caso de los medios sólidos.

Las cepas de *A. vinelandii* empleadas en el ensayo de cuantificación de actividad transcripcional se cultivaron en medio enriquecido peptona-levadura (PY), con peptona 0.5% y extracto de levadura 0.3%, adicionado con sacarosa al 2%.

Las cepas de *E. coli* empleadas en este trabajo fueron incubadas a 37 °C, a excepción de las cepas utilizadas en el ensayo de doble híbrido, en medio Luria-Bertani (LB), que contiene, en g/L: peptona de caseína, 10; extracto de levadura, 5; NaCl, 5.

### 1.2. *Protocolos con DNA*

Las purificaciones de DNA plasmídico se realizaron con el kit de purificación GeneJET Plasmid Miniprep. En el caso de los productos de PCR y de reacciones de digestión, éstos fueron extraídos mediante el kit GeneJET Gel Extraction Kit. Ambos son productos de ThermoFisher Scientific™.

### 1.3. *Extracción de plásmido por el método del perclorato*

Se incubaron las cepas de *E. coli* en medio LB líquido durante la noche. Se realizó la centrifugación de las muestras y su posterior recuperación en 175 µL de *buffer* TES (TROS 50mM pH 8.5, EDTA 50 mM pH 8.0, Sacarosa 15%) y se le añadieron 30 µL de lisozima (10 mg/mL), tras lo cual, se dejaron incubando en hielo durante 20 minutos. Posteriormente, se añadieron 400 µL de agua helada, se mezclaron en vórtex y se incubaron a 73 °C durante 15 minutos. Pasado dicho tiempo, se centrifugaron y se les removió el *pellet* utilizando un palillo estéril. Se añadieron 60 µL de NaClO<sub>4</sub> 5 M y 600 µL de isopropanol, tras lo cual, se mezclaron y se centrifugaron por 15 minutos. Después de dicho lapso, se le realizaron 3 lavados al *pellet* utilizando 1 mL de etanol 70% y centrifugando durante 10 minutos cada vez. Por último, cada muestra fue secada mediante un equipo Savant™ durante 15 minutos a 60 °C, para, posteriormente, resuspender en 40 µL de RNAsa (20 µg/mL).

### 1.4. *Preparación de células competentes de E. coli*

Se incubaron durante la noche las cepas de *E. coli* que se deseaban transformar en 1 mL de medio LB a 200 rpm. Al día siguiente, se añadió 1 mL del preinóculo a 99 mL de medio

LB sin antibiótico y se volvió a incubar a 37 °C hasta que la D.O. estuviese en un valor entre 0.4-0.5. Una vez alcanzada dicha D.O., se transfirieron las células a tubos Falcon de 50 mL y se mantuvieron en hielo durante 20 minutos, tras lo cual, se centrifugaron a 4 °C a 3600 rpm durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron los *pellets* con 20 mL de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M frío, para después incubar en hielo durante 30 minutos. Pasado ese tiempo, se centrifugaron las células a 4°C a 3600 rpm durante 10 minutos. Luego, se resuspendieron los *pellets* en 5 mL de CaCl<sub>2</sub> con glicerol 15% frío. Por último, se realizaron alícutas en tubos de 1.5 mL y se almacenaron a -72 °C.

### 1.5. Transformación de *E. coli*

Se emplearon 200 µL de las células quimiocompetentes preparadas mediante el método descrito en la sección anterior. Primero, se les agregaron 10 µL del plásmido correspondiente. Se incubaron en hielo por 30 minutos y, posteriormente, se les aplicó un choque térmico a 42 °C durante 2 minutos. Después, se les agregó 1 mL de medio LB líquido sin antibiótico y se incubaron durante una hora a 37 °C y 200 rpm. Para finalizar, se plaquearon distintos volúmenes de este cultivo en medio LB sólido con el antibiótico correspondiente y se incubaron *overnight* junto con un control negativo al que no se le añadió ningún plásmido.

### 1.6. Extracción de DNA cromosomal de *A. vinelandii*

Se incubaron las cepas de *A. vinelandii* en 100 mL de medio BS durante 36 horas a 30 °C. Pasado el tiempo de incubación, se centrifugaron las células y se les realizó un lavado con 1 mL de solución *buffer* TE 50/20 (Tris-Cl 50 mM, EDTA pH 8.0 20 mM). Se realizó una

segunda centrifugación y el *pellet* resultante fue resuspendido en 450  $\mu\text{L}$  de *buffer* TE 50/20. A estas soluciones se le agregaron 50  $\mu\text{L}$  de lisozima (10 mg/mL) y se incubaron por 30 minutos a 37 °C, y, pasado este tiempo, se les agregaron 50  $\mu\text{L}$  de proteasa (10 mg/mL) y se incubaron por 30 minutos a 37 °C. Posteriormente se les agregaron 50  $\mu\text{L}$  de SDS 10% y se incubaron por 15 minutos a 37 °C. Tras esto, se añadieron 100  $\mu\text{L}$  de NaCl 5 M, se mezcló y se incubaron durante 10 minutos a 65 °C. Se adicionaron 80  $\mu\text{L}$  de solución CTAB 10% NaCl 0.7 M previamente calentada y se incubaron por 15 minutos a 65 °C. Se procedió a realizar una serie de extracciones: la primera, con 500  $\mu\text{L}$  de solución fenol-cloroformo-álcohol isoamílico 24:1 y se centrifugó durante 5 minutos a 13,000 rpm, recuperando el sobrenadante; la segunda, con 1 volumen de una solución cloroformo-álcohol isoamílico 24:1; y la tercera, con 1 volumen de la solución cloroformo-fenol-álcohol isoamílico, centrifugando cada vez a 13,000 rpm durante 5 minutos. Luego, se añadieron 0.6 volumen de isopropanol y se recuperaron las hebras de DNA por centrifugación. Posteriormente, se realizaron 3 lavados consecutivos con 1 mL de etanol 70%, centrifugando y descartando el sobrenadante cada vez. Tras los lavados, las muestras se secaron por medio del equipo Savant™ durante 15 minutos a 65 °C y se resuspendieron en 30  $\mu\text{L}$  de RNAsa (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). Por último, fueron incubadas a 37 °C durante una hora con el fin de que actuara la RNAsa.

### 1.7. Cuantificación de proteína por el método de Lowry

Con el fin de determinar las unidades de nmoles de PNP u ONP producidos/min/ $\mu\text{g}$  de proteína en los ensayos de actividad de  $\beta$ -galactosidasa y  $\beta$ -glucuronidasa, se realizaron ensayos de cuantificación de proteína por el método de Lowry (40). Para esto, pasado el

tiempo de incubación pertinente, se colectó 1 mL del medio de cultivo para luego centrifugarlo y resuspenderlo en 1 mL de MgSO<sub>4</sub> 10 mM. De esta solución, se tomaron 20 µL y se le añadieron 180 µL de H<sub>2</sub>O Milli-Q. Luego, se le añadió 1 mL de solución reactiva (Solución A: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% en NaOH 0.1 N; Solución B: Tartrato de Na y K 2%; Solución C: CuSO<sub>4</sub> 1%) y se mantuvo en reposo durante 10 minutos. Tras dicho tiempo, se agregaron 0.1 mL de reactivo Folin con 1 volumen de H<sub>2</sub>O y se dejaron en reposo por 30 minutos en oscuridad. La lectura de absorbancia se realizó a 625 nm. Al mismo tiempo, se corrió una curva patrón con las concentraciones de albúmina descritas a continuación en µg/mL: 25, 50, 100, 200, 400 y 600. Todos los ensayos de cuantificación de proteína se realizaron por triplicado técnico.

### 1.8. Sistema bacteriano de dos híbridos (BACTH)

Con el fin de estudiar la interacción *in vivo* entre RsmA y EIIA<sup>Ntr</sup>, esta última, tanto en su versión silvestre como en la mutación H68A, la cual consiste en un intercambio de aminoácido en su residuo fosforilable; se utilizó el sistema bacteriano de dos híbridos (BACTH). En este sistema se hizo uso de la cepa BTH101 de *E. coli*, la cual carece de manera endógena de actividad de adenilato ciclasa (*cyA*<sup>-</sup>). Para reconstituir dicha actividad, se utilizaron dos plásmidos compatibles, pKT25 y pUT18C (Euromedex, s.f.). Cada uno de estos vectores contiene la secuencia correspondiente a un fragmento del dominio catalítico de la adenilato ciclasa de *Bordetella pertussis* (T25 y T18, respectivamente) (Fig. 9). Cuando estos fragmentos se encuentran separados, no muestran actividad catalítica, sin embargo, sus secuencias pueden ser fusionadas en su extremo N y/o C terminal con genes que codifican para proteínas que se desee establecer si existe una interacción proteína-

proteína entre ambas. Una vez que se poseen ambos vectores con los genes de interés fusionados a las secuencias de la adenilato ciclasa, se procede a transformar a la cepa aceptora con los dos plásmidos, con el fin de que se expresen ambas subunidades de la adenilato ciclasa fusionadas cada una con una de las dos proteínas de interés. Si las proteínas en cuestión interactúan entre sí, las dos subunidades de la adenilato ciclasa entran en contacto como consecuencia de dicha interacción, se restablece la actividad catalítica y, por lo tanto, la síntesis de AMP cíclico (AMPc).

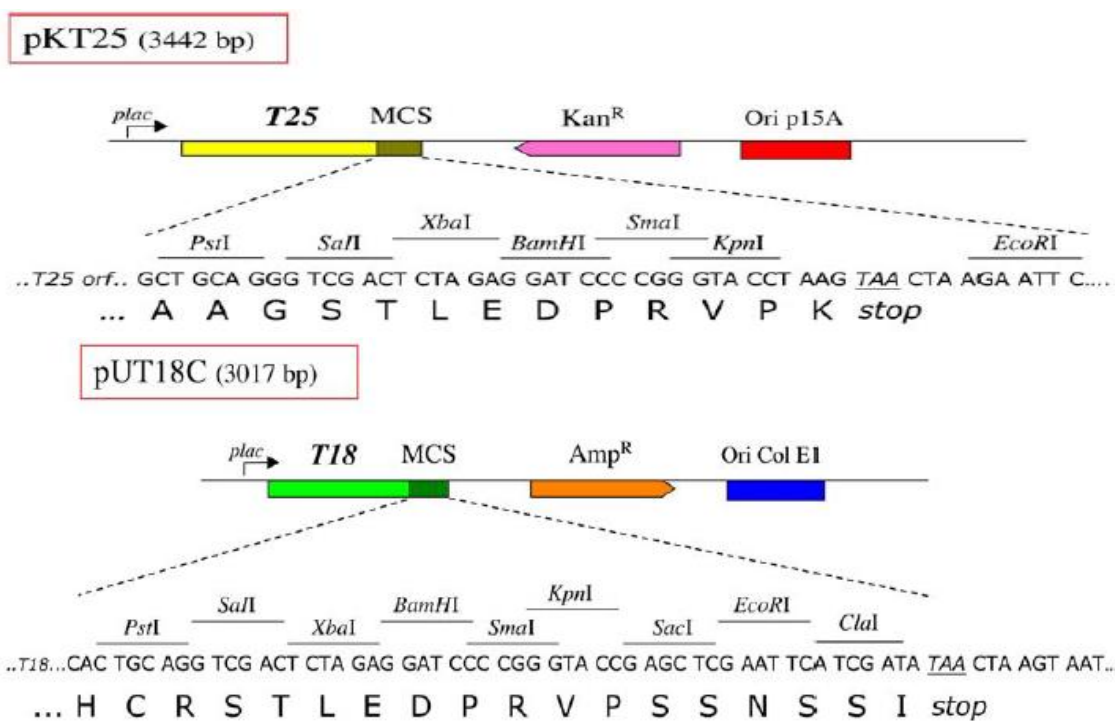


Figura 9. Representación de los vectores empleados en este trabajo: pKT25, que contiene el fragmento T25 de la adenilato ciclasa y un casete de resistencia a kanamicina; y pUT18C, que contiene el fragmento T18, así como un casete de resistencia a ampicilina. Modificado de EUROMEDEX.

Al restablecer la actividad de la adenilato ciclasa, el AMPc sintetizado forma un complejo regulador con la proteína activadora de catabolitos, CAP, que reconoce y se une a regiones promotoras, lo que activa la transcripción de diferentes genes, entre los que se encuentran los operones *lac* y *mal*, tras lo cual, las bacterias en las que llega a ocurrir la interacción son

capaces de metabolizar lactosa o maltosa, respectivamente, como fuente de carbono, o hidrolizan el sustrato X-gal. (Fig. 10).

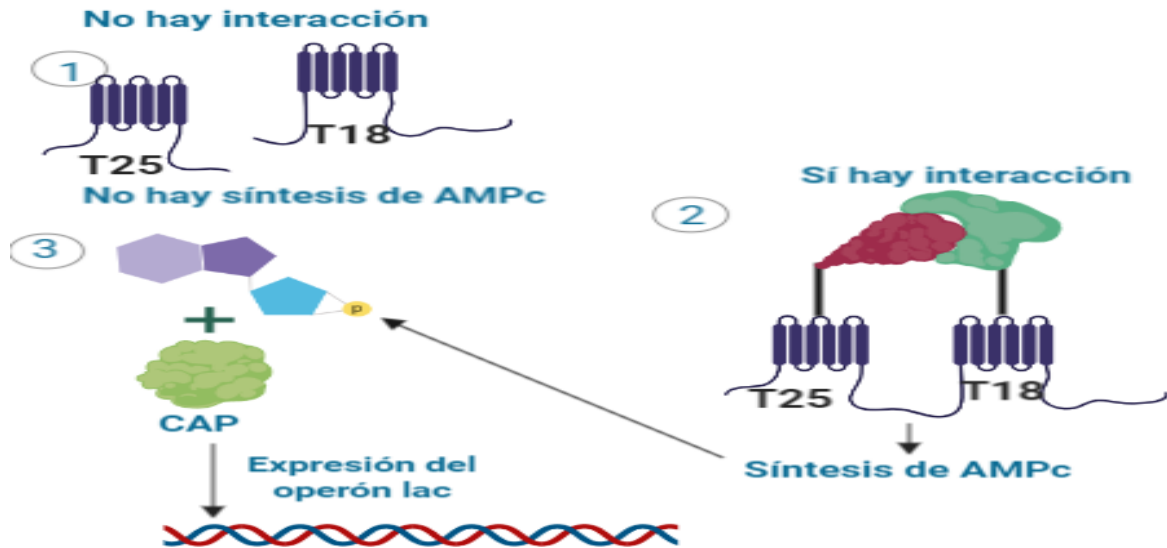


Figura 10. Representación esquemática del principio del sistema bacteriano de dos híbridos cuando se emplean dos proteínas interactuantes que restablecen la actividad de la adenilato ciclasa. Creada con BioRender.com.

Para la realización de este ensayo, se emplearon seis vectores distintos, construidos a partir de los plásmidos pKT25 y pUT18C, a los cuales les fueron integradas las secuencias de *rsmA*, *ptsN* y *ptsN*-H68A. Los constructos pKT25-*ptsN*, pKT25-*ptsN*-H68A, pUT18C-*ptsN* y pUT18C-*ptsNH68A* habían sido elaborados previamente por Muriel-Millán, 2015 (48).

Para la construcción de los plásmidos con la secuencia de *rsmA* se realizó una PCR punto final de DNA total de la cepa UW136 de *A. vinelandii*, utilizando oligonucleótidos diseñados con el fin de insertar sitios de restricción XbaI y KpnI a la secuencia correspondiente a dicho gen. El producto resultante fue ligado al vector pJET1.2 Blunt, para, posteriormente, transformar células competentes *E. coli* Top 10. El plásmido resultante, denominado pJET*rsmA*XbaI-KpnI, fue purificado y digerido con las enzimas de



restricción XbaI y KpnI, liberando el fragmento correspondiente a *rsmA* (150 pb) (Fig. 11). Dicho fragmento fue insertado mediante una reacción de ligación a los vectores pKT25 y pUT18C.

Con el fin de verificar que la secuencia de *rsmA* tuviese la inserción correcta, se enviaron a secuenciar ambos plásmidos, y se confirmó que la secuencia correspondía a la de *rsmA*, por lo que se emplearon estos vectores junto con los elaborados por Muriel-Millán, 2015 para la realización de este experimento.

