

**INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR**

**Efecto del Sistema CbrA/CbrB sobre la expresión del operón biosintético de  
Poly- $\beta$ -hidroxibutirato, *phbBAC*, en *Azotobacter vinelandii***

**TESIS**

**Para obtener el título de:**

**Licenciado en Ciencias con área terminal en Bioquímica y Biología Molecular**

**Presenta**

**Miriam Citlalli Gonzaga Pérez**

**Directora De Tesis**

**Dra. Cinthia Ernestina Núñez López**

***Cuernavaca, Morelos***

***Mayo, 2019***



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



Instituto de  
Investigación en  
Ciencias  
Básicas y  
Aplicadas

## INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS



Control Escolar de Licenciatura

### VOTOS DE APROBATORIOS

Presidente del Consejo Directivo del Instituto de Investigación en Ciencias Básicas Aplicadas de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

P r e s e n t e.

Por medio de la presente le informamos que después de revisar la versión escrita de la tesis que realizó la C. GONZAGA PEREZ MIRIAM CITLALI con número de matrícula **20144008277** cuyo título es:

**"Efecto del sistema CbrA/CbrB sobre la expresión del operón biosintético de poli- $\beta$ -hidroxibutirato, *phbBAC*, en *Azotobacter vinelandii*"**

Consideramos que **SI** reúne los méritos que son necesarios para continuar los trámites para obtener el título de **Licenciado Ciencias Área Terminal de Bioquímica y Biología Molecular**.

Cuernavaca, Mor a 10 de septiembre del 2020

Atentamente

Por una universidad culta

Se adiciona página con la e-firma UAEM de los siguientes:

**DRA. CARMEN NINA PASTOR COLÓN**

**DRA. MARIA EUGENIA NUÑEZ VALDEZ**

**DRA. CINTHIA ERNESTINA NUÑEZ LOPEZ**

**DR. ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA**

**DR. DANIEL GENARO SEGURA GONZALEZ**

**PRESIDENTE**

**SECRETARIO**

**VOCAL**

**PRIMER SUPLENTE**

**SEGUNDO SUPLENTE**



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**CARMEN NINA PASTOR COLON** | Fecha:2020-09-10 12:10:39 | Firmante

xcOqW9MUIECsakQUSuORgJDYgpa63ltPEpsl4138w5p0e9LnbodseKldGhB/DsCEcuE+uqYPX2CkHipyHstLkkWICvJKY7DBIJhyGJ1xO6AuCcninW+J11VtbK2o4XQDWeOH0G53PFkIixT5k5NRyWEdfge5gg9LKMt2UyXQZsuTNgCodgKu27FAeyQk2di+gDSr80zNqalzpwk70zeR2fKfLnHyqU2IVGstW8lejirMcrpPGzpaammKN+fp0UnbBrTO1ea1AktL7JD F+PIDB6G4OKKO1MtUaPrjKvqwbMfMqC1JTV00RKdNKu04NG1K7o8n7SMICKyV1hEA7pxfg==

**MARIA EUGENIA NUÑEZ VALDEZ** | Fecha:2020-09-10 12:55:09 | Firmante

EX2zUGZiMvRhwq4rzsFtWpRjOJgVu4X6+PumO2KQ2xi+QvFI5dLobjh7DzTF1MaHQ4UBwgA6g+IXkw3/9PkeCbF+uzlMg8sIPvImn5ck3ZguPBGubeqPzXopu9Q2K0zsDifLS5dRkCsMi395GKI2P3SdlKpkZkmtmbCY9CoTozQSpvzsbEzWRe10hyOaKYnL/OB78XSbyWBdMqIGmdaL+X0/y9Miq9ueYuhFs96OSKScw+lbfMT9sUWD8jYAFegXOSdUm70jkhql+X5kCkbH/XupevJk40esDfauZsB00JFnLUYOAt38NrLbh8vrdrVwWgjeqOwqZhrpwkUgS5zw==

**CINTHIA ERNESTINA NUÑEZ LOPEZ** | Fecha:2020-09-10 17:34:19 | Firmante

CkX+tHT0Uytwin5IGWuDY07BRKgh9NF8TyAEUatD5Qf1rthOVPILEJBkQ35G7Fy7i6yzbhOrFv9i44HHwDMnswQXZ8eTUzH3sf0/TUwxu4HbsMrodO08wSTF0/kMRybTut2t3VLoiKi2oDjP1KI8Z+5NnZz3CBV+tKKCLuTpnM4KntNiflegaY9iOfP/yDaJN8WEeGzKIBE9SdAJtYPRWje6N8DtfjCbzrkn8Zcde/Pnnm7Xt9zQZZWg61GzQ9500pilZB68s8VCJMThGmx8ZXwnGgCxb0Rc+Wv0u7P4BOSYqjWCSRZ2ieVeMUyVZB6VltqfNYNcSOMnr9DlwiGyg==

**ARMANDO HERNANDEZ MENDOZA** | Fecha:2020-09-18 12:11:26 | Firmante

iIP9Q1e9Ooc4CHE7A21e4iS0r5cLJFMhZJp/8ZiD7BngD2S9ed0CVgji2voW0ya2wrwXm1TtlnHfG7U05CRYAUPFF8w+2RZiWRL4L3PB0252Qy6hsgj53LBxdKCASKqa98I5FWxl6bNJ0poJQX1dhs6pySi2RgJccDIRvS9LMq04RtUr4Y8wGWx7EIZXHkDacruPDOFt8uLsec5OIUOkEQckPEXQFeV550kObCV+mDyV2XLznZeq6r5lg5F3deyEc1g2zjGLkKpGs651DXLkT+cYefgBp7sC2e8xJ2gdwvhRiAZ++nv7VzFMVC3XYKgtwOZ6ownJ80nt3EJu/fQSZNg==

**DANIEL GENARO SEGURA GONZALEZ** | Fecha:2020-11-03 17:16:00 | Firmante

Q0UjmvYt1Niv1OKkhxAxdZ0CoecQjMPYHyeLmgQqLFZnSAKNU+c7K0L2WRhRKq6jITS9LflzIE+FyR+mTCYont2mrY6KbFSEB4TosPziUng0UjyjcBwi6mM1YcXYI3tYUYiM/wDntn+T8d65oty6Rmp4H0Vi7thgWJx+gMMn30EPvxqsODxaKCJOxx3p/dhF0ZdwEugojVfD5zQNP+bCjVasGSsrnLCnK7UjEI30zk4zaJyBcTLMHpuKbUOJdEQZNIIfhF6Cn/Y5wYmf/EvAsh1vksRKXFebwkmLzBeiba+MEymqWbtLIVH6jBm8ktZtCgy+VCBRLk8u9ykGyZeow==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



GLNcJP

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/UJzm2mAgI1CYbdivalzzxW40Wur7XQ4>



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

El comité tutorial estuvo integrado por

Dra. Carmen Nina Pastor Colon

Presidente

Dra. María Eugenia Núñez Valdez

Secretario

Cinthia Ernestina Núñez López

Vocal

Armando Hernández Mendoza

Suplente

Daniel Genaro Segura González

Suplente

El desarrollo de este trabajo fue financiado por un proyecto CONACyT (CB-240095) otorgado a la Dra. Cinthia E. Núñez López. Así mismo, para el desarrollo de esta tesis recibí financiamiento de una beca de Licenciatura por parte de CONACyT, la cual se utilizó para los gastos de mi manutención durante mi estancia en el laboratorio.

## Agradecimientos

A la Dra. Cinthia Núñez por su excelente labor como directora de tesis. Por la paciencia y todo el tiempo dedicado.

A Sol por enseñarme como trabajar en el laboratorio, por todos sus consejos para realizar los experimentos.

A mis padres por todo el apoyo que me han brindado.

## ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. El polihidroxibutirato (PHB) como una alternativa a los plásticos derivados del petróleo.....	1
1.2. Generalidades de <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	2
1.3. Producción de PHB en <i>A. vinelandii</i> .....	2
1.4. Regulación de la biosíntesis de PHB.....	4
1.5. Represión catabólica por carbono (CCR).....	6
1.5.1. Represión catabólica en <i>E. coli</i> .....	6
1.5.2. Represión catabólica en la familia <i>Pseudomonadaceae</i> .....	8
1.5.2.1. El caso de CCR en <i>A. vinelandii</i> .....	11
2. ANTECEDENTES .....	14
2.1. El sistema CbrA/CbrB es necesario en la producción de PHB.....	14
2.2. La región reguladora del operón <i>phbBAC</i> posee un sitio putativo CA.....	15
2.3. Condiciones de alta CCR inhiben la producción de PHB en <i>A. vinelandii</i> .....	16
3. JUSTIFICACIÓN .....	18
4. HIPÓTESIS .....	18
5. OBJETIVOS.....	18
5.1. Objetivo general.....	18
5.2. Objetivos particulares.....	18
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
6.1. Cepas y plásmidos utilizados.....	19
6.2. Oligonucleótidos usados.....	19
6.3. Condiciones de cultivo.....	20
6.4. Preinóculos para las cinéticas de crecimiento.....	20
6.5. Preparación de células competentes de <i>A. vinelandii</i> .....	21
6.6. Transformación de <i>A. vinelandii</i> .....	21
6.7. Extracción de DNA cromosomal .....	21
6.8. Construcción de plásmidos.....	22
6.8.1 Construcción del plásmido pUMAgusA Tc PT pphbB.....	22
6.8.2 Construcción del plásmido pUMAgusA Tc T pphbB.....	22
6.8.3 construcción del plásmido pUMAgusA T pphbB.....	23
6.9. Cuantificación de proteína.....	24
6.10. Cuantificación de $\beta$ -glucuronidasa.....	24
7. RESULTADOS .....	26
7.1. Efecto de condiciones de alta y baja represión catabólica sobre la expresión de <i>phbB</i> .....	26
7.1.1 Comportamiento de la fusión transcripcional <i>PhbB-gusA</i> .....	26
7.1.2 Comportamiento de la fusión traduccional <i>PhbB-gusA</i> .....	27
7.2. Efecto de la cinasa histidínica sobre la expresión de <i>phbB</i> .....	29
8. DISCUSIÓN .....	32
9. CONCLUSIÓN .....	34
10. PERSPECTIVAS .....	35

11. REFERENCIAS .....36

# 1. Introducción

## 1.1 El polihidroxibutirato (PHB) como una alternativa a los plásticos derivados del petróleo

Los plásticos son materiales de bajo costo, resistentes, muy versátiles que son usados ampliamente para diversas aplicaciones. Gracias a ello la producción de estos materiales ha aumentado drásticamente en los últimos 60 años (Hopewell *et al.*, 2009). En la actualidad, la mayor parte de los plásticos son producidos a partir de polímeros derivados del petróleo, que tardan cientos de años en degradarse, causando una acumulación en el ambiente y por lo tanto un daño a los ecosistemas (Barnes *et al.*, 2009).

Una de las estrategias para tratar esta problemática es el uso de plásticos biodegradables, los cuales pueden ser producidos a partir de poli-hidroxialcanoatos (PHA's), una familia de polímeros de 3-hidroxiácidos (Anderson & Dawes, 1990) que tienen la estructura general presentada en la Fig. 1. Exhiben características termoplásticas, son biodegradables y tienen biocompatibilidad (Peña *et al.*, 2014) lo que los hace una alternativa a los plásticos derivados del petróleo. Los PHA's son producidos intracelularmente por algunas bacterias, como los son: *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Escherichia coli* recombinante y *Azotobacter* (Peña *et al.*, 2014).

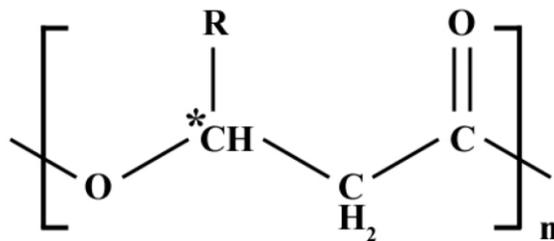


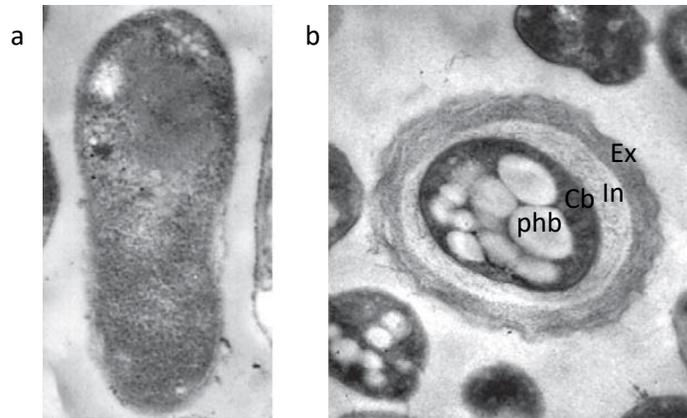
Figura 1. Estructura general de los PHA's (Tan *et al.*, 2014).

