



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**ESTUDIO DEL PAPEL DEL SISTEMA DE CONTROL POST
TRANSCRIPCIONAL RSM EN LA PRODUCCIÓN DE POLI-BETA
HIDROXIBUTIRATO (PHB) EN *Azotobacter vinelandii***

Tesis que para obtener el título de
LICENCIADA EN BIOTECNOLOGÍA

PRESENTA:

BRENDA ZÁRATE MORALES

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. MIGUEL CASTAÑEDA LUCIO

Noviembre 2020



DEDICATORIA

A mi amada familia. Por la dicha de compartir la vida.

AGRADECIMIENTOS

A mi querida familia:

Brenda Morales, Luis Zárate y Enrique Zárate. Todo lo que he logrado ha sido gracias a ustedes, por su apoyo incondicional y por su amor infinito. Gracias por siempre brindarme lo necesario para construir mi camino, por levantarme cada vez que caigo y por motivarme a seguir luchando en lo que creo. Los amo eternamente.

Al Doctor Miguel Castañeda Lucio:

Doctor, mi eterno agradecimiento por haberme permitido ser parte del equipo de trabajo del laboratorio y por confiar en mí para llevar a cabo este proyecto. Gracias por todo su apoyo, atención y valiosas enseñanzas; pero, sobre todo, gracias por mostrarme lo fascinante y emocionante que puede llegar a ser el camino de la ciencia. Es un investigador admirable y apasionado, me siento feliz de haberlo escogido como asesor, pues todo lo aprendido y vivido en el laboratorio estará siempre en mi corazón.

A la Dra. Liliana López Pliego:

Gracias Lili por todo el apoyo brindado durante mi estancia en el laboratorio y en la realización de este proyecto; por la disponibilidad, atención y enseñanzas con tanta amabilidad. Gracias también por la confianza y por hacerme sentir como si estuviera en casa, por las buenas pláticas que compartíamos, por tus consejos, por los bellos momentos fuera del laboratorio y por tantos postres disfrutados. Te admiro como profesionalista y como persona.

A la M. C. Elda Carreón López:

Gracias Maestra por aceptar ser parte del comité revisor y por sus aportaciones en la finalización del proyecto. Gracias por compartir su alegría y motivación a la ciencia con cada clase impartida, pues las recuerdo con mucho cariño.

A mis compañeros del Laboratorio de Genética Molecular Microbiana:

Aceituno, Alan, Lalo, Verito, Dianita, Ara y Diego; gracias por los bonitos momentos, aprendí de cada uno de ustedes, los recordaré con mucho cariño. A mis queridos amigos Lennis Hernández y Mauricio A. Basulto, gracias por haberme alegrado día con día en el laboratorio, por tantas pláticas y las risas infinitas compartidas, los quiero mucho.

A mis amigos de la Licenciatura en Biotecnología:

Karla Go, Betito, Lore y Gabo. Mi eterno cariño a ustedes por tantas experiencias compartidas en estos años de carrera. Porque más que amigos, fueron mi familia en la bella Ciudad de Puebla. Cómplices de largos días de estudio, de pláticas existenciales y motivacionales, de tantos lugares recorridos, de noches maravillosas y de viajes especiales e inolvidables. Gracias por permitirme crecer en esta etapa junto a ustedes. Los amo.

A mi querida Dani, Fabrizzio, Paco, Amaury, Dianita, Karlita, Alex, Alexis, y demás amigos que hicieron estos años de aprendizaje más divertidos. Gracias por su bonita y sincera amistad, mucho amor para ustedes siempre.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. <i>Azotobacter vinelandii</i> :	11
1.2. Poli-Beta-Hidroxibutirato (PHB)	12
1.3. Síntesis de PHB en <i>A. vinelandii</i> :	14
1.4. Factores metabólicos de importancia	15
1.4.1. Regulación metabólica de PHB:	15
1.4.2. La Enzima Piruvato Carboxilasa y la síntesis de PHB	16
1.5. Factores genéticos involucrados en la regulación de la síntesis de PHB:	17
1.5.1. Sistemas de doble componente.....	17
1.5.2. El Sistema de doble componente GacS/A	17
1.5.3. Sistema de control post-transcripcional Rsm (Csr)	18
1.5.4. Los reguladores PhbR y RpoS	20
1.5.5. Sistema PTS:.....	21
1.5.6. Regulación genética del PHB en <i>Azotobacter vinelandii</i>	21
2. ANTECEDENTES.....	24
3. JUSTIFICACIÓN.....	28
4. HIPÓTESIS	28
5. OBJETIVOS	29
5.1. Objetivo general:	29
5.2. Objetivos específicos:.....	29
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
6.1 MATERIAL BIOLÓGICO	30
6.2 MEDIOS DE CULTIVO.....	33
6.3 METODOLOGÍAS	34
6.3.1. Extracción de ADN genómico	34
6.3.2. Extracción de plásmido por lisis alcalina	34
6.3.3 Extracción de plásmido por perclorato	35
6.3.4. Extracción plásmido por MAXIPREP.....	35
6.3.5. Extracción de fragmento de ADN a partir de gel de agarosa.....	36
6.3.6 Transformación con células quimiocompetentes de <i>E. coli</i> DH5a	36
6.3.7. Preparación de células competentes de <i>A. vinelandii</i>	36
6.3.8 Transformación en células de <i>A. vinelandii</i> :	37
6.3.9. Protocolo cuantificación de PHB:	37

7.	RESULTADOS	40
7.1.	SOBREEXPRESIÓN DE LOS sRNAs:	40
7.1.1.	Generación de la cepa <i>EalgD</i>	40
7.1.2.	Sobreexpresión de los sRNAs Z1 y Z6	42
7.1.3.	Efecto de la sobreexpresión de los sRNAs sobre PHB	45
7.2	MUTANTE DOBLE <i>pycA/rsmA</i>	48
7.2.1.	Clonación y mutación del gen <i>pycA</i>	48
7.2.2.	Obtención de mutantes <i>pycA</i> en <i>A. vinelandii</i>	51
7.2.3.	Mutación en <i>rsmA</i>	53
7.2.4.	Obtención de mutantes dobles en <i>Azotobacter vinelandii</i>	55
7.2.5.	Obtención de mutantes <i>rsmA</i>	59
7.2.6.	Producción de PHB en las mutantes generadas	61
7.2.7.	Efecto de las fuentes de carbono sobre la producción de PHB:	63
8.	DISCUSIÓN.....	64
9.	CONCLUSIONES	68
10.	REFERENCIAS.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1: Célula vegetativa de <i>Azotobacter vinelandii</i> por microscopía de contraste de fases, la barra indica 1 μ m. Tomada de Hitchins y Sadoff (1970).	12
Fig. 2: Micrografía electrónica de <i>Azotobacter vinelandii</i> donde se observan los gránulo de PHB. Tomado de Segura y Espín (2004).	14
Fig. 3: Biosíntesis de PHB.	15
Fig. 4: Papel metabólico de PYC y modelo propuesto para la sobreproducción de PHB en la mutante en <i>pycA</i> . PYC piruvato carboxilasa, PYK, piruvato quinasa, PPC fosfoenolpiruvato carboxilasa, PEPS fosfoenolpiruvato sintasa, PODK piruvato fosfato dikinasa, PDH piruvato deshidrogenasa. Tomado de Segura y Espín (2004).	16
Fig. 5: Modelo de la vía de transducción de señales mediado por el sistema de doble componente GacS/GacA (Adaptado de Heeb & Hass, 2001).	18
Fig. 6: La inhibición por CsrA/RsmA (amarillo) se realiza a través de la unión de la proteína con la secuencia SD (naranja) del RNAm blanco impidiendo la unión de la maquinaria ribosomal (verde), lo que inhibe la traducción y disminuye la estabilidad del mensajero por la acción de las RNAsas (morado). Tomado de Aguilar (2009).	20
Fig. 7: Sistemas involucrados en la regulación de la producción de PHB en <i>Azotobacter vinelandii</i> .	23
Fig. 8: Fenotipo y cuantificación de alginato en las mutantes donde se sobre-expresan los sRNAs RsmZ1 y RsmZ6. Tomado de May (2016).	24
Fig. 9: A) Efecto de la mutación en <i>rsmA</i> (AE Δ D <i>rsmACT</i>) donde la producción de PHB puede ser visualizada por la opacidad producida en la placa, siendo AE Δ D la mutante en <i>algD</i> y AEIV la cepa silvestre. B) Cuantificación de la producción de PHB. Tomado de López Pliego, L. 2018.	25
Fig. 10: A) Concentraciones intracelulares de metabolitos centrales determinados en extractos celulares de cepas de <i>P. fluorescens</i> mutadas en el gen <i>fumA</i> y en <i>pycB</i> . B) Expresión de los sRNAs en la cepa mutante <i>pycA</i> . Tomado de Takeuchi et. al. (2009).	26
Fig. 11: Efecto de las fuentes de carbono glucolíticas y gluconeogénicas sobre la expresión de los RNAs <i>rsmZ1–7</i> utilizando fusiones transcripcionales <i>gusA</i> . Las células se cultivaron en medio mínimo de Burk modificado con fructosa (BFru), glucosa (BGlu) o succinato (BSucc) hasta la fase estacionaria (48 h). Tomado de López-Pliego et al., 2018.	26
Fig. 12: A) Papel metabólico de PYC y modelo propuesto para la sobreproducción de PHB en la mutante en <i>pycA</i> . PYC piruvato carboxilasa, PYK, piruvato quinasa, PPC fosfoenolpiruvato carboxilasa, PEPS fosfoenolpiruvato sintasa, PODK piruvato fosfato	27

dikinasa, PDH piruvato deshidrogenasa. B) Acumulación de PHB por las cepas de *Azotobacter vinelandii* UW136 (barras rellenas) y la mutante en *pycA* (barras con líneas) cultivadas en medio PY sólido suplementado con 2% de la fuente de carbono indicada. Tomado de Segura y Espín, 2004.

Fig. 13: A) Esquema plásmido pGEM Δ *algD*. B) Patrón de restricción del vector pGEM Δ *algD*::Sp donde se muestra al plásmido sin el casete con 4.8 kb y el casete de espectinomicina con 2 kb. C) Esquema del plásmido nuevo. 41

Fig. 14: A) Esquema PCR en el plásmido pGEM Δ *algD*::Sp. B) Corrimiento electroforético de la Verificación por PCR de la mutante E Δ *algD*::Sp. 42

Fig. 15: Vector integrativo pUMAgyrAkm que tiene clonado al sRNA RsmZ1. (Tomado de May Compañ, 2016). 43

Fig. 16: Vector integrativo pUMAgyrAkm que tiene clonado al sRNA RsmZ6. (Tomado de May Compañ, 2016). 43

Fig. 17: Verificación por PCR de la cepa recombinante para realizar la sobreexpresión de *rsmZ1*. En el primer carril se muestra el amplificado para el plásmido control, los siguientes tres carriles para recombinantes de la cepa E*algD* y las últimas para la cepa DJ. 44

Fig. 18: Verificación por PCR de la cepa recombinante para realizar la sobreexpresión *drsmZ6*. En el primer carril se muestra el amplificado para el plásmido control, los siguientes tres carriles para recombinantes de la cepa E*algD* y las últimas para la cepa DJ. 45

Fig. 19: Fenotipo de las recombinantes de *A. vinelandii* E Δ *algD*::Sp con la sobreexpresión de *rsmZ1* y *rsmZ6*. 45

Fig. 20: Fenotipo de las recombinantes de *A. vinelandii* UW136 con la sobreexpresión de *rsmZ1* y *rsmZ6*. 46

Fig. 21: Cuantificación de PHB en medio líquido PY sacarosa al 2% de la cepa E*algD* control y las recombinantes Z1 y Z6. 47

Fig. 22: Mapa físico del gen *pycA* y ubicación del par de primers usados para su amplificación. 48

Fig. 23: Corrimiento electroforético del producto de la amplificación por PCR gel gen *pycA*. 48

Fig. 24: A) Corrimiento electroforético de la digestión con *XhoI* de plásmidos candidatos para verificar la clonación del gen *pycA*. B) Esquema del vector clonado pJET*pycA*. 49

Fig. 25: A) Mapa de restricción *StuI* del gen *pycA* y *EcoRV* del gen de resistencia a Km clonado en el PBSL98. B) Corrimiento electroforético de las reacciones de digestión del PBSL98 con *EcoRV* y del pJET*pycA* con *StuI*. 50

Fig. 26: Corrimiento electroforético del patrón de restricción con <i>XhoI</i> para verificar las clonas que presentan la mutación <i>pycA</i> . En el carril A se muestra la candidata con la inserción en contra sentido de la transcripción del gen, en B y C se muestran las clonas con la inserción en sentido.	51
Fig. 27: A) Mapa de amplificación del gen <i>pycA</i> B) Corrimiento electroforético de la verificación por PCR de las mutantes <i>pycA</i> . En el primer carril se observa la banda correspondiente al control de la cepa DJ, después 1 y 2 corresponden a las mutantes en Dj, en el carril 3 se observa el control de la cepa E y los siguientes dos a las mutantes en la misma.	52
Fig. 28: Fenotipo de mutantes <i>EpycA</i> y <i>DJpycA</i> sembradas en el medio BS y PY.	53
Fig. 29: A) Representación de plásmidos y su correspondiente enzima de corte. B) Corrimiento electroforético de la digestión de los plásmidos pUC <i>rsmA</i> (carril 1 y 2 después del marcador de peso molecular) y pBSL141 (carril 3 y 4) con la enzima <i>Sall</i> , y digestión del pGEM <i>rsmA</i> (carril 5 y 6) y pBSL141 (carril 7 y 8) con la enzima <i>HindIII</i> .	54
Fig. 30: A) Corrimiento electroforético de la digestión y comprobación del cambio de marcador de resistencia en las clonas candidatas del vector pUC19Δ <i>rsmA</i> ::Gm con la enzima <i>Sall</i> liberando el casete de gentamicina de 0.9 kb. B) Corrimiento electroforético de la digestión de las clonas candidatas del vector pGEM <i>rsmA</i> ΔCT::Gm con la enzima <i>HindIII</i> liberando el casete de gentamicina de 0.9 kb.	55
Fig. 31: A) Comprobación de la mutación en <i>rsmA</i> por PCR en las cepas <i>EpycA</i> . B) Comprobación de la mutación en <i>rsmA</i> por PCR en la cepa <i>DJpycA</i> .	56
Fig. 32: Comprobación mediante PCR de la inserción del plásmido control pGEM <i>retS</i> ::Gm en la cepa <i>EpycA</i> . En el primer carril se muestra el amplicón del gen <i>retS</i> y en el segundo, el gen mutado con el marcador de Gm.	57
Fig. 33: Fenotipo de las mutantes dobles.	58
Fig. 34: Fenotipo de las mutantes dobles en comparación de la cepa silvestre <i>EalgD</i> .	58
Fig. 35: Fig. 35: A) Corrimiento electroforético para la verificación de las mutantes en <i>rsmA</i> . En el carril 1 se muestra el amplificado del gen <i>rsmA</i> (900 pb) en <i>EalgD</i> , en el siguiente carril se observa el gen silvestre de <i>rsmA</i> (900 pb) y el mutado con un casete de espectinomicina (2.9 kb) en <i>ErsmA</i> Δ::Sm y finalmente, se muestra también el gen silvestre de <i>rsmA</i> y el mutado con un casete de gentamicina (1.8 kb) en H3Gm. B) Crecimiento de las mutantes en <i>rsmA</i> sobre el medio PY sacarosa 2% por dos días.	60
Fig. 36: Cuantificación de PHB en las mutantes generadas a partir de la cepa madre <i>EalgD</i> .	61
Fig. 37: Cuantificación de PHB en las mutantes generadas a partir de la cepa DJ.	62
Fig. 38: Fenotipo de las cepas madres y mutantes crecidas en medio PY con fructosa.	63

RESUMEN

Azotobacter vinelandii es una bacteria de vida libre que produce distintos metabolitos secundarios de interés biotecnológico, entre ellos encontramos a los polímeros alginato y el Poli- β -Hidroxibutirato (PHB). El PHB puede ser extraído de la bacteria y ser utilizado como materia prima para elaborar elementos plásticos; siendo éste una opción de bioplástico, mostrando ventajas sobre los polímeros derivados del petróleo ya que es obtenido de una fuente renovable, biodegradable y biocompatible. Gracias a sus características, se ha generado gran interés en estudiar su síntesis y regulación para poder obtener cepas super productoras del polímero y escalar la producción a nivel industrial. Para lograr dicho objetivo, actualmente se estudian los sistemas que regulan la producción del polímero, y se ha demostrado que su biosíntesis está sujeta a una regulación compleja con participación de diferentes niveles de regulación.