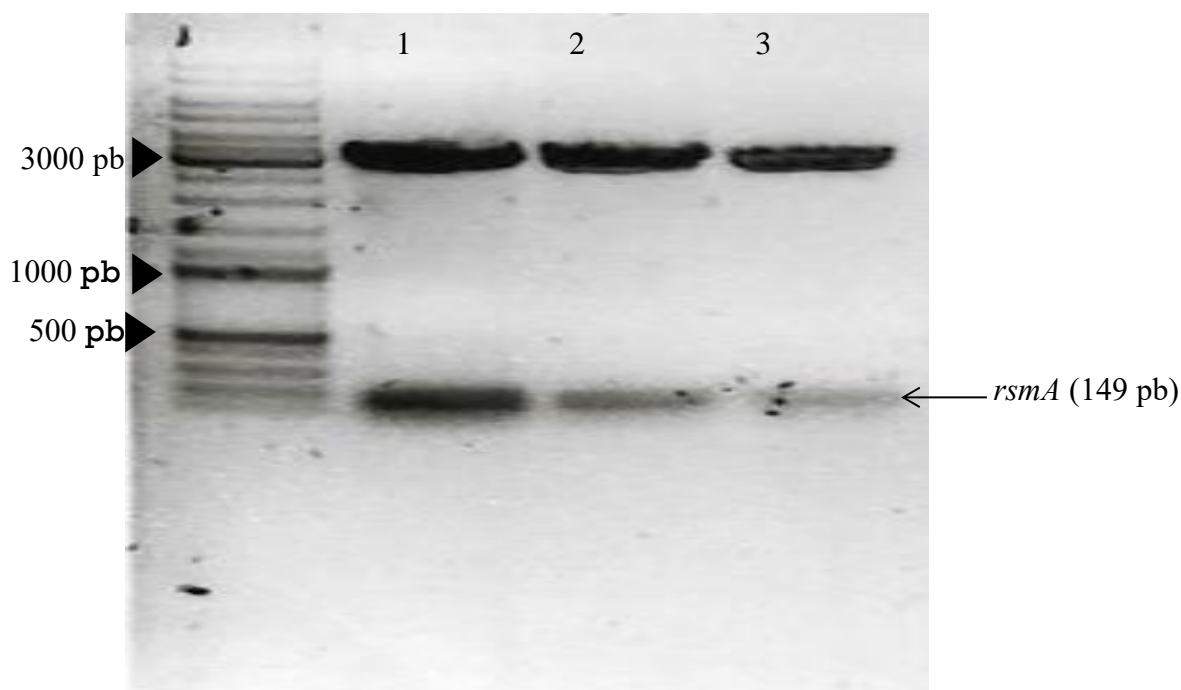


Figura 11. Patrón de digestión del vector pJET *rsmA* con las enzimas XbaI y KpnI. Se observa el fragmento de 149 pb correspondiente a *rsmA* en los carriles 1, 2 y 3, liberado por la reacción de digestión con dichas enzimas.

Una vez obtenidos todos los plásmidos requeridos para la realización de este ensayo, se verificó en un gel de agarosa mediante una doble digestión XbaI-KpnI, que cada uno liberase la secuencia correspondiente al gen insertado (*ptsN*, *ptsN*-H68A de 465 pb; y *rsmA* de 149 pb) (Fig. 12). Posteriormente, se procedió a transformar células químicamente

competentes de la cepa BTH101 con todas las combinaciones posibles de dos plásmidos; éstas fueron preparadas con  $\text{CaCl}_2$  0.1 M. Adicionalmente, se emplearon los vectores pKT2zip y pUT18Czip como control positivo; y tanto la cepa BTH101 sin transformar como los vectores vacíos como controles negativos.

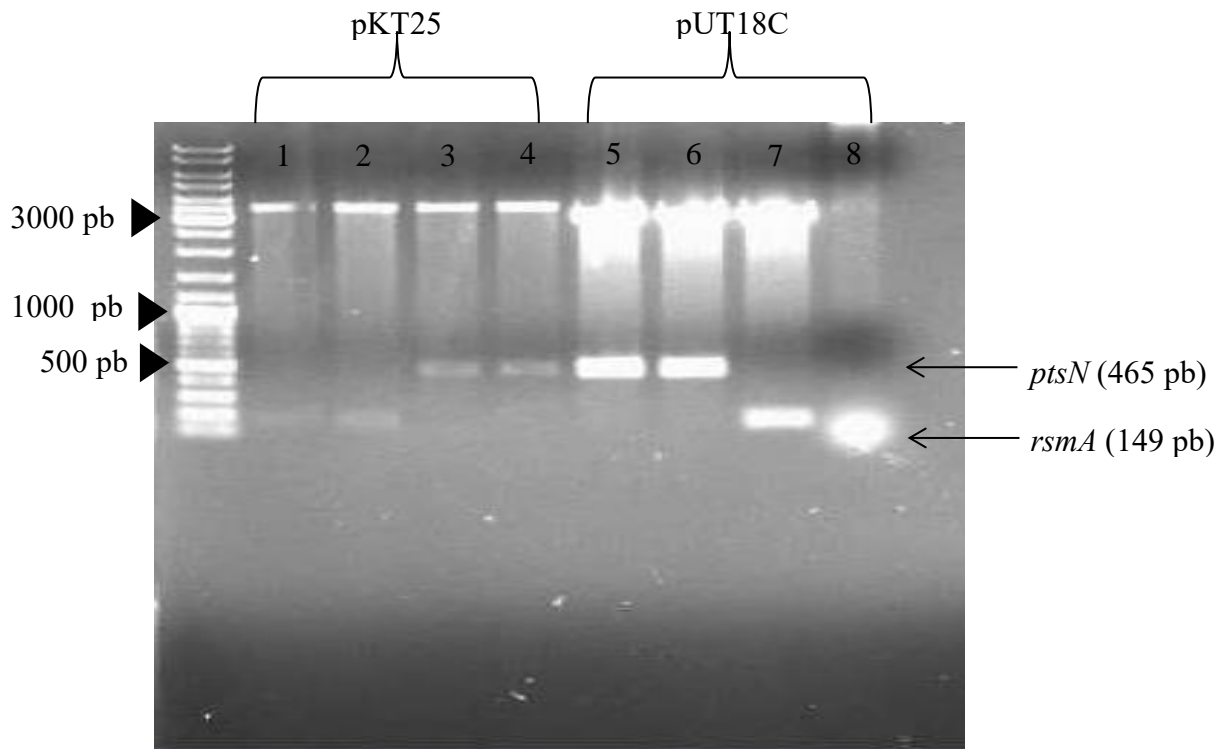


Figura 12. Patrón de digestión de los plásmidos pKT25 y pUT18C con las enzimas KpnI y XbaI. Los carriles 1 y 2 corresponden al vector pKT25 con la secuencia de *rsmA*, 3 y 4 corresponden a pKT25 con la secuencia de *ptsN*, 5 y 6 corresponden a pUT18C con la secuencia de *ptsN*, y 7 y 8 corresponden a pUT18C con la secuencia de *rsmA*. En todos los casos se observa el patrón esperado para cada vector.

Todas las cepas fueron incubadas a 37 °C, con excepción de las cepas de BTH101 empleadas para la realización del ensayo de dos híbridos, las cuales fueron incubadas a 30°C durante 36 horas en medio LB adicionado con el sustrato cromogénico X-gal e IPTG, de acuerdo con las recomendaciones del protocolo proporcionado por EUROMEDEX. Las concentraciones de antibióticos (en  $\mu\text{g/mL}$ ), fueron las siguientes: ampicilina (Amp) 200 y kanamicina (Km) 30.

### 1.9. Medición cuantitativa de actividad de $\beta$ -galactosidasa

Con el fin de realizar la cuantificación de actividad de  $\beta$ -galactosidasa, se llevó a cabo una medición espectrofotométrica de la absorbancia a 425 nm de las distintas cepas empleadas para el ensayo de dos híbridos descritas en la sección anterior, utilizando el sustrato cromogénico o-nitrofenil- $\beta$ -D-galactósido (ONPG).

Para la realización de este ensayo, se incubaron las cepas descritas anteriormente en esta sección, en medio LB líquido adicionado con IPTG, Amp y Km, a 30 °C durante 36 horas. Pasado este tiempo, se recuperaron y centrifugaron las células, para luego ser resuspendidas en 730  $\mu$ L de *buffer* Z ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.06 M,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0.04 M, KCl 0.01 M,  $\text{MgSO}_4$  0.001 M,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.05 M), y adicionalmente, se les agregaron 30  $\mu$ L de Tritón X-100. Por último, se llevó el volumen de cada una de las muestras a 1 mL con el sustrato ONPG, e inmediatamente se colocaron en una incubadora a 37 °C con agitación. Una vez colocadas las muestras en la incubadora, se tomó el tiempo de reacción, marcado por un cambio de tonalidad en la muestra de transparente a amarillo, en cuanto cada tubo se tornó amarillo, se le agregó 300  $\mu$ L de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1 M para detener la reacción.

Tras finalizar el procedimiento, se procedió a realizar la medición de absorbancia de cada una de las muestras a 420 nm contra un blanco al que se le realizó el mismo procedimiento. Adicionalmente se realizó la cuantificación de proteína en  $\mu\text{g/mL}$  de cada muestra mediante el método de Lowry.

### 1.10. Purificación de EIIA<sup>Ntr</sup> mediante columna de afinidad

Con el fin de obtener a la proteína EIIA<sup>Ntr</sup> purificada para empelarla a manera de proteína carnada para el ensayo de *pull-down*, se utilizaron los plásmidos pALA7 y pALA8, los cuales son derivados del vector de expresión pET24a, lo que les confiere características como un casete de resistencia a kanamicina y una secuencia de polihistidinas, las cuales presentan afinidad por el níquel presente en la columna Ni-NTA, lo que permite utilizar las proteínas expresadas como este plásmido como carnada al unirse éstas de manera covalente a la columna. La diferencia entre ambos plásmidos radica en que pALA7 contiene la secuencia de EIIA<sup>Ntr</sup> en su versión silvestre, mientras que en pALA8, se encuentra la versión de dicha proteína con la mutación puntual H68A, es decir, la forma no fosforilable de la misma.

La expresión de la proteína fue inducida de la siguiente forma: Se realizaron cultivos como preinóculos de 500 mL de la cepa *E. coli* BL21 (DE23) transformada con los vectores pALA7 y pALA8, a los cuales, tras 24 horas de incubación, se les adicionó 1 mL a 50 mL de medio LB líquido. Una vez que los inóculos alcanzaron una D.O. de 0.6, se le agregaron 500  $\mu$ L de IPTG 100 mM para después mantenerlos en incubación durante 4 horas a 30 °C. Después de recuperar las células por centrifugación, se resuspendieron en buffer de lisis 10 mM, se les realizó un tratamiento de congelación y descongelación con hielo seco durante 5 minutos, se les añadió 40  $\mu$ L de lisozima (100 mg/mL) y, finalmente, se sonicaron durante 10 minutos.

Tras centrifugar las células, se recuperaron tanto los *pellets* como los sobrenadantes y se corrieron en un SDS-PAGE, donde se identificó a EIIA<sup>Ntr</sup> sobreexpresada a partir de ambos vectores, dada la observación de la banda del peso correspondiente (16.9 kDa), en la fracción correspondiente a los sobrenadantes.

Una vez sobreexpresada EIIA<sup>Ntr</sup>, tanto en su forma silvestre como en su versión no fosforilable, se procedió a realizar la purificación de ésta. Para ello, se empleó todo el volumen correspondiente a los sobrenadantes obtenidos después de inducir la lisis celular donde se identificó a EIIA<sup>Ntr</sup> en ambas versiones. Este volumen se añadió a la columna de Ni-NTA. Posteriormente, se realizaron eluciones a la columna utilizando soluciones amortiguadoras con distintas concentraciones de Imidazol (30, 70, 100, 250 y 500 mM), con el fin de separar a EIIA<sup>Ntr</sup> del resto de proteínas que se hubiesen encontrado unidas de manera no específica a la columna. Dado que EIIA<sup>Ntr</sup> se encuentra fusionada a una secuencia de polihistidinas en su extremo C, esto permite que ésta se una de manera no covalente al níquel presente en la columna. Cada una de las eluciones realizadas con soluciones de imidazol a distintas concentraciones fue colectada en distintos tubos de 5 mL, uno para cada concentración de imidazol. Posteriormente, cada muestra obtenida de cada elución, fue analizada en un SDS-PAGE, al cual, posteriormente, se le realizó un *western blot* con anticuerpos específicos para EIIA<sup>Ntr</sup>. De esta manera, se encontró que EIIA<sup>Ntr</sup>, en sus dos versiones, se separó de la columna al añadir la solución *buffer* de Imidazol 500 mM, por lo que se colectó la fracción correspondiente a dicha elución para su posterior utilización en el ensayo de *pull-down*.

### 1.11. Ensayo de pull-down de interacción proteína-proteína

Otro método de análisis de la interacción de proteínas *in vitro* que se empleó para complementar los resultados obtenidos en el experimento de dos híbridos consistió en un ensayo de *pull-down*, empleando una columna de Cromatografía de Afinidad de ión Metálico Inmovilizado (IMAC), la cual contiene una resina de agarosa 6% y Níquel-NTA, que es un complejo de un metal iónico y un ligando quelante (ácido nitrilotriacético).

Este protocolo consiste en la inmovilización de una proteína (en este caso la proteína EIIA<sup>Ntr</sup>), que se denomina carnada, en la columna por medio del ligando quelante, lo cual funciona como base para capturar y purificar proteínas, que interaccionen con la proteína carnada, denominadas presas. Tanto la carnada como las presas se pueden obtener mediante distintas fuentes como lisados celulares y proteínas purificadas (39).

Para la realización de este ensayo, se usó como proteína carnada a EIIA<sup>Ntr</sup>, tanto en su versión silvestre como la versión mutante H68A no fosforilable, la cual fue sobreexpresada y purificada mediante la columna de afinidad mencionada anteriormente. Por otro lado, como presa, se empleó un extracto total de proteínas de la cepa UW136 incubada en medio BS durante 48 horas, el cual se añadió a las dos columnas de afinidad (una para EIIA<sup>Ntr</sup> silvestre y otra para la mutante H68A) que ya contenían fijada a la proteína carnada. Una vez agregada la solución presa, se realizó una serie de lavados de cada columna por medio de soluciones *buffer* que contenían distintas concentraciones de imidazol, el cual es un compuesto que presenta alta afinidad por el níquel presente en la columna, con el fin de identificar la concentración necesaria para liberar el complejo formado por la proteína

carnada anclada a la columna y aquellas proteínas contenidas en el extracto que se uniesen a ésta. Cada uno de los lavados fue colectado en un tubo de 5 mL para posteriormente ser analizados en un gel desnaturalizante de poliacrilamida (Fig. 14).

### *1.12. Medición de actividad transcripcional de *rsmZ1* y *rsmZ2* por medio del gen reportero *gusA**

Con el fin de saber si los sRNAs *rsmZ1* y *rsmZ2* dependen del factor sigma RpoS para su transcripción, se emplearon las cepas SAWZ1 y SAWZ2, las cuales contienen fusiones transcripcionales de los promotores de los genes *rsmZ1* y *rsmZ2*, respectivamente, en el fondo de la cepa UW 136 (23). Dichas fusiones, de acuerdo con lo reportado por Hernández-Eligio, et. al., 2012; fueron construidas con las regiones promotoras de los genes a evaluar, unidas río arriba del gen reportero *gusA* y utilizando la región cromosomal Avin12230, que corresponde a un gen codificante para una transposasa, como sitio de inserción; adicionalmente, río abajo de *gusA* y en la misma dirección de éste, se encuentra un casete de resistencia a tetraciclina. Debido a que *A. vinelandii* no cuenta de manera silvestre con actividad de  $\beta$ -glucuronidasa, es posible aprovechar y cuantificar el producto del gen *gusA* a manera de reportero con el fin de medir y comparar la actividad transcripcional y/o traduccional de genes cuya región promotora sea fusionada río arriba de *gusA* (15).

Se realizaron extracciones de DNA cromosomal de las cepas SAWZ1 y SAWZ2 con el fin de utilizar dicho material genético para transformar distintas cepas mutantes en las que se desea evaluar los niveles de transcripción de *rsmZ1* y *rsmZ2*, mediante recombinación

homóloga. Las cepas aceptoras que se emplearon en este ensayo fueron las siguientes: UW *rpoS*<sup>-</sup>, UW *ptsN*<sup>-</sup>, UW *rppH*<sup>-</sup> y UW *rppH/ptsN*<sup>-</sup>; por lo que se prepararon células competentes de cada una para, posteriormente, realizar el protocolo de transformación de *A. vinelandii* con DNA cromosomal.

Una vez concluidas las transformaciones se procedió a sembrar cada una tanto en medio selectivo BS como en medio PY; éste último con el fin de verificar y comparar el fenotipo de producción de PHB. Adicionalmente, se realizó un primer ensayo de actividad  $\beta$ -glucuronidasa utilizando 4-nitrofenil  $\beta$ -D-glucopiranosido (PNPG), para confirmar que las cepas resultantes hayan adquirido dicha actividad como resultado de la correcta inserción de *gusA*, debido a que *A. vinelandii* no posee tal actividad de manera silvestre.

Después de verificar que todas las cepas construidas presentaban actividad de  $\beta$ -glucuronidasa, se procedió a realizar la cuantificación de la actividad mediante ensayo espectrofotométrico a 405 nm, empleando PNPG como sustrato cromogénico. El protocolo realizado para realizar esta medición es el mismo que se describe en la sección 5.2 de este trabajo, con la excepción de que se emplea PNPG en lugar de ONPG como sustrato.

Las cepas empleadas fueron incubadas en medio PY sacarosa líquido y se realizó la medición de la actividad a las 8, 12, 24 y 36 horas de incubación.