## 1.2 Generalidades de *Azotobacter vinelandii*

*A. vinelandii* es una bacteria de vida libre, Gram negativa perteneciente a la familia *Pseudomonaceae*, que se reproduce por fisión binaria. Presenta morfología pleomórfica, variando de bacilos hasta cocos, con tamaño de 1.6 a 2.5  $\mu\text{m}$  de diámetro y 3-5  $\mu\text{m}$  de longitud. Es poliploide, alcanzando a tener hasta 80 copias de su genoma y cuenta con motilidad gracias a que posee flagelos plerítricos. Es quimioorganotrófica, y puede utilizar diferentes sustratos como fuente de carbono, en los que se incluyen azúcares, alcoholes, sales inorgánicas y ácidos orgánicos (Kennedy *et al.*, 2005). Cuando se cultiva es cultivada en medio suplementado con acetato-glucosa, *A. vinelandii* presenta un crecimiento diaúxico, utilizando acetato como fuente de carbono preferida (Taucher *et al.*, 1990). *Azotobacter* es aerobia estricta, no obstante, posee la capacidad de fijar nitrógeno en presencia de oxígeno, ya que posee mecanismos de protección de la nitrogenasa.

*A. vinelandii* durante crecimiento vegetativo produce el polisacárido alginato, mientras que en fase estacionaria tardía o en condiciones poco favorables es capaz de sufrir un proceso de diferenciación, en el que se forman quistes resistentes a la desecación. Los quistes son formas metabólicamente inactivas, compuestas por una estructura ovalada, llamada cuerpo central, que contiene gránulos insolubles de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB), los cuales comprenden una reserva de carbono (Seguara *et al.*, 2014). Este cuerpo central está rodeado por una capsula compuesta de dos capas, la capa externa se llama exina y la capa interna es llamada intina (Fig. 2b). Las dos capas están compuestas por alginato, un exopolisacárido lineal que contribuye a la resistencia a la desecación. Debido a su capacidad de producir alginato y PHB, polímeros de interés industrial, *A. vinelandii* es objeto de estudio (Galindo *et al.*, 2007).

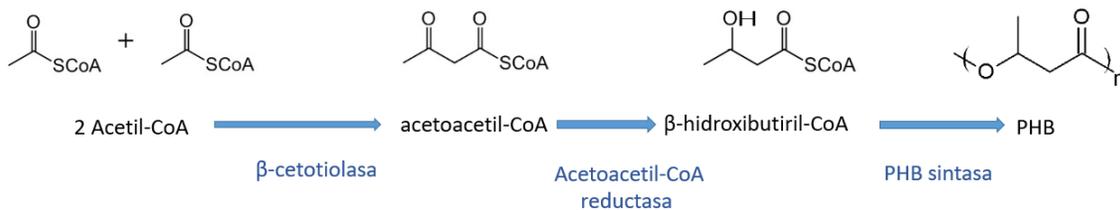
## 1.3 Producción de PHB en *A. vinelandii*



**Figura 2. Morfología de *A. vinelandii*.** (a) Célula de *A. vinelandii*, en estado vegetativo. (b) quiste maduro. Ex, exina, In, intina, Cb, cuerpo central, phb, poli-β-hidroxibutirato (Segura *et al.*, 2014).

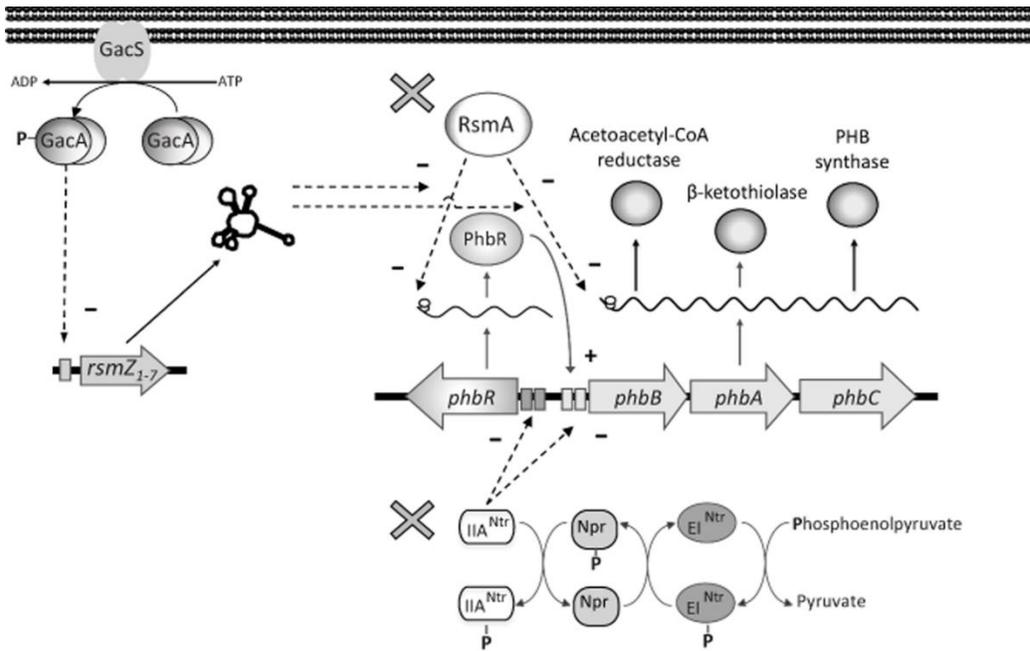
El polihidroxibutirato (PHB) es un polímero compuesto por monómeros de β-hidroxibutirato. Forma parte de la familia de los polihidroxialcanoatos (PHAs), los cuales son poliésteres producidos por una gran variedad de bacterias como reservas de carbono (Aldor & Keasling, 2003). Es semi-cristalino y sus propiedades termoplásticas dependen de su masa molecular. Puede ser obtenido con un amplio rango de masa molecular, variando de 200 a 20 000 KDa (Peña *et al.*, 2014).

El PHB se acumula como gránulos insolubles en el citoplasma de las células durante la fase estacionaria del crecimiento vegetativo de *A. vinelandii* (Fig. 2), y en el cuerpo central de los quistes de esta bacteria (Segura *et al.*, 2003).



**Figura 3. Ruta de biosíntesis de PHB.** En azul se indican las enzimas y en negro los productos de cada reacción (modificado de Segura *et al.*, 2003).

La biosíntesis del PHB comienza con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA por la enzima  $\beta$ -cetotilasa, codificada por el gen *phbA*, para formar acetoacetyl-CoA. La acetoacetyl-CoA reductasa, codificada por el gen *phbB*, reduce al acetoacetyl-CoA a D- $\beta$ -hidroxibutiril-CoA usando NADPH, que posteriormente es polimerizado por la PHB sintasa, codificada por *phbC* (Segura *et al.*, 2003) (Fig. 3). Los genes *phbA*, *phbB* y *phbC* se encuentran organizados en el operón *phbBAC* (Fig. 4), y se transcriben a partir de los promotores pB1 y pB2. El regulador PhbR es necesario para la activación del pB1, mientras que pB2 es dependiente del factor sigma RpoS (Peralta-Gil *et al.*, 2002).



**Figura 4. Organización y regulación del génico del operón biosintético *phbBAC* de *A. vinelandii*** (Peña *et al.*, 2014).

#### 1.4 Regulación de la biosíntesis de PHB

La biosíntesis de PHB está controlada por una compleja red de regulación que involucra a varios sistemas, los cuales poseen un efecto a nivel transcripcional y post-transcripcional. Ríe arriba del operón biosintético de PHB, en dirección

contraria, se encuentra el gen *phbR* que codifica a la proteína PhbR, la cual es un activador transcripcional de su propio promotor (P<sub>phbR</sub>), así como del promotor PB1 del operón *phbBAC*. La transcripción de este operón biosintético también inicia a partir de otro promotor, PB2, el cual es dependiente del factor sigma de fase estacionaria RpoS (Hernandez-Eligio *et al.*, 2011).

A nivel post transcripcional nos encontramos al sistema de dos componentes GacS/GacA, GacS es un histidin quinasa y GacA es un regulador de respuesta. Este sistema activa la transcripción de una familia de ARN pequeños rsmZ-Y, los cuales son capaces de unirse a la proteína RsmA inhibiendo su actividad represora de la traducción. RsmA en *A. vinelandii* actúa como un regulador negativo de la sobre la estabilidad de los mRNA de *phbR* y *phbB*. Así pues, una mutante nula en RsmA produce altas cantidades de PHB con respecto a la cepa silvestre, debido al desbloqueo en la traducción de *phbR* y la activación del operon biosintético *phbBAC*, mientras que una cepa deficiente en GacA no es capaz de producir PHB dada la permanente represión de la traducción por RsmA (Hernandez-Eligio *et al.*, 2012).

Adicionalmente el sistema GacA/GacS regula la síntesis de PHB a través del controlar la expresión de factor sigma RpoS (Castañeda *et al.*, 2001), el cual es necesario para reconocer uno de los dos promotores del operón *phbBAC*

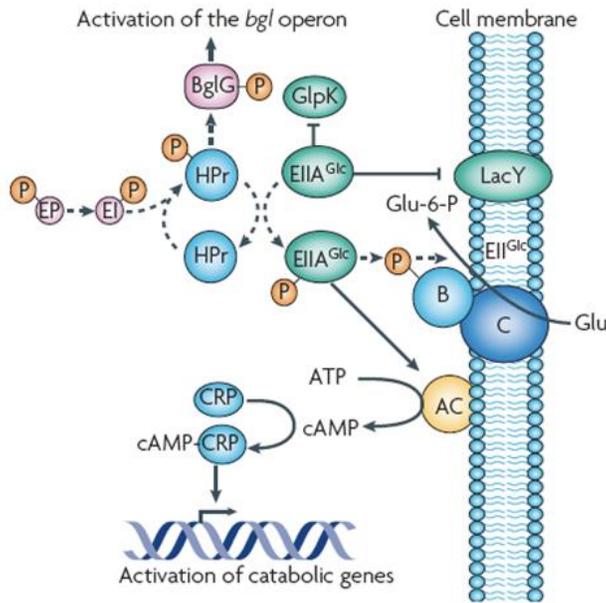
También encontramos al sistema de fosfotransferasa asociado a nitrógeno PTS<sup>Ntr</sup>, conformado por las proteínas EI<sup>Ntr</sup>, NPr y EIIA<sup>Ntr</sup>, codificadas por los genes *ptsP*, *ptsO* y *ptsN* respectivamente. Estas proteínas participan en una cascada de fosforilación; en primer lugar, la proteína EI<sup>Ntr</sup> se autofosforila a partir de fosfoenolpiruvato, fosforila a NPr y por último ésta fosforila a EIIA<sup>Ntr</sup>. EIIA<sup>Ntr</sup> en su forma no fosforilada inhibe la producción de PHB debido a que reprime indirectamente la expresión de genes asociados a la síntesis de PHB: *phbR* y *phbBAC*, esto es debido a que EIIA<sup>Ntr</sup> en su forma no fosforilada induce la degradación del factor sigma RpoS necesario para la activación transcripcional de estos genes (Muriel-Millán *et al.*, 2015).

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

Las bacterias son microorganismos muy versátiles, que pueden modificar su metabolismo para usar diferentes fuentes de carbono como fuente de energía. Gracias a ello pueden vivir y adaptarse a diferentes condiciones ambientales (Rojo, 2010). La represión catabólica por carbono (CCR, por sus siglas en inglés) es un mecanismo de regulación que permite la utilización selectiva de fuentes de carbono que se tienen disponibles, en la cual la presencia en el medio de una fuente preferida de carbono impide la asimilación de fuentes de carbono secundarias (Görke & Stülke, 2008). Este mecanismo presenta diferencias entre los distintos tipos de bacterias debido a las diferencias propias de su metabolismo y el hábitat de cada grupo de bacterias.