El presente trabajo se enfocó en estudiar el sistema Rsm y su posible relación con el ciclo de Krebs para dirigir y aumentar la producción de PHB en *A. vinelandii*. Para ello, se sobreexpresaron dos elementos no codificantes del sistema Rsm, RsmZ1 y RsmZ6, para establecer la importancia que tienen estos en la regulación de la producción del polímero; y, por otra parte, se generó una mutante doble a partir de dos reguladores negativos como lo es la proteína represora RsmA del mismo sistema Rsm y la enzima anaplerótica piruvato carboxilasa, con el objetivo de conocer si hay una relación entre ambos reguladores y generar una cepa super productora de PHB. En este trabajo, se utilizaron los fondos genéticos de la cepa DJ y *EalgD-*, ambas no productoras de alginato a partir de una mutación en el regulador transcripcional *algU* (DJ) y en el gen *algD* respectivamente; esto para dirigir la fuente de carbono hacia la síntesis de PHB, debido a que se propone que el microorganismo y sus sistemas de regulación le dan preferencia a la síntesis de alginato, antes que a la de PHB. Finalmente, también se observó que no hubiese efecto en el crecimiento en diferentes fuentes de carbono de las mutantes generadas para poder hacer comparables los datos obtenidos.

Se encontró que la sobreexpresión de los sRNAs no afecta la producción del polímero, sugiriendo que no regulan directamente la síntesis del polímero y que no son los elementos principales en la cascada de regulación del sistema Rsm. Sin embargo, la proteína RsmA genera una regulación negativa como se había descrito previamente (Hernández- Eligio, 2012), así mismo, la mutación de la enzima piruvato carboxilasa, genera un efecto negativo sobre la producción del polímero. Interesantemente la mutación de ambos reguladores muestra una sobreproducción del polímero. Adicionalmente, la utilización de fructuosa como fuente de carbono permite un aumento en la producción de PHB, respecto a la sacarosa, que es la fuente de carbono comúnmente utilizada.

Finalmente, se concluye que el sistema Rsm es de relevancia para la regulación de PHB, sin embargo, existen otros sistemas que igualmente están involucrados que necesitan ser más explorados y relacionados con el sistema Rsm.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. *Azotobacter vinelandii*:

El género *Azotobacter* forma un grupo de bacterias fácilmente reconocibles y ampliamente distribuidas en suelo y agua. Es caracterizado morfológicamente por su gran tamaño y por la forma variable de sus células que algunas veces semejan levaduras o algas unicelulares, fisiológicamente por su estilo de vida estrictamente aerobia y por su crecimiento abundante en un medio apropiado libre de nitrógeno combinado. El género comprende al menos a siete especies bien definidas: *A. crocoocum*, *A. armeniacus*, *A. beijerinckii*, *A. nigricans*, *A. paspali*, *A. salinestris* y *A. vinelandii* (Jensen, 1954), (Kennedy et al., 2005).

Aislado por primera vez en suelo de Vineland, Nueva Jersey, *Azotobacter vinelandii* fue el organismo experimental elegido por muchos investigadores durante el surgimiento de la bioquímica como disciplina dominante dentro de las ciencias de la vida.

Esta bacteria pertenece a las γ -proteobacteria de la familia *Pseudomonadaceae*, es Gram negativa, aerobia, pleomórfica observándose como bacilos o cocos, poliploide con aproximadamente 80 copias de su cromosoma (Punita et al., 1989) y fijadora de nitrógeno. Bajo condiciones ambientales adversas tiene la capacidad de diferenciarse morfológicamente generando formas celulares latentes resistentes a la desecación denominadas quistes (Sadoff, 1975).

Como organismo modelo para la investigación, *A. vinelandii* muestra varias características favorables como el hecho de ser naturalmente competente en ciertas condiciones pues al absorber ADN lineal puede realizar una doble recombinación con porciones homólogas de su genoma permitiendo modificaciones estables (Noar y Bruno-Bárcena, 2018). Dicha competencia aumenta el valor como organismo de investigación en biotecnología, permitiendo la eliminación directa de genes, mutaciones e introducción de nuevos rasgos. También se ha estudiado por sus diversos potenciales biotecnológicos ya que posee un metabolismo secundario

bastante versátil que le permite producir alginatos, **poli- β -hidroxibutirato (PHB)**, sideróforos y alquilresorcinoles (ARs) (Hendrink, 2006).

Se han descrito dos cepas de *A. vinelandii*, la AEIV (E) y la UW136 (DJ), la cepa E fue aislada en la Universidad de Rutgers por Jacob Lipman en 1903 y una de sus características principales es la formación de colonias mucoides debido a la producción de alginatos (López-Pliego, 2018). Contrario a la cepa E, la cepa DJ no es productora de colonias mucoides debido a una mutación generada por transposición en el gen *algU* que codifica para el factor sigma AlgU (Setubal et al., 2009); en esta cepa se han realizado diversos estudios de genética por su flexibilidad en el trabajo experimental y además de que es una de las cepas de referencia para estudios sobre producción de PHB.

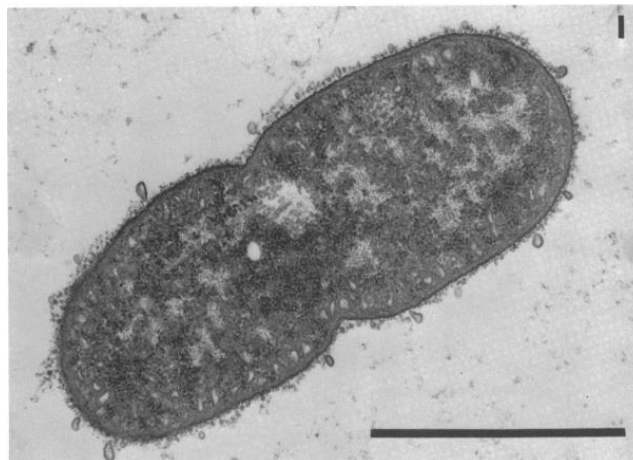


Fig. 1: Célula vegetativa de *Azotobacter vinelandii* por microscopía de contraste de fases, la barra indica 1 μ m. Tomada de Hitchins y Sadoff (1970).

1.2. Poli-Beta-Hidroxibutirato (PHB)

Azotobacter produce polímeros de hidrocarburos en ciertas condiciones, esto fue descubierto en 1937 por la observación de gránulos similares a lípidos en las células de bacterias del género; posteriormente se identificaron estos gránulos compuestos por PHB y confirmaron su presencia en *A. vinelandii* en 1958 (Noar y Bruno-Bárcena, 2018).

El Poli-Beta-Hidroxibutirato es un poli-éster constituido por monómeros de β -hidroxibutirato que pertenece a la familia de los polihidroxicanoatos. Polihidroxicanoato (PHA) es el término químico para la forma natural de poliéster. Un canoato es simplemente un ácido graso que es una molécula lineal que contiene carbono e hidrógeno (un cano) con un grupo carboxilo (-COOH) en un extremo (formando un canoato). Además, estos monómeros tienen un grupo hidroxilo (-OH) en la posición beta, es decir, en el tercer carbono, lo que produce estos beta o 3-hidroxicanoatos. El grupo hidroxilo de un monómero está unido al grupo carboxilo de otro mediante un enlace éster; Por tanto, estos plásticos se consideran poliésteres. Respecto a su estructura monomérica, los PHA's se pueden clasificar en varios tipos según la longitud de la cadena de los ácidos hidroxicanoicos de los que están constituidos. De esta manera, se definen como PHA de cadena corta aquellos polímeros compuestos por unidades monoméricas de 3 a 5 átomos de carbono, y como PHA de cadena media a los que se componen por monómeros de 6 a 14 átomos de carbono. Sin embargo, también existen PHA mixtos, es decir que se componen de monómeros tanto de cadena corta como de cadena media (González et al., 2013).

Los PHA's son polímeros producidos naturalmente por bacterias de diversos géneros, dentro de las más estudiadas se encuentran *Ralstonia eutropha*, *Alcaligenes latus*, *Pseudomonas oleovorans* y *Azotobacter vinelandii*. Estas bacterias los producen a partir de sustratos orgánicos, como carbohidratos, aceites, alcoholes, ácidos orgánicos e hidrocarburos; los acumulan en grandes cantidades dentro de la célula bacteriana en forma de gránulos llegando a constituir hasta el 90% de la biomasa. Las bacterias productoras los usan como material de reserva que puede ser utilizado posteriormente bajo condiciones de limitación de nutrientes para mantener su metabolismo. La cantidad de polímero producido y acumulado depende de la especie de bacteria y de las condiciones en las que se cultiva. En general, condiciones de desbalance de nutrientes en el medio usado para cultivar a la bacteria favorecen una alta producción (Segura et al., 2007).

Estos polímeros tienen ciertas ventajas sobre los polímeros derivados del petróleo ya que son una forma de bioplástico renovable, son biodegradables (pueden ser asimilados por muchos microorganismos ya sea de suelos, mares, lagos o aguas residuales), y con ellos se pueden fabricar dispositivos médicos biocompatibles con el tejido humano (generan respuestas biológicas aceptables, sin toxicidad); lo que les confiere una gran importancia como sustitutos de los plásticos convencionales.

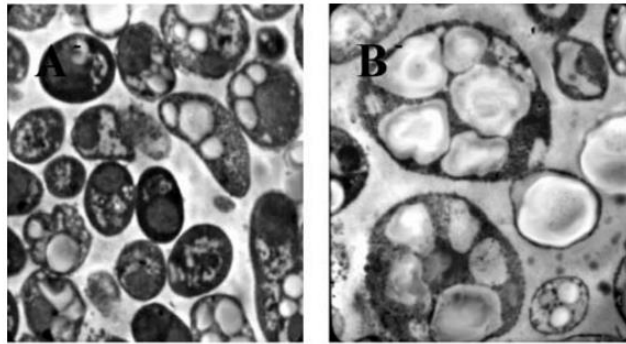


Fig. 2: Micrografía electrónica de *Azotobacter vinelandii* donde se observan los gránulo de PHB.
Tomado de Segura y Espín (2004).

1.3. Síntesis de PHB en *A. vinelandii*:

En la síntesis bioquímica del polímero están involucradas tres reacciones enzimáticas: la primera reacción consiste en la condensación de dos moléculas de acetil-CoA por la enzima β -cetotilasa para dar acetoacetil-CoA. El acetoacetil-CoA formado se reduce por la acetoacetil-CoA reductasa utilizando NADPH y produciendo D(-)- β -hidroxibutiril-CoA, que finalmente se polimeriza por la actividad de la enzima PHB sintasa. En *A. vinelandii* los genes *phbA*, *phbB* y *phbC* codifican respectivamente para la β -cetotilasa, la acetoacetil-CoA reductasa y la PHB sintasa, los cuales se encuentran agrupados formando el operón *phbBAC* (Peralta-Gil et al., 2002).

La cantidad de PHB producido por *A. vinelandii* depende de diversos factores, pero principalmente de las condiciones de cultivo y de los diversos mecanismos

reguladores genéticos que controlan la expresión de los genes biosintéticos *phbBAC* (Romero et al., 2014).

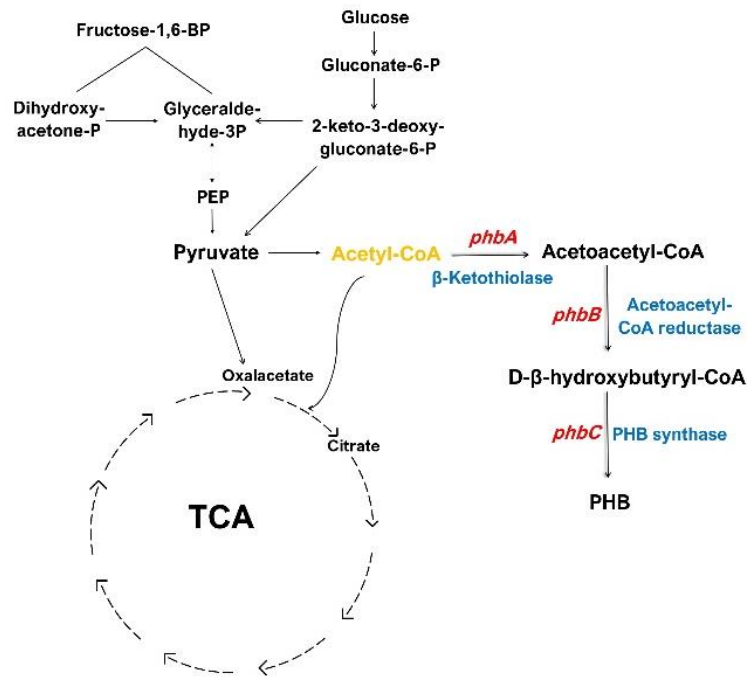


Fig. 3: Biosíntesis de PHB.

1.4. FACTORES METABÓLICOS DE IMPORTANCIA

1.4.1. Regulación metabólica de PHB:

La síntesis de PHB en esta bacteria se ha relacionado con el funcionamiento del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) o ciclo de Krebs. En condiciones de crecimiento equilibrado, el acetil-CoA alimenta principalmente al ciclo de Krebs, y el CoA resultante inhibe la actividad de la β -cetotilasa evitando la producción de PHB (Senior y Dawes. 1973). Sin embargo, en ciertas condiciones desequilibradas, como la limitación de oxígeno en presencia de un exceso de fuente de carbono, conducen a un aumento en la concentración de NAD(P)H que, a su vez, inhibe la citrato sintasa y la isocitrato deshidrogenasa. Esta inhibición reduce el flujo de acetil-CoA en el

ciclo de TCA, elevando el nivel de este metabolito y disminuyendo la concentración de CoA. Por lo tanto, se supera la inhibición de la β -cetotiolasa por CoA, lo que permite que continúe la síntesis de PHB (Segura y Espín 2004).

1.4.2. La Enzima Piruvato Carboxilasa y la síntesis de PHB

Se ha reportado que una mutación en el gen de la enzima piruvato carboxilasa (*pycA*) causa una desaceleración en la actividad del ciclo TCA debido a una baja concentración de oxalacetato, lo que resulta en una mayor disponibilidad de acetyl-CoA para la síntesis de PHB.

La piruvato carboxilasa (PYC) es una de las enzimas que pertenecen a las reacciones anapleróticas, éstas se llevan a cabo para rellenar o reponer a los intermediarios del ciclo del ácido cítrico cuando alguno de ellos ha sido utilizado para la biosíntesis de otros compuestos y que así, el ciclo pueda continuar. La función de esta enzima consiste en catalizar la carboxilación dependiente de ATP del piruvato para generar oxalacetato (Segura y Espín, 2004).

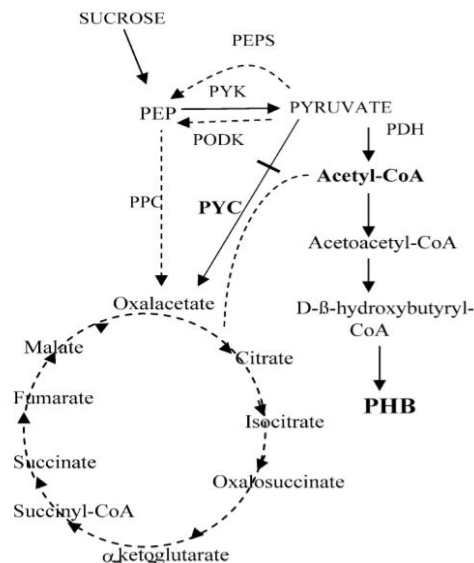


Fig. 4: Papel metabólico de PYC y modelo propuesto para la sobreproducción de PHB en la mutante en *pycA*. PYC piruvato carboxilasa, PYK, piruvato quinasa, PPC fosfoenolpiruvato carboxilasa, PEPS

fosfoenolpiruvato sintasa, PODK piruvato fosfato dikinasa, PDH piruvato deshidrogenasa. Tomado de Segura y Espín (2004).

1.5. FACTORES GENÉTICOS INVOLUCRADOS EN LA REGULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE PHB:

1.5.1. Sistemas de doble componente

La transducción de señales en bacterias es a menudo desempeñada por proteínas de señalización las cuales actúan en sistemas conocidos como Sistemas de Doble Componente (SDC). Estos sistemas se distribuyen ampliamente entre las bacterias y también se encuentran en algunas eucariotas. Estos sistemas reguladores ayudan a los organismos a adaptarse a tener condiciones diferentes y a colonizar hábitats específicos en respuesta a señales ambientales (Heeb y Haas, 2001). Los SDC, están constituidos por una proteína receptora (cinasa histidínica, HK) que al recibir una señal se autofosforila y activa por fosforilación al segundo elemento del sistema conocido como Regulador de Respuesta (RR), que funciona como regulador transcripcional (Gao y Stock, 2009). Las señales pueden ser abióticas (por ejemplo, pH, temperatura u osmolaridad) o bióticas; algunas señales son producidas por un huésped, otras son sintetizadas por las propias poblaciones bacterianas (mecanismos reguladores comúnmente conocidos como quorum sensing) y para varios sistemas de dos componentes las señales aún no se conocen.