## 5. Resultados y discusión

### 1.1. Ensayo de doble híbrido

Con el objeto de determinar si las proteínas EIIA<sup>Ntr</sup> y RsmA interaccionan *in vivo*, se utilizó la técnica conocida como el sistema bacteriano de dos híbridos (BACTH) que se describe en la sección de Materiales y métodos. En este experimento se empleó la cepa de *E. coli* BTH101, que presenta un fenotipo *cya*<sup>-</sup> (Ausencia de adenilato ciclasa), la cual fue transformada con los vectores del sistema BACTH, pKT25 y pUT18C que poseen las subunidades T25 y T18 de la adenilato ciclasa. La secuencia de las dos subunidades en cada uno de los vectores se encuentra fusionada a la secuencia de las dos proteínas de interés para este trabajo, RsmA y EIIA<sup>Ntr</sup> tanto en su versión silvestre como la mutante no fosforilable H68A. La secuencia codificante para RsmA se insertó en ambos vectores, así como la secuencia correspondiente a EIIA<sup>Ntr</sup> y EIIA<sup>Ntr</sup>H68A, lo que resultó en la obtención de los plásmidos pKT25 y pUT18C con la secuencia codificante para RsmA, EIIA<sup>Ntr</sup> y EIIA<sup>Ntr</sup>H68A fusionadas al dominio de la adenilato ciclasa correspondiente para cada vector. Estos vectores, denominados pKT25*rsmA*, pKT25*ptsN*, pKT25*ptsN*-H68A, pUT18C*rsmA*, pUT18C*ptsN* y pUT18C*ptsN*-H68A (donde *ptsN* es el gen que codifica para EIIA<sup>Ntr</sup>), fueron insertados en células competentes de la cepa BTH101, de manera que se obtuviesen todas las combinaciones posibles entre los vectores pUT18C y pKT25 con el fin de analizar la interacción *in vivo* entre RsmA y EIIA<sup>Ntr</sup> mediante ensayos cualitativos y cuantitativos.

En el análisis cualitativo del ensayo de doble híbrido, al observar el crecimiento y la coloración de las cepas en medio LB X-gal/IPTG, se puede discernir una diferencia en la

tonalidad e intensidad del color azul entre las distintas cepas evaluadas. Al realizar la comparación de las distintas construcciones con los grupos control, asignados a los números 1, 2 y 3 en la figura 13, se puede apreciar que las cepas en donde se presentó interacción proteína-proteína (pKT25*rsmA*pUT18*CrsmA*, pKT25*ptsN*pUT18CH68A, pKT25H68ApUT18*CptsN*, pKT25*ptsN*pUT18CH68A, pKT25H68ApUT18CH68A, pKT25*ptsN*pUT18*CptsN*) evidenciado por coloración azul en medio X-gal, fueron aquellas en que se insertaron vectores que contenían la misma proteína (colonias con la doble RsmA, la combinación EIIA<sup>Ntr</sup>H68A y EIIA<sup>Ntr</sup> silvestre, la doble EIIA<sup>NTR</sup>H68A y la doble EIIA<sup>Ntr</sup> silvestre, que corresponden a las colonias marcadas con los números 4, 8, 9, 11 y 12, en la figura 13); lo que sugiere que tanto RsmA como EIIA<sup>Ntr</sup> son capaces de formar homodímeros..

Por otro lado, las cepas que contenían en un plásmido a EIIA<sup>Ntr</sup> tanto en su versión silvestre como en la mutante no fosforilable H68A y en otro a RsmA, es decir, en las cepas pKT25*rsmA*pUT18CH68A, pKT25*rsmA*pUT18*CptsN*, pKT25H68ApUT18*CrsmA* y pKT25*ptsN*pUT18*CrsmA* (colonias 5, 6, 7 y 10 en la figura 13), presentaron un fenotipo similar a los controles negativos(cepa BTH101 sin transformar y cepa transformada con ambos vectores sin ninguna secuencia fusionada a las subunidades de la adenilato ciclasa, colonias 1 y 3 en la figura 13), indicado como una coloración más tenue o inexistente, lo cual sugiere que no existe una interacción directa entre estas dos proteínas.

Debido a que los resultados cualitativos por sí solos no son concluyentes, se procedió a realizar la medición de actividad de  $\beta$ -galactosidasa en cada una de las cepas observadas en la figura 13.

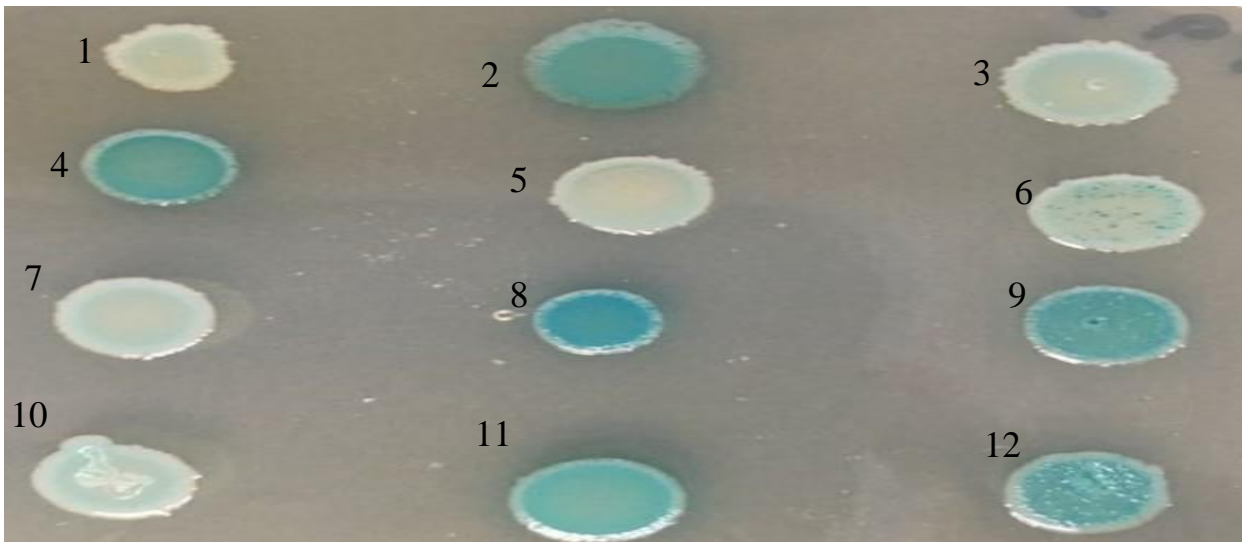


Figura 13. Ensayo de doble híbrido. Colonias de BTH101 transformadas con dos plásmidos y crecidas en medio LB Xgal/IPTG. La coloración azul indica actividad de  $\beta$ -galactosidasa y posible interacción proteica. 1: BTH101 sin plásmido; 2: pKT25zipper/pUT18Czipper; 3: pKT25vacío/pUT18Cvacío; 4: pKT25*rsmA*/pUT18C*rsmA*; 5: pKT25*rsmA*/pUT18CH68A; 6: pKT25*rsmA*/pUT18C*ptsN*; 7: pKT25H68A/pUT18C*rsmA*; 8: pKT25*ptsN*/pUT18CH68A; 9: pKT25H68A/pUT18C*ptsN*; 10: pKT25*ptsN*/pUT18C*rsmA*; 11: pKT25H68A/pUT18CH68A; 12: pKT25*ptsN*/pUT18C*ptsN*.

A su vez, el análisis cuantitativo del ensayo, cuyos resultados se muestran en el gráfico 1, se realizó midiendo la actividad de la enzima galactosidasa, reconstituida por la interacción entre las dos proteínas empleadas en cada uno de los vectores, mediante espectrofotometría, empleando el sustrato cromogénico ONPG, con una lectura de absorbancia realizada a 425 nm.

La mayor actividad de  $\beta$ -galactosidasa, medida en nmoles de ONP producidos/min/ $\mu$ g de proteína, se registró en aquellas cepas que habían sido transformadas con vectores que poseían la misma secuencia codificante fusionada a ambas subunidades de la adenilato ciclasa, es decir, *rsmA* tanto en el vector pKT25 como en pUT18C, con un valor promedio

de 0.184; así como *ptsN* y *ptsNH68A* insertados en ambos plásmidos, con valores de 0.095 y 0.168 unidades, respectivamente. Mientras que, los niveles más bajos de actividad de  $\beta$ -galactosidasa, con comportamiento similar a los observados en los controles negativos, correspondieron a cepas que fueron transformadas con vectores que poseían secuencias codificantes distintas, es decir, aquellas que poseían a *rsmA* en el vector pKT25 junto con *ptsN* o H68A en el vector pUT18C, y las que poseían a *ptsN* o H68A en el plásmido pKT25 y a *rsmA* en el plásmido pUT18C. Todos estos casos donde la cepa en cuestión fue transformada con un vector con *rsmA* y en otro con *ptsN* silvestre o la mutante H68A, es decir, donde se evaluó la interacción entre dos proteínas distintas, presentaron valores por debajo de 0.02 unidades de ONP producidos/min/ $\mu$ g de proteína.

Estos datos nos sugieren que EIIA<sup>Ntr</sup> es una proteína capaz de formar homodímeros, principalmente al encontrarse únicamente la versión no fosforilada de la misma, es decir, en el caso de la muestra correspondiente a la doble EIIA<sup>Ntr</sup>H68A, por lo que la formación de dichos homodímeros podría depender del estado de fosforilación de la proteína.

En el caso de RsmA, ya había sido reportado anteriormente que esta proteína existe como un dímero con subunidades idénticas compuestas por 5 láminas- $\beta$  con una arquitectura en forma de barril, las cuales contienen dos sitios de unión a RNA, por medio de los cuales lleva a cabo su actividad inhibidora de la traducción, al reconocer tanto el *hairpin* río arriba de la secuencia Shine-Dalgarno, como dicha secuencia *per se* a través de uno de sus dominios GxxG (19). Este mecanismo explica el resultado obtenido en la muestra que correspondía a *rsmA* en ambos vectores, con un valor de 0.184 unidades de ONP

producidos/min/ $\mu\text{g}$  de proteína, el cual es significativamente mayor a los valores obtenidos para las muestras con combinaciones distintas de *rsmA* con *ptsN*.

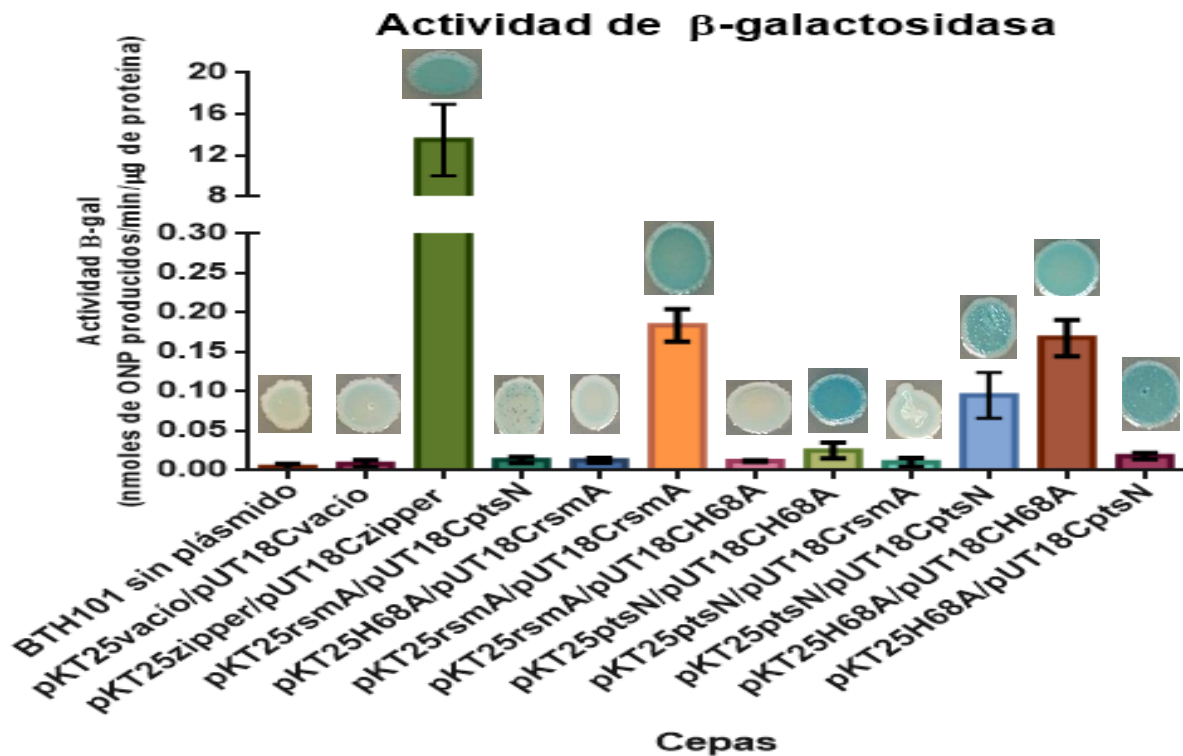


Gráfico 1. Ensayo cuantitativo de actividad de  $\beta$ -galactosidasa en distintas cepas de *E. coli* BTH101. La medición se realizó a las 36 horas de incubación por triplicado técnico. Las cepas fueron incubadas en medio LB adicionado con X-gal e IPTG, así como los antibióticos de selección Ampicilina y Kanamicina, a 30 °C.

Los resultados obtenidos en esta sección no concordaron con lo esperado, ya que no se observó actividad en los híbridos formados por *rsmA* insertado en uno de los dos vectores (pKT25 y pUT18C) y *ptsN* en su forma silvestre o la mutante H68A insertado en el otro, es decir, en las combinaciones pKT25rsmApUT18CptsN, pKT25rsmApUT18CH68A, pKT25ptsNpUT18CrsmA y pKT25H68ApUT18CrsmA, lo que sugiere que no hay una

interacción *in vivo* entre EIIA<sup>Ntr</sup> y RsmA bajo las condiciones probadas, debido a que las colonias que poseían cualquier combinación entre ambas proteínas presentaron una coloración muy tenue, similar a la de los controles negativos, al ser sembradas en medio LB/X-gal/IPTG. Adicionalmente, presentaron los valores más bajos de ONP producidos/min/ $\mu$ g de proteína durante la cuantificación de actividad de  $\beta$ -galactosidasa. La idea de que existiese una interacción proteína-proteína entre EIIA<sup>Ntr</sup> y RsmA resultaba interesante debido a que tanto EIIA<sup>Glc</sup> como EIIA<sup>Ntr</sup> actúan como reguladores del metabolismo, modificando la actividad de sus distintos blancos mediante una interacción directa con éstos o con otros factores. Un ejemplo de regulación mediado por EIIA<sup>Ntr</sup> es el que reportan Muriel-Millán, et. al., 2017, en donde promueve la degradación del factor sigma RpoS a través del complejo chaperona-proteasa ClpAP. Por otro lado, se ha demostrado que EIIA<sup>Glc</sup> se une a distintas proteínas involucradas en el transporte e ingesta de carbohidratos dependiendo de su estado de fosforilación en *E. coli* y en *Salmonella enterica* (9). Adicionalmente, EIIA<sup>Glc</sup> es capaz de inhibir rutas metabólicas de fuentes alternas de carbono, al establecer interacciones proteína-proteína con la glicerol cinasa en *Salmonella typhimurium* (60).

Adicionalmente, resulta interesante notar, que, de acuerdo con los resultados cuantitativos, parece existir cierta interacción entre EIIA<sup>Ntr</sup> consigo misma, la cual depende de igual manera de su estado de fosforilación, ya que éstos resultados sugieren que esta enzima no forma homodímeros entre sus formas fosforilada y no fosforilada, debido a que se reportó una mayor actividad de  $\beta$ -galactosidasa cuando EIIA se encuentra en su forma no fosforilada en ambos vectores, con un valor de 0.168 unidades de ONP producidos/min/ $\mu$ g

de proteína; en comparación con el valor que corresponde a la muestra que contenía a la versión silvestre de la enzima, con un valor de 0.095 unidades (Gráfico 1).

## 1.2. *Ensayo de pull-down*

Con el fin de determinar si la interacción hipotética entre EIIA<sup>Ntr</sup> y RsmA ocurre *in vitro*, se realizó un ensayo de *pull-down* de proteínas mediante una Cromatografía de Afinidad de Ión Metálico Inmovilizado (IMAC), en este caso, empleando una columna con resina de agarosa 6% y Ni-NTA. Este ensayo consiste en la asociación de una proteína de interés con la columna de afinidad, a la cual se le denomina proteína carnada o cebo, la cual, en este trabajo, fue EIIA<sup>Ntr</sup> tanto en su versión silvestre como la mutante no fosforilable H68A, por lo que se emplearon dos columnas, una para cada versión de la proteína. Una vez unida la proteína cebo a su respectiva columna, se procede a añadir una proteína presa, la cual se retendrá en la columna en caso de interactuar con el cebo. El complejo formado por el cebo y la presa es eluido de la columna y recolectado para su posterior visualización en un SDS-PAGE, en donde se deberían observar las dos bandas correspondientes tanto al cebo como a la presa. Para poder unir a EIIA<sup>Ntr</sup> silvestre y a EIIA<sup>Ntr</sup> no fosforilable a su respectiva columna, se realizó la purificación de esta en ambas versiones a partir de vectores derivados de pET24a, lo que resulta en la adición de una cola de seis histidinas a la proteína de interés a través de la cual puede establecer interacciones no covalentes con el níquel en la columna. Mientras que, en el caso de la presa, se empleó un extracto total de proteína de la cepa UW136 debido a que no se logró realizar una purificación exitosa de la proteína RsmA. Para la realización de este protocolo se diseñaron distintas cepas y plásmidos descritas en la sección de Materiales y métodos.