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

El fenómeno de represión catabólica ha sido estudiado principalmente en la bacteria modelo *E. coli*, la cual tiene como fuente de carbono preferida a la glucosa; en condiciones en las que están presentes varias fuentes de carbono, entre ellas la glucosa, primero será metabolizada la glucosa. Esto es debido a que los genes para el metabolismo de fuentes secundarias de carbono no se expresan. La CCR es controlada por el sistema de fosfotransferencia (PTS) y el AMPc-CRP, por lo tanto, son los encargados de la jerarquización de la asimilación de fuentes de carbono en *E.coli* (Görke & Stülke, 2008).



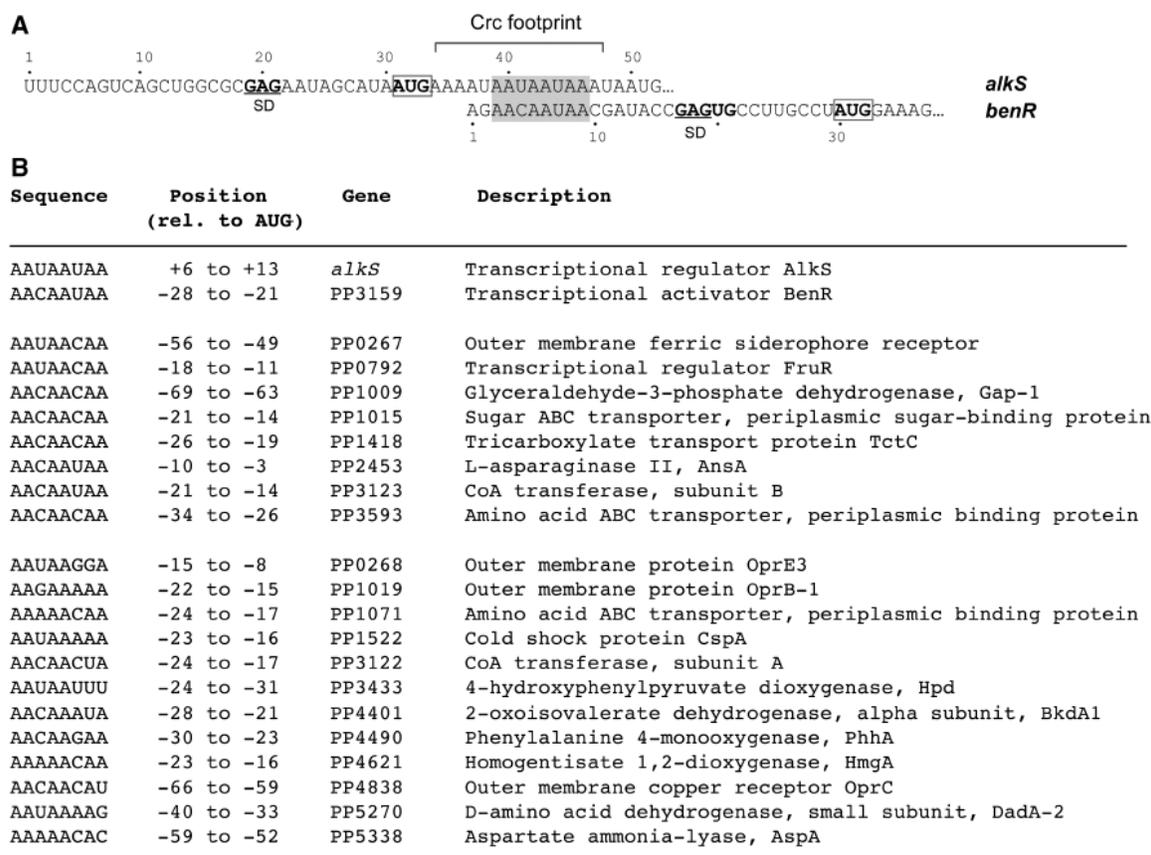
**Figura 5. Esquema del proceso de represión catabólica por carbono en *E. coli*.** En esta bacteria la enzima *EIIA<sup>Glc</sup>* juega un rol importante; cuando la glucosa se agota se encuentra en su estado fosforilado. En esta condición activa a la AC que lleva a la síntesis de cAMP que activa a la proteína CRP (Görke & Stülke, 2008).

La glucosa puede ser transportada al interior de la célula por el sistema PTS, que la transporta a través de la membrana citoplasmática y la fosforila al mismo tiempo. Este sistema está compuesto por varias enzimas que llevan a cabo la transferencia del grupo fosfato del fosfoenolpiruvato (PEP) a la glucosa. La última enzima que participa en este proceso de fosfotransferencia es *EIIA<sup>Glc</sup>*, la cual fosforila a la glucosa. Por lo tanto, en presencia de glucosa *EIIA<sup>Glc</sup>* se encuentra en un estado no fosforilado debido a que el grupo fosforilo es transferido a la glucosa formando así glucosa-6-fosfato (Fig. 5). En esta condición *EIIA<sup>Glc</sup>* se une e inhibe a transportadores de fuentes de carbono secundarias, impidiendo su transporte al interior de la célula. Por el contrario, cuando la concentración de glucosa es baja o nula *EIIA<sup>Glc</sup>* se encuentra en su estado fosforilado, y se libera la inhibición de transportadores para fuentes secundarias de carbono. Además, *EIIA<sup>Glc</sup>* no fosforilado interacciona y activa a la adenilato ciclasa, que conlleva a la producción de AMPc; el AMPc se une a CRP que activa la transcripción de genes para el metabolismo de fuentes de carbono no preferidas (Fig. 5).

### **1.5.2 Represión catabólica en la familia *Pseudomonadaceae***

Bacterias de esta familia (como *Azotobacter* y *Pseudomonas*) habitan en ambientes muy diversos, por lo que las fuentes de carbono que tienen disponibles son diferentes con respecto a *Enterobacterias* como *E. coli*. En la jerarquización de sus fuentes de carbono utilizadas tenemos que prefieren a los ácidos orgánicos y a los aminoácidos antes que carbohidratos como la glucosa (Rojo, 2010).

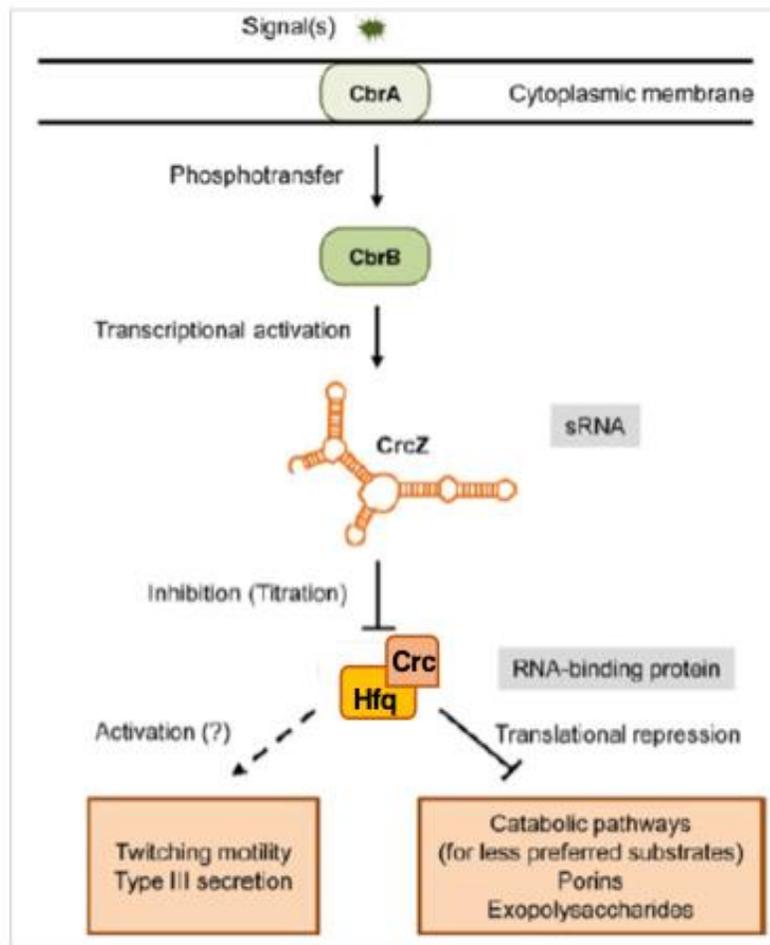
El mecanismo de represión metabólica por carbono en estas bacterias es principalmente a nivel traduccional. En este proceso participan la proteína de control de la represión catabólica (Crc, por sus siglas en inglés), así como la chaperona de RNA Hfq. El complejo de Crc-Hfq controla la expresión de sus genes blanco a nivel post-transcripcional, impidiendo la traducción del mRNA blanco. Estas proteínas se unen a una región del mRNA rica en adeninas, llamada de actividad catabólica (CA), localizada cerca del inicio de la traducción. En este sistema la chaperona Hfq es la encargada del reconocimiento del sitio CA y Crc es responsable de estabilizar dicha unión (Moreno *et al.*, 2007)(Fig. 6).



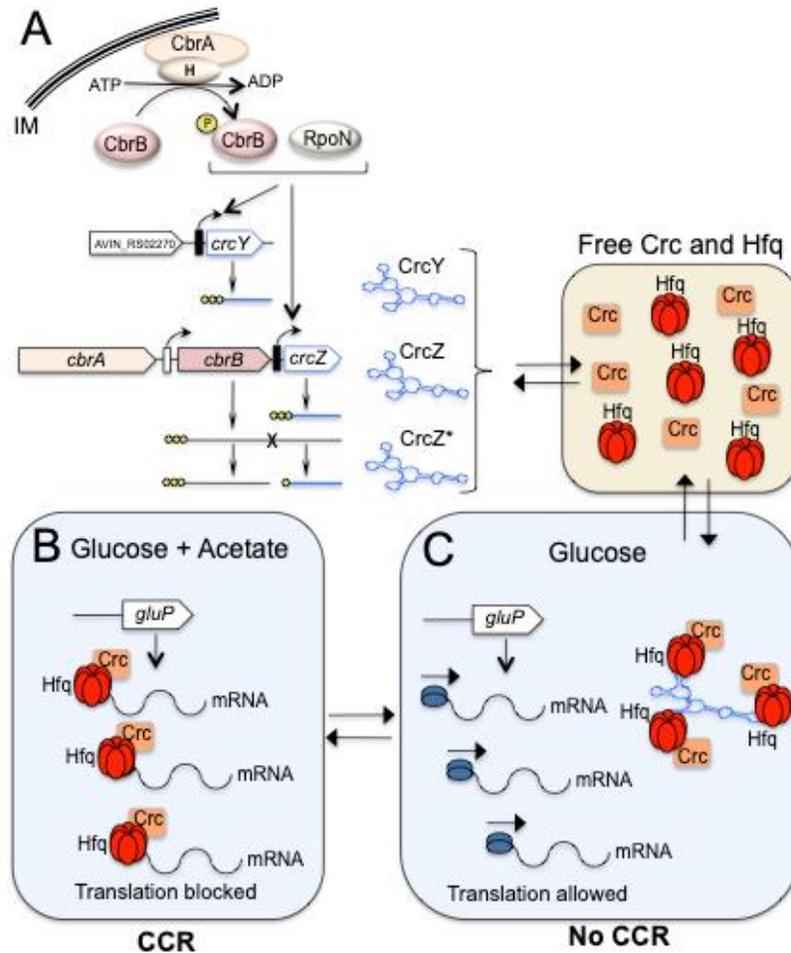
**Fig.6. El complejo Hfq-Crc reconoce secuencias ricas en adeninas cerca del sitio de inicio de la traducción.** A. En *P. putida* los mRNA de *alkS* y *benR*, que codifican activadores transcripcionales de la vía de degradación de alcanos y bencenos, respectivamente, son reconocidos por el complejo Hfq-Crc. B. Lista de potenciales sitios de reconocimiento de Hfq-Crc (primera columna) en mRNA de proteínas bajo el control de Crc, según un análisis proteómico (Moreno, Martínez-Gomariz, Yuste, Gil, & Rojo, 2009).