1.5.2. El Sistema de doble componente GacS/A

El SDC GacS / GacA (Global activation of antibiotic and cyanide synthesis) es común en bacterias del subgrupo y donde está restringido un sistema regulador global de metabolismo secundario.

La cinasa sensora GacS (originalmente designada LemA) se encontró en *Pseudomonas syringae pv. syringae* como un regulador clave de la patogenicidad y su homólogo BarA como un supresor multicopia de una mutante de *Escherichia coli* osmóticamente comprometida. El regulador de respuesta GacA fue descubierto como un regulador maestro de metabolitos antifúngicos en la bacteria de control biológico *Pseudomonas fluorescens* CHA0. La evidencia de que GacS y GacA forman un sistema de dos componentes provino de estudios genéticos en *P. syringae* y luego de experimentos de fosfotransferencia in vitro con los homólogos BarA/UvrY en *E. coli* (Heeb y Haas, 2001).

La regulación que ejerce GacS / A tiene como intermediario al sistema de control post-transcripcional Rsm (Csr) (Lapouge et al., 2008)

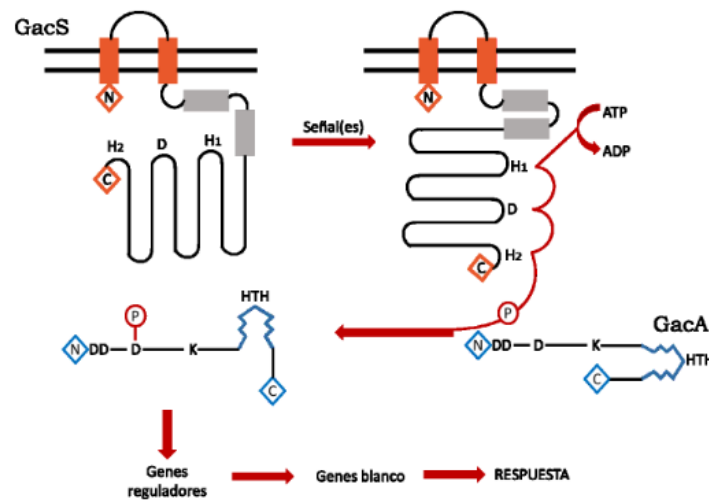


Fig. 5: Modelo de la vía de transducción de señales mediado por el sistema de doble componente GacS/GacA (Adaptado de Heeb & Hass, 2001).

1.5.3. Sistema de control post-transcripcional Rsm (Csr)

Las proteínas de unión al ADN y otros factores de transcripción juegan un papel importante en las redes reguladoras globales que coordinan el metabolismo

bacteriano y la fisiología en respuesta al medio ambiente. Además, la regulación post-transcripcional juega un papel importante en la coordinación de las redes de expresión génica (Romeo, 2013).

Dos tipos de sistemas postranscripcionales predominan en las gamma proteobacterias:

1) ARNs que actúan en trans que utilizan a la proteína chaperona Hfq para unirse a los ARNm blanco.

2) Sistemas Csr (regulador de almacenamiento de carbono) como es descrito en *Escherichia coli* o Rsm (represor de metabolitos de fase estacionaria) descrito en especies relacionadas como *Erwinia carotovora* y *P. aeruginosa*, que manejan una proteína de unión a ARN de secuencia específica, denominada CsrA, RsmA o RsmE, para alterar la traducción y / o la estabilidad de los ARNm blanco (Babitzke y Romeo, 2007).

Los sistemas Rsm están constituidos por una proteína y dos o más pequeños RNAs reguladores (sRNAs). La proteína del sistema, codificada por el gen *rsmA* (*csrA*), se une a sus RNAs blancos de regulación bloqueando su traducción y promoviendo su degradación. Los sRNAs-Rsm contrarrestan esta actividad represora de RsmA secuestrándola, dejando libre el sitio de unión a ribosoma de los RNAs mensajeros para activarse el inicio de la traducción.

En *Pseudomonas*, los RNAs reguladores que se unen a las proteínas RsmA/CsrA se producen típicamente bajo el control positivo de un sistema de dos componentes, denominado GacS/GacA. Estos sRNAs han sido clasificados en tres familias, RsmX, RsmY y RsmZ. La presencia de dos o más sRNAs de la familia Rsm han sido reportados en algunas especies de bacterias, siendo *A. vinelandii* la bacteria con el número mayor de sRNAs-Rsm reportados, siete sRNAs pertenecientes a la familia RsmZ (RsmZ1-RsmZ7) y uno de la familia RsmY (López-Pliego et al., 2018).

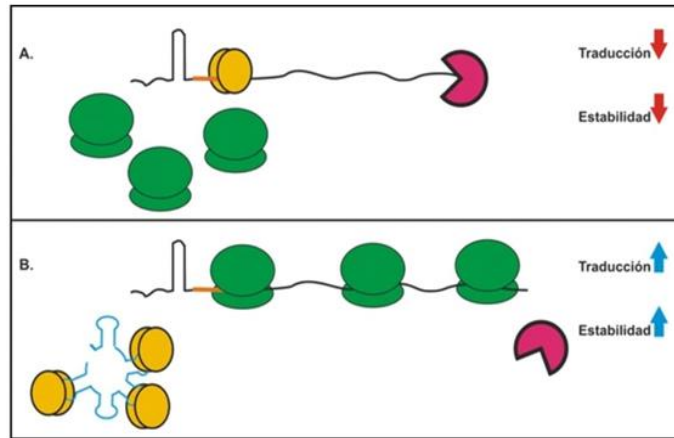


Fig. 6: La inhibición por CsrA/RsmA (amarillo) se realiza a través de la unión de la proteína con la secuencia SD (naranja) del RNAm blanco impidiendo la unión de la maquinaria ribosomal (verde), lo que inhibe la traducción y disminuye la estabilidad del mensajero por la acción de las RNAsas (morado). Tomado de Aguilar (2009).

1.5.4. Los reguladores PhbR y RpoS

PhbR es una proteína que exhibe identidad para un activador transcripcional de la familia AraC, que actúa como el activador transcripcional del operón *phbBAC*, esta proteína es codificada por el gen *phbR* y sus promotores pR1 – pR2 (Hernández-Eligio et al., 2011). El factor sigma RpoS participa en la transcripción tanto del gen regulador *phbR* como de los genes del operón *phbBAC* (Peralta-Gil et al., 2002). Los factores sigma son factores de iniciación que promueven la unión de la ARN polimerasa a sitios de iniciación específicos. El factor sigma RpoS es un regulador central durante la fase estacionaria en las bacterias. En *A. vinelandii*, RpoS participa en la formación de quistes maduros (Cocotl-Yañez et al., 2011) y también es necesario para la supervivencia bajo estrés oxidativo y en condiciones de deficiencia de carbono o nitrógeno (Sandercock y Page, 2008).

1.5.5. Sistema PTS:

Un importante sistema en la regulación del metabolismo de los carbohidratos es el sistema de fosfotransferasa (PTS), que hace referencia a un grupo de enzimas que transfieren restos de fosfato derivados del fosfoenolpiruvato (PEP) de un miembro del sistema al siguiente, en un orden determinado. Se conocen dos tipos generales: el fosfoenolpiruvato o PTS de carbohidratos o PTS de azúcar, que es responsable del transporte y fosforilación concomitantes de un carbohidrato al interior de la célula y el PTS de nitrógeno (PTS^{Ntr}), que no transporta carbohidratos, pero ejerce funciones reguladoras (Pflüger-Grau y Boris Görke, 2010).

El sistema PTS^{Ntr} está formado por las proteínas INtr (EI^{Ntr}), Npr y IIA^{Ntr} (EIIA^{Ntr}), codificadas por los genes *ptsP*, *ptsO* y *ptsN* respectivamente.

Estas proteínas participan en una cadena de transferencia de fosforilo en varias bacterias, donde EIIA^{Ntr} parece ser el aceptor terminal de fosforilo. La proteína IIA^{Ntr} en su forma no fosforilada actúa como un regulador negativo sobre la expresión de *phbR* y el operón biosintético *phbBAC* a través de un mecanismo aún desconocido (Noguez et al., 2008).

1.5.6. Regulación genética del PHB en *Azotobacter vinelandii*

Varios sistemas reguladores están involucrados en el control de la expresión de los genes biosintéticos para la producción de PHB. La transcripción del operón biosintético *phbBAC* se inicia a partir de dos promotores superpuestos, pB1 y pB2; donde se requiere a PhbR para la activación de pB1, pues se encontraron seis sitios conservados de 18 pb designados R1-R6 que están presentes dentro de la región intergénica de *phbR* y *phbB*, donde se propuso que PhbR activa la expresión de *phbB* uniéndose específicamente a R1 y R2 (TGTCACCAA-N4-CACTA y TGTCACCAA-N4-CAGTA) presentes en la región promotora de *phbB* (Peralta-Gil et al., 2002) (Hernández-Eligio et al., 2011).

Similar a PhbR, el factor sigma RpoS también juega un papel importante en la activación de la transcripción de los genes *phbB* y *phbR*, pues en una mutante *rpoS*, se observan efectos negativos como una reducción significativa de los niveles de transcripción de *phbR* iniciados a partir del promotor pR2 (Hernández-Eligio et al., 2011).

Además, también existen dos sistemas reguladores globales que controlan la expresión de los genes del operón *phbBAC*, uno de ellos está formado a su vez por dos sistemas: El sistema global de dos componentes, compuesto por la cinasa receptora GacS y su regulador de respuesta GacA (Castañeda et. al, 2000, 2001), y el sistema regulador postranscripcional RsmA RsmZ/Y. El control de la síntesis de PHB en este caso lo ejerce la proteína RsmA, que se une al ARN mensajero del operón biosintético *phbBAC*, reprimiendo su traducción y promoviendo su degradación. A su vez, el regulador de respuesta GacA, fosforilado por GacS, activa la transcripción de los pequeños ARN reguladores denominados RsmZ/Y (Hernández-Eligio et al., 2012) (Manzo et al., 2011). Estos pequeños ARNs se unen a RsmA, contrarrestando su actividad represora hacia *phbR* y *phbBAC* permitiendo su expresión (Hernández-Eligio et al., 2012).

Cabe mencionar que la cascada Gac-Rsm también está involucrada en la regulación del alginato, polímero también producido por *Azotobacter vinelandii*. Estos sistemas regulan al alza la producción de ambos polímeros de la bacteria y, en algunas condiciones, eliminar la capacidad de *A. vinelandii* para producir PHB o alginato aumenta el rendimiento del otro.

El segundo sistema global implicado en la regulación es el sistema PTS^{Ntr} , donde en *A. vinelandii*, $EIIA^{Ntr}$ no fosforilado actúa como un regulador negativo de la expresión de *phbR* y el operón biosintético *phbBAC* a través de un mecanismo aún desconocido (Noguez et al., 2008). Sin embargo, también se revela un enlace existente entre GacA y PTS^{Ntr} , pues en una mutante *gacA*, solo se detectó la forma no fosforilada de $EIIA^{Ntr}$, en contraste con la cepa de tipo salvaje enquistada donde están presentes las formas fosforiladas y no fosforiladas de $EIIA^{Ntr}$, lo que implica que GacA es necesaria para el funcionamiento de la cascada de fosforilación de

PTS^{Ntr}. Pero aún queda por determinar si GacA controla la fosforilación de EIIA^{Ntr} mediante la interacción directa con los componentes de PTS^{Ntr} (Trejo et al., 2017).

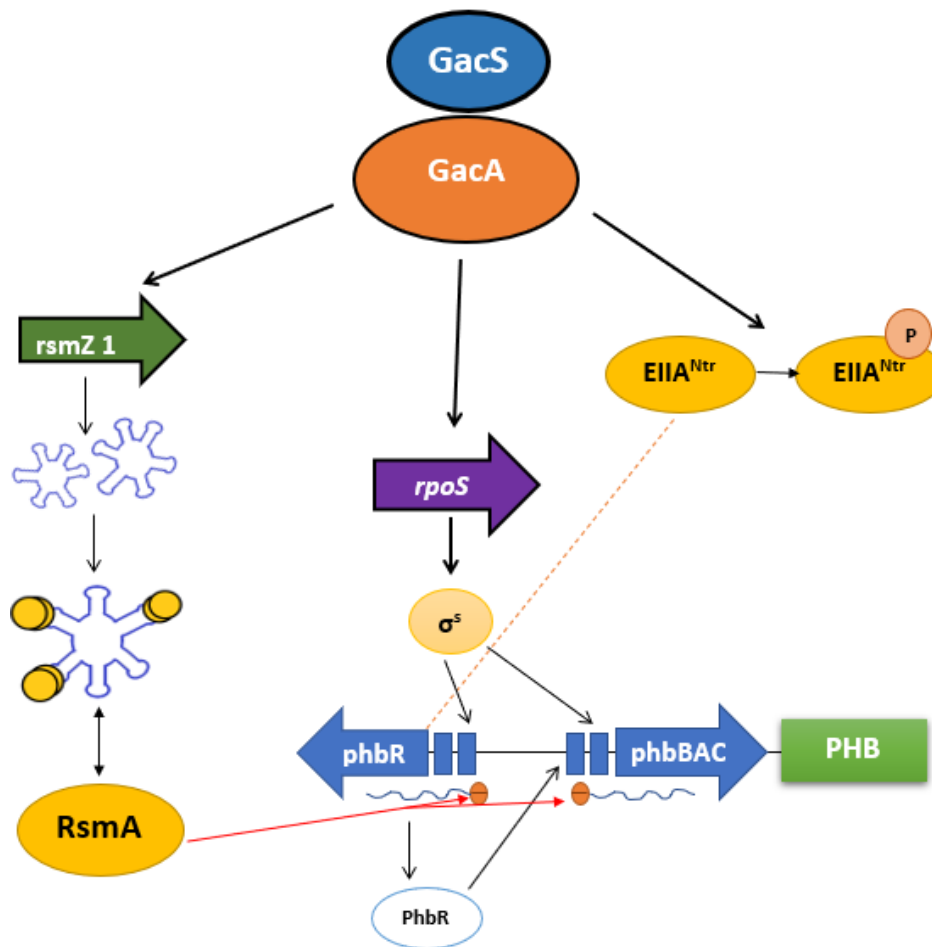


Fig. 7: Sistemas involucrados en la regulación de la producción de PHB en *Azotobacter vinelandii*.

2. ANTECEDENTES

En *Azotobacter vinelandii* se ha demostrado que el sistema de doble componente GacS/GacA regula la síntesis de PHB y alginato, ambos polímeros producidos por la bacteria. A su vez, este SDC controla al sistema de regulación post-transcripcional Rsm, a través del regulador de respuesta GacA, el cual activa la transcripción de los genes *rsmZ* que codifican pequeños ARN que interactúan con RsmA para contrarrestar su actividad represora.

En una mutante *gacA* la producción de alginato y PHB se ve disminuida, ya que los sRNAs no están activos para impedir la acción de la proteína RsmA (Castañeda et al., 2000); esto se comprobó respecto a la producción de alginato con estudios posteriores sobre los sRNAs, pues al sobre-exresar cada sRNA en una mutante *gacA*, el efecto se revierte, la cepa vuelve a producir alginato (May, 2016) (Fig. 8). Sin embargo, en PHB no se tuvo el mismo efecto, tanto los sRNAs mutados como los sobreexpresados en una mutante *gacA*, no se observa ningún efecto en la producción en cuanto a la cepa silvestre (datos no mostrados), planteándose la posibilidad de que el sistema post-transcripcional Rsm favorezca la síntesis de alginato sobre la producción de PHB, permitiendo la expresión de genes biosintéticos de alginato y organizando los flujos de carbono en consecuencia. Lo anterior podría ser modificado en una cepa no productora de alginato que presentara una mutación en el gen *algD* (GDP-6-manosa-deshidrogenasa), un gen estructural clave para la síntesis del exopolisacárido.