Al analizar las fracciones colectadas a partir de las dos columnas, una para EIIA<sup>Ntr</sup> silvestre y otra para la mutante H68A, utilizando las soluciones amortiguadoras con aumentos graduales de imidazol en un gel desnaturizante de poliacrilamida, se observó que en la fracción correspondiente a la elución con la solución 500 mM de imidazol, que fue la concentración más alta empleada, se eluyeron las proteínas cebo EIIA<sup>Ntr</sup> y EIIA<sup>Ntr</sup>H68A. En el gel de poliacrilamida, en las columnas correspondientes a dichas eluciones, se observaron numerosas bandas en ambas columnas, además de las correspondientes a las proteínas carnada. Esto debido a que se empleó como presa un extracto proteico total de *A. vinelandii*, lo que sugiere que una gran cantidad de proteínas se unen, ya sea de manera específica o inespecífica, a EIIA<sup>Ntr</sup> tanto en su versión fosforilada como en la no fosforilada y a la columna de níquel.

Debido a la numerosa cantidad de bandas que aparecieron en el gel en la columna correspondiente a la elución con imidazol 500 mM, no era posible realizar un análisis individual de cada una de las bandas observadas a partir de los pesos moleculares, por lo que no se podía discernir en el gel qué proteínas habían sido eluidas junto con EIIA<sup>Ntr</sup> en cada una de sus versiones. Por lo tanto, las fracciones que se analizaron en el gel mostrado en la Fig. 13., fueron sometidas a un análisis proteómico con apoyo del Laboratorio de Proteómica del Centro de Ciencias Genómicas con el fin de dilucidar qué proteínas se encontraban en dichas soluciones. Durante el proceso de análisis proteómico se mezclaron las muestras de ambas columnas debido a un error metodológico, por lo que no es posible discernir qué proteínas interactúan con la proteína EIIA<sup>Ntr</sup> silvestre y cuáles con la versión no fosforilable H68A.



El resultado del análisis proteómico arrojó un total de 576 proteínas (Tabla 3, Anexos) que podrían tener interacción con EIIA<sup>Ntr</sup>, dentro de las cuales se destacan algunas como las proteasas dependientes de ATP, ClpX y ClpP; la fosfoenolpiruvato carboxilasa, ppc; la 3-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa; la fosfoenolpiruvato sintasa, PpsA; la beta-cetotiolasa, PhbA; y la fosfoenolpiruvato fosfotransferasa, PtsP, entre otras, las cuales se consideran de importancia para la regulación de la síntesis de PHB. Es importante notar que, dentro de estas proteínas destacadas, las proteasas dependientes de ATP, ClpX y ClpP, representan proteínas que ya habían sido asociadas a EIIA<sup>Ntr</sup>, ya que son estas proteasas las que degradan al factor sigma RpoS en *A. vinelandii* cuando EIIA<sup>Ntr</sup> se encuentra en su estado no fosforilado (43). También es importante destacar a la enzima PtsP, pues forma parte de la cascada de fosforilación del sistema PTS<sup>Ntr</sup> en la que también participa EIIA<sup>Ntr</sup>. Por otro lado, también se destacan proteínas cuya posible interacción con EIIA<sup>Ntr</sup> resultaría interesante en el organismo modelo *A. vinelandii*, como es el caso de PhbA, que es una de las tres enzimas de la biosíntesis de PHB; o de PpsA, la cual cataliza la fosforilación de piruvato a fosfoenolpiruvato, proveedor de los grupos fosforilo para el sistema PTS, por lo que actúa como un regulador del sistema PTS<sup>Ntr</sup>. Por lo tanto, este análisis de proteoma, además de ser empleado para evaluar la interacción de EIIA<sup>Ntr</sup> con RsmA, también sirvió como un método de *screening* para proteínas candidatas de unión a EIIA<sup>Ntr</sup> en *A. vinelandii*, ya que los resultados mostraron tanto proteínas ya relacionadas con EIIA<sup>Ntr</sup>, como algunas que no han sido evaluadas para dicha interacción pero que intervienen en procesos como síntesis de PHB y regulación del metabolismo del nitrógeno.

Sin embargo, en concordancia con lo sugerido por los análisis cualitativo y cuantitativo del ensayo de doble híbrido, la proteína RsmA no se encontró en ninguna de las dos fracciones

correspondientes a la elución con imidazol 500 mM de las columnas de EIIA<sup>Ntr</sup> y EIIA<sup>Ntr</sup>H68A, que fue la fracción donde se eluyeron ambas proteínas carnadas y las que fueron evaluadas en el proteoma. Este resultado refuerza la idea de que no existe una interacción directa entre EIIA<sup>Ntr</sup> y RsmA *in vivo* ni *in vitro*.

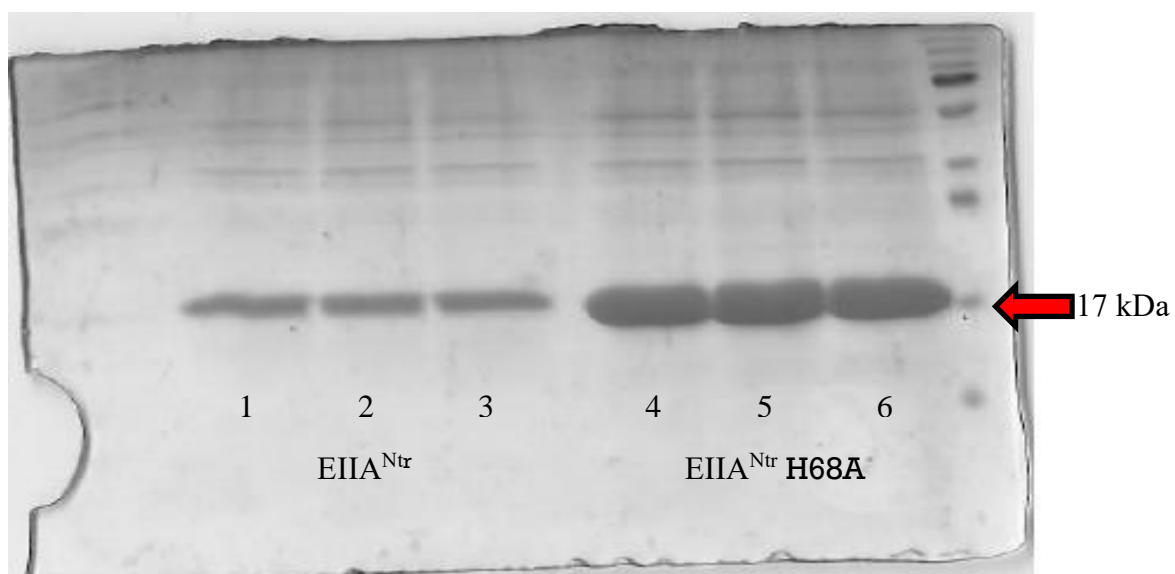


Figura 14. Gel SDS-PAGE en el que se evaluaron las muestras correspondientes a las eluciones con la solución *buffer* 500 mM de imidazol, fracción en que se eluyó la proteína cebo junto con otras proteínas contenidas en la solución presa. Los carriles 1,2 y 3 corresponden a la columna que contenía a EIIA<sup>Ntr</sup> en su estado silvestre; mientras que los carriles 4, 5 y 6 corresponden a la columna que contenía a la proteína con la mutación H68A.

### 1.3. Actividad transcripcional de *rsmZ1* y *rsmZ2*

Se realizó la cuantificación de la actividad transcripcional de los sRNAs *rsmZ1* y *rsmZ2* en fase exponencial y fase estacionaria mediante el gen reportero *gusA* que codifica para la  $\beta$ -glucuronidasa en cepas mutantes de *A. vinelandii*, particularmente en las mutantes en *ptsN* y en *rpoS* con el fin de establecer si dichos sRNAs dependen del factor sigma RpoS para su transcripción. En la cepa mutante UW*ptsN*, el factor sigma RpoS presenta una mayor estabilidad que en una cepa silvestre debido a que *ptsN* codifica para un regulador negativo

post-traducciona de RpoS, por lo que, si los sRNAs mencionados son regulados por RpoS, se esperarí un aumento de su transcripci3n en esta cepa. Por otro lado, al cuantificar la transcripci3n de los sRNAs en la mutante *rpoS*, se esperarí una disminuci3n de este parámetro con respecto a la cepa silvestre. La actividad de  $\beta$ -glucuronidasa se midi3 mediante ensayos espectrofotom3tricos. Las cepas empleadas para este ensayo se encuentran descritas en la secci3n de Materiales y m3todo.

Se realiz3 tanto la cuantificaci3n de proteína total en  $\mu\text{g/mL}$  mediante el m3todo de Lowry (36) con el fin de obtener el dato correspondiente para normalizar el valor de actividad de  $\beta$ -glucuronidasa que se considera dentro del c3lculo dentro de la cuantificaci3n de la actividad enzimática, así como la actividad transcripcional de los sRNAs mediante el reportero de  $\beta$ -glucuronidasa en nmoles de p-nitrofenil- $\beta$ -D-glucur3nido (PNPG) producidos/min/ $\mu\text{g}$  de proteína de las cepas UW *rsmZ1gus*, UW *rsmZ2gus*, UW *rpoS/rsmZ1gus*, UW *rpoS/rsmZ2gus*, UW *rppH/rsmZ1gus*, UW *rppH/rsmZ2gus*, UW *ptsN/rsmZ1gus*, UW *ptsN/rsmZ2gus*, UW *rppH/ptsN/rsmZ1gus* y UW *rppH/ptsN/rsmZ2gus*, las cuales poseen la mutaci3n correspondiente y la fusi3n transcripcional para *rsmZ1* o *rsmZ2* integrada en el cromosoma.

Adicionalmente, se observ3 el fenotipo de las colonias sembradas en medio PY sacarosa a las 48 horas con el fin de confirmar la opacidad esperada en cada una dada la mutaci3n respectiva de cada cepa con respecto a su producci3n de PHB, ya que, la opacidad de las colonias sembradas en medio PY se relaciona con la producci3n de PHB, a mayor opacidad, mayor producci3n de PHB. Por esto, se observa una menor opacidad en las cepas UW*rppH* y UW*rpoS* con respecto a la cepa silvestre, ya que estos genes codifican para

reguladores positivos de la síntesis del polímero, por lo que, al estar inactivados, disminuye la producción de PHB (Fig. 15).

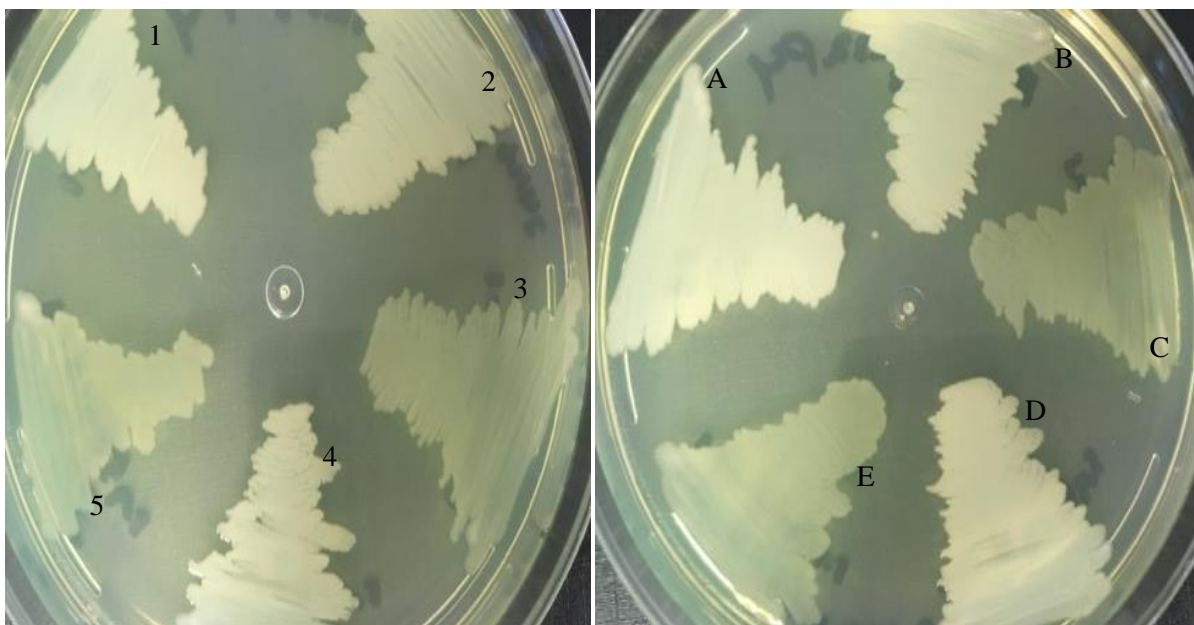


Figura 15. Colonias de distintas cepas mutantes de *A. vinelandii* sembradas en medio PY sacarosa. 1. UW *rsmZ1gus*; 2. UW *rppH/ptsN/rsmZ1gus*; 3. UW *rppH/rsmZ1gus*; 4. UW *ptsN/rsmZ1gus*; 5. UW *rpoS/rsmZ1gus*; A. UW *rsmZ2gus*; B. UW *rppH/ptsN/rsmZ2gus*; C. UW *rppH/rsmZ2gus*; D. UW *ptsN/rsmZ2gus*; E. UW *rpoS rsmZ2gus*.

Al relacionar la opacidad de las colonias con la producción de PHB, el fenotipo de cada cepa analizada correspondió a lo esperado, dado que las colonias con una menor opacidad (colonias 3, 5, C y E) presentan mutaciones en reguladores positivos de la producción de PHB (*rppH* y *ptsN*), por lo que su inactivación resulta en la disminución de la producción de PHB. En el caso de las mutantes en *rppH* (mutantes 3 y C en la figura 15), existe disminución de PHB debido a que *rppH* codifica para una pirofosfohidrolasa que promueve la degradación de transcritos al remover extremos tri o difosfatados, y en *A. vinelandii*, RppH tiene como blanco al transcrito de RsmA, que es un regulador negativo post-

transcripcional de genes involucrados en la síntesis de PHB, por lo que, en ausencia de *rppH*, aumenta la expresión de RsmA y disminuye la traducción de genes de la ruta biosintética. Por otro lado, en las cepas 5 y E de la figura 15, existe disminución en la síntesis de PHB debido a la disminución en la transcripción de *phbR* y *phbB* como consecuencia de la inactivación del factor sigma RpoS, que actúa como un regulador positivo de la transcripción de dichos genes.

Una vez evaluado y confirmado el fenotipo de acumulación de PHB esperado de cada una de las cepas construidas y descritas anteriormente, se procedió a realizar el ensayo de cuantificación de actividad transcripcional mediante el reportero de  $\beta$ -glucuronidasa con el fin de comparar el perfil de expresión a través del tiempo de los sRNAs *rsmZ1* y *rsmZ2* en las distintas cepas mutantes construidas para determinar si estos sRNAs dependen del factor sigma RpoS para su transcripción. Este ensayo se evaluó mediante análisis espectrofotométrico.

Los resultados del procedimiento cuantitativo coinciden con los datos reportados por Hernández-Eligio, et. al., 2012, dado que la actividad transcripcional, tanto de *rsmZ1* como de *rsmZ2*, fue mayor en fase estacionaria (12-36 horas), que en fase exponencial (0-12 horas); asimismo, la actividad de *rsmZ2* fue mayor en un orden de magnitud de 10 veces con respecto a la de *rsmZ1*. Estas observaciones, aunadas al fenotipo de las cepas observado en medio PY sacarosa, sugieren que las construcciones se realizaron correctamente, lo que permitió determinar que los resultados presentados en los gráficos 2 y 3 son confiables.

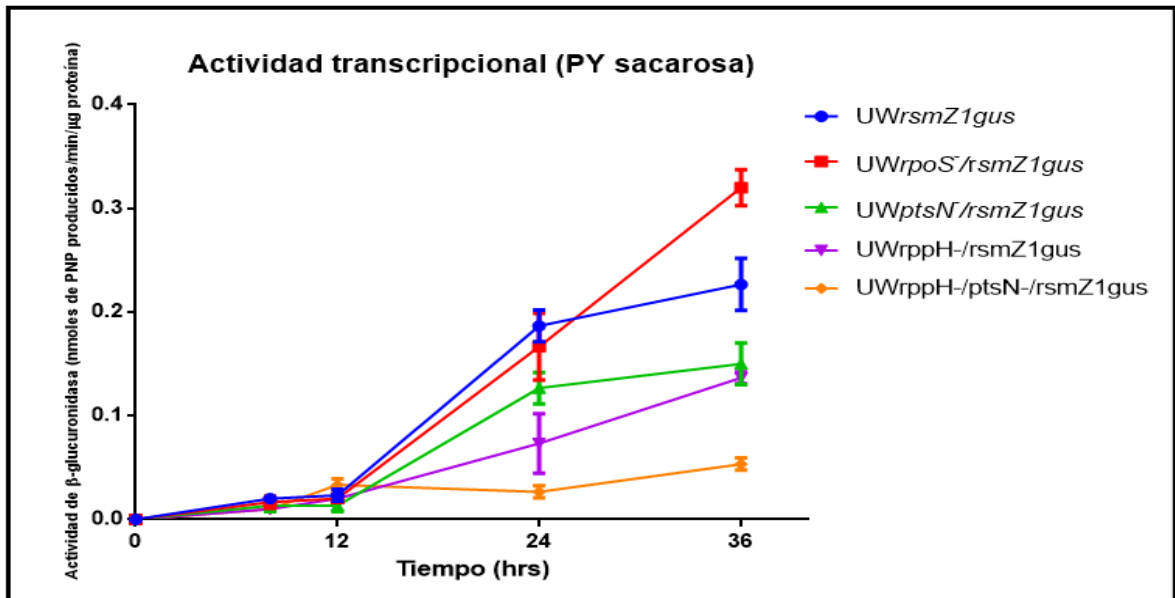


Gráfico 2. Cuantificación de la actividad transcripcional de *rsmZ1* en distintas cepas mutantes de *A. vinelandii*. La medición se realizó a las 8, 12, 24 y 36 horas por triplicado técnico. Las cepas fueron incubadas en medio PY sacarosa a 30 °C.