Hasta arriba de la cascada de señalización que controla el proceso de represión catabólica por carbono se encuentra un sistema de dos componentes (TCS, por sus siglas en inglés), constituido por una cinasa histidínica embebida en membrana interna, llamada CbrA y un regulador de respuesta, llamado CbrB, que una vez fosforilado por CbrA actúa como activador transcripcional (Fig. 7). En presencia de fuentes de carbono preferidas (como el acetato), Crc-Hfq impiden la traducción de mensajeros para el metabolismo de fuentes de carbono secundarias (como la glucosa). Pero cuando la fuente de carbono preferida se agota el sistema de dos componentes CbrA/CbrB se activa, promoviendo la transcripción de pequeños ARNs (sRNA) de la familia CrcZ-Y-X que cuentan con sitios CA que secuestran a

Crc-Hfq (Moreno *et al.*, 2009), permitiendo que los mensajeros de fuentes de carbono secundarias se traduzcan. La transcripción de los sRNAs de Crcz requiere del TCS CbrA/CbrB. De esta manera los sistemas CbrA/CbrB-CrcZ-Y y Crc-Hfq, en conjunto jerarquizan y reorganizan el metabolismo para la asimilación de fuentes de carbono (Quiroz-Rocha *et al* 2017; Martinez-Valenzuela *et al* 2018) (Fig. 7).



**Fig. 7. Los Sistemas CbrA/B y Hfq-Crc controlan el proceso de CCR en las especies de la familia *Pseudomonadaceae*.** Esquema del proceso en *P. aeruginosa*. Ante una señal que aún se desconoce, el sistema de dos componentes CbrA/B activa la expresión de sRNA CrcZ el cual secuestra a las proteínas Hfq-Crc permitiendo la traducción de mRNAs para el consumo de fuentes de carbono secundarias. En *P. aeruginosa* Crc también está implicado en otros procesos celulares (Modificado de Sonnleitner 2009).

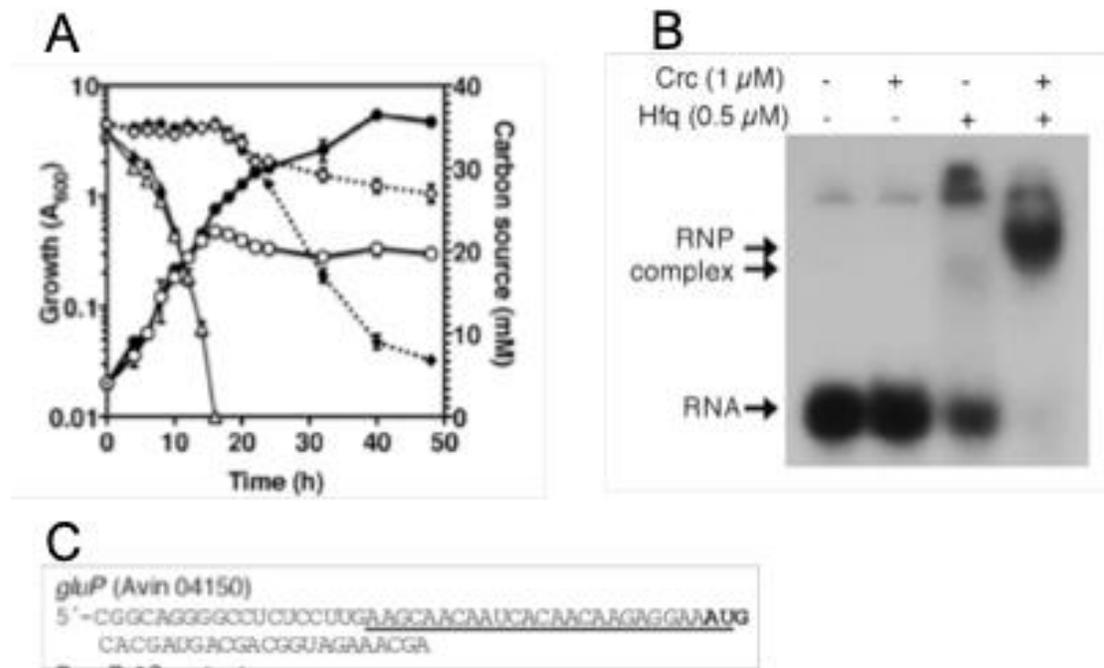


**Figura 8. Modelo del proceso de Represión catabólica por carbono en *A. vinelandii*.** En este modelo el sistema CbrA/CbrB detecta la naturaleza de las fuentes de carbono disponible (en preferidas (como acetato) y no preferidas (como glucosa)). En medio con ambas fuentes Crc y Hfq se unen a mRNA de *gluP* impidiendo su traducción, cuando el acetato se agota CbrA/CbrB activan la transcripción de CrcZ y CrcY secuestrando a Crc/Hfq, restaurando así la traducción de GluP. Hasta el momento se desconoce la naturaleza de la señal que detecta CbrA (Martínez-Valenzuela *et al.*, 2018).

### 1.5.2.1 El caso de CCR en *A. vinelandii*

El fenómeno de CCR se puede apreciar de manera clara en el crecimiento diáxico que presenta *A. vinelandii* en un medio que contiene acetato y glucosa como fuentes de carbono (Fig. 8A). En esas condiciones, primero es consumido el acetato y

cuando éste se agota es usada la glucosa. La inhibición de la asimilación de glucosa en presencia de acetato se debe a que el complejo Hfq-Crc reconoce el mRNA de *gluP*, que codifica para el transportador de glucosa (Fig. 8B y C). Una vez consumido el acetato, se activa el sistema de dos componentes CbrA/B; CbrB activa la transcripción de los sRNAs CrcZ y CrcY los cuales secuestran a Hfq-Crc permitiendo la asimilación de glucosa. Así pues, CbrA es necesaria para la asimilación de glucosa en crecimiento diaúxico pues se observa que la mutante *cbrA* una vez agotado el acetato es incapaz de crecer a expensas de la glucosa (Fig. 8A). Esto se explica porque en ausencia de CbrA no se expresan los sRNAs CrcZ y CrcY, por lo que Hfq-Crc bloquean permanentemente la traducción de *gluP* y enzimas para el metabolismo de glucosa como genes de la vía Entner-Doudoroff (Fig. 8B) (Quiroz-Rocha, 2017). El modelo de CR en el crecimiento diaúxico acetato-glucosa se presenta en la Fig. 9.



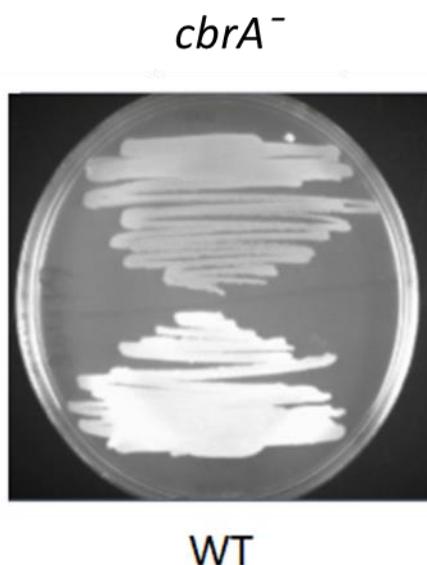
**Figura 9. El transportador de glucosa GluP es blanco de regulación de las proteínas Hfq-Crc durante el crecimiento diaúxico acetato-glucosa en *A. vinelandii*.** A, Crecimiento diaúxico de la cepa silvestre (símbolos blancos) de *A. vinelandii* y su derivada *cbrA*<sup>-</sup> (símbolos negros) en medio Burk's suplementado con acetato y glucosa como fuentes de carbono. Se representa el crecimiento celular con base al contenido de proteína (círculos), así como el consumo de acetato (triángulos) o glucosa (rombos). B, Las proteínas

Crc y Hfq reconocen el líder de *gluP*. Se indica la migración del complejo ribonucleoproteico (RNP complex). C, secuencia del líder de mRNA de *gluP*. El sitio de inicio de la traducción se encuentra en negritas (AUG); el sitio de unión de Hfq-Crc se encuentra subrayado (Quiroz-Rocha *et al.*, 20117).

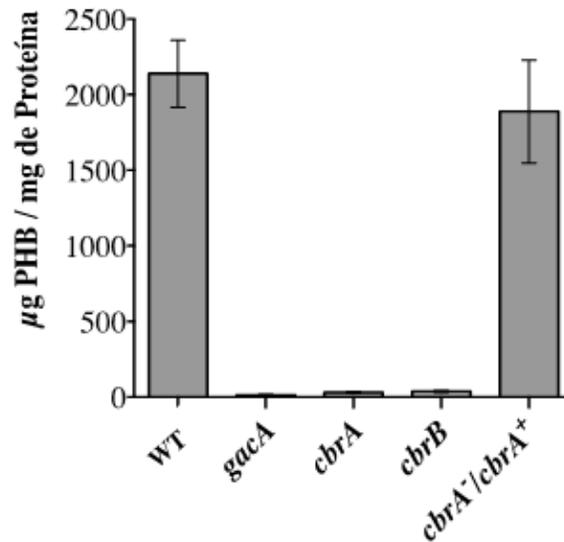
## 2. Antecedentes

### 2.1 El sistema CbrA/CbrB es necesario en la producción de PHB

En un trabajo anterior en nuestro laboratorio se observó que la mutante nula en *CbrA* fue incapaz de producir PHB. En placas de medio rico PY-sacarosa la cepa silvestre muestra un crecimiento blanquecino por la presencia de gránulos de PHB. En contraste, el crecimiento de la mutante *cbrA* es transparente, sugiriendo la ausencia de PHB (Quiroz-Rocha 2017) (Fig.10). Lo anterior fue comprobado al cuantificar la presencia de PHB en medio líquido; se observa que las mutantes *cbrA* y *cbrB* son incapaces de producir PHB, y al complementar la mutante *cbrA* la producción de PHB se restablece (Fig. 11). Esto nos indica el TCS CbrA/B es necesario para la síntesis de PHB pues la producción de este polímero está sujeta a represión catabólica por carbono.



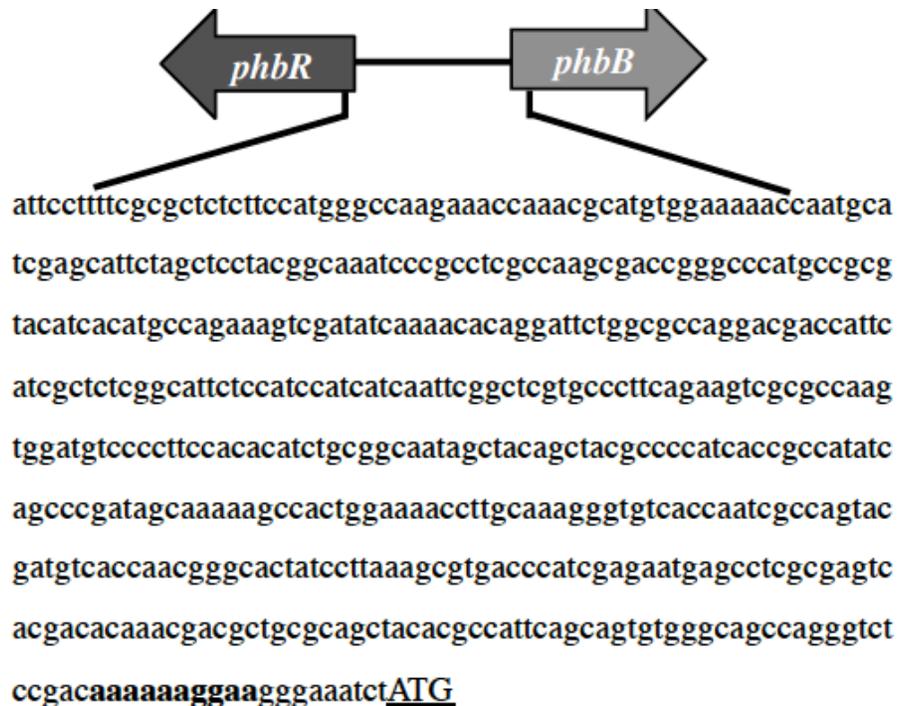
**Figura 10.** Producción de PHB en la cepa silvestre de *A. vinelandii* (WT) y en su derivada mutante *cbrA*<sup>-</sup>, crecidas en medio PY-sacarosa 20%(Quiroz-Rocha, 2017)



**Figura 11. El Sistema de dos componentes CbrA/CbrB es necesario para la producción de PHB.** La cepa silvestre (wt) y sus derivadas *gacA*, *cbrA*, *cbrB* y la mutante *cbrA* complementada (*cbrA/cbrA+*) se crecieron en medio líquido Burk's-sacarosa por 48 h. Las células se colectaron y se cuantificó el contenido de PHB (Quiroz-Rocha 2017).