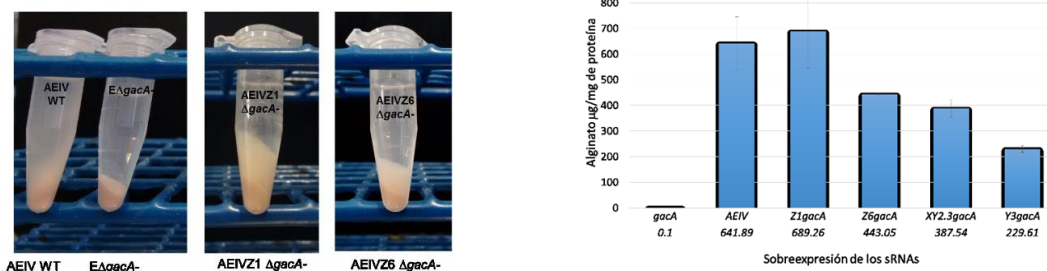


Fig. 8: Fenotipo y cuantificación de alginato en las mutantes donde se sobre-expresan los sRNAs RsmZ1 y RsmZ6. Tomado de May (2016).

Así mismo sobre el sistema Rsm, se ha demostrado que la inactivación de *rsmA* en un fondo genético de *A. vinelandii* que tiene mutado al gen *algD*, se genera un aumento en la producción de PHB, generando cepas con un fenotipo más blanquecino y opaco (Fig. 9).

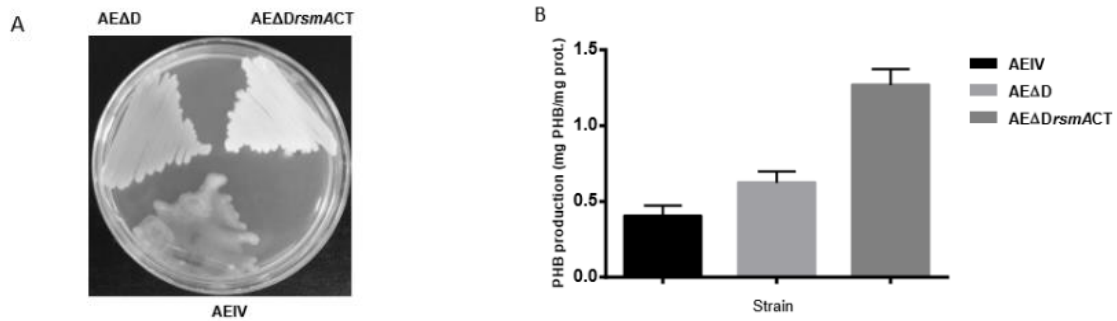


Fig. 9: A) Efecto de la mutación en *rsmA* (AEΔ*rsmACT*) donde la producción de PHB puede ser visualizada por la opacidad producida en la placa, siendo AEΔD la mutante en *algD* y AEIV la cepa silvestre. B) Cuantificación de la producción de PHB. Tomado de López Pliego, L. 2018.

Esto nos sugiere que RsmA tiene un efecto negativo en la producción de PHB y que en caso de que los sRNAs no actúen directamente como lo hacen para el alginato, el sistema Rsm podría estar involucrado también de otra manera o a otro nivel; Lo que nos lleva a lo reportado por Takeuchi (2009), tomando como modelo a *Pseudomonas fluorescens* (especie relacionada filogenéticamente), donde encuentra un enlace regulatorio entre el metabolismo primario y secundario a través de mutaciones que afectan el metabolismo central (*pycAB* y *fumA*), basándose en la presencia de intermediarios del ciclo de Krebs en el medio de cultivo como succinato y malato; mostrando que un desbalance en el TCA puede cambiar fuertemente la expresión de los sRNAs dependientes de GacA y, por lo tanto, la producción de metabolitos secundarios (Fig. 10).

Intracellular concentrations of central metabolites determined in cell extracts of *P. fluorescens* strains CHA0, CHA1322 (*fumA*⁻), and CHA1201 (*pycB*⁻) during exponential growth (trophophase) and postexponential growth phase (idiophase).

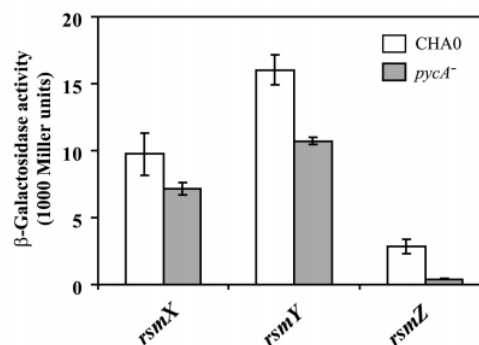
Metabolite	Phase ^a	Concentration (μmol/g)		
		Wild type	<i>fumA</i> ⁻	<i>pycB</i> ⁻
		μmol/g		
Hexose-P	T	5.4 ± 1.0	4.6 ± 0.3	4.2 ± 0.3
	I	2.0 ± 0.1	2.5 ± 0.5	1.7 ± 0.1
3-Phosphoglycerate	T	1.5 ± 0.3	1.1 ± 0.1	1.1 ± 0.1
	I	0.6 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.9 ± 0.5
Phosphoenolpyruvate	T	1.5 ± 0.2	0.8 ± 0.1	1.2 ± 0.1
	I	0.4 ± 0.1	0.6 ± 0.1	0.5 ± 0.1
Pyruvate	T	9.2 ± 4.9	5.7 ± 0.4	20 ^b ± 1
	I	2.1 ± 0.2	4.5 ± 0.5	1.8 ± 0.4
Citrate + isocitrate ^c	T	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.1 ± 0.1
	I	1.6 ± 0.5	1.9 ± 0.3	0.8 ± 0.2
Succinate	T	7.1 ± 4.4	29 ^b ± 5	6.4 ± 3.0
	I	4.1 ± 3.3	12 ^b ± 3	0.9 ± 0.4
Fumarate	T	0.4 ± 0.05	140 ^b ± 7	0.5 ± 0.05
	I	0.2 ± 0.05	62 ^b ± 16	0.2 ± 0.05
Malate	T	0.1 ± 0.05	0.3 ± 0.05	0.3 ± 0.05
	I	<0.1 ± 0.05	0.2 ± 0.05	<0.05 ± 0.05
2-Oxoglutarate	T	2.3 ± 0.1	10 ± 0.6	1.8 ± 0.05
	I	0.4 ± 0.05	0.5 ± 0.1	0.1 ± 0.05

^a T, trophophase; I, idiophase.

^b Values outside linear range.

^c Metabolites not separated.

A)



B)

Fig. 10: A) Concentraciones intracelulares de metabolitos centrales determinados en extractos celulares de cepas de *P. fluorescens* mutadas en el gen *fumA* y en *pycB*. B) Expresión de los sRNAs en la cepa mutante *pycA*. Tomado de Takeuchi et. al. (2009).

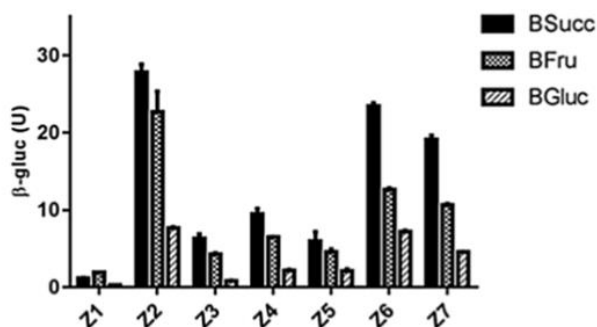


Fig. 11: Efecto de las fuentes de carbono glucolíticas y gluconeogénicas sobre la expresión de los ARNs *rsmZ1–7* utilizando fusiones transcripcionales *gusA*. Las células se cultivaron en medio mínimo de Burk modificado con fructosa (BFru), glucosa (BGlu) o succinato (BSucc) hasta la fase estacionaria (48 h). Tomado de López-Pliego et al., 2018.

En cuanto a *A. vinelandii*, se reporta también un cambio en la expresión de los sRNAs al utilizar distintas fuentes de carbono glucolíticas y gluconeogénicas (Fig. 11) (López-Pliego et al., 2018). Además, a nivel metabólico se tiene evidencia de que una mutante en la piruvato carboxilasa (*pycA*) sobre la cepa UW136 de *A. vinelandii* tiene un efecto positivo en la producción de PHB, como el flujo de acetil-

CoA en el ciclo de TCA depende de su condensación con oxaloacetato, el acetil-CoA estaría disponible para la síntesis de PHB (Fig. 12) (Segura y Espín, 2004).

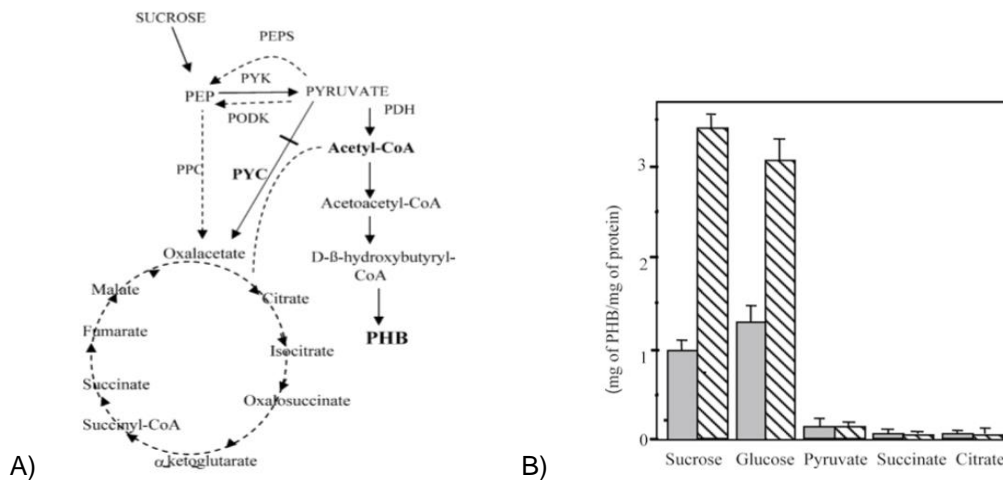


Fig. 12: A) Papel metabólico de PYC y modelo propuesto para la sobreproducción de PHB en la mutante en *pycA*. PYC piruvato carboxilasa, PYK, piruvato quinasa, PPC fosfoenolpiruvato carboxilasa, PEPS fosfoenolpiruvato sintasa, PODK piruvato fosfato dikinasa, PDH piruvato deshidrogenasa. B) Acumulación de PHB por las cepas de *Azotobacter vinelandii* UW136 (barras rellenas) y la mutante en *pycA* (barras con líneas) cultivadas en medio PY sólido suplementado con 2% de la fuente de carbono indicada. Tomado de Segura y Espín, 2004.

Así que, debido a la importancia de la disponibilidad de Acetil-coA y tomando en cuenta los flujos de carbono y las mutantes ya reportadas, sería interesante estudiar la sinergia entre los puntos de control del sistema Rsm y los metabolitos del ciclo de Krebs para dirigir y aumentar la producción de polímero de interés, el polibetahidroxibutirato.

3. JUSTIFICACIÓN

Desde el punto de vista biotecnológico los polihidroxicanoatos son compuestos interesantes que pueden formar plásticos con propiedades semejantes a los de uso actual, con la ventaja de ser plásticos biodegradables, además de provenir de una fuente renovable; es por esto que, la realización del siguiente trabajo generará conocimiento sobre la regulación genética de la síntesis del polímero producido por *A. vinelandii*, permitiendo obtener cepas con mejores capacidades de producción del mismo.

4. HIPÓTESIS

El sistema Rsm y los intermediarios del ciclo de Krebs están implicados en el flujo de carbono y regulación de la síntesis de PHB en *A. vinelandii*.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general:

Estudiar el sistema Rsm y su posible relación con el ciclo de Krebs para dirigir y aumentar la producción de PHB en *A. vinelandii*.

5.2. Objetivos específicos:

- Generar cepas recombinantes *algD*⁻ en las que se sobreexpresen los genes que codifican para los sRNAs RsmZ1 y RsmZ6.
- Determinar el efecto de la sobreexpresión de los sRNAs RsmZ1 y RsmZ6 sobre la producción de PHB en una mutante *algD*⁻.
- Construir mutantes dobles *pycA-rsmA* en las cepas *EalgD*⁻ y DJ de *A. vinelandii*.
- Determinar la producción de PHB en las cepas generadas en presencia de fuentes de carbono glucolíticas y gluconeogénicas.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 MATERIAL BIOLÓGICO

Tabla 1: Cepas bacterianas utilizadas en el trabajo.

Cepa	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i> DH5 α :	SupE44, lacU169, hsdR17, resA1, endA1, gyrA96, thi-1, rel1	
<i>Azotobacter vinelandii</i>:		
DJ (UW136)	Cepa no mucoide con una mutación en el regulador <i>algU</i>	Bishop y Brill 1977
E (AEIV)	Cepa silvestre mucoide productora de alginato.	Larsen y Haug 1971
E Δ <i>algD</i>	Mutante derivada de la cepa E a la que se le removió la región que codifica para el sitio catalítico de la enzima, colocando en su lugar un casete de resistencia a Kanamicina.	Morales 2013
E Δ <i>algD</i> ::Sp	Derivada de la cepa E con una mutación por inserción/remoción con un casete de espectinomicina.	Este trabajo
EKZ1	Cepa derivada de la E Δ <i>algD</i> ::Sp a la que se le integró la construcción <i>pgyrAKmrsmZ1</i> .	Este trabajo
EKZ6	Cepa derivada de la E Δ <i>algD</i> ::Sp a la que se le integró la construcción <i>pgyrAKmrsmZ6</i> .	Este trabajo
DJZ1	Cepa derivada de la DJ a la que se le integró la construcción <i>pgyrAKmrsmZ1</i> .	Este trabajo
DJZ6	Cepa derivada de la DJ a la que se le integró la construcción <i>pgyrAKmrsmZ6</i> .	Este trabajo
E <i>pycA</i>	Cepa derivada de la E Δ <i>algD</i> ::Sp a la que se le mutó el gen <i>pycA</i> por inserción de un casete de kanamicina.	Este trabajo
DJ <i>pycA</i>	Cepa derivada de la DJ a la que se le mutó el gen <i>pycA</i> por inserción de un casete de kanamicina.	Este trabajo
E <i>pycArsmA</i> Δ CT	Mutante doble generada de la cepa E <i>pycA</i> a la que se le insertó el plásmido <i>pGEMrsmAGm</i> .	Este trabajo
E <i>pycA</i> Δ <i>rsmA</i>	Mutante doble generada de la cepa E <i>pycA</i> a la que se le insertó el plásmido <i>pUCrsmAGm</i> .	Este trabajo

DJpycAΔrsmA	Mutante doble generada de la cepa DJ a la que se le insertó el plásmido pUCrsmAGm.	Este trabajo
H3Gm (EalgDrsmAΔCT)	Mutante derivada de la EΔalgD, con remoción en el extremo carboxilo terminal del gen rsmA interrumpido con un casete de resistencia a Gentamicina.	Morales 2013
ErsmAΔ::Sm	Mutante derivada de la EΔalgD, con el plásmido pUC19rsmA::ΩSm que carga la remoción del gen rsmA.	Morales 2013

Tabla 2: Plásmidos bacterianos utilizados en el trabajo.

Plásmidos	Descripción	Referencia
pGEMΔalgD::Km	Derivado del pGEMtEasyVector; porta un fragmento de 2.4 kb que contiene la remoción del gen <i>algD</i> interrumpido con un casete de resistencia a Kanamicina.	Morales 2013
pGEMΔalgD::Sp	Porta una mutación del gen <i>algD</i> por remoción e inserción del casete de espectinomicina.	Este trabajo
pBSL130	Fuente del casete de espectinomicina.	Alexeyev 1995
pUMAgyrAKmrsmZ1	Vector integrativo derivado del pUMAgyrAKm que tiene clonado al sRNA RsmZ1.	May 2016
pUMAgyrAKKmrsmZ6	Vector derivado del pUMAgyrAKm que tiene clonado al sRNA RsmZ6.	May 2016
pJET1.2/blunt	Vector de clonación, AmpR.	(ThermoFisher scientific)
PJETpycA	Vector que porta el gen <i>pycA</i> .	Este trabajo
pJETpycA::Km	Vector que porta el gen <i>pycA</i> por inserción del casete de kanamicina.	Este trabajo
pBSL98	Fuente del casete de kanamicina.	Alexeyev 1995
pUC19rsmA::ΩSm	Derivado del pUC19 que contiene un fragmento de 2 Kb en el que se removió el gen <i>rsmA</i> y se insertó en su lugar el interposón Ω Sm.	Cocotl-Yañez 2006

pGEM Δ rsmA::Km	Porta un fragmento de 1Kb que contiene la remoción del carboxilo terminal del gen <i>rsmA</i> interrumpido con un casete de resistencia a kanamicina.	Morales 2013
pBSL141	Fuente del casete de Gentamicina.	Alexeyev 1995
pUC19 Δ rsmA::Gm	Derivado del vector puc19 Δ rsmA::Sm, donde se cambió del casete de espectinomicina por gentamicina.	Este trabajo
PGEMrsmA Δ CT::Gm	Derivado del pGEM Δ rsmA::Km, donde se cambió el casete de kanamicina por gentamicina.	Este trabajo
pGEMretS::Gm	Plásmido que contiene la mutación del gen <i>retS</i> mediante la inserción del casete de gentamicina.	No publicado

Tabla 3: Oligonucleótidos utilizados en el trabajo.