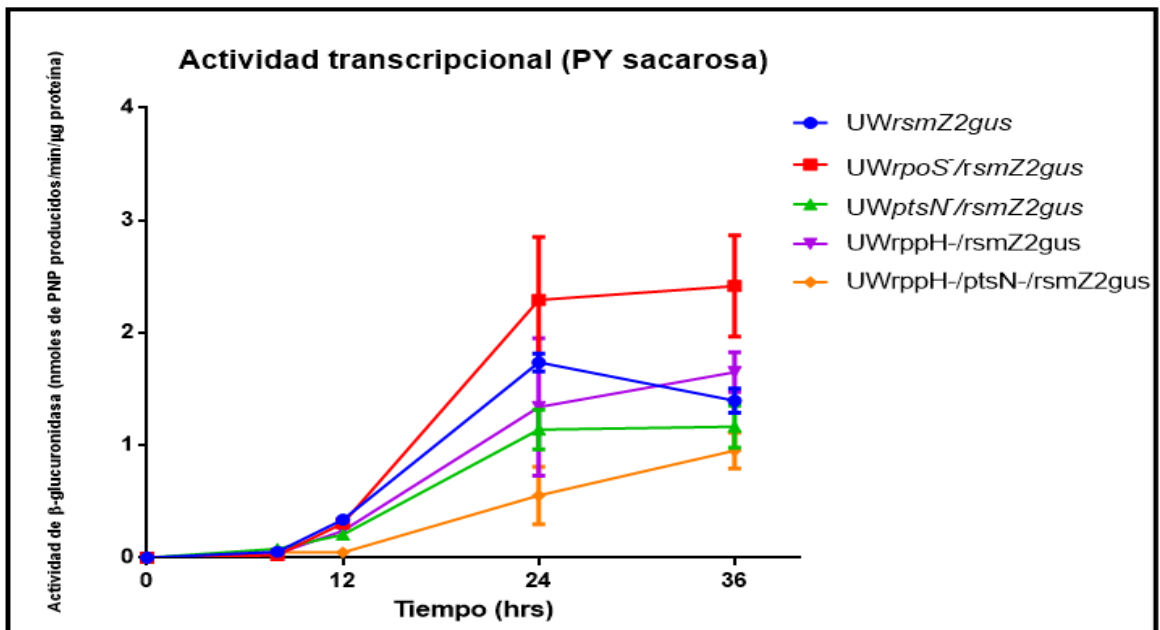


Gráfico 3. Cuantificación de la actividad transcripcional de *rsmZ2* en distintas cepas mutantes de *A. vinelandii*. La medición se realizó a las 8, 12, 24 y 36 horas por triplicado técnico. Las cepas fueron incubadas en medio PY sacarosa a 30 °C.

Dado el marcado aumento en la transcripción de *rsmZ1* y *rsmZ2* en fase estacionaria con respecto a sus niveles de expresión en la fase exponencial, se sospechaba que la transcripción de dichos sRNAs dependían del factor sigma RpoS, el cual presenta su mayor actividad en dicha etapa de crecimiento, promoviendo la transcripción de genes necesarios para distintos procesos de fase estacionaria como la respuesta de las células a la privación de nutrientes y al daño en el DNA (78). Por lo tanto, debido a que EIIA<sup>Ntr</sup> promueve la degradación de RpoS mediada por el complejo chaperona proteasa ClpAP (43), se planteó la hipótesis de que, si los sRNAs *rsmZ1* y *rsmZ2* dependían de RpoS para su transcripción, entonces EIIA<sup>Ntr</sup> estaría actuando como un regulador negativo sobre su expresión, disminuyendo así la concentración de sRNAs que secuestran a RsmA. No obstante, en este ensayo no se observó una disminución significativa en la transcripción de ambos sRNAs en la cepa UW *rpoS*<sup>-</sup> con respecto a la cepa silvestre. En el punto de mayor actividad transcripcional, que correspondió a la medición realizada a las 36 horas, se registró un valor de actividad de 0.2267 unidades de  $\beta$ -glucuronidasa para la cepa silvestre de *rsmZ1*, mientras que para el mismo punto en la cepa silvestre de *rsmZ2* se registró un valor de 1.397 unidades. Para la cepa mutante UW*rpoS*<sup>-</sup>, donde se esperaba un abatimiento en la transcripción para ambos sRNAs, se obtuvo un valor, a las 36 horas, de .32 y de 2.4167 unidades para *rsmZ1* y *rsmZ2*, respectivamente; los cuales son valores más altos de transcripción que en la cepa silvestre.

Adicionalmente, en la cepa UW *ptsN*, donde RpoS presenta una mayor estabilidad (47), por lo que se esperaba un aumento en la transcripción de los sRNAs si éstos fuesen regulados por dicho factor sigma, no se observó dicho comportamiento en la transcripción,

así como en el caso de la doble mutante UW *rppH/ptsN*. En el caso de la mutante UW*ptsN*, a las 36 horas se obtuvo un valor de transcripción de 0.15 y 1.1667, para *rsmZ1* y *rsmZ2*, respectivamente; y estos valores son menores a los registrados en la cepa silvestre UW136 a dicho tiempo, por lo que la ausencia de *ptsN* no tiene el efecto esperado sobre los sRNAs.

Estos datos indican que, a pesar del comportamiento de la transcripción de *rsmZ1* y *rsmZ2*, éstos no son regulados por el factor sigma RpoS; por lo tanto, EIIA<sup>Ntr</sup> no controla la transcripción de los sRNAs al no depender éstos de RpoS, por lo que tampoco regula indirectamente la actividad de RsmA. Es importante destacar que anteriormente se ha reportado que RpoS es capaz de promover la transcripción de distintos sRNAs, como el caso de *sraL* en *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (73), o de *csrC*, que es homólogo a los sRNAs *rsm* reportados en este trabajo, en *Salmonella* (37). Sin embargo, hasta el momento, en *A. vinelandii*, el regulador de respuesta GacA del sistema de dos componentes GacS/GacA es uno de los reguladores positivos de la transcripción de estos sRNAs que se han reportado, por lo que su patrón de expresión es dependiente, al menos parcialmente, de este regulador de respuesta, y no del factor sigma RpoS (23).

## 6. Conclusiones

Tras la realización de diversos experimentos que tenían como objetivo determinar la relación que existe entre las proteínas EIIA<sup>Ntr</sup> y RsmA de *A. vinelandii*, se obtuvieron las siguientes conclusiones.



De acuerdo con los resultados presentados en esta tesis, no se observó una interacción *in vivo* ni *in vitro*, por lo que se sugiere que las proteínas reguladoras negativas involucradas en la ruta biosintética de PHB, EIIA<sup>Ntr</sup> y RsmA, no presentan una interacción proteína-proteína, por lo que se descarta la hipótesis de que dicha interacción promueve la actividad de RsmA como represor de la traducción de los genes *phbR* y *phbB*.

En este trabajo se obtuvo un proteoma a partir de un *pull-down* de proteínas empleando a EIIA<sup>Ntr</sup> como cebo y un extracto proteico total de la cepa silvestre UW136 de *A. vinelandii* como carnada. De esta forma, se obtuvo un total de 576 proteínas identificadas que podrían establecer interacciones con EIIA<sup>Ntr</sup>, dentro de las cuales destacan algunas como ClpP o PhbA, las cuales forman parte de la regulación de la síntesis de PHB. En el caso de ClpP, ya se había asociado esta proteína a la actividad reguladora de EIIA<sup>Ntr</sup> (49) mediante la degradación del factor sigma de fase estacionaria RpoS. Sin embargo, es importante destacar que dentro del total de proteínas encontradas en el proteoma no se encontró a RsmA.

A pesar de que los sRNAs *rsmZ1* y *rsmZ2* presentan una mayor transcripción en fase estacionaria que en fase exponencial, éstos no son dependientes del factor sigma RpoS, por lo que su activación por GacA se lleva a cabo en fase estacionaria a partir de un promotor no reconocido por RpoS. Adicionalmente, al no depender de dicho factor sigma, EIIA<sup>Ntr</sup> no afecta la transcripción de estos sRNAs mediante el mecanismo de degradación de RpoS, por tanto, EIIA<sup>Ntr</sup> no afecta la actividad de RsmA a través de promover la disminución de la expresión de los sRNAs antagonistas de RsmA.

Adicionalmente, los resultados de este trabajo sugieren que la proteína EIIA<sup>Ntr</sup> es capaz de formar homodímeros entre dos monómeros en su estado fosforilado, o entre dos monómeros en su versión no fosforilada; sin embargo, no forma dímeros entre un monómero fosforilado y uno no fosforilado.

## 7. Anexos

Tabla 1. Cepas empleadas en este estudio

Cepa	Descripción	Referencia o fuente
<b><i>A. vinelandii</i></b>		
<b>UW136</b>	Mutación natural en <i>algU</i> , Nal <sup>r</sup> , Rif <sup>r</sup>	(Bishop and Brill, 1977; Martínez-Salazar <i>et al.</i> , 1996)
<b>UW136::pALA7</b>	UW136 con el plásmido pALA7 co-integrado que expresa a EIIA <sup>Ntr</sup> fosforilable.	(Noguez <i>et al.</i> , 2008)
<b>UW136::pALA8a</b>	UW136 con el plásmido pALA8 co-integrado que expresa a EIIA <sup>Ntr</sup> H68A no fosforilable.	(Noguez <i>et al.</i> , 2008)
<b>SAWZ1</b>	UW136 con fusión transcripcional <i>rsmZ1-gusA</i>	(Hernández-Eligio <i>et al.</i> , 2012)
<b>SAWZ2</b>	UW136 con fusión transcripcional <i>rsmZ2-gusA</i>	(Hernández-Eligio <i>et al.</i> , 2012)
<b>RN4</b>	UW136 con una mutación <i>ptsN::Km</i>	(Noguez <i>et al.</i> , 2008)
<b>UWrppH</b>	UW136 con una mutación <i>rppH::Sp</i>	(Bedoya-Pérez <i>et al.</i> , 2018)
<b>JGW-S</b>	UW136 con una mutación <i>rpoS::Sp</i>	(Peralta-Gil <i>et al.</i> , 2002)
<b>UW <i>ptsN</i>/<i>rppH</i></b>	UW136 con mutaciones <i>ptsN::Km</i> y <i>rppH::Sp</i>	Este trabajo
<b>UW <i>ptsN</i>/<i>rsmZ1gus</i></b>	SAWZ1 con una mutación <i>ptsN::Km</i>	Este trabajo
<b>UW <i>ptsN</i>/<i>rppH</i>/<i>rsmZ1gus</i></b>	SAWZ1 con mutaciones <i>ptsN::Km</i> y <i>rppH::Sp</i>	Este trabajo
<b>UW <i>rpoS</i>/<i>rsmZ1gus</i></b>	SAWZ1 con una mutación <i>rpoS::Sp</i>	Este trabajo
<b>UW <i>ptsN</i>/<i>rsmZ2gus</i></b>	SAWZ2 con una mutación <i>ptsN::Km</i>	Este trabajo
<b>UW <i>ptsN</i>/<i>rppH</i>/<i>rsmZ2gus</i></b>	SAWZ2 con mutaciones <i>ptsN::Km</i> y <i>rppH::Sp</i>	Este trabajo
<b>UW <i>rpoS</i>/<i>rsmZ2gus</i></b>	SAWZ2 con una mutación <i>rpoS::Sp</i>	Este trabajo
<b><i>E. coli</i></b>		
<b>BTH101</b>	F-, <i>cya-99</i> , <i>araD139</i> , <i>galE15</i> , <i>galK16</i> , <i>rpsL1</i> ( <i>Str<sup>r</sup></i> ), <i>hsdR2</i> , <i>mcrA1</i> ,	EUROMEDEX

	<i>mcrB1</i>	
<b>DH5a</b>	<i>supE44 ΔlacU169 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 relA</i>	Stock de laboratorio
<b>BL21(DE3)</b>	<i>ompT gal dcm lon hsdS<sub>B</sub>(r<sub>BMB</sub>) λ(DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])</i>	Stock de laboratorio

Tabla 2. Plásmidos empleados en este estudio

Nombre	Descripción	Referencia o fuente
<b>pJET1.2-Blunt</b>	Vector de clonación	Thermo Scientific
<b>pET24a</b>	Vector de expresión	Novagen
<b>pKT25</b>	Vector del sistema de doble híbrido que codifica el fragmento T25 de la adenilato ciclasa, Km	EUROMEDEX
<b>pUT18C</b>	Vector del sistema de doble híbrido que codifica el fragmento T18 de la adenilato ciclasa, Amp	EUROMEDEX
<b>pKT25-<i>zip</i></b>	pKT25 con el <i>zipper</i> de leucina de GCN4	EUROMEDEX
<b>pUT18C-<i>zip</i></b>	pUT18C con el <i>zipper</i> de leucina de GCN4	EUROMEDEX
<b>pKT25<i>ptsN</i></b>	pKT25 con la secuencia de <i>ptsN</i>	(Muriel-Millán, 2015)
<b>pUT18C<i>ptsN</i></b>	pUT18C con la secuencia de <i>ptsN</i>	(Muriel-Millán, 2015)
<b>pKT25<i>ptsNH68A</i></b>	pKT25 con la secuencia de <i>ptsN</i> con la mutación H68A	(Muriel-Millán, 2015)
<b>pUT18C<i>ptsNH68A</i></b>	pUT18C con la secuencia de <i>ptsN</i> con la mutación H68A	(Muriel-Millán, 2015)
<b>pKT25<i>rsmA</i></b>	pKT25 con la secuencia de <i>rsmA</i>	Este trabajo
<b>pUT18C<i>rsmA</i></b>	pUT18C con la secuencia de <i>rsmA</i>	Este trabajo
<b>pALA7</b>	pET24a que contiene a <i>ptsN</i>	(Noguez <i>et al</i> , 2008)
<b>pALA8</b>	pET24a que contiene a <i>ptsN</i> con la mutación H68A	(Noguez <i>et al</i> , 2008)

Tabla 3. Lista de proteínas que aparecieron en el proteoma correspondiente al *pull-down* de EIIA<sup>Ntr</sup> como proteína carnada y un extracto proteico total de la cepa UW136 de *A. vineladii* como presa.

Identificador KEGG	Descripción
--------------------	-------------

<b>Avin44900</b>	Componente E1 de la piruvato deshidrogenasa
<b>Avin45910</b>	Alquil hidroperóxido reductasa C
<b>Avin 48030</b>	Aldehído deshidrogenasa (NAD <sup>+</sup> )
<b>Avin02910</b>	Fosfomannomutasa
<b>Avin47550</b>	Regulador de la subunidad sigma de la RNA polimerasa, Rsd
<b>Avin02190</b>	Proteína chaperona CbpA
<b>Avin11960</b>	Proteína chaperona ClpB
<b>Avin23580</b>	Proteasa dependiente de ATP ClpX
<b>Avin4490</b>	Monóxido de carbono deshidrogenasa
<b>Avin31610</b>	Proteína asociada a CRISPR Csd1
<b>Avin12980</b>	Proteína de fusión multifuncional
<b>Avin42950</b>	4-hidroxi-tetrahidrodipicolinato
<b>Avin21190</b>	Componente F de la enteroquelina sintasa
<b>Avin05600</b>	Fructosa 1,6-bifosfato aldolasa
<b>Avin23540</b>	Proteína bifuncional FodD
<b>Avin12190</b>	Multifosforilo fructosa-específico FruB
<b>Avin12630</b>	Glutamil-tRNA(Gln) amidotransferasa
<b>Avin43320</b>	Glicolato oxidasa de unión a FAD
<b>Avin40970</b>	Serina hidroximetiltransferasa
<b>Avin 13480</b>	Chaperonina de 60 kDa GroL
<b>Avin03170</b>	Glutación sintetasa
<b>Avin19970</b>	Proteína chaperona HtpG
<b>Avin03310</b>	Dihidroxi-ácido deshidratasa
<b>Avin28260</b>	Factor de inicio de la traducción IF-1
<b>Avin05880</b>	Catalasa-peroxidasa
<b>Avin08460</b>	Lipoil sintasa
<b>Avin34450</b>	Aspartocinasa
<b>Avin34140</b>	O-succinilhomoserina sulfhidrilasa
<b>Avin41330</b>	Probable malato:quinona
<b>Avin23460</b>	Sistema de transporte nitrato/nitrito
<b>Avin28470</b>	NADH.ubiquinona oxidorreductasa
<b>Avin23330</b>	OprF
<b>Avin13060</b>	Ubiquinol-citocromo c reductasa
<b>Avin17640</b>	6-fosfogluconolactonasa
<b>Avin34190</b>	Acetil-coenzima A carboxilasa
<b>Avin34530</b>	Acetil.coenzima A sintetasa
<b>Avin42780</b>	Poliribonucleótido nucleotidiltransferasa
<b>Avin39300</b>	Fosfoenolpiruvato carboxilasa ppc
<b>Avin34070</b>	NAD cinasa
<b>Avin39280</b>	Adenilato cinasa
<b>Avin41470</b>	Factor de liberación de cadena peptídica 1
<b>Avin03570</b>	Adenosilhomocisteinasa
<b>Avin23210</b>	2-metilisocitrato liasa
<b>Avin34550</b>	Fosfato acetiltransferasa
<b>Avin12770</b>	Proteína del sistema de fosfotransferasa asociado a nitrógeno