## 2.2 La región reguladora del operón *phbBAC* posee un sitio putativo CA

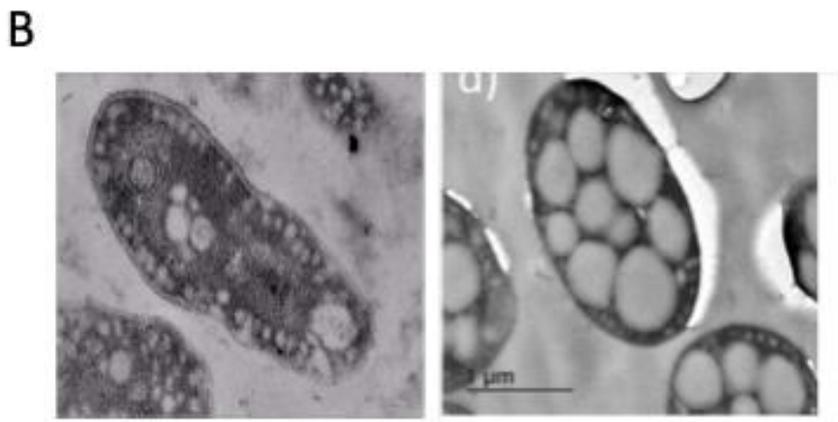
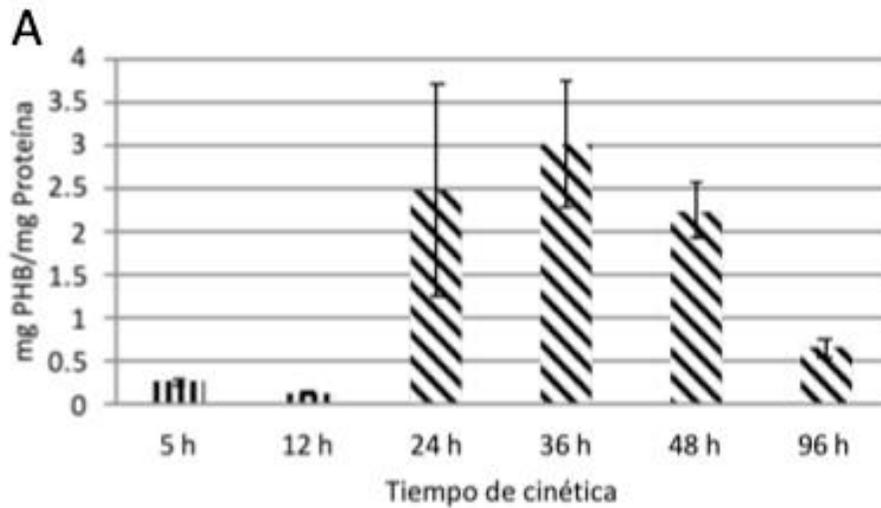
El análisis de la región reguladora de *phbBAC* nos permitió identificar un posible sitio de reconocimiento de las proteínas Hfq-Crc, 9 nt río arriba del sitio de inicio de la traducción y precediendo la secuencia Shine-Dalgarno de *phbB* (Fig. 12). Este dato nos sugiere fuertemente que la traducción del mRNA de *phbB* pudiera responder a las condiciones de CCR y explicaría la dependencia de la síntesis de PHB en el sistema CbrA/B.



**Figura 12. El gen *phbB* posee un posible sitio de reconocimiento de Crc/Hfq.** En letras oscuras podemos apreciar un sitio rico en adeninas precediendo el sitio de inicio de la traducción (ATG) de *phbB* (Quiroz-Rocha *et al.*, 2017).

### 2.3 Condiciones de alta CCR inhiben la producción de PHB en *A. vinelandii*

En un trabajo paralelo en nuestro laboratorio, se logró establecer que, efectivamente, la producción de PHB responde a las condiciones de fuerte o baja represión catabólica. En un análisis de cuantificación de los niveles de PHB durante el crecimiento diaúxico acetato-glucosa se observó que la acumulación de PHB es mínima durante el crecimiento en acetato (fuerte represión catabólica), pero que durante el crecimiento en glucosa la acumulación de PHB se incrementó a razón de 6 veces (Fig. 13A). Además, la visualización por micrografías electrónicas de células de *A. vinelandii* confirmaron que los niveles intracelulares de PHB son mucho más elevados durante el consumo de glucosa (Fig. 13B) (Barrios-Rafael 2019).



**Fig. 13. La acumulación de PHB se favorece en condiciones de baja CCR. A.** Cinética de acumulación de PHB en la cepa silvestre en medio mínimo Burk's suplementado con acetato-glucosa (30 mM de cada uno) como fuentes de carbono. En estas condiciones, el consumo de acetato termina a las 12h (período de fuerte represión catabólica) y es simultáneo al inicio del consumo de la glucosa (período de baja represión catabólica). **B.** Micrografías electrónicas de células de *A. vinelandii* crecidas en medio diáuxico a expensas de acetato (12 h; izquierda) o glucosa (derecha; 48h) (Barrios Rafael 2019).

### **3. Justificación**

En la actualidad nos enfrentamos a un problema causado por la contaminación de plásticos derivados del petróleo; una de las estrategias que pudieran ayudar a sustituir su uso es la utilización de plásticos que sean biodegradables, como el PHB.

Por ello, el estudio del sistema CbrA/B-Crc-Hfq, que jerarquiza la utilización de fuentes de carbono en la biosíntesis de PHB, abriría nuevas oportunidades para la optimización de la producción de este biopolímero.

### **4. Hipótesis**

La expresión del operón *phbBAC* responde a las condiciones de Represión catabólica por carbono pues es blanco de regulación de las proteínas Crc-Hfq; por tal razón el sistema de dos componentes *CbrA/B* se requiere para la expresión de *phbBAC* y por lo tanto la producción de PHB.

### **5. Objetivos**

#### **5.1 Objetivo general**

Establecer el efecto de distintos grados de represión catabólica por carbono y del sistema de dos componentes CbrA/CbrB sobre la expresión del operón biosintético de PHB *phbBAC*.

#### **5.2 Objetivos particulares**

- Determinar los niveles de transcripción y traducción del promotor *phbBAC* en condiciones de alta (acetato) o baja (glucosa) represión catabólica, mediante fusiones transcripcionales y traduccionales con el gen reportero *gusA*.
- Determinar el efecto de CbrA sobre la expresión del operón *phbBAC*.

## 6. Materiales y Métodos

### 6.1 Cepas y plásmidos utilizados

Nombre	Características	Referencia
AEIV	Cepa silvestre de <i>A. vinelandii</i> .	(Larsen & Haug, 1971)
GG15	Derivada de AEIV, obtenida por mutagénesis al azar con miniTn5, <i>cbrA::miniTn5</i> , Sp.	(Quiroz-Rocha, 2017)
E. coli Top10		
pUMAgusA Tc PT	Vector con el gen <i>gusA</i> para fusiones post transcripcionales, T <sup>c</sup>	(Quiroz-Rocha, 2017)
pUMAgusA Tc T	Vector con el gen <i>gusA</i> para fusiones transcripcionales, T <sup>c</sup>	(Muriel-Millán, 2015)
pJETphbB	Vector con la región reguladora de <i>phbB</i>	Este trabajo
pAHFUedTd-B	Vector con la región promotora de <i>phbB</i> y <i>gusA</i>	(Hernández-Elegio, 2016)
pUMAgusABTs	Porta la región reguladora de <i>phbB</i>	Este trabajo
pUMAgusABTd	Porta la región reguladora de <i>phbB</i>	Este trabajo

### 6.2 Oligonucleótidos usados

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')
FusB_Tr_R1	GAA TTC GAT TGC TCA TAG ATT TCC CTT CC
FusB_Fw_Xba	TCT AGA GAG CCG TGC ATA ATT CAC ACT G
TransFusBFw	ATCGAATTCCCCATCACCGCCATATCA
TradFusBRev	ATCCTGCAGTTGATGGCTCATAGATTT

### 6.3 Condiciones de cultivo

Los cepas de *A. vinelandii* se crecieron en medio Burk-Sacarosa (BS), que está compuesto por: 0.16 g/l  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , 0.002 g/l  $NaMO_4 \cdot 2H_2O$ , 0.005g/l  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ , 0.073 g/l  $CaCl_2$ , 0.183 g/l  $Na_2SO_4$ , Buffer fosfatos (0.8 g/l  $K_2HPO_4$ , 0.2 g/l  $KH_2PO_4$ ), 20 g/l Sacarosa. El medio Burk glucosa (BG) contiene como fuente de carbono 5.4g/l de glucosa (30 mM), el medio Burk acetato (BA) 2.4g/l de acetato de sodio (30 mM) y el medio Burk glucosa-acetato (BGA) contiene 5.4g/l de glucosa y 2.4g/l de acetato de sodio.

El medio sólido se preparó agregando agar 1.5%, esterilizado junto con el agua. Todas las soluciones fueron esterilizadas a 120 °C por 20 min, a excepción de la glucosa y el  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  que se esterilizó por filtración usando una membrana de 0.45  $\mu m$ .

El medio solido se incubó por 48h a 30°C. Mientras que el medio liquido se incubó con agitación constante de 200 rpm a 30°C

El medio de competencia para *A. vinelandii* (CM) utiliza las sales mismas sales del BS, a excepción de  $NaMO_4 \cdot 2H_2O$  y  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ .

Las cepas de *E. coli* se crecieron a 37°C en medio Luria Bertani (LB), el cual está compuesto por 10 g/l peptona de caseína, 5 g/l extracto de levadura, 10 NaCl.

Las concentraciones de antibiótico usadas para las cepas de *A. vinelandii* fueron: espectinomicina 100  $\mu g/ml$ , tetraciclina 40  $\mu g/ml$ . Para la cepa de *E. coli* se usó tetraciclina 10  $\mu g/ml$ .

### 6.4 Preinóculos para las cinéticas de crecimiento

Los preinóculos para la cinética en BS y BG se prepararon tomando una asada de la colonia proveniente de una caja de 48 h en 25 ml de medio BS líquido en un matraz de 125 ml, el cual fue incubado durante 18 h en agitación a 200 rpm. Después se cuantificó proteína por el método de Lowry para utilizar 400  $\mu g/ml$  de células en cada uno de los cultivos iniciales.

Los preinóculos para las cinéticas en BA y BGA se realizaron tomando una asada de la colonia procedente de una caja de 48 h a 25 ml de BA líquido en un matraz de 125 ml, que fue incubado durante 12 h en agitación a 200 rpm. Posteriormente se cuantificó proteína por el método de Lowry para poner 200  $\mu$ l de células en los cultivos iniciales.

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

Las células de *A. vinelandii* se hicieron competentes. Para ello primero se cultivó la cepa en medio CM a 30°C por 48 h, después se les dió un segundo pase en CM a 30°C durante 15 h, enseguida se recogió el tapete celular con una espátula estéril y se lavaron con MgSO<sub>4</sub> 10 mM hasta remover el alginato. La pastilla recuperada finalmente fue resuspendida en 200  $\mu$ l de CM 16 mM de MgSO<sub>4</sub>.

### **6.6 Transformación de *A. vinelandii***

Se transformaron 100  $\mu$ l de células competentes de *A. vinelandii* con 5  $\mu$ g del plásmido linearizado o DNA cromosomal; para ello ambos se mezclaron en un tubo eppendorff estéril, luego se plaqueó esta mezcla en CM sólido en una superficie aproximada de 2 cm<sup>2</sup> y se incubó durante 24 h. Se recuperó el tapete celular y se lavó con MgSO<sub>4</sub>, se resuspendió en 500  $\mu$ l y por último se platearon 100  $\mu$ l en el medio de selección. Esta caja se incubó en las condiciones antes mencionadas.

### **6.7 Extracción de DNA cromosomal.**

Se cultivó *A. vinelandii* en 100 mL de medio BS por 48 h a 30° y 200 rpm. Posteriormente se centrifugó, el pellet se lavó con buffer TE 50/20, y se resuspendió en 450  $\mu$ L de buffer TE 50/20, se le agregaron 50  $\mu$ L de lisozima (10mg/mL) e incubó 30 min a 37°. Una vez transcurrido el tiempo se agregó 50  $\mu$ L de proteasa (10mg/mL) e incubó 30 minutos a 37° C. Posteriormente se le adicionaron 50  $\mu$ L de SDS 10%, se incubó 15 minutos a 37°, después se agregaron 100  $\mu$ L de NaCl 5M, se mezcló y se incubó durante 10 minutos a 65° C, luego se adicionaron 80  $\mu$ L de una solución de CTAB 10% NaCl 0.7 M, se incubó de 15-20 minutos a una temperatura de 65°C.