Oligonucleótidos	Secuencia 5' – 3'	Tm
SmFw	TTTTGTCAGCAAGATAGCCAGA	54°C
SmRv	GATCGAAATCCAGATCCTTGAC	54°C
FD	GACTGAGCTCGCGTGATG	54°C
TacR	CTCGAGAATAAGGGCGACACGGAAAT	60°C
CsrmB5'	GTCGATGGAACGACGTCGGCTGAC	60°C
Ged	CGTCGACGGTACCACGCAAGCC	60°C
PycAFw	CTCGCTCGTGGCTGTTTCGTAGGTC	63.2°C
PycARv	CCGCGGGCCAGGGCTTCTTCC	68°C
RsmAD	CGACGGTGCGCATTATAGTGT	58°C
RsmAR	CGGCGCACGCGAAGTCAT T	58°C
RetSD	ACCGCCGGACTGCTGGACAAGAAC	65,4°C
RetSR	GCGGCACCTGCGGCTGGATG	68°C

6.2 MEDIOS DE CULTIVO

Luria Bertani (LB)

Fórmula	Cantidad (g/L)
NaCl	5.0
Extracto de levadura	5.0
Peptona de caseína	10.0
Agar agua (para medio sólido)	15.0

Medio mínimo Burk-Sacarosa (BS)

Fórmula	g/L	ml/L
Buffer fosfato (K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄)	8.0, 2.0	100
Sacarosa	20 %	100
CaCl ₂	7.3	10
Na ₂ SO ₄	18.3	10
MgCl ₂	16	1
FeSO ₄	5.0	1
Na ₂ MoO ₄	0.2	1
Agar agua (para sólido)	15	

Medio de competencia (CM)

Fórmula	g/L	ml/L
Buffer fosfato (K ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄)	8.0, 2.0	100
Sacarosa	20 %	100
CaCl ₂	7.3	10
Na ₂ SO ₄	18.3	10
MgCl ₂	16	1
Agar agua (para sólido)	15	

Medio PY

Fórmula	g/L
Peptona de caseína	5
Extracto de levadura	3
Agar agua	15

6.3 METODOLOGÍAS

6.3.1. Extracción de ADN genómico

A partir de un cultivo de *A. vinelandii* (sólido o líquido), coleccionar el paquete celular y lavar con 1 ml de MgSO₄. Resuspender la pastilla en 450 µl de buffer TRIS EDTA 50/20, después agregar 50 µl de lisozima (10mg/ml) e incubar a 37°C por 30 minutos; Agregar 30 µl de proteasa (10mg/ml) y meter a incubar a 37°C por 30 minutos; agregar 50 µl de SDS (10%) e incubar 15 min a 37°C; agregar 100 µl de NaCl 5M e incubar 10 min a 65°C; 80 µl de solución CTAB (10% NaCl 0.7M previamente incubada a 65°C) e incubar 20 min a 65°C; extraer con un volumen de cloroformo-álcohol isoamílico 24:1 y centrifugar por 5 min. Decantar el sobrenadante a un tubo nuevo y agregar 10 µl de sílica para posteriormente centrifugar 1 min, decantar el sobrenadante y lavar 3 veces con 500 µl de solución NEW WASH y dejar secar la pastilla a 50 °C para después ser resuspendida en 30 µl de RNAsa diluida dejándola incubar a 37°C por una hora.

6.3.2. Extracción de plásmido por lisis alcalina

Inocular la cepa de interés en 5 ml de LB líquido con su respectivo antibiótico, incubar a 37°C y 200 rpm durante 12 a 18 horas. Centrifugar el cultivo y recuperar la pastilla para lavar con 1 ml de MgSO₄. Agregar 100 µl de Solución I (Glucosa/Dextrosa 50 mM, EDTA 10 mM, 25µl TRIS a pH8), después 200 µl de Solución II (preparada al momento 80% H₂O, 10% NaOH 2N, 10% SDS) y mezclar suavemente por inversión para dejar reposar en hielo 10 min. Adicionar 150 µl de solución III (40 ml de CH₃COOK 3M pH 4.8 con ácido acético glacial), reposar 10 min y centrifugar 15 min a 13,000 rpm. Recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo, colocar 10 µl de sílica y reposar 5 min para posteriormente centrifugar 2 min a 13,000 rpm, lavar el pellet con 500 µl de New Wash (por triplicado), dejar secar a 37°C y resuspender en 30 µl de RNAsa diluida. Finalmente centrifugar para recuperar el sobrenadante.

6.3.3 Extracción de plásmido por perclorato

A partir de un cultivo de 5 ml de *E. coli* incubado entre 12-18 horas a 200 rpm, recuperar el paquete celular y lavar con 1 ml de MgSO₄, resuspender la pastilla en 175 µl de solución TES (Tris 1M a pH de 8.5, EDTA 0.1M a pH de 8 y sacarosa 15%), agregar 25 µl de lisozima y reposar en hielo por 20 minutos, posteriormente agregar 400 µl de agua destilada helada e incubar a 73° C durante 15 min. Posteriormente, centrifugar a 12,000 rpm por 15 minutos, transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, agregar 600 µl de isopropanol y 60 µl de perclorato de sodio (NaClO₄ 5M), mezclar y dejar reposar 5 minutos en hielo, centrifugar por 15 minutos, retirar el sobrenadante y lavar la pastilla con etanol al 70% (3 veces), dejar secar a 55° C y finalmente se agregan 30 µl de RNAsa diluida para incubar a 37° C por una hora.

6.3.4. Extracción plásmido por MAXIPREP

Iniciar con un cultivo de 50 ml incubado a 37°C, 200 rpm por 12-18 horas. Recuperar el paquete celular y lavar con MgSO₄ 10 mM, agregar 1.5 ml de solución I (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM y Tris- HCL 25 mM pH 8), después 3.5 ml de solución II (NaOH 0.2N y SDS 10% se prepara al momento) y mezclar suavemente hasta ver claro el lisado y dejar reposar 10 min, agregar 2.5 ml de solución III (acetato de potasio 5 M y ácido acético glacial a pH de 4.8) y agitar, dejar en hielo por 15 minutos y centrifugar a 6,000 rpm 10 min, recuperar el sobrenadante en un tubo nuevo, agregar el mismo volumen de isopropanol, mezclar suavemente para homogenizar y mantener 5 min en hielo, centrifugar 10 minutos y retirar el sobrenadante, lava el pellet con etanol al 70% y centrifugar por 2 minutos, retirar el sobrenadante y dejar secar a 55° C, agregar 150 ml de RNAsa concentrada e incubar a 37° C toda la noche.

6.3.5. Extracción de fragmento de ADN a partir de gel de agarosa

Correr en un gel de agarosa la reacción de interés (restricción o PCR), teñir en BET y enjuagar en agua, colocar en el transiluminador de luz UV de baja intensidad para observar la banda requerida, cortar la banda, colocar el fragmento en un microtubo (1.5 ml), pesar y agregar NaI 6M 3 veces el peso de la banda (restar 1 g del peso del tubo), posteriormente incubar a 55° C hasta derretir completamente la agarosa, agregar 10 µl de sílica y dejar reposar por 10 min. Centrifugar 2 minutos a 13,000 rpm, retirar el sobrenadante y lavar con 500 µl de solución New Wash (repetir tres veces). Retirar el sobrenadante, dejar secar a 55°C hasta que la pastilla se desprenda del tubo, resuspender en 10 µl de agua pisa, centrifugar por 2 minutos y pasar el sobrenadante a un tubo nuevo para retirar la sílica.

6.3.6 Transformación con células quimiocompetentes de *E. coli* DH5α

Colocar 10 µl del material genético a transformar en 200 µl de células competentes químicas, mantener en hielo por 20 minutos. Después a 42°C por dos minutos e inmediatamente otros 2 minutos en hielo, agregar 1 ml de medio LB líquido e incubar a 37°C en agitación por una hora, después tomar 200 µl de la muestra y plaquear con perlas de vidrio estéril en una placa de medio LB con su respectivo antibiótico de selección, dejar secar la placa e incubar a 37°C por 12 h.

6.3.7. Preparación de células competentes de *A. vinelandii*

Tomar una sola colonia de la cepa de *A. vinelandii* de interés (fresca), resembrar por estría cruzada en placa de medio CM sin antibiótico, incubar por 48 horas a 30° C. Una vez crecida la cepa, tomar nuevamente solo una colonia y resembrar en placas de medio CM de forma masiva e incubar 48 horas a 30°C. Recoger tapete, colocar en un microtubo y agregar 1 ml de MgSO₄, resuspender y después

centrifugar a 13,000 rpm por 2 minutos, resuspender en 200 μ l (o el volumen adecuado) de MgSO₄ para proceder a transformar o guardar.

6.3.8 Transformación en células de *A. vinelandii*:

Mezclar 200 μ l de células competentes y 50 μ l de DNA plasmídico (MaxiPrep), mezclar y verter la mezcla en una placa de CM, dejar secar e incubar durante 48 horas. Posteriormente recuperar el tapete celular y lavar con MgSO₄, centrifugar por 2 minutos a 13,000 rpm, resuspender la pastilla celular en MgSO₄ de acuerdo con la cantidad de células, plaquear con perlas en medios BS con el antibiótico de selección, dejar secar e incubar por 48 horas a 30°C.

6.3.9. Protocolo cuantificación de PHB:

- Preparar un preinóculo de 24 h de incubación en agitación de 210 rpm a 30°C con la cepa de *A. vinelandii* de interés en 25 ml de medio PY líquido suplementado con sacarosa.

- Cultivo para cuantificación en medio líquido:
 - Tomar 1 ml del preinóculo para inocular en 25 ml de medio PY líquido con sacarosa, el cual se incuba durante 5 días en agitación a 210 rpm y 30 °C.
 - Dependiendo del crecimiento del cultivo, tomar 5 ml o 1 ml y depositarlo en un tubo Falcon o Eppendorf (hacerlo por duplicado, una muestra para cuantificar proteína y otra para PHB), centrifugar por 2 minutos a 8000 rpm, lavar las células con MgSO₄ 10mM y centrifugar 5 minutos a 12000 rpm.
 - Guardar en congelador.

- Cultivo para cuantificación en medio sólido:
 - Tomar 200 µl del preinóculo para inocular en placas Petri pequeñas que contienen el medio PY sólido con sacarosa. Agregar el preinóculo con cuidado al centro de la placa, cuidando que crezca de forma uniforme como círculo. Incubar durante 5 días a 30°C.
 - Recoger con un broche Baco todo el tapete o crecimiento celular y depositar en un tubo Falcon de 15 ml para resuspender en 5 ml de MgSO₄. Tomar 2 ml y depositar cada mililitro en un tubo Eppendorf (un tubo para proteína y otro para PHB). Centrifugar los dos tubos por 2 minutos a 8000 rpm, lavar las células con MgSO₄ y centrifugar 5 minutos a 12000.
 - Guardar en congelador.

- Cuantificación de PHB por el método de Law y Slepecky:
 - Lavar las células una vez con 1 ml de agua destilada
 - Agregar 1 ml de NaHCl (hipoclorito de sodio) al 30% y mezclar
 - Depositar los tubos en un frasco para incubar por una hora y media a 37°C o por una hora a 30°C en agitación.
 - Centrifugar 2 minutos a 14000 rpm
 - Lavar el paquete con 1 ml de H₂O destilada
 - Centrifugar 2 minutos a 14000 rpm
 - Lavar con 1 ml de etanol al 100%
 - Centrifugar 2 min a 14000
 - Lavar el paquete con 1 ml de acetona
 - Centrifugar por 2 min a 14000 rpm
 - Dejar secar el paquete. De preferencia toda la noche.
 - Disolver con ayuda de un vortex en 1 ml de H₂SO₄ concentrado
 - Transferir el contenido a un tubo de cristal
 - Incubar a 90°C por 10 minutos (se debe observar un cambio en el color del ácido)

- Leer absorbancia a 235 nm
- Cuantificación de proteína por el método de Lowry:
 - Lavar las células con $MgSO_4$ y resuspender en 1 ml.
 - Tomar 10 μl y agregar 190 μl de $MgSO_4$ para llevarlo a un volumen de 200 μl .
 - Añadir 1 ml de la solución reactiva, mezclar y dejar reposar por 10 minutos.
 - Agregar 100 μl de reactivo de Folín y dejar reposar por 30 minutos.
 - Medir absorbancia a 625 nm.
 - Correr al mismo tiempo una curva de calibración usando Albúmina Sérica 2 mg/ml.

Reactivos:

1. Solución reactiva: 1 ml solución C + 1 ml solución B + 98 ml solución A.
 Solución A: Na_2CO_3 2% en NaOH 0.1N
 Solución B: Tartrato de NaK 2%
 Solución C: $CuSO_4$ 1%
2. Folín 1:2
3. Curva de calibración de albúmina:

Albúmina	$MgSO_4$	Concentración de albúmina
0 μl	200 μl	0
2 μl	198 μl	4
4 μl	196 μl	8
8 μl	192 μl	16
16 μl	184 μl	32
32 μl	168 μl	64

7. RESULTADOS

7.1. SOBREENPRESIÓN DE LOS sRNAs:

7.1.1. Generación de la cepa *EalgD*⁻

Para cumplir con los objetivos planteados y tener una cepa útil para ampliar el conocimiento sobre la producción de PHB, el trabajo comenzó con la generación de una cepa no productora de alginato que favoreciera la acumulación de PHB y en esta realizar los experimentos de sobre-expresión de los sRNAs de la familia Rsm.

Previamente en el laboratorio se había generado una cepa *EΔalgD*⁻, para lo cual se usó el plásmido mutagénico pGEMΔ*algD* (Morales, 2013) este plásmido se creó a partir de la remoción de parte de la región catalítica y parte del sitio de pegado a sustrato del gen *algD*, abatiendo de esta forma la actividad de la enzima GDP manosa deshidrogenasa que es fundamental para la síntesis de alginato. Una vez que se removió la región catalítica, en su lugar se insertó un casete de resistencia a kanamicina. Sin embargo, de acuerdo con la estrategia experimental planteada la cepa no era compatible con los vectores a ser usados para la sobre-expresión de los sRNAs por lo que se procedió a cambiar el casete de resistencia de kanamicina a espectinomycinina.

Para llevar a cabo el cambio de resistencia, se extrajo el DNA plasmídico de pGEMΔ*algD* y este se sometió a una restricción enzimática con *KpnI* para liberar el casete de kanamicina (1.4 kb). Al mismo tiempo, se extrajo el DNA plasmídico del pBSL130 que contiene el casete de resistencia a espectinomycinina (tamaño de 2 kb) y también se sometió a restricción enzimática con *KpnI* para liberar el casete. Posteriormente, se hizo la extracción de banda del gel de agarosa de ambas partes de interés y estas se ligaron para llevar a cabo la transformación de células quimiocompetentes de *E. coli* DH5α. El nuevo vector se nombró como pGEMΔ*algD*::Sp y para verificar el cambio de casete, se hizo una restricción enzimática con la enzima *KpnI* (Figura 13).

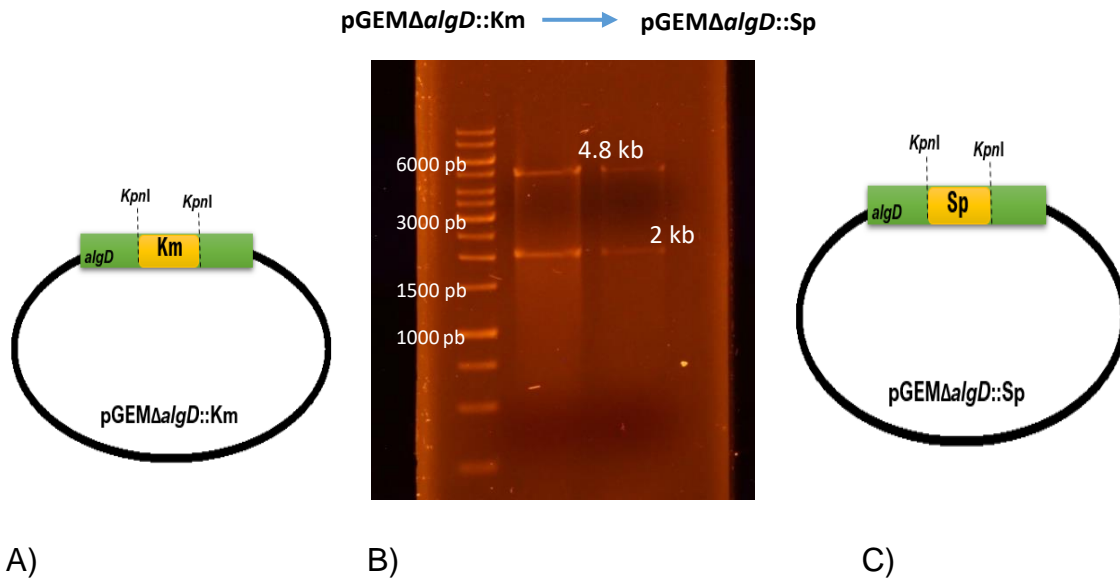


Fig. 13: **A)** Esquema plásmido pGEMΔ*algD*. **B)** Patrón de restricción del vector pGEMΔ*algD*::Sp donde se muestra al plásmido sin el casete con 4.8 kb y el casete de espectinomicina con 2 kb. **C)** Esquema del plásmido nuevo.