	EIIA <sup>Ntr</sup>
<b>Avin06890</b>	Proteína bifuncional de biosíntesis de purinas
<b>Avin34500</b>	Acetilornitina aminotransferasa
<b>Avin13350</b>	Proteína bifuncional de biosíntesis de arginina
<b>Avin52160</b>	Subunidad beta de la ATP sintasa
<b>Avin05070</b>	Subunidad D de la celulosa sintasa
<b>Avin06750</b>	6,7-dimetil-8-ribitilumazina
<b>Avin02930</b>	Biosíntesis de coenzima A
<b>Avin13040</b>	Proteína L13 ribosomal 50S
<b>Avin06410</b>	Proteína L18 50S ribosomal
<b>Avin47000</b>	Factor sigma RpoD
<b>Avin15870</b>	Proteína S1 30S ribosomal
<b>Avin28290</b>	Proteína de choque frío CspD
<b>Avin07640</b>	Proteína S6 30S ribosomal
<b>Avin06470</b>	Proteína S13 30S ribosomal
<b>Avin23140</b>	Proteína transcripcional LysR
<b>Avin37080</b>	Cisteína sintasa
<b>Avin35340</b>	4-hidroxi-tetrahidrodipicolinato
<b>Avin47710</b>	Diaminopimelato epimerasa
<b>Avin48330</b>	D-3-fosfoglicerato deshidrogenasa
<b>Avin48850</b>	Putrescina aminotransferasa
<b>Avin29770</b>	2-oxoglutarato deshidrogenasa
<b>Avin27250</b>	KDPG aldolasa
<b>Avin49460</b>	Receptor periplásmico tripartito de tricarboxilato, tctC
<b>Avin40240</b>	GTPasa
<b>Avin44600</b>	Fosfometilpirimidina sintasa
<b>Avin02470</b>	Alfa-glucosidasa
<b>Avin20420</b>	Treonina-tRNA ligasa
<b>Avin05570</b>	Transcetolasa
<b>Avin14450</b>	Complejo de oxidación de ácidos grasos
<b>Avin52150</b>	Cadena épsilon de la ATP sintasa
<b>Avin34220</b>	tRNA pseudouridina sintasa A
<b>Avin05980</b>	Biotina sintasa
<b>Avin38980</b>	Factor de elongación Ts
<b>Avin46900</b>	Proteína multifuncional CCA
<b>Avin41360</b>	Uracil fosforibosiltransferasa
<b>Avin19980</b>	Citocromo c oxidasa tipo Cbb3
<b>Avin28170</b>	Sirohemo sintasa
<b>Avin22280</b>	Xantina deshidrogenasa
<b>Avin39180</b>	Proteína de choque frío
<b>Avin27450</b>	3-carboximuconato ciclasa
<b>Avin32850</b>	Cisteína sintasa
<b>Avin48100</b>	Partícula de reconocimiento de señal
<b>Avin34880</b>	Fumarato hidratasa clase II
<b>Avin47960</b>	Alanina racemasa

<b>Avin02020</b>	Glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa
<b>Avin00380</b>	NAD(P)H deshidrogenasa (quinona)
<b>Avin00010</b>	Iniciador de replicación cromosomal
<b>Avin42970</b>	Proteína chaperona DnaK
<b>Avin43330</b>	Subunidad de la glicolato oxidasa GlcD
<b>Avin27990</b>	1,4-alfa-glicano enzima ramificante
<b>Avin42860</b>	Fosfoglucosamina mutasa
<b>Avin15190</b>	Flavoproteína de transferencia de electrones
<b>Avin29820</b>	Citrato sintasa
<b>Avin02830</b>	Guanilato cinasa
<b>Avin13790</b>	GTPasa Era
<b>Avin05020</b>	Glutamato-cisteína ligasa
<b>Avin19920</b>	Coproporfirinógeno-III oxidasa
<b>Avin12930</b>	Histidinol deshidrogenasa
<b>Avin45440</b>	Fosforibosil-AMP ciclohidrolasa
<b>Avin42500</b>	Ceto-ácido reductoisomerasa
<b>Avin03540</b>	RNA helicasa dependiente de ATP, DEAD
<b>Avin42440</b>	2-isopropilmalato sintasa
<b>Avin38960</b>	Factor de reciclaje de ribosoma
<b>Avin13290</b>	Proteína de división celular FtsA
<b>Avin46670</b>	4-aminobutirato transaminasa
<b>Avin15090</b>	Proteína reguladora IclR
<b>Avin35120</b>	Proteína determinante de sitio
<b>Avin45720</b>	Regulón de glicerol-3-fosfato GlpR
<b>Avin42920</b>	Factor de elongación de la transcripción GreA
<b>Avin42980</b>	Proteína GrpE
<b>Avin00040</b>	Subunidad B de la DNA girasa
<b>Avin06400</b>	Proteína L6 50S ribosomal
<b>Avin47450</b>	Ácido delta-aminolevulínico
<b>Avin09260</b>	Glutamato-1-semialdehído 2,1-aminomutasa
<b>Avin04600</b>	Imidazol glicerol fosfato sintasa
<b>Avin51090</b>	Flavohemoproteína
<b>Avin45390</b>	Subunidad ATPasa de la proteasa dependiente de ATP, HslU
<b>Avin33290</b>	Ribonucleósido-difosfato reductasa
<b>Avin48270</b>	L-treonina deshidratasa
<b>Avin28460</b>	NADH-quinona oxidorreductasa
<b>Avin42520</b>	Acetolactato sintasa
<b>Avin07420</b>	Alcohol deshidrogenasa que contiene Zinc
<b>Avin07490</b>	Proteína de fusión multifuncional
<b>Avin36630</b>	Proteína asociada a peptidoglicano
<b>Avin38230</b>	Regulador transcripcional PcaR
<b>Avin13440</b>	Piridoxamina 5-fosfato oxidasa
<b>Avin13920</b>	Lon proteasa
<b>Avin23590</b>	Lon proteasa
<b>Avin37700</b>	Cisteína peptidasa PfpI

<b>Avin09060</b>	Proteína parecida a PhoH
<b>Avin39390</b>	Lisina-tRNA ligasa
<b>Avin36950</b>	Nucleótido pirofosfohidrolasa
<b>Avin48560</b>	Transportador específico de fosfato
<b>Avin07940</b>	Pirofosfatasa
<b>Avin47440</b>	Polifosfato cinasa
<b>Avin11260</b>	Piranopterina monofosfato cíclica
<b>Avin46870</b>	Serina proteasa cinasa PrkA
<b>Avin36750</b>	Prolina-tRNA ligasa
<b>Avin08030</b>	UDP-N-acetilmuramato-L-alanil-gama-D-glutamil-meso-2,6-diaminoheptandioato ligasa
<b>Avin07600</b>	Adenilosuccinato sintasa
<b>Avin34150</b>	Amidofosforibosiltransferasa
<b>Avin36900</b>	Fosforibosilcinamida formiltransferasa
<b>Avin38810</b>	CTP sintasa
<b>Avin38310</b>	Regulador transcripcional MvaT
<b>Avin06800</b>	GTP ciclohidrolasa-2
<b>Avin11460</b>	Hidrolasa de la superfamilia HAD
<b>Avin40330</b>	Nucleósido difosfato cinasa
<b>Avin11700</b>	Proteína con dominio de choque frío
<b>Avin01450</b>	Cofactor MoFe de la nitrogenasa
<b>Avin14060</b>	Ribonucleasa T
<b>Avin01630</b>	Cisteína desulfurasa
<b>Avin48280</b>	Ribosa-5-fosfato isomerasa A
<b>Avin06160</b>	Proteína ribosomal L7/L12 50S
<b>Avin14590</b>	Na(+)-translocador de NADH-quinona reductasa subunidad A
<b>Avin12380</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin45900</b>	Proteína de unión a DNA NtrC
<b>Avin06330</b>	Proteína ribosomal L29 50S
<b>Avin28450</b>	NADH-quinona oxidorreductasa
<b>Avin06180</b>	RNA polimerasa RpoC
<b>Avin06420</b>	Proteína ribosomal S5 30S
<b>Avin06340</b>	Proteína ribosomal S17 30S
<b>Avin23290</b>	4-hidroxi-4-metil-2-oxoglutarato aldolasa putativa
<b>Avin13020</b>	Proteína de división celular ZapE
<b>Avin23100</b>	Lipoproteína de membrana externa OprI
<b>Avin29780</b>	Succinato-deshidrogenasa ferrosulfurada
<b>Avin14040</b>	Glutarredoxina
<b>Avin07050</b>	Arginina decarboxilasa biosintética
<b>Avin14170</b>	Proteína de estrés universal
<b>Avin18730</b>	Aminopeptidasa N
<b>Avin14550</b>	Purina nucleósido fosforilasa
<b>Avin40480</b>	Queuina tRNA-ribosiltransferasa
<b>Avin15030</b>	Cisteína desulfurasa
<b>Avin02980</b>	Tiazol sintasa

<b>Avin22150</b>	Transcetolasa
<b>Avin15420</b>	Aminotransferasa, clase I y clase II
<b>Avin00630</b>	DNA polimerasa I
<b>Avin15470</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin00140</b>	Proteína de ingesta de potasio TrkA
<b>Avin52440</b>	GTPasa de modificación de tRNA MnmE
<b>Avin15600</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin46120</b>	Antranilato fosforibosiltransferasa
<b>Avin01190</b>	N5-carboxiaminoimidazol ribonucleótido mutasa
<b>Avin16040</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin06090</b>	Factor de elongación Tu
<b>Avin13610</b>	Uracil-DNA glicosilasa
<b>Avin09880</b>	Subunidad alfa de la ureasa
<b>Avin42810</b>	Factor A de unión al ribosoma
<b>Avin02810</b>	Guanosina 3,5-bispirofosfato
<b>Avin15920</b>	dTDP-glucosa 4,6-deshidratasa
<b>Avin16740</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin47410</b>	Factor de terminación de la transcripción Rho
<b>Avin22290</b>	Subunidad pequeña de la xantina deshidrogenasa
<b>Avin07620</b>	Ribonucleasa R
<b>Avin06250</b>	Proteína ribosomal L3 50S
<b>Avin17590</b>	3-hidroxiubutirato deshidrogenasa
<b>Avin40790</b>	Proteína ribosomal L21 50S
<b>Avin17670</b>	Carbohidrato cinasa de la familia PfkB
<b>Avin48050</b>	Proteína ribosomal L28 50S
<b>Avin06170</b>	Subunidad beta de la RNA polimerasa
<b>Avin00420</b>	Proteína con dominio GGDEF
<b>Avin06490</b>	Proteína ribosomal S4 30S
<b>Avin00540</b>	Peptidasa de la familia U32
<b>Avin06240</b>	Proteína ribosomal S10 30S
<b>Avin39560</b>	Proteína ribosomal S16 30S
<b>Avin18170</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin51810</b>	Sacarosa-6-fsfato hidrolasa
<b>Avin29790</b>	Succinato deshidrogenasa
<b>Avin04700</b>	Proteína de exportación SecB
<b>Avin01360</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin18740</b>	Acetil-CoA hidrolasa/transferasa
<b>Avin48870</b>	Glutamina amidotransferasa
<b>Avin06950</b>	Biotina carboxilasa
<b>Avin34560</b>	Acetato cinasa
<b>Avin40440</b>	Inositol-1-monofosfatasa
<b>Avin32700</b>	Transaldolasa
<b>Avin35030</b>	Catión/acetato simportador ActP
<b>Avin03250</b>	Proteína UPF0312
<b>Avin03530</b>	Peptidasa M16



<b>Avin24900</b>	Malto-oligosiltrehalosa trehalohidrolasa
<b>Avin02900</b>	Acetilglutamato cinasa
<b>Avin47420</b>	Tiorredoxina
<b>Avin14080</b>	Argininosuccinato sintasa
<b>Avin45240</b>	3-dehidroxiquinato sintasa
<b>Avin52170</b>	Cadena gama de la ATP sintasa
<b>Avin21060</b>	Enoil-CoA hidratasa-isomerasa
<b>Avin20000</b>	Citocrom c oxidasa
<b>Avin23570</b>	Proteasa dependiente de ATP ClpP
<b>Avin05150</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin46070</b>	Bisíntesis de ubiquinona
<b>Avin46100</b>	Gen activador de catabolitos Crp
<b>Avin17630</b>	Glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa
<b>Avin12970</b>	Sulfato adenililtransferasa
<b>Avin00220</b>	Coproporfirinógeno III oxidasa
<b>Avin27520</b>	Subunidad beta de la sulfito reductasa
<b>Avin39090</b>	2,3,4,5-tetrahidropiridina-2-carboxilato N-succiniltransferasa
<b>Avin05910</b>	Proteína de unión a nucleótido cíclico
<b>Avin06390</b>	Proteína ribosomal S8 30S
<b>Avin42690</b>	Proteína chaperona DnaJ
<b>Avin01220</b>	Proteína de unión a penicilina
<b>Avin06670</b>	Tiorredoxina
<b>Avin27280</b>	6-fosfogluconato deshidratasa
<b>Avin01560</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin27220</b>	Enolasa
<b>Avin29060</b>	3-oxoacil- (Proteína acarreadora de acilos)
<b>Avin29690</b>	Enoil- (Proteína acarreadora de acilos)
<b>Avin23490</b>	tRNA-hidroxilasa
<b>Avin25560</b>	Sintasa de péptidos no ribosomales Pvd
<b>Avin09370</b>	AMP nucleosidasa
<b>Avin38440</b>	Fumarato hidratasa clase I
<b>Avin09850</b>	Resistencia a telurito TerB
<b>Avin25890</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<b>Avin05190</b>	Proteína reguladora de la transcripción GntR
<b>Avin47260</b>	Glicina deshidrogenasa
<b>Avin26310</b>	Alfa/beta hidrolasa
<b>Avin43290</b>	Malato sintasa G
<b>Avin26790</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin20110</b>	Glutamato-tRNA ligasa
<b>Avin00100</b>	Subunidad beta de la glicina-tRNA ligasa
<b>Avin13470</b>	Chaperonina de 10kDa GroS
<b>Avin15810</b>	Subunidad A de la DNA girasa
<b>Avin06540</b>	Proteína de unión a DNA de cadena sencilla
<b>Avin07540</b>	Proteína de unión a RNA, Hfq
<b>Avin12940</b>	Histidinol-fosfato aminotransferasa

<b>Avin056660</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin05430</b>	Chaperonina de 33 kDa
<b>Avin11780</b>	Isoleucina-tRNA ligasa
<b>Avin42510</b>	Subunidad pequeña de la acetolactato sintasa
<b>Avin07170</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin12880</b>	Factor de tolerancia a solventes orgánicos ABC
<b>Avin13150</b>	Tetrapirrol metilasa
<b>Avin46830</b>	Tetrapirrol metilasa
<b>Avin06960</b>	Proteína acarreadora de carboxil biotina
<b>Avin44910</b>	Componente de acetiltransferasa de la piruvato deshidrogenasa
<b>Avin23470</b>	Aconitato hidratasa B
<b>Avin12800</b>	Proteína de transporte de LPS, LptB
<b>Avin19460</b>	Agarasa
<b>Avin34460</b>	Alanina-tRNA ligasa
<b>Avin09040</b>	Transportador con dominio CBS
<b>Avin14860</b>	7-metil-GTP pirofosfatasa
<b>Avin03550</b>	Metilnetetrahidrofolato reductasa
<b>Avin46010</b>	Anhidro-N-ácido acetilmurámico cinasa
<b>Avin04920</b>	Aminoácido acetiltransferasa
<b>Avin14030</b>	Ornitina carbamoiltransferasa
<b>Avin15850</b>	3-fosfoshikimato 1-carboxiviniltransferasa
<b>Avin14120</b>	Biosíntesis de cofactor de molibdeno
<b>Avin52180</b>	Subunidad alfa de la ATP sintasa
<b>Avin52200</b>	Subunidad beta de la ATP sintasa
<b>Avin15980</b>	Glicosil transferasa
<b>Avin10630</b>	Canal protónico TonB
<b>Avin31020</b>	NADP oxidorreductasa coenzima F420
<b>Avin10730</b>	Regulador transcripcional LysR
<b>Avin12910</b>	UDP-N-acetilglucosamina 1-carboxiviniltransferasa
<b>Avin20010</b>	Citocromo c oxidasa
<b>Avin11240</b>	Proteína parecida a PhoH
<b>Avin13650</b>	L-aspartato oxidasa
<b>Avin12000</b>	NADH:quinona oxidorreductasa no acoplada
<b>Avin01390</b>	Cadena alfa de la nitrogenasa
<b>Avin31600</b>	Proteína asociada a CRISPR Csd2
<b>Avin12560</b>	Regulador de respuesta RegA/PrrA/ActR
<b>Avin12690</b>	Ribonucleasa E/G
<b>Avin28490</b>	NADH-quinona oxidorreductasa
<b>Avin32920</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin12780</b>	Proteína de modulación ribosomal sigma 54
<b>Avin18940</b>	D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa
<b>Avin06110</b>	Factor de terminación/antiterminación de la transcripción NusG
<b>Avin13370</b>	Proteína de la familia MutT/NUDIX
<b>Avin13270</b>	D-alanina-D-alanina ligasa
<b>Avin43460</b>	DNA topoisomerasa 4 subunidad A