Para realizar la extracción se le agregó 1 volumen de una solución de Cloroformo-Isoamílico 24:1, se mezcló y se centrifugó a 13 000 rpm durante 5 minutos. La fase acuosa se transfirió a otro tubo y se realizó el proceso de extracción por dos veces más. Posteriormente se agregó .6 volúmenes de isopropanol, se centrifugó 5 min por 13000 rpm y se decantó el isopropanol. Finalmente se lavó con etanol al 70% tres veces. Se dejó secar por completo y se resuspendió en 30 µL de RNAsa (20µg/mL).

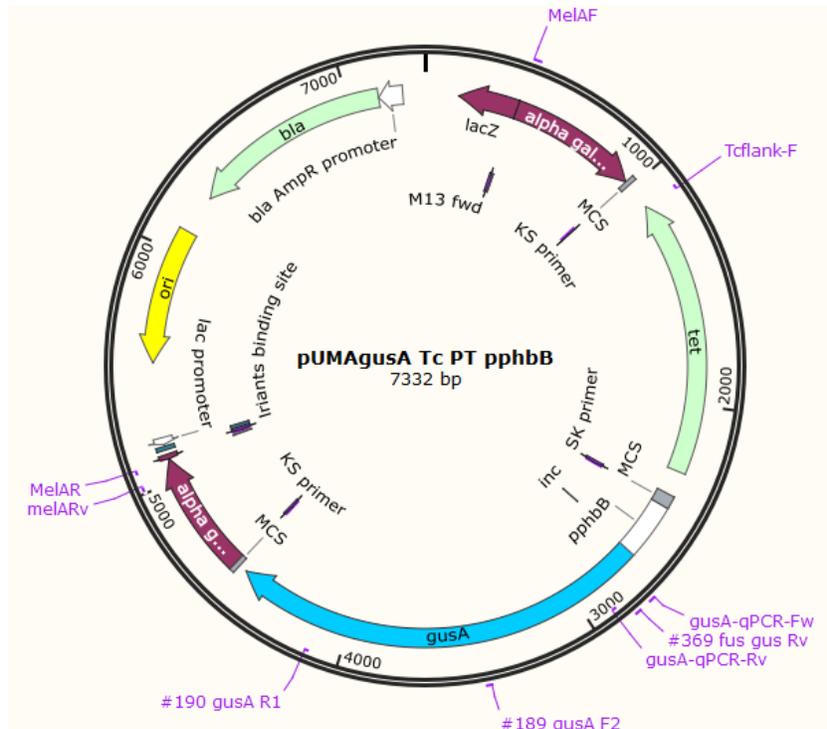
## **6.8 Construcción de plásmidos**

### **6.8.1 Construcción del plásmido pJETphbBT.**

Para la construcción de este plásmido primero se realizó un PCR del ADN cromosomal de la cepa AEIV con los oligonucleótidos FusBFw\_Xba y FusB\_Tr\_RI usando la enzima Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific), con los parámetros de acuerdo con el protocolo. Posteriormente este fragmento de 577pb se clonó en el vector pJET1.2 (Thermo scientific) siguiendo las indicaciones del fabricante.

### **6.8.2 Construcción del plásmido pUMAgusA Tc PT pphbB**

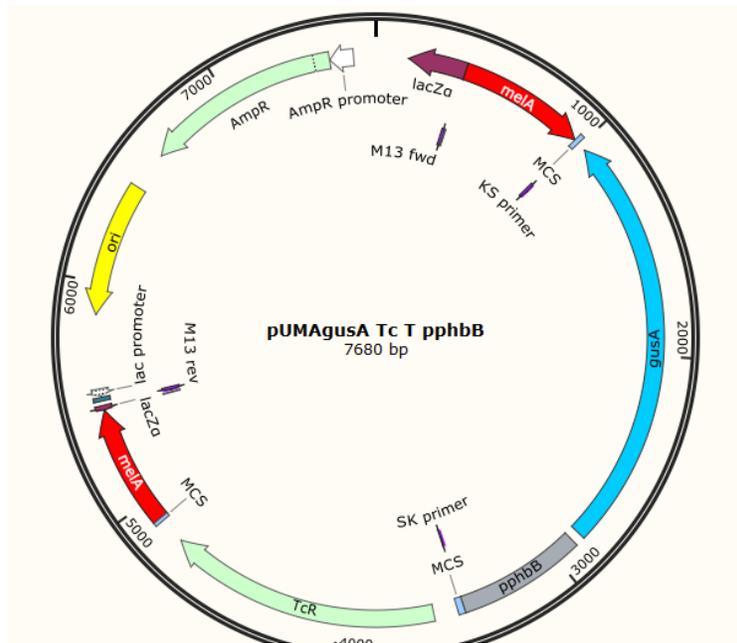
Para la construcción de este plásmido primero se digirió al plásmido pAHFUedTd-B con las enzimas EcoRI-HindIII, seguido de la purificación de la banda de 2101 pb, la cual se clonó en el plásmido pUMATc3'-5' previamente digerido con las mismas enzimas.



**Figura 14.** Mapa físico de plásmido pUMAgusAPTpphbB

### 6.8.3 Construcción del plásmido pUMAgusATpphbB.

Para la construcción de este plásmido primero fue digerido el plásmido pJET pphbB T con las enzimas de restricción XbaI-PstI, posteriormente se purificó la banda de phbB de 577 pb, la cual se insertó en el vector pUMAgusA Tc T previamente digerido con las mismas enzimas.



**Figura 15.** Mapa físico del plásmido pUMAgusA Tc T pphbB

### 6.9 Cuantificación de proteína por el método de Lowry

Se utilizaron las siguientes soluciones: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 2% en NaOH 0.1 N, tartrato de NA y K 2%, CuSO<sub>4</sub> 1 %. La solución reactiva se preparó con 49 ml de solución A, 0.5 ml de solución B y 0.5 ml de solución C.

La cuantificación de proteína se realizó por el método de Lowry (1951). Primero el paquete celular se lavó con MgSO<sub>4</sub> 10mM y se resuspendió en 1mL de MgSO<sub>4</sub>. A continuación se tomó 30 µl de esta muestra y se llevó a 200 µl, a éste se le agregó 1 ml de solución reactiva. Se dejó reposar durante 10 min y se le adicionaron 100 µl de folín diluido 1:1. Se dejó reposar por 30 min y se leyó la absorbancia a 625 nm. Al mismo tiempo se corrió una curva de calibración que contenía concentraciones de albumina de: 50, 100, 200 y 400 µg/ml.

### 6.10 Cuantificación de β-glucuronidasa

Se prepararon los siguientes reactivos: lisozima 10 mg/ml; p- nitrofenil - β - D- glucurónido (PNPG) 4mg/ml; Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.2 M; tritón X100 solución 10% V/V de tritón

en agua destilada;  $K_2HPO_4$  0.5 M,  $KH_2PO_4$  0.5 M, EDTA 0.25 M, DTT 0.25 M. El buffer Z se preparó con 3 ml de  $K_2HPO_4$  0.5M, 2 ml de  $KH_2PO_4$  0.5M, 0.21 ml de EDTA 0.25 M, 1 ml de DTT 0.25 M, llevando el volumen a 50 ml con agua destilada.

Para la cuantificación primero se resuspendió la pastilla celular de la muestra en 1 ml de  $MgSO_4$  10mM del cual se tomaron 20  $\mu$ l (Vol. Rx) y se le agregaron 710  $\mu$ l de buffer Z. Simultáneamente se preparó un blanco que contenía 730  $\mu$ l de buffer Z y se procesó junto a las demás muestras. Se les agregaron 10  $\mu$ l de solución de lisozima y se incubaron los tubos a 37°C durante 5 min. Terminando el tiempo de incubación se les agregaron 10  $\mu$ l de solución de tritón 10%. Los tubos se transfirieron a un baño de agua a 28°C y se les agregaron 100  $\mu$ l de la solución de PNPG y se cronometró en tiempo de la reacción por 10 min. Al pasar los 10 min se le agregaron 150  $\mu$ l de  $Na_2CO_3$  para detener la reacción. Por último, se leyó la absorbancia a 405 nm contra el blanco.

Para conocer la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa se hicieron los siguientes cálculos:

$$U \beta\text{-Gluc} = DO_{405} (1000) / [(0,018) (t \text{ Rx min}) (Vol \text{ Rx } \mu\text{l}) (\text{proteína } \mu\text{g /ml})]$$

## 7. Resultados

### 7.1 Efecto de condiciones de alta y baja represión catabólica sobre la expresión de *phbB*

Para lograr el primer Objetivo Particular, el cual es “Determinar los niveles de expresión del operón *phbBAC* en condiciones de alta (acetato) o baja (glucosa) represión catabólica”, construimos una cepa de *A. vinelandii* que porta en el cromosoma una fusión transcripcional o traduccional de la región reguladora del gen *phbB* con el gen reportero *gusA*. De esta manera, la expresión de *phbB* se estima de manera indirecta mediante la cuantificación de la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa.

#### 7.1.1 Comportamiento de la fusión transcripcional *PhbB-gusA*

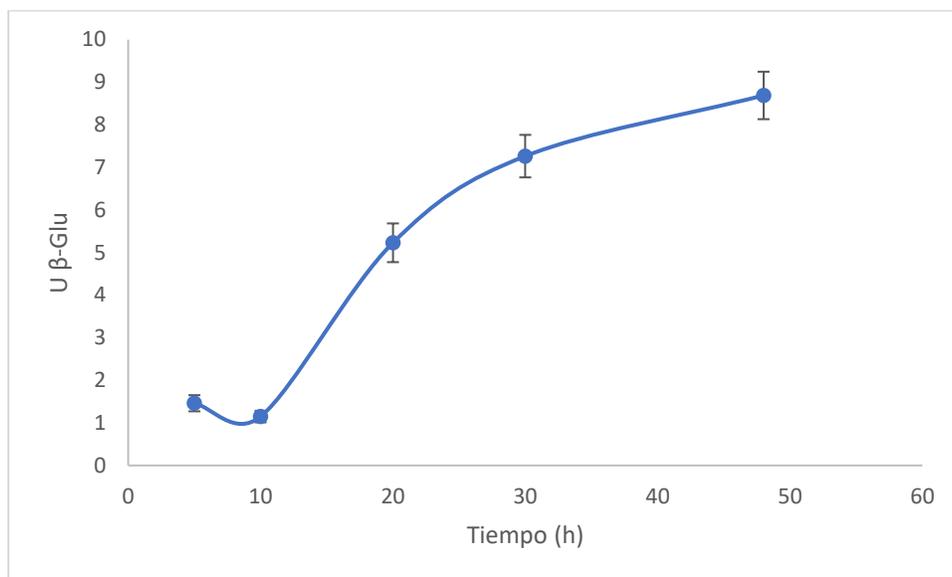
Para el caso de la fusión transcripcional, se utilizó el vector pJETphpB que contiene una región de 555 pb, que corresponde a la región reguladora de *phbB* (PphbB) y que contiene los dos promotores PB1 y PB2. Posteriormente, esta región reguladora se subclonó en el vector pUMAgusAPT, generando el plásmido pUMAgusABTs tal y como se describe en Materiales y Métodos. Este plásmido se utilizó para integrar en el *locus melA* del cromosoma de *A. vinelandii* la fusión transcripcional *PphbB-gusA*. La cepa resultante se nombró CG1BgusT.

Para evaluar el comportamiento de la fusión transcripcional en distintas condiciones de represión catabólica, se cultivó la cepa CG1BgusT en medio BGA, en el cual la cepa exhibe un crecimiento diaúxico. Como se recordará, antes de las 12 h el crecimiento ocurre a expensas de acetato, mientras que el consumo de glucosa ocurre después de este tiempo.

Como se puede apreciar en la Fig. 16, la transcripción de *phbB*, estimada de manera indirecta, al cuantificar los niveles de  $\beta$ -glucuronidasa, mostró niveles reducidos a las 5 y 10 h de cultivo (de aprox. 1 U), tiempo en el que se encuentra utilizando al acetato como fuente de carbono. Sin embargo, al terminar de consumir el acetato, después de las 12 h, podemos apreciar que existe un aumento en la transcripción de *phbB*, de 5 veces a las 20 h de cultivo, que coincide con el crecimiento a

expensas de la glucosa. Cabe hacer notar que la transcripción de *phbB* aumentó aún más en la etapa estacionaria, a las 30 y 48 h de cultivo.