Una vez verificado el cambio de casete, se procedió a sembrar la cepa de *E. coli* que mantiene el vector, en el medio LB líquido para extraer el plásmido por Maxiprep. Este plásmido sería mezclado y transformado posteriormente con células competentes de la cepa silvestre de *Azotobacter vinelandii* llamada AEIV (E), previamente inducida a competencia al resembrarla en repetidas ocasiones en el medio de competencia (CM). Las candidatas obtenidas se sembraron en medio mínimo Burk Sacarosa (BS) con el antibiótico espectinomicina y se seleccionaron algunas candidatas para verificar la transformación y su consecuente doble recombinación homóloga.

El plásmido mutagénico es incapaz de replicarse en *A. vinelandii* de tal forma la única vía para que la bacteria retenga la resistencia al marcador de selección (Km) es la doble recombinación homóloga, donde el locus silvestre *algD* se intercambia por el locus mutante contenido en el plásmido. Para la verificación de las cepas transformantes-recombinantes de la cepa E con el vector pGEMΔ*algD*::Sp, se utilizó el par de oligonucleótidos SmFw y SmRv, que amplifican parte del casete de

resistencia insertado, con una T_m de 54°C y con un tiempo de extensión de un minuto, amplificando un fragmento de 1046 pb (Figura 14).

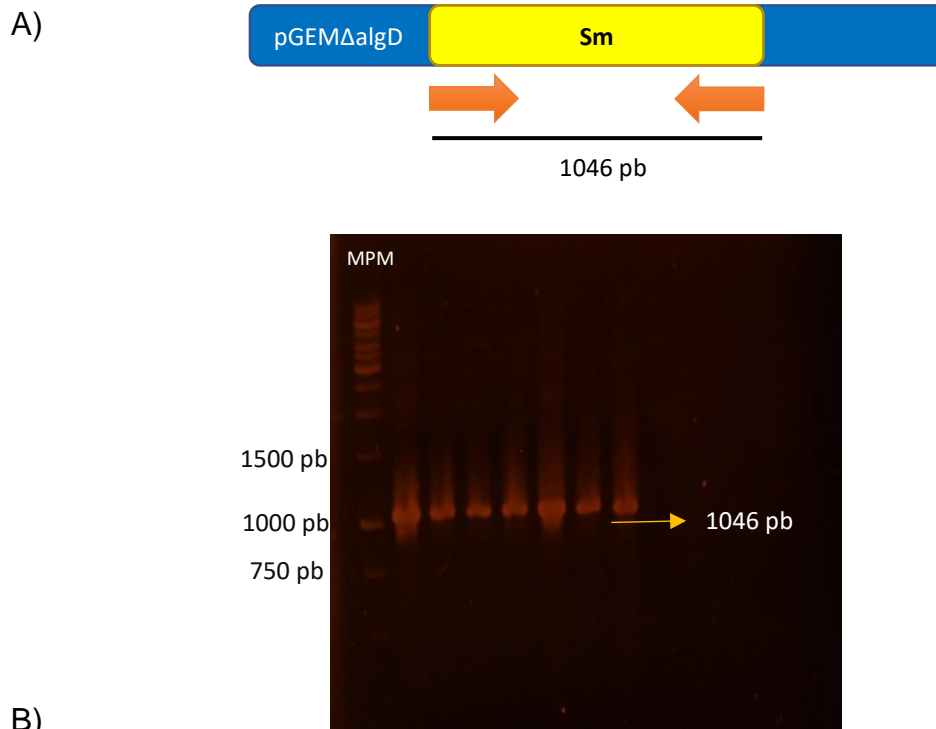


Fig. 14: A) Esquema PCR en el plásmido pGEM Δ algD::Sp. **B)** Corrimiento electroforético de la verificación por PCR de las candidatas a mutantes E Δ algD::Sp, mostrando en el primer carril el Marcador de peso molecular.

7.1.2. Sobreexpresión de los sRNAs Z1 y Z6

Para cumplir con el primer objetivo planteado y respondernos si los pequeños RNAs tienen un efecto sobre la producción de PHB en una cepa no mucoide, se sobreexpresaron los sRNAs RsmZ1 y RsmZ6 en la cepa E Δ algD::Sp generada.

Previamente en el laboratorio se había construido el vector integrativo pUMAgyrAKm (May-Compañ, 2016) el cual se generó intercambiando el promotor inducible *tac* del vector pUMAKmtac, por el promotor constitutivo *gyrA*, nativo de *A. vinelandii*. A este vector se le clonaron individualmente cada uno de los siguientes genes: *rsmZ1*, *rsmZ2*, *rsmZ4*, *rsmZ5*, *rsmZ6* y *rsmY*. Pero en este caso, solo

utilizamos los correspondientes a *rsmZ1* y *rsmZ6* debido a que se tienen reportes donde se muestra que *rsmZ1* favorece la producción de alginato mientras que *rsmZ6* participa de manera negativa en la producción (Fig. 15 y 16). Cabe destacar que este vector integrativo tiene como locus neutro de recombinación al gen *meIA*, este gen es monocistrónico y codifica para una α -galactosidasa.

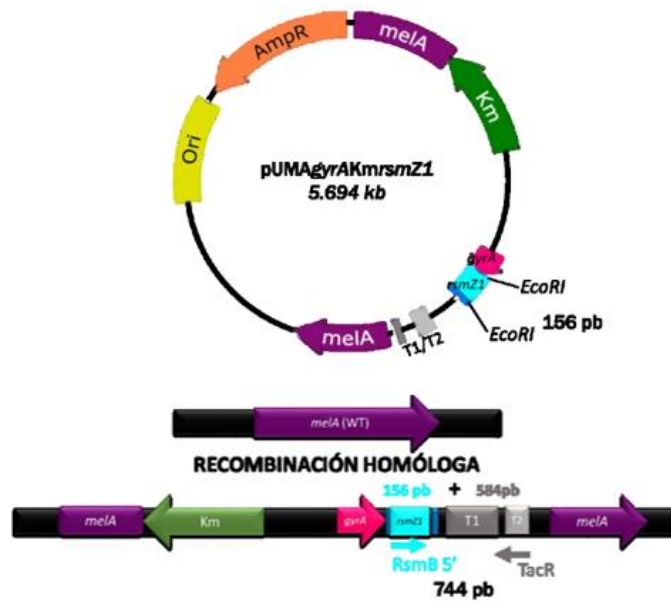


Fig. 15: Vector integrativo pUMAgyrAkm que tiene clonado al sRNA RsmZ1. (Tomado de May Compañ, 2016).

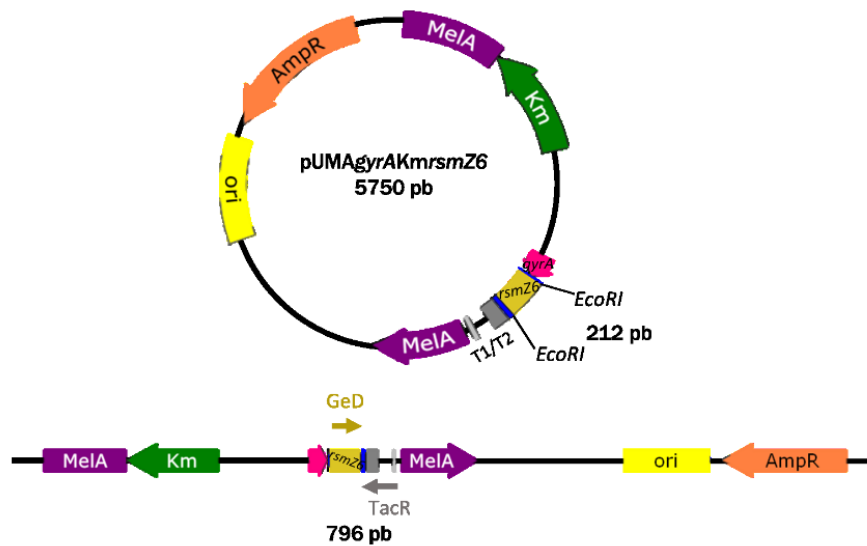


Fig. 16: Vector integrativo pUMAgyrAkm que tiene clonado al sRNA RsmZ6. (Tomado de May Compañ, 2016).

Se extrajo el DNA por lisado celular y este se mezcló con células competentes en medio CM de la cepa *EΔalgD::Sp* y también de la cepa UW136 que no produce alginato, para hacer la comparación entre cepas.

Una vez que se obtuvieron las candidatas con el medio de selección BS kanamicina, se tomaron algunas para verificar mediante PCR aquellas en las que se logró establecer con éxito el proceso de doble recombinación homóloga. Tanto para la cepa E como en la DJ, se utilizó el oligonucleótido TacR para ambos sRNAs y el oligonucleótido delantero correspondiente, para *rsmZ1* el oligonucleótido CsmB5' y para *rsmZ6* el oligo Ged con las siguientes condiciones: Tm de 60°C y tiempo de extensión de 45 segundos. Dando un amplificado de 744 pb para el *rsmZ1* (Figura 17) y un amplificado de 795 pb para el *rsmZ6* (Figura 18).

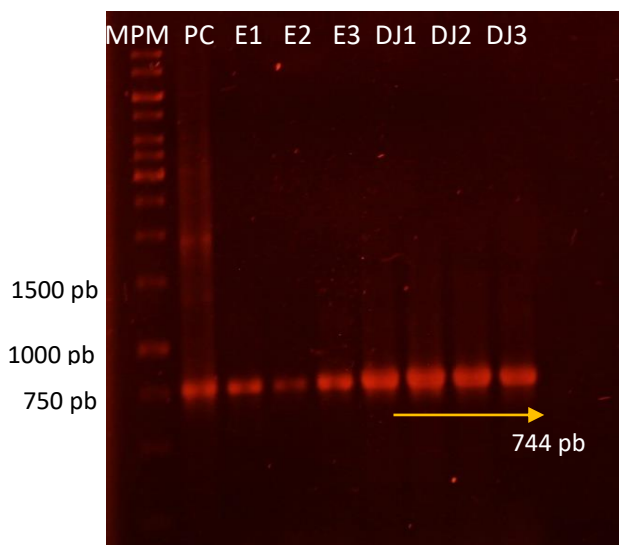


Fig. 17: Verificación por PCR de las cepas recombinantes para realizar la sobreexpresión de *rsmZ1*. En el primer carril se muestra el Marcador de peso molecular, en el segundo se muestra el amplificado para el plásmido control y en los siguientes tres carriles para recombinantes de la cepa *EalgD* y las últimas para la cepa DJ.

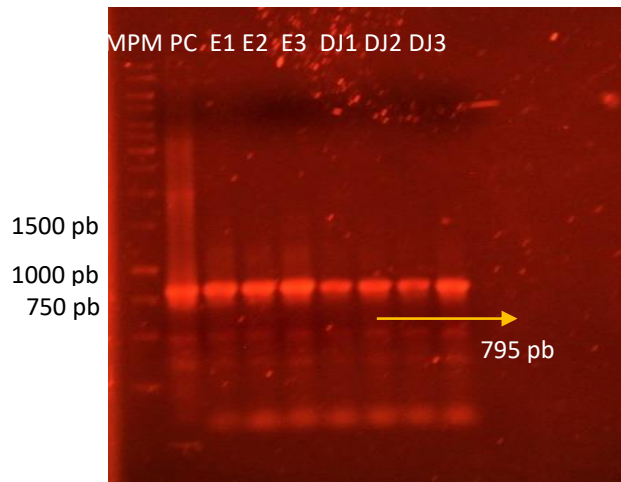


Fig. 18: Verificación por PCR de las cepas recombinantes para realizar la sobreexpresión de *rsmZ6*. En el primer carril se muestra el Marcador de peso molecular, en el segundo el amplificado para el plásmido control, los siguientes tres carriles para recombinantes de la cepa *EalgD* y las últimas para la cepa DJ.

7.1.3. Efecto de la sobreexpresión de los sRNAs sobre PHB

Las cepas obtenidas se sembraron en el medio PY (Peptona-Extracto de levadura) adicionado con sacarosa al 2% a 30°C por 5 días. Este es el medio que usualmente se usa para promover la acumulación de PHB en *A. vinelandii*; el polímero es fácilmente reconocido al mostrarse un fenotipo característico opaco y blanquecino de las cepas productoras.

EΔalgD::Sp

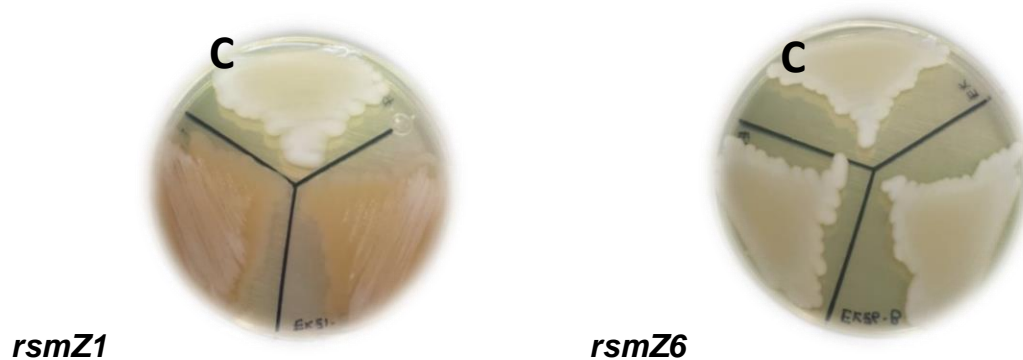


Fig. 19: Fenotipo de las recombinantes de *A. vinelandii* *EΔalgD::Sp* con la sobreexpresión de *rsmZ1* y *rsmZ6*.

UW136



Fig. 20: Fenotipo de las recombinantes de *A. vinelandii* UW136 con la sobreexpresión de *rsmZ1* y *rsmZ6*.

Las cepas recombinantes sobre el fondo genético *EalgD* no muestran un cambio fenotípico significativo con respecto a la cepa control; se observa y se sugiere que la sobreexpresión de *rsmZ1* disminuye ligeramente la producción generando un cambio de color de origen desconocido y en *rsmZ6* la producción se mantiene igual (Figura 19). De igual manera, en las recombinantes *rsmZ1* y *rsmZ6* sobre el fondo genético de la cepa UW136, la sobreexpresión de estos pequeños RNAs no generó ningún cambio fenotípico relacionado con PHB al compararse con la cepa control sin la sobreexpresión (Figura 20).

Para verificar que hubiera o no un aumento en la producción de PHB se realizó la cuantificación de este polímero, pero solo en las recombinantes de la cepa *EΔalgD::Sp*. La determinación de proteína se hizo mediante el método de Lowry (1951) y el contenido de PHB se analizó mediante el método de Law y Slepecky (1961) que consiste en una técnica espectrofotométrica que se basa en la conversión del polímero a ácido crotónico mediante el uso de ácido sulfúrico concentrado y la aplicación de calor. El ácido crotónico producido se cuantifica por espectrofotometría UV a 235 nm.