<b>Avin14150</b>	Transglicosilasa soluble lítica
<b>Avin42690</b>	Poli(A) polimerasa I
<b>Avin11650</b>	Probable aminopeptidasa de citosol
<b>Avin15280</b>	Factor de elongación P
<b>Avin38790</b>	Enolasa
<b>Avin27440</b>	2,3-bifosfoglicerato-independiente fosfoglicerato mutasa
<b>Avin14680</b>	Glicerofosforil diester fosfodiesterasa
<b>Avin34370</b>	Antagonista de factor antisigma STAS
<b>Avin15830</b>	Corismato mutasa
<b>Avin29050</b>	3-hidroxidecanoil-(proteína acarreadora de acilos) deshidratasa
<b>Avin18960</b>	Desoxiguanosintrifosfato trifosfohidrolasa
<b>Avin14920</b>	3-oxoacil-(proteína acarreadora de acilos) reductasa
<b>Avin45640</b>	Fructosa-1,6-bifosfatasa clase I
<b>Avin19110</b>	FMN-dependiente NADH-azorreductasa
<b>Avin34920</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin47430</b>	Exopolifosfatasa
<b>Avin40760</b>	Glutamato 5-cinasa
<b>Avin35380</b>	Peptidasa
<b>Avin06880</b>	Fosforibosilamina-glicina ligasa
<b>Avin39660</b>	Fosforibosilformilglicinamida sintasa
<b>Avin20130</b>	Oxaloacetato decarboxilasa
<b>Avin27240</b>	Piruvato cinasa
<b>Avin38410</b>	Piruvato cinasa
<b>Avin16820</b>	Alcohol deshidrogenasa
<b>Avin06710</b>	Proteína de síntesis de riboflavina Rib
<b>Avin11940</b>	Pseudouridina sintasa
<b>Avin06220</b>	Factor de elongación G
<b>Avin24990</b>	UTP-glucosa-1-fosfato uridiltransferasa
<b>Avin12610</b>	Aspartil-glutamil-tRNA (Asn/Gln) amidotransferasa subunidad B
<b>Avin06280</b>	Proteína ribosomal L2 50S
<b>Avin06150</b>	Proteína ribosomal L10 50S
<b>Avin17570</b>	3-oxoácido CoA-transferasa subunidad A
<b>Avin05920</b>	Malato sintasa G
<b>Avin43310</b>	Glicolato oxidasa ferrosulfurasa subunidad GlcF
<b>Avin36830</b>	Flavodoxina parecida a WrbA
<b>Avin06500</b>	RNA polimerasa RpoA
<b>Avin06310</b>	Proteína ribosomal S3 30S
<b>Avin51890</b>	Glutamina-fructosa-6-fosfato aminotransferasa
<b>Avin42790</b>	Proteína ribosomal S15 30S
<b>Avin45710</b>	Glicerol cinasa
<b>Avin18310</b>	Peptidasa de la familia U32
<b>Avin37840</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin39720</b>	GMP sintasa
<b>Avin13340</b>	Translocasa subunidad SecA
<b>Avin07550</b>	GTPasa HflX

<b>Avin04590</b>	Imidazolglicerol-fosfato deshidratasa	
<b>Avin30470</b>	Superóxido dismutasa	
<b>Avin13100</b>	Proteína de respuesta estricta B	
<b>Avin22680</b>	Proteína no caracterizada	
<b>Avin44880</b>	Aminóacido ramificado aminotransferasa	
<b>Avin22760</b>	Ferritina de la familia Dps	
<b>Avin42820</b>	Factor de inicio de la traducción IF-2	
<b>Avin39730</b>	Inosina-5'-monofosfato deshidrogenasa	
<b>Avin23260</b>	Fosfoenolpiruvato sintasa putativa	
<b>Avin11880</b>	FAD-dependiente glicina oxidasa	
<b>Avin12840</b>	Arabinosa 5-fosfato isomerasa	
<b>Avin23550</b>	Factor de disparo	
<b>Avin12740</b>	Modulador de la DNA girasa, peptidasa U62	
<b>Avin20290</b>	Xilitol deshidrogenasa	
<b>Avin14470</b>	DNA topoisomerasa 1	
<b>Avin40960</b>	Transportador ABC	
<b>Avin12810</b>	Sistema de exportación de lipopolisacárido	
<b>Avin02990</b>	tRNA (guanina-N(7)-)-metiltransferasa	
<b>Avin38870</b>	Acil-(proteína acarreadora de acilos)-UDP-N-acetilglucosamina O-aciltransferasa	
<b>Avin02120</b>	Cadena beta de la triptófano sintasa	
<b>Avin41390</b>	Renalasa	
<b>Avin20090</b>	Aminotransferasa	
<b>Avin13980</b>	5-metiltetrahidropteroiltriglutamato-homocisteína metiltransferasa	S-
<b>Avin25650</b>	Sintasa de péptidos no ribosomales	
<b>Avin06520</b>	Proteína A del sistema UvrABC	
<b>Avin11620</b>	Valina-tRNA ligasa	
<b>Avin25750</b>	Proteína no caracterizada	
<b>Avin26140</b>	Transportador ABC	
<b>Avin27260</b>	Glucosa-6-fosfato 1-deshidrogenasa	
<b>Avin13200</b>	UDP-N-acetilmuramil-tripéptido sintetasa	
<b>Avin43110</b>	Proteína con dominio Fe-S/FAD	
<b>Avin35390</b>	Quinolinato sintasa A	
<b>Avin22670</b>	Proteína no caracterizada	
<b>Avin22800</b>	Aminotransferasa clase III	
<b>Avin00840</b>	Proteína de ingesta de hierro	
<b>Avin28480</b>	NADH-quinona oxidorreductasa subunidad F	
<b>Avin01550</b>	Proteína no caracterizada	
<b>Avin23120</b>	Proteína no caracterizada	
<b>Avin23600</b>	Proteína parecida a histonas	
<b>Avin02070</b>	Flavin monooxigenasa parecida a luciferasa	
<b>Avin23790</b>	Acirreductona dioxigenasa	
<b>Avin52240</b>	Partición de cromosoma ParB	
<b>Avin44580</b>	Nudix hidrolasa de la familia YffH	

<b>Avin17650</b>	Glucosa-6-fosfato isomerasa
<b>Avin46890</b>	Proteína parecida a SpoVR
<b>Avin04340</b>	Proteína parecida a transglutaminasa
<b>Avin47460</b>	Glioxilasa
<b>Avin23280</b>	Fosfoenolpiruvato sintasa PpsA
<b>Avin04640</b>	Proteasa carboxi-terminal S41A
<b>Avin23220</b>	Citrato sintasa
<b>Avin38280</b>	Formiltetrahidrofolato deformilasa
<b>Avin38560</b>	Proteína RecA
<b>Avin05620</b>	Oxidoreductasa de unión a NAD Rossman
<b>Avin27090</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin27210</b>	Gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
<b>Avin14810</b>	Ribonucleasa E
<b>Avin06650</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin06130</b>	Proteína ribosomal L1 50S
<b>Avin49880</b>	Proteína de choque frío
<b>Avin50020</b>	Azúcar isomerasa (SIS)
<b>Avin07090</b>	Proteína de estrés universal, UspA
<b>Avin06360</b>	Proteína ribosomal L24 50S
<b>Avin28350</b>	Fosfatasa NudJ
<b>Avin38990</b>	Proteína ribosomal S2 30S
<b>Avin06290</b>	Proteína ribosomal S19 30S
<b>Avin51550</b>	Bomba de membrana
<b>Avin46080</b>	S-adenosilmetionina decarboxilasa
<b>Avin34470</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin12720</b>	Modulador de la DNA girasa, peptidasa U62
<b>Avin30140</b>	Acil-CoA sintetasa
<b>Avin10400</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin02130</b>	Cadena alfa de la triptófano sintasa
<b>Avin42800</b>	tRNA pseudouridina sintasa B
<b>Avin15760</b>	Biosíntesis de ubiquinona O-metiltransferasa
<b>Avin13360</b>	Proteína de la familia glutatión S-transferasa
<b>Avin13550</b>	Enoil-CoA hidratasa/isomerasa
<b>Avin36400</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin00020</b>	Pinza beta
<b>Avin36820</b>	Arsenato reductasa
<b>Avin00830</b>	Transportador ABC
<b>Avin00880</b>	Alcohol deshidrogenasa
<b>Avin01130</b>	Proteína trimérica parecida a LpxA
<b>Avin38520</b>	Fosfocetolasa
<b>Avin01760</b>	Tioesterasa
<b>Avin39070</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin35360</b>	Alquil hidroperóxido reductasa
<b>Avin15770</b>	Amidohidrolasa
<b>Avin02460</b>	Proteína no caracterizada

<b>Avin35470</b>	Alcohol deshidrogenasa
<b>Avin41140</b>	Proteína de la familia OmpA
<b>Avin04020</b>	Regulador transcripcional LysR
<b>Avin04330</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin17870</b>	Proteína UPF0753
<b>Avin17970</b>	Proteína de estrés universal
<b>Avin42570</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin43100</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin18650</b>	Proteína de la familia de la triada de histidinas (HIT)
<b>Avin05510</b>	Beta-cetoacil sintasa
<b>Avin18990</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin19040</b>	Dienelactona hidrolasa
<b>Avin19310</b>	Fsoforibosiltransferasa
<b>Avin06570</b>	dTDP-4-deshidroammosa reductasa
<b>Avin20170</b>	Proteína de choque térmico Hsp20
<b>Avin20380</b>	Oxidoreductasa FAD-dependiente
<b>Avin44420</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin41110</b>	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa
<b>Avin41230</b>	D-glicerato deshidrogenasa
<b>Avin20770</b>	Escualeno/fitoeno sintasa
<b>Avin41340</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin45400</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin45600</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin21140</b>	5-hidroxiisourato hidrolasa
<b>Avin46060</b>	Proteína de la familia de la triada de histidinas (HIT)
<b>Avin07980</b>	Alcohol deshidrogenasa
<b>Avin46880</b>	Proteína UPF0229
<b>Avin43090</b>	Proteína de unión a clúster ferrosulfurado
<b>Avin47580</b>	Proteína parecida a HemX
<b>Avin48690</b>	Tiosulfato sulfutransferasa GlpE
<b>Avin22710</b>	Translocador de metales pesados tipo P
<b>Avin10760</b>	Glu/Leu/Phe/Val deshidrogenasa
<b>Avin22980</b>	Proteína de síntesis de cobalamina
<b>Avin44460</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin11520</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin45650</b>	Alfa-1,4-glicano fosforilasa
<b>Avin25730</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin12730</b>	Proteína UPF0307
<b>Avin25790</b>	Proteína de estrés universal UspA
<b>Avin47330</b>	Amino-peptidasa P
<b>Avin47570</b>	Proteína parecida a HemY
<b>Avin13620</b>	Proteína parecida a YgfZ
<b>Avin52090</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin48620</b>	Glucosa-6-fosfato 1-epimerasa putativa
<b>Avin14560</b>	Proteína no caracterizada

<b>Avin49810</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin15740</b>	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta
<b>Avin28160</b>	Glicosil transferasa
<b>Avin16700</b>	Acetil-CoA hidrolasa/transferasa
<b>Avin29200</b>	Proteína trimérica parecida a LpxA
<b>Avin17200</b>	Proteína asociada a CRISPR
<b>Avin17400</b>	Flavoproteína de transferencia de electrones
<b>Avin17680</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin29650</b>	Transportador periplásmico ABC
<b>Avin30940</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin31440</b>	Hidrolasa de la familia de las isocorismatasas
<b>Avin34340</b>	KHG/KDPG aldolasa
<b>Avin22370</b>	Aldo/ceto reductasa
<b>Avin35170</b>	Peptidasa C-terminal
<b>Avin22700</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin23510</b>	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa
<b>Avin24750</b>	Nitroreductasa
<b>Avin25020</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin25250</b>	Enzima activadora de acilos
<b>Avin25570</b>	Sintasa de péptidos no ribosomales
<b>Avin25770</b>	Proteína de choque térmico Hsp20
<b>Avin37960</b>	O-metiltransferasa
<b>Avin26320</b>	FAD-dependiente piridina nucleótido-disulfido oxidoreductasa
<b>Avin38400</b>	Proteína de estrés universal
<b>Avin27580</b>	Proteína de unión a esterol
<b>Avin41530</b>	Proteína ribosomal L25 50S
<b>Avin43080</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin45150</b>	Proteína de estrés universal
<b>Avin47300</b>	Transportador ABC
<b>Avin48310</b>	Oxidoreductasa unida a FAD
<b>Avin48440</b>	Regulador transcripcional de la familia LysR
<b>Avin48670</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin35160</b>	Alcohol deshidrogenasa
<b>Avin35210</b>	Peptidil-prolil cis-trans isomerasa
<b>Avin36070</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin37950</b>	Alcohol deshidrogenasa
<b>Avin52070</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin38940</b>	Regulador de respuesta de la familia LuxR
<b>Avin40590</b>	Regulador transcripcional
<b>Avin41210</b>	Proteína de unión a peptidoglicano
<b>Avin41520</b>	Ribosa-fosfato pirofosfocinasa
<b>Avin45920</b>	Acil-CoA deshidrogenasa
<b>Avin48300</b>	Fumarilacetoacetato (FAA) hidrolasa
<b>Avin50900</b>	Proteína de fijación de nitrógeno
<b>Avin51410</b>	Alfa-galactosidasa

<b>Avin47790</b>	Proteína reguladora de nitrógeno
<b>Avin47610</b>	Regulador de respuesta de enquistamiento y biosíntesis de alginato AlgR
<b>Avin48230</b>	Fosfoenolpiruvato fosfotransferasa
<b>Avin01710</b>	Flavodoxina
<b>Avin01380</b>	Nitrogenasa férrica
<b>Avin01620</b>	Proteína de fijación de nitrógeno NifU
<b>Avin01400</b>	Nitrogenasa hierro-molibdeno
<b>Avin01470</b>	Biosíntesis de cofactor MoFe
<b>Avin51010</b>	Biosíntesis de cofactor de nitrogenasa
<b>Avin28310</b>	Isocitrato deshidrogenasa
<b>Avin29750</b>	Dihidrolipoil deshidrogenasa
<b>Avin29760</b>	Dihidrolipoillisina succiniltransferasa
<b>Avin50580</b>	Hidrogenasa de membrana níquel-dependiente
<b>Avin45850</b>	Glutamina sintetasa
<b>Avin14050</b>	Bacterioferritina
<b>Avin50480</b>	Hidrogenasa de incorporación de níquel
<b>Avin50670</b>	Transportador de molibdeno
<b>Avin02800</b>	Endoribonucleasa L-PSP
<b>Avin02000</b>	Citocromo c4
<b>Avin07450</b>	Sulfutransferasa
<b>Avin45950</b>	Flavodoxina 1
<b>Avin13300</b>	Proteína de división celular, FtsZ
<b>Avin43210</b>	Subunidad beta de la proteína de almacenamiento de molibdeno
<b>Avin43200</b>	Subunidad alfa de la proteína de almacenamiento de molibdeno
<b>Avin19880</b>	Citocromo bd ubiquinol oxidasa
<b>Avin50990</b>	Proteína reguladora de fijación de nitrógeno
<b>Avin19890</b>	Citocromo bd ubiquinol oxidasa
<b>Avin13730</b>	Serina endoproteasa periplásmica
<b>Avin01990</b>	Proteína de intercambio tiol:disulfido
<b>Avin50690</b>	Procesamiento de molibdeno, homeostasis
<b>Avin01490</b>	Proteína no caracterizada
<b>Avin43000</b>	Proteína de ingesta de hierro
<b>Avin23670</b>	Fasina
<b>Avin50910</b>	Proteína de fijación de nitrógeno
<b>Avin23640</b>	Beta-cetotiolasa de biosíntesis de polihidroxitirato
<b>Avin14670</b>	Transhidrogenasa subunidad beta
<b>Avin37820</b>	Superóxido dismutasa



## 8. Referencias

1. Anderson, A. & Dawes, E. (1990). *Occurrence, Metabolism, Metabolic Role, and Industrial Uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates*. *Microbiological Reviews*; 54(4): 450-472.
2. Andler, R. & Díaz-Barrera, Á. (2013). *Ingeniería para producir plásticos desde bacterias*. *INGENERARE*; 27: 29-36.
3. Ballard, D. & Holmes, P. (1987). *Formation of Polymers of  $\beta$ -Hydroxybutyric Acid in Bacterial Cells and a Comparison of the Morphology of Growth With the Formation of Polyethylene in the Solid State*. *Recent Advances in Mechanistic and Synthetic Aspects of Polymerization*; 293-314.
4. Beckman, E. *The world's plastic problem in numbers*. (2018). EU.: World Economic Forum. Recuperado de: <https://www.weforum.org/agenda/2018/08/the-world-of-plastics-in-numbers>
5. Bedoya-Pérez, L., Muriel-Milán, L., Moreno, S., Quiroz-Rocha, E., Rivera-Gómez, N. & Espín, G. (2018). *The pyrophosphohydrolase RppH is involved in the control of RsmA/CsrA expression in Azotobacter vinelandii and Escherichia coli*. *Microbiological Research*; 214: 91-100.
6. Berleman, J. & Bauer, C. (2004). *Characterization of cyst cell formation in the purple photosynthetic bacterium Rhodospirillum rubrum*. *Microbiology*; 150: 383-390.
7. Bishop, P. & Brill, W. (1977). *Genetic analysis of Azotobacter vinelandii mutant strains unable to fix nitrogen*. *Journal of Bacteriology*; 130(2): 954-956.
8. Castañeda, M., Sánchez, J., Moreno, S., Núñez, C. & Espín, G. (2001). *The Global Regulators GacA and  $\zeta^S$  Form Part of a Cascade That Controls Alginate Production in Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*; 183(23): 6787-6793.