Este resultado indica que la transcripción del operón *phbBAC* responde a los distintos niveles de represión catabólica, muy probablemente modificando la actividad de reguladores ya conocidos como RpoS o PhbR.



**Figura 16. Transcripción del promotor *phbBAC* en condiciones de alta y baja CCR.** Fusión transcripcional de *phbBAC* en la cepa silvestre AEIV en medio Burk adicionado con acetato 30 mM y glucosa 30mM a las 5, 10, 20, 30 y 48 h. Las barras de error representan la desviación estándar de resultados de 3 réplicas biológicas.

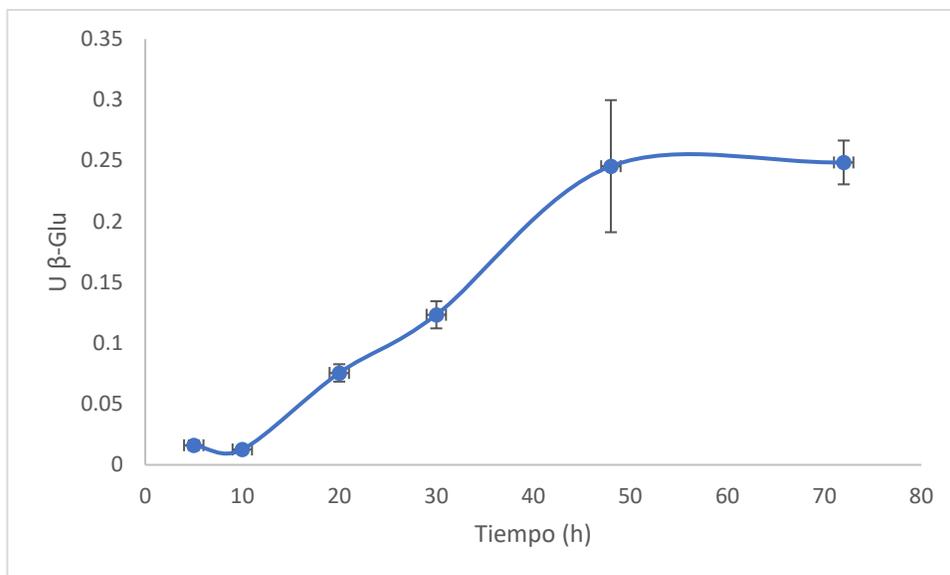
### 7.1.2 Comportamiento de la fusión traduccional *PhbB-gusA*

Para estudiar la cinética de traducción de *phbB* se construyó una derivada de la cepa AEIV que portara en su cromosoma una fusión traduccional de la región reguladora de *phbB* con el gen reportero *gusA* (*PphbB-gusA*). Para tal fin, se partió del plásmido pAHFUedTd-B, el cual porta un fragmento de 0.251 kb que contiene el promotor de *phbB*, su secuencia Shine-Dalgarno y los cuatro primeros codones de *phbB* en fusión traduccional con el gen *gusA* (Hernandez-Eligio 2016). Vale la pena aclarar que el plásmido pAHFUedTd-B fue diseñado para construir fusiones

traduccionales en el *locus* Avin12230 de la cepa de *A. vinelandii* UW136, pero no puede utilizarse en la cepa AEIV, ya que este *locus* está ausente en esta cepa. Por tal razón recurrimos al uso del plásmido pUMAgusA-PT el cual dirige las construcciones al *locus melA* de la cepa AEIV. La fusión traduccional *phbB-gusA'* del plásmido pAHFUedTd-B fue escindida con las enzimas *XbaI-PstI*, y subclonada en el vector pUMAgusA-PT generando el plásmido pUMAgusBTd. Este plásmido se utilizó para integrar la fusión traduccional *PphbB-gusA* en el de *A. vinelandii*, tal y como se describe en Materiales y Métodos. La cepa resultante se nombró CG1BgusPT.

Para evaluar el comportamiento de la fusión traduccional en distintas condiciones de represión catabólica, se cultivó la cepa CG1BgusT en medio BGA. Como se puede apreciar en la Fig. 17, la traducción de *phbB* también respondió a las distintas condiciones de represión catabólica. Durante la etapa inicial, a las 5 y 10 h, se observaron bajos niveles de traducción de *phbB*; posteriormente, a las 20 h de cultivo, es decir durante el consumo de glucosa aumentaron en 5 veces los niveles de traducción. En la fase estacionaria se observó un aumento sostenido que alcanzó niveles de hasta 20 veces con relación a la etapa inicial. Esto indica claramente que en condiciones de alta represión catabólica se inhibe la traducción de *phbB* y, por ende, de todo el operón biosintético de PHB; además, dicha traducción se desreprime en condiciones de baja represión catabólica y aún más en fase estacionaria.

Estos resultados sugieren que la traducción de *phbB* está bajo el control negativo de Hfq-Crc y que el sistema de dos componentes CbrA/CbrB es necesario para liberar dicha represión.



**Figura 17. traducción de *phbB* en condiciones de alta y baja CCR.** Fusión traduccional de *phbBAC* en la cepa silvestre AEIV en medio Burk adicionado con acetato 30 mM y glucosa mM a las 5, 10, 20, 30, 48 y 72 hrs. Las barras de error representan la desviación estándar de resultados de 3 réplicas. indicar la zona de alta y baja CCR

## 7.2 Efecto de la cinasa histidínica sobre la expresión de *phbB*

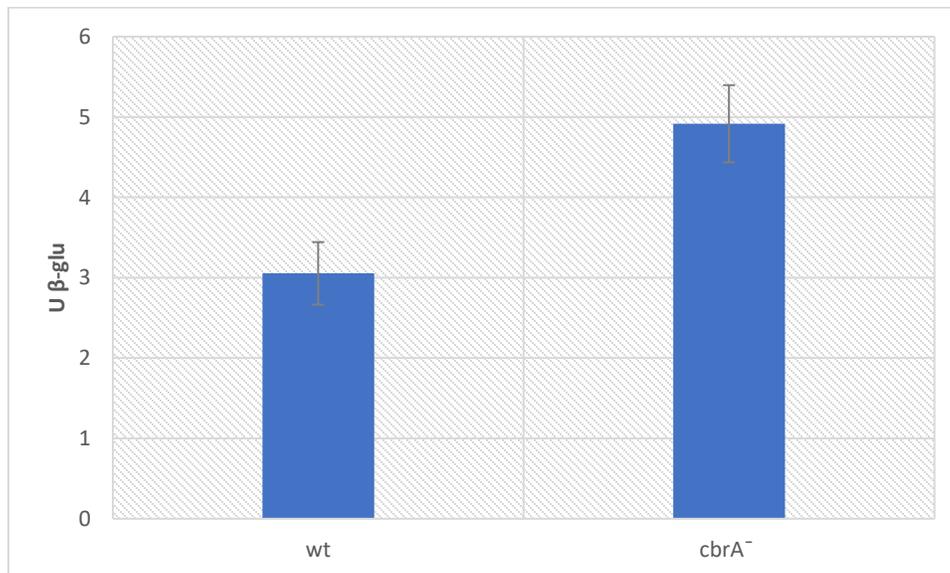
Con el fin de evaluar el efecto del sistema CbrA/CbrB sobre la expresión del operón *phbBAC*, construimos una cepa que porta la fusión transcripcional (*PphbB-gusA*) o traduccional (*PphbB-gusA'*) de la región reguladora de *phbB* (*PphbB*) con el gen reportero *gusA*, en el fondo de la mutante GG15 (*cbrA*-).

Para la fusión transcripcional se transformó la cepa CG1BgusT con ADN cromosomal de la cepa GG15, tal y como se indica en Materiales y Métodos; la cepa resultante se nombró CGGBgusT. Para la fusión traduccional se transformó la cepa CG1BgusPT con ADN cromosomal de la cepa GG15; la cepa resultante se nombró CGGBgusT.

Las cepas que carecen de CbrA no pueden utilizar glucosa como fuente de carbono pues no expresan los sRNAs CrcZ/Y necesarios para liberar la represión catabólica sobre esta fuente de carbono preferida. Sin embargo, sí son capaces de utilizar sacarosa, pues es una fuente de carbono que está sujeta a una débil represión

catabólica (Quiroz-Rocha 2017). Con la finalidad de evaluar el comportamiento de las fusiones transcripcional y traduccionales *PphbB-gusA* en el fondo de la mutante *cbrA* se cultivaron las cepas CGGBgusT y CGGBgusPT en medio mínimo Burk suplementado con sacarosa (BS).

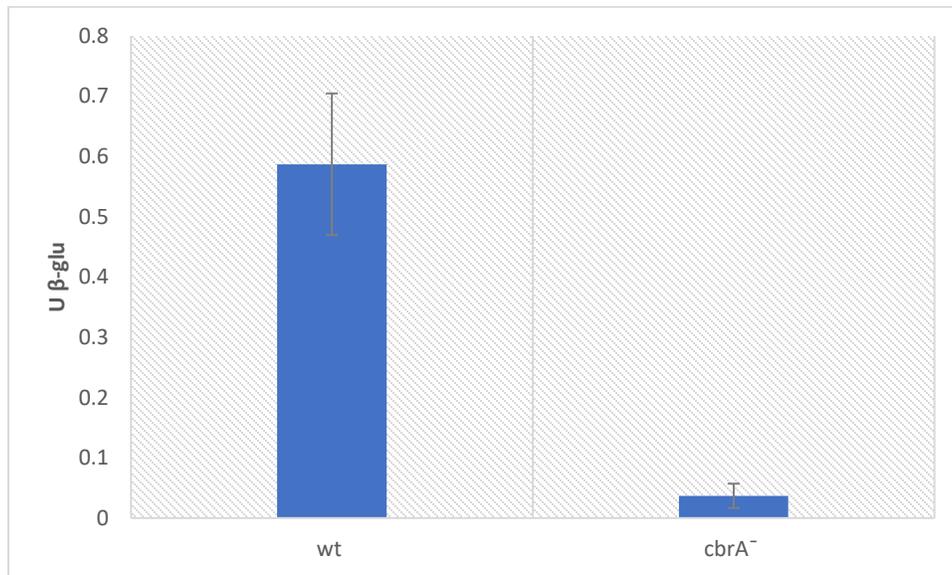
Como podemos observar en la Fig. 18, la transcripción de *phbB* no se redujo en ausencia de CbrA, muy al contrario, observamos un aumento de aprox. el 40%. Este resultado indica que este sistema de dos componentes no se necesita para transcribir a *phbBAC* y que pudiera existir un posible efecto negativo sobre su transcripción.



**Figura 18. Efecto de CbrA en la transcripción del promotor de *phbB*.** Las cepas CGB-gusT (wt) y CGGB-gusT (*cbrA*<sup>-</sup>) que portan la fusión transcripcional *PphbB-gusA*, se cultivaron en medio Burk-sacarosa por 48 h y se determinó la actividad de  $\beta$ -glucuronidasa. Las barras de error representan la desviación estándar de resultados de 3 réplicas biológicas.

Como se muestra en la Fig. 19, la traducción de *phbB* depende de CbrA, ya que en el fondo de la mutante *cbrA*<sup>-</sup> la actividad de la fusión traduccional *PphbB-gusA* se abatió con respecto a la cepa silvestre. Este resultado indica que en ausencia de CbrA la traducción del mRNA de *phbBAC* está bloqueada, y que CbrA se necesita para que los sRNAs CrcZ/Y se expresen y liberen la represión de Hfq-Crc sobre este mRNA. Sería importante realizar ensayos tipo EMSA con la región líder de

*phbB* y con las proteínas Hfq-Crc para comprobar que efectivamente estas proteínas sí reconocen y se unen a esta región.



**Figura 19. Efecto de CbrA en la traducción del promotor de *phbB*.** Las cepas CGB-gusPT (wt) y CGGB-gusPT (*cbrA*<sup>-</sup>) que portan la fusión traduccional *PphbB-gusA*, se cultivaron en medio Burk-sacarosa por 48 h y se determinó la actividad de β-glucuronidasa. Las barras de error representan la desviación estándar de resultados de 3 réplicas biológicas.