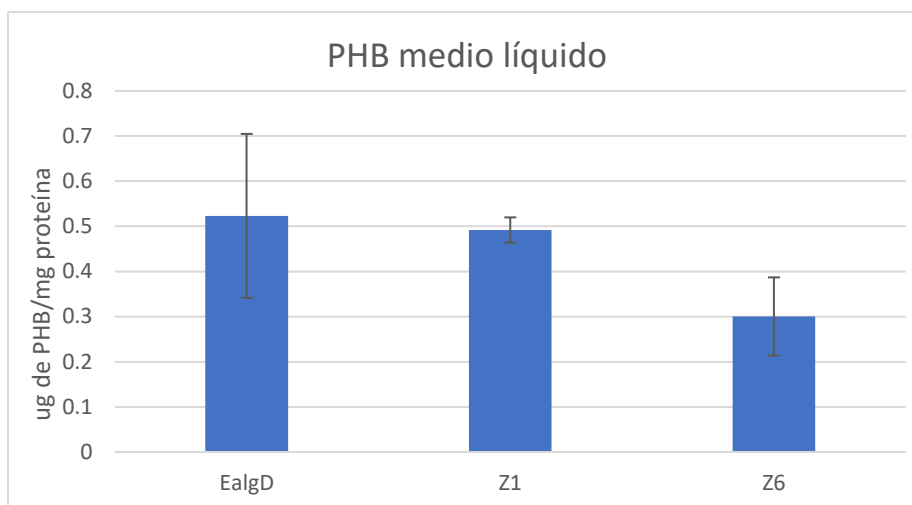


Fig. 21: Cuantificación de PHB en medio líquido PY sacarosa al 2% de la cepa *EalgD* control y las recombinantes Z1 y Z6.

De acuerdo con los resultados en los ensayos de cuantificación (Figuras 21), las cepas recombinantes no muestran una diferencia estadísticamente significativa en la producción de PHB si se comparan con la cepa control. Esto podría deberse a las condiciones en las cuales se generaron los experimentos, pues hay evidencia de que los sRNAs pueden expresarse en menor o mayor medida dependiendo la fuente de carbono utilizada (López-Pliego, et. al, 2018); además de que en el presente trabajo solo se tomaron dos sRNAs-Rsm, recordando que *A. vinelandii* cuenta con ocho y que probablemente los escogidos no tienen un mayor efecto; también podría ser que el sistema Rsm y los pequeños RNAs no son los elementos principales para establecer un mayor impacto en la producción del polímero, pues hay que recordar que hay más sistemas involucrados en la regulación de la síntesis de PHB.

7.2 MUTANTE DOBLE *pycA/rsmA*

7.2.1. Clonación y mutación del gen *pycA*

Se inició con la búsqueda de la secuencia del gen que codifica para la enzima piruvato carboxilasa (1637 pb) y a su vez, el diseño del par de oligonucleótidos para amplificarlo, resultando así los oligonucleótidos *pycAFw* y *pycARv* que generarían un amplicón de 1352 pb (Figura 22).

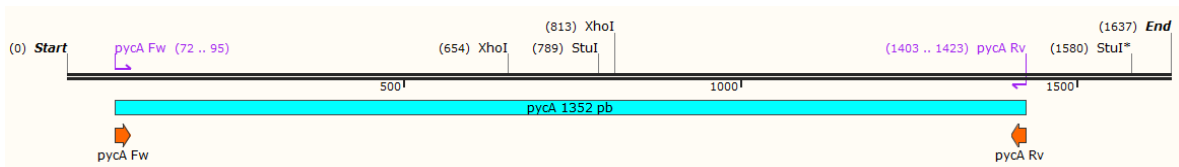


Fig. 22: Mapa físico del gen *pycA* y ubicación del par de primeros usados para su amplificación.

Se extrajo el DNA genómico de la cepa *EalgD*, y se preparó la reacción de PCR, que se probaría en distintas condiciones para elegir la que mejor condición de amplificación del gen *pycA*; encontrando que la condición más adecuada fue 68°C con dos minutos de extensión por 30 ciclos (Figura 23).

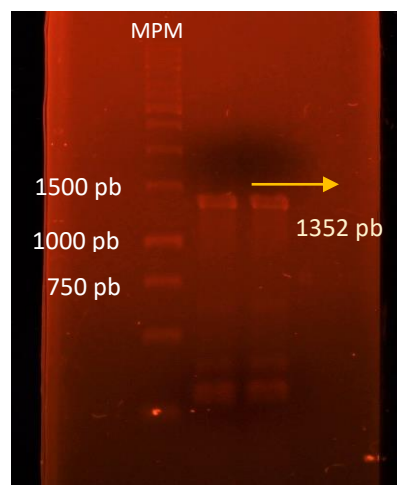


Fig. 23: Corrimiento electroforético del producto de la amplificación por PCR del gen *pycA*.

Como se observaron bandas inespecíficas, aunque en menor proporción, se cortó del gel de agarosa la banda que corresponde al peso predicho y se purificó para

después ligarlo al vector de clonación pJET2.0. El producto de la ligación se transformó en la cepa *E. coli* DH5 α . Para comprobar la clonación del gen, se seleccionaron algunas colonias candidatas y se extrajo el plásmido resultante (4326 pb), el cual se sometió a una reacción de restricción con la enzima *Xho*I, la cual nos daría tres fragmentos ya que el vector contiene dos sitios de corte de la enzima y el gen de interés cuenta con uno (Figura 24).

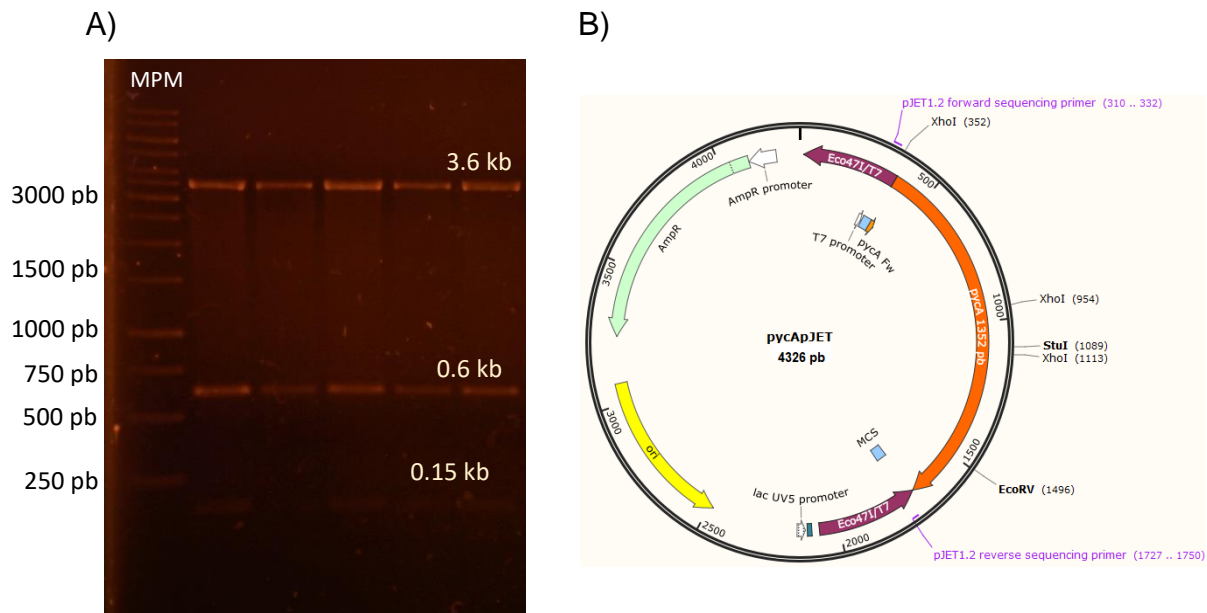
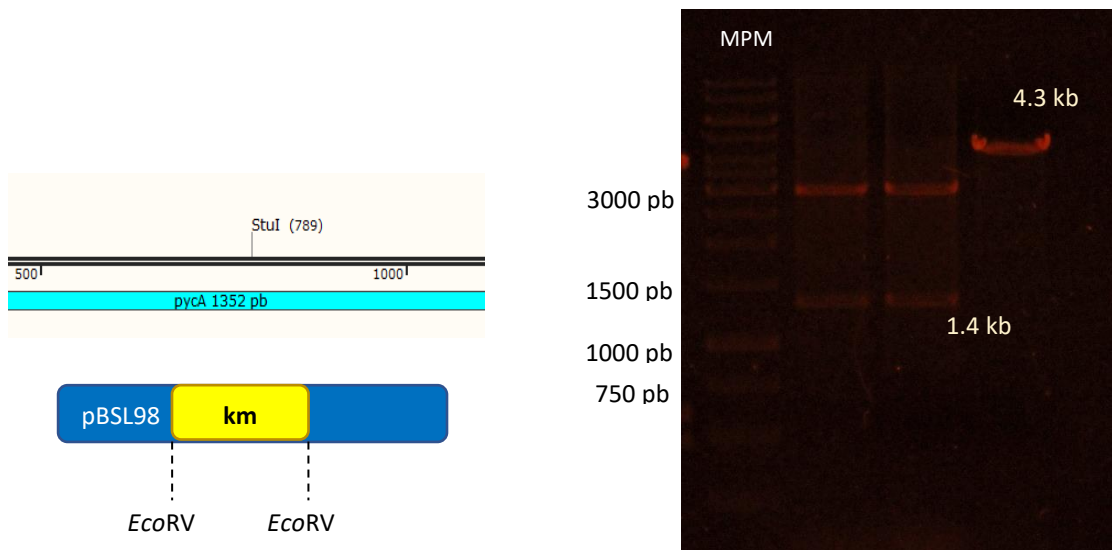


Fig. 24: A) Corrimiento electroforético de la digestión con *Xho*I de plásmidos candidatos para verificar la clonación del gen *pycA*. B) Esquema del vector clonado pJET*pycA*.

Para generar la mutación en el gen, primero se extrajo el DNA plasmídico del vector recién clonado pJET*pycA* y al mismo tiempo, el del plásmido pBSL98 que contiene el casete de resistencia kanamicina a utilizar. Ambos se sometieron a una reacción de restricción que generan extremos romos: Como el gen *pycA* contiene un sitio de corte para *Stu*I casi al centro, el vector pJET*pycA* fue linearizado con esta enzima (4.3 kb). El pBSL98 también se sometió a restricción enzimática, pero con la enzima *Eco*RV para liberar el casete de kanamicina (1.4 kb) (Figura 25).



A) Mapa de restricción *StuI* del gen *pycA* y *EcoRV* del gen de resistencia a Km clonado en el PBSL98. **B)** Corrimiento electroforético de las recciones de digestión del pBSL98 con *EcoRV* y del pJET*pycA* con *StuI*.

Posteriormente, se hizo la extracción del gel de agarosa de ambos fragmentos y se ligaron para después llevar a cabo la transformación con células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α . Se tomaron algunas clonas candidatas previamente seleccionadas en medio LB con kanamicina como antibiótico de selección y se extrajo el DNA plasmídico del nuevo plásmido al que se nombró como pJET*pycA*::Km. Para verificar esta inserción del casete se hizo una restricción enzimática al plásmido con la enzima *XhoI*. Se verificó la orientación de la inserción del casete conforme a los pesos mostrados en el gel de electroforesis: la inserción en sentido de la transcripción generó los fragmentos de 3.6 kb, 1225 pb, 600 y 100 pb; mientras que la inserción en contra sentido de la transcripción son de 3.6 kb, 1100 pb, 600 y 200 pb. Cabe mencionar que la banda menor es muy pequeña por lo cual no se alcanza a observar en el gel (Figura 26).

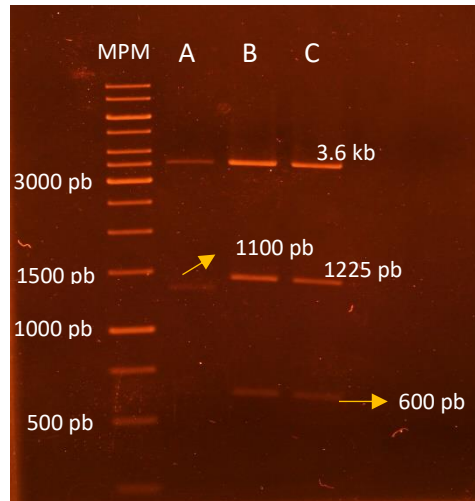


Fig. 26: Corrimiento electroforético del patrón de restricción con *XhoI* para verificar las clonas que presentan la mutación *pycA*. En el carril A se muestra la candidata con la inserción en contra sentido de la transcripción del gen, en B y C se muestran las clonas con la inserción en sentido.

7.2.2. Obtención de mutantes *pycA* en *A. vinelandii*

Una vez que se verificaron las clonas con la mutación en *pycA*, se procedió a transformar las cepas de *Azotobacter*. Para esto, se extrajo el DNA plasmídico por MaxiPrep. Este plásmido se mezcló con células competentes de la cepa *EalgD* y también de la cepa DJ. Las células transformantes se inocularon en placas con medio BS adicionado con el antibiótico de selección kanamicina, sin embargo, después de varios intentos no se obtuvieron transformantes por lo que se decidió cambiar el medio de selección BS a PY que es rico en nutrimentos. Fue así, que se lograron obtener candidatas. Estas se resembraron en el mismo medio y se les extrajo el DNA genómico para realizar la comprobación por PCR.

Para verificar las cepas con la mutación en *pycA*, se utilizó el mismo par de oligonucleótidos con los que se amplificó el gen, PycAFw y PycARv, solo que esta vez con una temperatura de alineamiento de 69.2°C y con un tiempo de extensión de dos minutos y medio (condiciones establecidas por una PCR en gradiente previamente hecha con los controles en ambas cepas), lo que nos dio un amplificado de 2,752 pb, que corresponde al peso del gen (1352 pb) más la inserción del casete de kanamicina (1400 pb) (Figura 27).

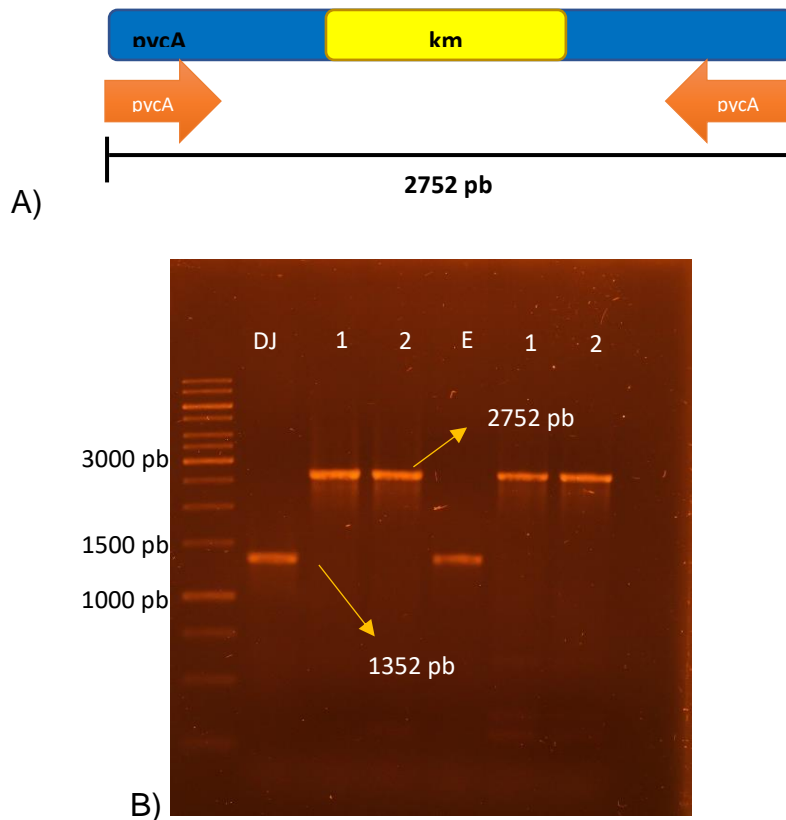


Fig. 27: A) Mapa de amplificación del gen *pycA* **B)** Corrimiento electroforético de la verificación por PCR de las mutantes *pycA*. En el primer carril se observa la banda correspondiente al control de la cepa DJ, después 1 y 2 corresponden a las mutantes en Dj, en el carril 3 se observa el control de la cepa E y los siguientes dos a las mutantes en la misma.

Una vez que se verificaron las mutantes, estas se nombraron *EpycA* y *DJpycA* y se procedió a sembrarlas nuevamente en ambos medios de cultivo, BS sacarosa y PY sacarosa, para comparar el crecimiento y comprobar que en el medio BS no son aptas para crecer como se intentó al momento de hacer la selección de candidatas. Esto sugiere que la enzima piruvato carboxilasa es la única que provee oxalacetato a la célula (Segura, 2004) y en contraste, la habilidad de crecer en el medio PY puede ser explicado por la presencia de intermediarios del ciclo de Krebs o por metabolitos derivado del mismo. Las condiciones de incubación fueron las mismas que en anterioridad, a una temperatura de 30° por dos días y como se había mencionado, hubo una gran diferencia de crecimiento; además de que el fenotipo

de las mutantes en el medio PY se mostró blanquecino y opaco, demostrando la producción del biopolímero de interés (Figura 28).