9. Deutscher, J., Désirée, F., Derkaoui, M., Constant, A., Nguyen, T., Bouraoui, H., Kentache, T., Mokhtari, A., Milohanic, E. & Joyet, P. (2014). *The Bacterial Phosphoenolpyruvate:Carbohydrate Phosphotransferase System: Regulation by Protein Phosphorylation and Phosphorylation-Dependent Protein-Protein Interactions*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*; 78(2): 231-256.
10. Dubrac, S., Bisicchia, P., Devine, K. & Msadek, T. (2008). *A matter of life and death: cell wall homeostasis and the WalKR (YycGF) essential signal transduction pathway*. *Molecular Microbiology*; 70(6): 1307-1322.
11. Egas, J. (2010). *Efecto de la inoculación con Azotobacter sp. en el crecimiento de plantas injertadas de cacao (Theobroma cacao), genotipo nacional, en la provincia de Esmeraldas* (Proyecto previo a la obtención del título Ingeniero Agroindustrial). Facultad de Ingeniería Química y Agroindustria, Quito, Ecuador.
12. Espín, G. (2001). *Biología de Azotobacter vinelandii*. Recuperado de: <http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap6/>
13. Espín, G. (2016). *Genes involved in the formation of desiccation-resistant cysts in Azotobacter vinelandii*. En de Burjijn, F. (Ed.), *Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria* (pp. 709-715). EU: John Wiley & Sons, Inc.
14. Evans, J. & Sikdar, S. (1990). *Biodegradable plastics: an idea whose time has come?* *Chemical Technology*; 20(1): 38-42.
15. Feldhaus, M., Hwa, V., Cheng, Q. & Salyers, A. (1991). *Use of an Escherichia coli beta-glucuronidase gene as a reporter gene for investigation of Bacteroides promoters*. *Journal of Bacteriology*; 173(14): 4540-4543.

16. Galindo, E., Peña, C., Núñez, C., Segura, D. & Espín, G. (2007). *Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by Azotobacter vinelandii*. *Microbial Cell Factories*; 6(1), 7.
17. García, A. & Ponce, E. (2003). *Metabolismo del carbono en microorganismos de interés biomédico y biotecnológico: Vía de Entner-Doudoroff*. *Biotecnología Aplicada*; 20(2): 85-94.
18. Göpel, Y. & Görke, B. (2012). *Rewiring two-component signal transduction with small RNAs*. *Current Opinion in Microbiology*; 15: 132-139.
19. Gutiérrez, P., Li, Y., Osborne, M., Pomerantseva, E., Liu, Q., Gehring, K. (2005). *Solution Structure of the Carbon Storage Regulator Protein CsrA form, Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*; 187(10): 3496-3501.
20. Haywood, G., Anderson, A. Chu, L. & Dawes, E. (1988). *The role of NADH- and NADPH-linked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiology Letters*; 52: 259-264.
21. Heeb, S. & Haas, D. (2001). *Regulatory Roles of the GacS/GacA Two-Component System in Plant-Associated and Other Gram-Negative Bacteria*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*; 14(12): 1351-1363.
22. Heeswijk, W., Westerhoff, H., Boogerd, F. (2013). *Nitrogen Assimilation in Escherichia coli: Putting Molecular Data into a Systems Perspective*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*; 77(4): 628-695.
23. Hernández-Eligio, A., Moreno, S., Castellanos, M., Castañeda, M., Núñez, C., Muriel-Millán, L. & Espín, G. (2012). *RsmA post-transcriptionally controls PhbR*

- expression and polyhydroxybutyrate synthesis in Azotobacter vinelandii.* Microbiology; 158: 1953-1963.
24. Hitchins, V. & Sadoff, H. (1970). *Morphogenesis of Cysts in Azotobacter vinelandii.* Journal of Bacteriology; 104(1): 492-498.
25. Hitchins, V. & Sadoff, H. (1973). *Sequential Metabolic Events During Encystment of Azotobacter vinelandii.* Journal of Bacteriology; 113(3): 1273-1279.
26. Igarashi, R. & Seefeldt, L. (2003). *Nitrogen Fixation: The Mechanism of the Mo-Dependent Nitrogenase.* Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology; 38: 351-3384.
27. Jackson, F. & Dawes, E. (1976). *Regulation of the Tricarboxylic Acid Cycle and Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate Metabolism in Azotobacter beienrickii Grown under Nitrogen or Oxygen Limitation.* Journal of General Microbiology; 97: 303-312.
28. Jiménez, D., Montaña, J. & Martínez, M. (2011). *Characterization of free nitrogen fixing bacteria of the genus Azotobacter in organic vegetable-grown Colombian soils.* Brazilian Journal of Microbiology; 42(3): 846-858.
29. Kessel, M., Maurizi, M., Kim, B., Kocsis, E., Trus, B., Singh, S. & Steven, A. (1995). *Homology in Structural Organization Between E. coli ClpAP Protease and the Eukaryotic 26 S Proteasome.* Journal of Molecular Biology; 250: 587-594.
30. Khanna, S. & Srivastava, A. (2005). *Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates.* Process Biochemistry; 40: 607-619.
31. Kujawa, M., Lirski, M., Ziecina, M., Drabinska, J., Modzelan, M. & Kraszewska, E. (2017). *Nudix-type RNA pyrophosphohydrolase provides homeostasis of virulence factor pocyenin and functions as a global regulator in Pseudomonas aeruginosa.* Molecular Microbiology; 106(3): 381-394.

32. Kuhla, J. & Oelze, J. (1988). *Dependence of Nitrogenase Switch-Off upon Oxygen Stress on the Nitrogenase Activity in Azotobacter vinelandii*. Journal of Bacteriology; 170(11): 5325-5329.
33. Lapouge, K., Schubert, M., Allain, F. & Haas, D. (2007). *Gac/Rsm signal transduction pathway of  $\gamma$ -proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour*. Molecular Microbiology; 67(2): 241-253.
34. Lee, S. (1996). *Plastic bacteria? Progress and prospects for polyhydroxyalkanoate production in bacteria*. Cell Press; 14(11): 431-438.
35. Lemos, A. & Mina, A. (2015). *Polihidroxicanoatos (PHA) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial*. Informador Técnico (Colombia); 79(1): 93-101.
36. Leng, Y., Vakulskas, C., Zere, T., Pickering, B., Watnick, P., Babitzke, P. & Romeo, T. (2016). *Regulation of CsrB/C sRNA decay by EIIA (Glc) of the phosphoenlpyruvate: carbohydrate phosphotransferase system*. Molecular Microbiology; 99(4): 627-639.
37. Lévi-Meyrueis, C., Monteil, V., Sismeiro, O., Dillies, M., Monot, M., Jagla, B., Coppée, J., Dupuy, B. & Norel, F. (2014). *Expanding the RpoS/ $\sigma^S$  – Network Sequencing and Identification of  $\sigma^S$  – Controlled Small RNAs in Salmonella*. PLOS ONE; 9(5): e96918.
38. Lin, L. & Sadoff, H. (1968). *Encystment and Polymer Production by Azotobacter vinelandii in the Presence of  $\beta$ -Hydroxybutyrate*. Journal of Bacteriology; 95(6): 2336-2343.
39. Louche, A., Salcedo, S. & Bigot, S. (2017). *Protein-Protein Interactions: Pull-Down Assays*. Methods in Molecular Biology; 1615: 247-255.

40. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, A. & Randall, R. (1951). *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. The Journal of Biological Chemistry; 193(1): 265-275.
41. Maldonado, R., Jiménez, J. & Casadesús, J. (1994). *Changes of Ploidy during the Azotobacter vinelandii Growth Cycle*. Journal of Bacteriology; 176(13): 3911-3919.
42. Mandin, P. & Guillier, M. (2013). *Expanding control in bacteria: interplay between small RNAs and transcriptional regulators to control gene expression*. Current Opinion in Microbiology; 16: 125-132.
43. Manzo, J., Cocotl-Yañez, M., Tzontecomani, T., Martínez, V., Bustillos, R., Velásquez, C. et. al. (2011). *Post-Transcriptional Regulation of the Alginate Biosynthetic Gene algD by the Gac/Rsm System in Azotobacter vinelandii*. Journal of Molecular Microbiology; 21: 147-159.
44. Martínez-Salazar, J., Moreno, S., Najera, R., Boucher, J., Espín, G., Soberón-Chávez, G. (1996). *Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its regulators MucA, MucB, MucC and MucD in Azotobacter vinelandii and evaluation of their roles in alginate biosynthesis*. Journal of Bacteriology; 178: 1800-1808.
45. McLennan, A. (2006). *The Nudix hydrolase superfamily*. Cellular and Molecular Life Sciences; 63: 123-143.
46. Moll, S., Schneider, D., Stodghill, P., Myers, C., Cartinhour, S. & Filiatrault, M. (2010). *Construction of an rsmX co-variance model and identification of five rsmX non-coding RNAs in Pseudomonas syringae pv. tomato DC3000*. RNA Biology; 7(5): 508-516.

47. Mukhtar, H., Bashir, H., Nawaz, A. & Haq, I. (2018). *Optimization of growth conditions for Azotobacter species and their use as biofertilizer*. Journal of Bacteriology & Mycology: Open Access; 6(5): 274-278.
48. Muriel-Millán, L. (2015). *El Sistema de Fosfotransferasa Asociado a Nitrógeno ( $PTS^{Ntr}$ ) y su Papel en la Regulación de la Síntesis de Poli- $\beta$ -Hidroxitirato y Alquilresorcinoles en Azotobacter vinelandii* (Tesis doctoral). Universidad Nacional Autónoma de México, Morelos, México.
49. Muriel-Millán, L., Moreno, S., Gallegos-Monterrosa, R. & Espín, G. (2017). *Unphosphorylated  $EIIA^{Ntr}$  induces ClpAP-mediated degradation of RpoS in Azotobacter vinelandii*. Molecular Microbiology; 104(2): 197-211.
50. Mus, F., Crook, M., García, K., et. al. (2016). *Symbiotic Nitrogen Fixation and the Challenges to Its Extension to Nonlegumes*. Applied and Environmental Microbiology; 83(13): 3698-3710.
51. Natzke, J., Noar, J. & Bruno-Bárcena, J. (2018). *Azotobacter vinelandii Nitrogenase Activity Hydrogen Production, and Response to Oxygen Exposure*. Applied and Environmental Microbiology; 84(16): e01208-18.
52. Navarro, A. & García, C. (2010). *Biopolymers by Azotobacter vinelandii*. Biopolymers; IntechOpen. Recuperado de: <https://www.intechopen.com/books/biopolymers/biopolymers-by-azotobacter-vinelandii>
53. 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- $\beta$ -Hydroxybutyrate Biosynthetic Genes in Azotobacter vinelandii*. Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology; 15: 244-254.

54. Oeding, V. & Schlegel, H. (1973). *B-Ketothiolase form Hydrogenomonas eutropha H16 and its Significance in the Regulation of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate Metabolism*. *Biochemical Journal*; 134: 239-248.
55. Ortiz, C. (2019). *Papel de la proteína EIIA<sup>Ntr</sup> en el mecanismo de regulación de la síntesis de PHB en Azotobacter vinelandii* (Tesis de maestría). UNAM, Cuernavaca, Morelos.
56. Page, W. & Cornish, A. (1993). *Growth of Azotobacter vinelandii UWD in Fish Peptone Medium and Simplified Extraction of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate*. *Applied and Environmental Microbiology*; 59(12): 4236-4244.
57. Peralta-Gil, M., Segura, D., Guzmán, J., Servín-González, L. & Espín, G. (2002). *Expression of the Azotobacter vinelandii poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthetic phbBAC operon its drivem by two overlapping promoters and is dependent n the transcriptional activator PhbR*. *Journal of Bacteriology*; 184: 5672-5677.
58. Pettinari, M., Vázquez, G., Silberschmidt, D., Rehm, B., Steinbüchel, A. & Méndez, B. (2001). *Poly(3-Hydroxybutyrate) Synthesis Genes in Azotobacter sp. Strain FA8*. *Applied and Environmental Microbiology*; 67(11): 5331-5334.
59. Pilla, S. (2011). *Handbook of Bioplastics and Biocomposites Engineering Applications*. EU: John Wiley & Sons.
60. Postma, P., Epstein, W., Schuitema, A. & Nelson, S. (1984). *Interaction Between III<sup>Glc</sup> of the Phosphoenolpyruvate: Sugar Phosphotransferase System and Glycerol Kinase of Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*; 158(1): 351-353.
61. Postma, P., Lengeler, J. & Jacobson, G. (1993). *Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate Phosphotransferase Systems of Bacteria*. *Microbiological Reviews*; 57(3).



62. Pridachina, N., Novogradskaja, E., Krugliak, E., et. al. (1982). *Azotobacter chroococcum*, a producer of a new antifungal antibiotic. *Antibiotiki*; 27(1): 3-6.
63. Pulakat, L., Lee, S-H. & Gavini, N. (2002). *Genome of Azotobacter vinelandii: counting of chromosomes by utilizing copy number of a selectable genetic marker*. *Genetica*; 115: 147-158.
64. Ritchie, G., Senior, P. & Dawes, E. (1971). *The Purification and Characterization of Acetoacetyl-Coenzyme A Reductase form Azotobacter beijerickii*. *Biochemical Journal*; 121: 309-316.
65. Rubio, L. & Ludden, P. (2008). *Biosynthesis of the Iron-Molybdenum Cofactor of Nitrogenase*. *Annual Review of Microbiology*; 62: 93-111.
66. Sadoff, H. (1975). *Encystment and Germination in Azotobacter vinelandii*. *Bacteriological Reviews*; 39(4): 516-539.
67. Sadoff, H., Berke, E. & Loperfido, B. (1971). *Physiological Studies of Encystment in Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*; 105(1): 185-189.
68. Sadoff, H., Dhimel B. & Eliis, S. (1979). *Characterization of Azotobacter vinelandii Deoxyribonucleic Acid and Folded Chromosomes*. *Journal of Bacteriology*; 138(5): 871-877.
69. Segura, D., Cruz, T. & Espín G. (2003). *Encystment and alkylresorcinol production by Azotobacter vinelandii strains impaired in poly- $\beta$ -hydroxybutyrate synthesis*. *Archives of Microbiology*; 179: 437-443.
70. Segura, D., Núñez, C. & Espín, G. (2020). *Azotobacter cysts*. En: eLS. John Wiley & Sons, Ltd: Chichester.
71. Senior, P. & Dawes, E. (1973). *The Regulation of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate Metabolism in Azotobacter beijenrickii*. *Biochemical Journal*; 134: 225-238.

72. Setubal, J., dos Santos, P., Goldman, B., Ertesvag, H., Espín, G., Rubio, L., Valla, S., et. al. (2009). *Genome sequence of Azotobacter vinelandii, an Obligate Aerobe Specialized To Support Diverse Anaerobic Metabolic Processes*. *Journal Of Bacteriology*; 191(14): 4534-4545.
73. Silva, I., Ortega, Á., Viegas, S., García-del Portillo, F. & Arraiano, C. (2013). *An RpoS-dependent sRNA regulates the expresión of a chaperone involved in protein folding*. *RNA*; 19(9): 1253-1265.
74. Shah, V., Pate, J. & Brill, W. (1973). *Protection of Nitrogenase in Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*; 115(1): 15-17.
75. Shuisu, W. (2012). *Bacterial Two-Component Systems\_ Structures and Signaling Mechanisms*. En C. Huang (Ed.), *Protein Phosphorylation in Human Health*. EU: IntechOpen. Disponible en: <https://www.intechopen.com/books/protein-phosphorylation-in-human-health/bacterial-two-component-systems-structures-and-signaling-mechanisms>
76. Socolofsky, M. & Wyss, O. (1961). *Cysts of Azotobacter*. *Journal of Bacteriology*; 81(6): 946-954.
77. Socolofsky, M., & Wyss, O. (1962). *Resistance of the Azotobacter Cyst*. *Journal of Bacteriology*; 84(1): 119-124.
78. Storvik, K. & Foster, P. (2010). *RpoS, the stress response sigma factor, plays a dual role in the regulation of Escherichia coli's error-prone DNA polymerase IV*. *Journal of Bacteriology*; 192(14): 3639-3644.
79. Trejo, A., Moreno, S., Cocotl-Yañez, M., Espín, G. (2016). *GacA regulates the PTS<sup>Ntr</sup>-dependent control of cyst formation in Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiology Letters*; 364(2): 1-7.

80. 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*. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*; 8: 386.
81. Wyss, O., Neumann, G. & Socolofsky, D. (1961). *Development and Germination of the Azotobacter Cyst*. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*; 10: 555-565.
82. Wyss, O., Smith, D., Pope, L. & Olson, K. (1969). *Endogenous Encystment of Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*; 100(1): 475-479.