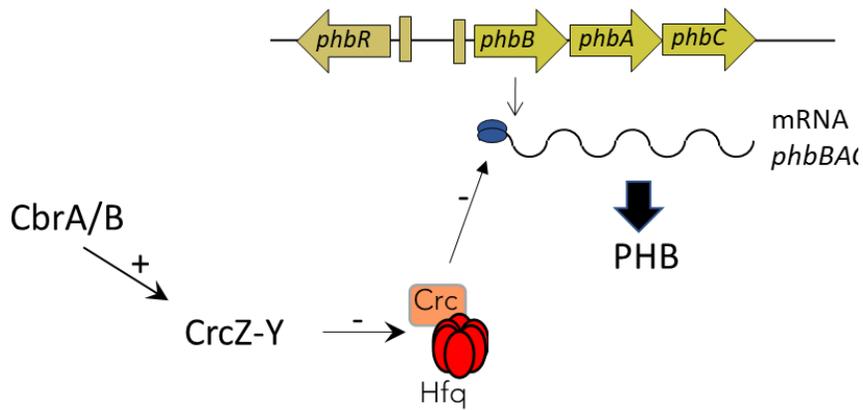
## 8. Discusión

En el presente trabajo investigamos el efecto de la CCR en la expresión del operón *phcBAC* en *A. vinelandii* cepa AEIV. Como se describió antes, una mutante en la histidina quinasa CbrA no es capaz de producir PHB en un medio de débil represión catabólica, Burk-sacarosa (Quiroz-Rocha 2017). Además de que se ha reportado que en *Pseudomonas* Crc-Hfq controlan la producción de PHA's al impedir la traducción de una PHA polimerasa (La Rosa *et al.*, 2014).

Los resultados indican que el fenómeno de CCR juega un papel importante en la expresión del operón biosintético de PHB, *phbBAC*. En condiciones de alta represión catabólica, existe una baja traducción y transcripción de *phbBAC*. Lo anterior explica por qué en crecimiento diaúxico, durante el consumo de acetato la producción de PHB es baja, mientras que en presencia de glucosa existe una mayor traducción y transcripción de *phbBAC*, lo que contribuye a una mayor producción de PHB.

A pesar de se ha descrito que la CRR en *A. vinelandii* actúa a nivel de la traducción. Observamos que la transcripción de *phbBAC* también se encuentra afectada en condiciones de alta represión catabólica, lo que nos sugiere que existe otra vía de regulación a nivel transcripcional.

En concordancia con el hecho de que la producción de PHB respondió a los distintos grados de CCR, también encontramos que el sistema CbrA/CbrB fue necesario para la traducción de *phbB* en medio Burk-sacarosa; en la mutante *cbrA*- la traducción de *phbB* se redujo 16 veces con respecto a la cepa silvestre, lo que explica porque una mutante CbrA es incapaz de acumular PHB. Este resultado sugiere fuertemente que en esta mutante existe una fuerte represión del mRNA de *phbBAC* por Hfq-Crc, pues sabemos que en esta mutante no se producen los sRNAs CrcZ y CrcY (Fig.20).



**Figura 20. Modelo propuesto de la regulación del TCS CbrA/CbrB sobre la producción de PHB en *A. vinelandii*.** En este modelo el ARNm de *phbBAC* es reconocido por Crc-Hfq que evita su traducción, cuando las células se encuentran en un estado de baja CCR. CbrA/CbrB activan la transcripción de CrcZ-CrcY para antagonizar la actividad de Crc-Hfq.

Este trabajo sugiere que la CRR tiene un efecto en la expresión y de *phbBAC* y por lo tanto la producción de PHB. Es necesario conocer cuál es la jerarquización de las fuentes de carbono en *Azotobacter*, cuales están sujetas a una baja CRR, donde se observó una mayor expresión de *phbB*. De esta forma se podría optimizar la producción de este polímero.

## 9. Conclusiones

1. La expresión de operón biosintético de PHB, *phbBAC*, responde a las condiciones de alta o baja represión catabólica.
2. En el crecimiento diaúxico acetato-glucosa, en condiciones de alta represión catabólica (en presencia de acetato) tanto la transcripción como la traducción del operón *phbBAC* se reprime, con respecto a condiciones de baja represión catabólica (en presencia de glucosa).
3. En el crecimiento diaúxico acetato-glucosa, los niveles de traducción del operón biosintético *phbBAC* se duplican durante la fase estacionaria (a partir de las 48 h).
4. El sistema CbrA/CbrB es necesario para la traducción del operón *phbBAC* en condiciones de baja represión catabólica.

## 10. Perspectivas

1. Investigar si el gen *phbR* está bajo el control del Sistema CbrA/CbrB-Hfq-Crc.
2. Determinar si el mRNA de *phbBAC* es blanco directo de regulación de Hfq-Crc, mediante ensayos tipo EMSA.
3. Investigar si otras fuentes de carbono preferidas (p- ej. Fumarato o malato) ejercen un efecto negativo sobre la traducción de *phbBAC*.
4. Investigar si el control de la traducción muestra un comportamiento similar en mezclas con otras fuentes de carbono al observado en la mezcla acetato-glucosa.

## 11. Bibliografía

- Aldor, I. S., & Keasling, J. D. (2003). Process design for microbial plastic factories: metabolic engineering of polyhydroxyalkanoates. [Review]. *Curr Opin Biotechnol*, 14(5), 475-483.
- Anderson, A. J., & Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol Rev*, 54(4), 450-472.
- Barnes, D. K., Galgani, F., Thompson, R. C., & Barlaz, M. (2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. [Review]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364(1526), 1985-1998. doi: 10.1098/rstb.2008.0205
- Barrios-Rafael, V. (2018). *Efecto de los distintos grados de represión catabólica por carbono en la producción de poli-β-hidroxibutirato (PHB) en Azotobacter vinelandii*. Licenciatura Universidad Autónoma del Estado de Morelos UAEM.
- Castañeda, M., Sanchez, J., Moreno, S., Nunez, C., and Espin, G. (2001). The global regulators GacA and sigma(S) form part of a cascade that controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *J Bacteriol* **183**, 6787-93.
- Galindo, E., Pena, C., Nunez, C., Segura, D., and Espin, G. (2007). Molecular and bioengineering strategies to improve alginate and polyhydroxyalkanoate production by *Azotobacter vinelandii*. *Microb Cell Fact* **6**, 7.
- Görke, B., & Stülke, J. (2008). Carbon catabolite repression in bacteria: many ways to make the most out of nutrients. *Nat Rev Microbiol*, 6(8), 613-624. doi: 10.1038/nrmicro1932
- Hernández-Eligio, A., Castellanos, M., Moreno, S., & Espín, G. (2011). Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes *phbBAC* by PhbR and RpoS. *Microbiology*, 157(Pt 11), 3014-3023. doi: 10.1099/mic.0.051649-0
- Hernandez-Eligio A, Moreno S, Castellanos M, Castañeda M, Nuñez C, Muriel-Millan LF, Espín G. RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression

- and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology* (Reading). 2012 Aug;158(Pt 8):1953-1963.
- Hopewell, J., Dvorak, R., & Kosior, E. (2009). Plastics recycling: challenges and opportunities. [Review]. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 364(1526), 2115-2126. doi: 10.1098/rstb.2008.0311
- Kennedy, C., Rudnick, P., MacDonald, M. L., & Melton, T. (2005). Genus III. *Azotobacter Beijerinck*. In A. I. B. D. 1901, Noel RK, Staley JT and Garrity GM (eds) (Ed.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (pp. 384–402.). The Proteobacteria, pp.: New York, NY: Springer.
- La Rosa R, Nogales J, Rojo F. The Crc/CrcZ-CrcY global regulatory system helps the integration of gluconeogenic and glycolytic metabolism in *Pseudomonas putida* (2015). *Environ Microbiol*. 16,278-290.
- Martínez-Valenzuela, Ahumada-Manuel, C. L., Gúzman, J., Espín, G., & Nuñez, C. (2008 ). Expression of the sRNAs CrcZ and CrcY modulate the strength of carbon catabolite repression under diazotrophic or non-diazotrophic growing conditions in *Azotobacter vinelandii*. *PlosOne*.
- Moreno, R., Hernández-Arranz, S., La Rosa, R., Yuste, L., Madhushani, A., Shingler, V., & Rojo, F. (2015). The Crc and Hfq proteins of *Pseudomonas putida* cooperate in catabolite repression and formation of ribonucleic acid complexes with specific target motifs. *Environ Microbiol*, 17(1), 105-118. doi: [10.1111/1462-2920.12499](https://doi.org/10.1111/1462-2920.12499)
- Moreno, R., Martínez-Gomariz, M., Yuste, L., Gil, C., & Rojo, F. (2009). The *Pseudomonas putida* Crc global regulator controls the hierarchical assimilation of amino acids in a complete medium: evidence from proteomic and genomic analyses. *Proteomics*, 9(11), 2910-2928. doi: 10.1002/pmic.200800918
- Moreno, R., Ruiz-Manzano, A., Yuste, L., & Rojo, F. (2007). The *Pseudomonas putida* Crc global regulator is an RNA binding protein that inhibits translation of the AlkS transcriptional regulator. *Mol Microbiol*, 64(3), 665-675. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05685.x

- Muriel-Millán, L. F., Moreno, S., Romero, Y., Bedoya-Pérez, L. P., Castañeda, M., Segura, D., & Espín, G. (2015). The unphosphorylated EIIA(Ntr) protein represses the synthesis of alkylresorcinols in *Azotobacter vinelandii*. *PLoS One*, *10*(2), e0117184. doi: 10.1371/journal.pone.0117184
- Peña, C., Castillo, T., García, A., Millán, M., & Segura, D. (2014). Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work. *Microb Biotechnol*, *7*(4), 278-293. doi: 10.1111/1751-7915.12129
- Peralta-Gil, M., Segura, D., Guzmán, J., Servín-González, L., & Espín, G. (2002). Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly-beta-hydroxybutyrate biosynthetic phbBAC operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *Journal of bacteriology*, *184*(20), 5672–5677.
- Quiroz-Rocha, E. (2017). *Estudio de la función del sistema de dos componentes CbrA/CbrB en la síntesis de alginato y represión catabólica por carbono en Azotobacter vinelandii*. Doctorado en Ciencias Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Biotecnología
- Quiroz-Rocha, E., Bonilla-Badia, F., Garcia-Aguilar, V., Lopez-Pliego, L., Serrano-Roman, J., Cocotl-Yanez, M., . . . Nunez, C. (2017). Two-component system CbrA/CbrB controls alginate production in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*, *163*(7), 1105-1115. doi: 10.1099/mic.0.000457
- Quiroz-Rocha, E., Moreno, R., Hernández-Ortiz, A., Fragoso-Jiménez, J. C., Muriel-Millán, L. F., Guzmán, J., . . . Núñez, C. (2017). Glucose uptake in *Azotobacter vinelandii* occurs through a GluP transporter that is under the control of the CbrA/CbrB and Hfq-Crc systems. *Sci Rep*, *7*(1), 858. doi: 10.1038/s41598-017-00980-5
- Rojo, F. (2010). Carbon catabolite repression in *Pseudomonas* : optimizing metabolic versatility and interactions with the environment. *FEMS Microbiol Rev*, *34*(5), 658-684. doi: [FMR218 \[pii\]10.1111/j.1574-6976.2010.00218.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2010.00218.x)

- Segura, D., Cruz, T., & Espín, G. (2003). Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly-beta-hydroxybutyrate synthesis. *Arch Microbiol*, 179(6), 437-443. doi: [10.1007/s00203-003-0553-4](https://doi.org/10.1007/s00203-003-0553-4)
- Segura, D., Guzmán, J., & Espín, G. (2003). *Azotobacter vinelandii* mutants that overproduce poly-beta-hydroxybutyrate or alginate. *Appl Microbiol Biotechnol*, 63(2), 159-163. doi: 10.1007/s00253-003-1397-1
- Segura, D., Núñez, C., & Espín, G. (2014). *Azotobacter* cysts. *eLS Wiley Online Library*. doi: 10.1002/9780470015902.a0000295.pub2
- Tan, G. Y. A., Chen, C. L., Li, L., Ge, L., Wang, L., Razaad, I. M. N., . . . Wang, J. Y. (2014). Start a Research on Biopolymer Polyhydroxyalkanoate (PHA): A Review. *Polymers*, 6(3), 706-754. doi: 10.3390/polym6030706
- Tauchert K, Jahn A, Oelze J. Control of diauxic growth of *Azotobacter vinelandii* on acetate and glucose. *J Bacteriol*. 1990 Nov;172(11):6447-51.