BS sacarosa

PY sacarosa

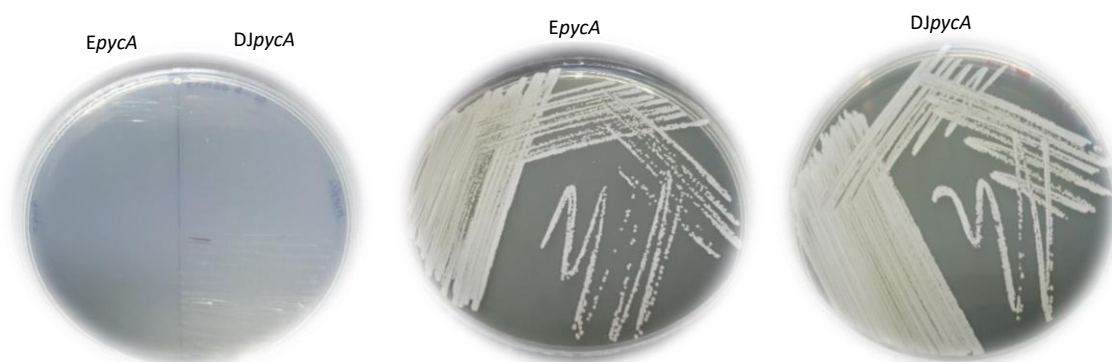


Fig. 28: Fenotipo de mutantes *EpycA* y *DJpycA* sembradas en el medio BS y PY.

7.2.3. Mutación en *rsmA*

Para hacer la mutante doble *pycArsmA*, se decidió intentar la mutagénesis de *rsmA* probando dos plásmidos previamente construidos en el laboratorio, el pUC19*rsmA*:: Ω Sm y el pGEM Δ *rsmA*::Km; ambos portan una mutación en el gen *rsmA*, en el primero se removió completamente el gen y en el segundo se removió el extremo carboxilo terminal del gen.

Se utilizaron dos plásmidos porque el equipo de trabajo del laboratorio estaba llevando a cabo un estudio en paralelo sobre el tipo de mutación generada en *rsmA*, su correspondiente efecto en la fisiología del microorganismo y su capacidad para producir los metabolitos secundarios como el alginato y el PHB; en este estudio, se enfocó al efecto producido en PHB.

Sin embargo, estos vectores no se podían utilizar tal cual por la incompatibilidad de marcadores. Ya que la cepa *EpycA* contiene el marcador de espectinomicina por la mutación generada previamente en *algD*, y la mutación en *pycA* se realizó con el casete de kanamicina. Por lo que se optó por cambiar el marcador de resistencia de

los vectores mutagénicos a utilizar por el de gentamicina, este casete se tomaría del vector pBSL141.

Para empezar, se sembraron en medio LB las cepas de *E. coli* que contienen los plásmidos mutagénicos para posteriormente extraerlos por perclorato. Después se hizo la digestión de cada plásmido para liberar los casetes correspondientes. En el vector pUCrsmA::ΩSm se liberó con la enzima *Sal*I el casete de 2kb que confiere resistencia a Sm, en el pGEMΔrsmAKm se usó *Hind*III para liberar el casete de Km de 1.4 kb. Para liberar el casete que confiere resistencia a Gm de 0.9 kb del pBSL141, este plásmido se digirió con ambas enzimas. Las enzimas se inactivaron después de su uso con EDTA (Figura 29).

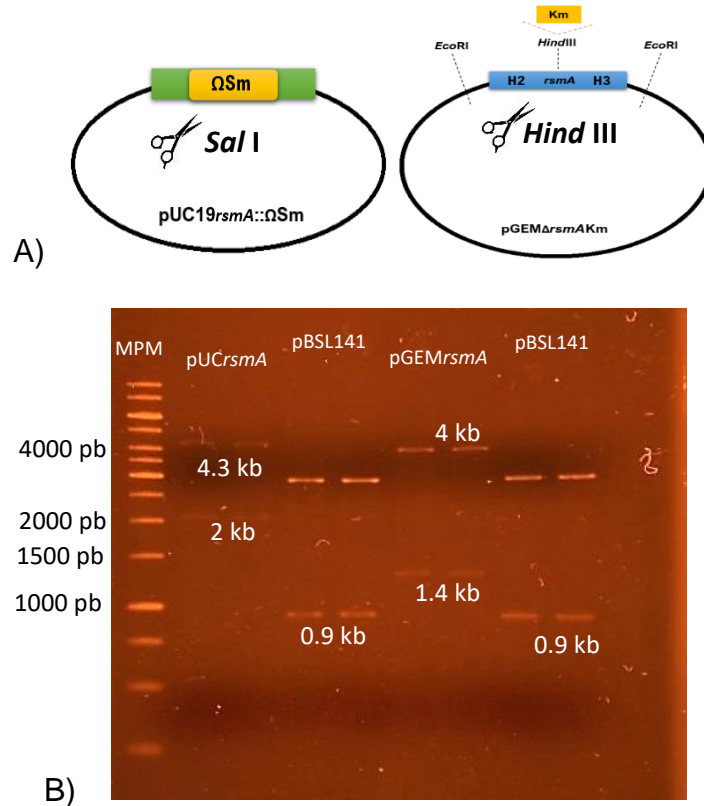


Fig. 29: A) Representación de plásmidos y su correspondiente enzima de corte. **B)** Corrimiento electroforético de la digestión de los plásmidos pUCrsmA (carril 1 y 2 después del marcador de peso molecular) y pBSL141 (carril 3 y 4) con la enzima *Sal*I, y digestión del pGEMrsmA (carril 5 y 6) y pBSL141 (carril 7 y 8) con la enzima *Hind*III.

Se hizo la extracción y purificación de banda del gel de agarosa de los vectores con sus respectivos casetes ya liberados y, la purificación de banda del casete de Gm. Después se hizo la reacción de ligación de ambos vectores con el casete de Gm para posteriormente realizar la transformación química en *E. coli* DH5 α . Se obtuvieron candidatas y se verificaron por medio de un patrón de restricción con las mismas enzimas utilizadas para liberar los casetes correspondientes (Figura 30).

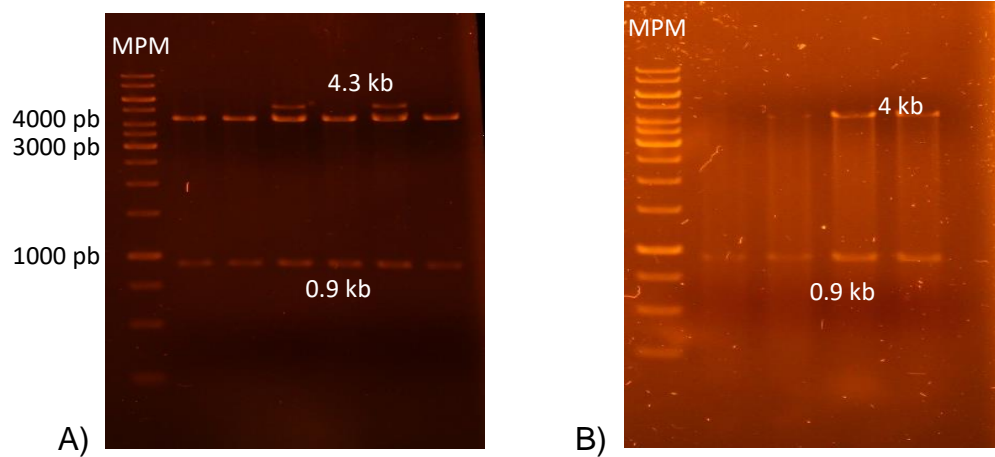


Fig. 30: A) Corrimiento electroforético de la digestión y comprobación del cambio de marcador de resistencia en las clonas candidatas del vector pUC19 Δ *rsmA*::Gm con la enzima *SalI* liberando el casete de gentamicina de 0.9 kb. B) Corrimiento electroforético de la digestión de las clonas candidatas del vector pGEM*rsmA* Δ CT::Gm con la enzima *HindIII* liberando el casete de gentamicina de 0.9 kb.

7.2.4. Obtención de mutantes dobles en *Azotobacter vinelandii*

Una vez que el cambio de casete fue comprobado, los plásmidos resultantes fueron nombrados pUC19 Δ *rsmA*::Gm y pGEM*rsmA* Δ CT::Gm, se tomó una clona de cada uno y se resguardaron. Estas cepas se sembraron de forma masiva para extraerles el plásmido por MaxiPrep y llevar a cabo la transformación con células competentes de las cepas *EpycA* y *DJpycA*; estas cepas previamente se sometieron a competencia en el medio CM, pero ahora con succinato como fuente de carbono, ya que, como se mencionó, las mutantes *pycA* no son capaces de crecer en un medio mínimo con glucosa como fuente de carbono.

Para corroborar que las células entraban en competencia y eran capaces de transformar con diferentes plásmidos, se utilizó como control la transformación del plásmido pGEM*retS*::Gm, del cual ya se conocía su eficiencia de transformación. Así que, también se hizo la extracción del DNA plasmídico pGEM*retS*::Gm.

Después de la transformación de las dos cepas con los tres plásmidos descritos, la selección de candidatas se llevó a cabo en el medio PY adicionado con sacarosa con el antibiótico de gentamicina como marcador de resistencia. A estas se les extrajo el DNA genómico y se procedió a realizar la reacción de PCR para comprobar la doble recombinación homóloga.

Para amplificar el locus *rsmA*, se utilizó el par de oligonucleótidos RsmAD y RsmAR con una temperatura de alineamiento de 58° C y con un tiempo de extensión de dos minutos, dando los siguientes amplificados: 1.8 kb para las mutantes generadas con el plásmido pUCΔ*rsmA*::Gm, tanto en cepa *EpycA* como en la *DJpycA*, (Figura 31, B), y de 1.9 kb para las mutante *EpycA* generadas con el plásmido pGEM*rsmA*ΔCT::Gm (Figura 31, A), su contraparte en la cepa DJ no se logró obtener. Con esta PCR se confirmó, la generación exitosa de las mutantes dobles sin presencia de copias del gen silvestre *rsmA*.

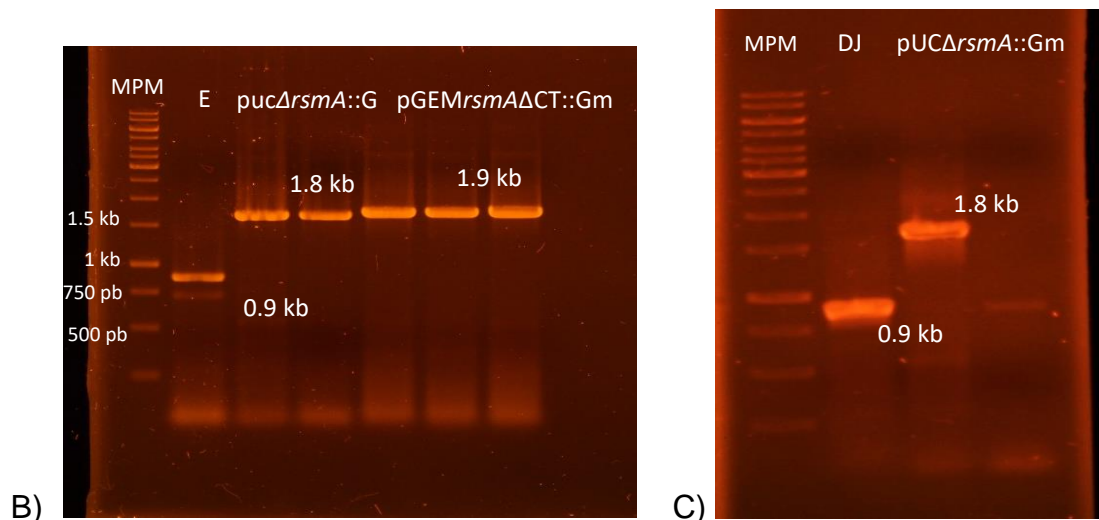


Fig. 31: A) Comprobación de la mutación en *rsmA* por PCR en las cepas *EpycA*. B) Comprobación de la mutación en *rsmA* por PCR en la cepa *DJpycA*.

Mientras que, para amplificar el plásmido control pGEM*retS*::Gm en la candidata obtenida, se utilizó el par de primers RetSD y RetSR, a una temperatura de alineamiento de 68°C con dos minutos y medio de tiempo de extensión, dando un amplificado de 1.92 kb; verificando así, el éxito de transformación en medio CM succinato (Figura 32).

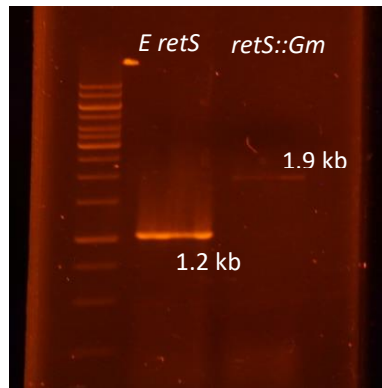


Fig. 32: Comprobación mediante PCR de la inserción del plásmido control pGEM*retS*::Gm en la cepa *EpycA*. En el primer carril se muestra el amplicón del gen *retS* y en el segundo, el gen mutado con el marcador de Gm.

Las mutantes dobles fueron sembradas en el medio PY con sacarosa por tres días para establecer el fenotipo relacionado a la producción de PHB. Las colonias de la cepa *DJpycAΔrsmA* se observan robustas, de un color ligeramente rosáceo, de rápido crecimiento y suaves al manipularlas, lo que dudosamente parece ser PHB; en comparación, las colonias de las cepas *EpycArsmAΔCT* y *EpycAΔrsmA* (Figura 33) se observan pequeñas, de menor crecimiento, blancas y rígidas al tocarlas, lo que sugiere la producción PHB.

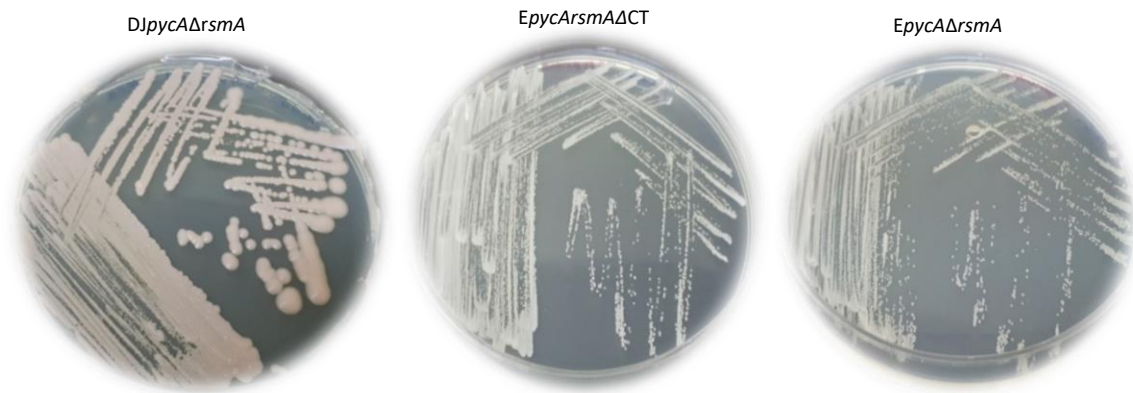


Fig. 33: Fenotipo de las mutantes dobles.

Al sembrar las mutantes dobles junto con la cepa parental *EalgD*, se observa que éstas son más opacas y blanquizcas, sugiriendo un cambio en la producción del polímero (Figura 34).

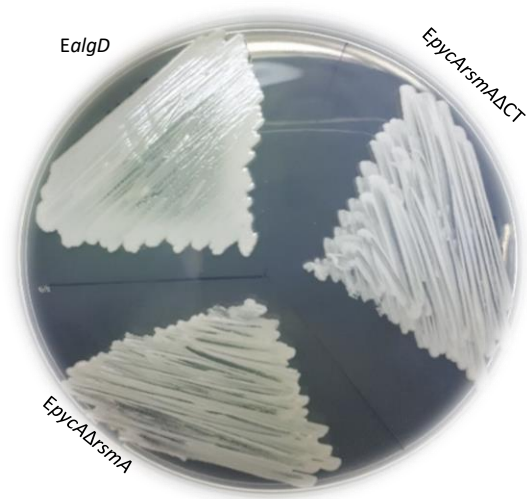


Fig. 34: Fenotipo de las mutantes dobles en comparación de la cepa silvestre *EalgD*.

7.2.5. Obtención de mutantes *rsmA*

A la vez que se comprobaban las mutantes dobles *pycArsmA* en *Azotobacter vinelandii*, se trabajaron también las cepas que serían utilizadas como control con la mutación en *rsmA* sobre el fondo genético de las cepas no productoras de alginato *EalgD* y DJ. Para esto, se intentó generar mutantes con los plásmidos utilizados en las mutantes dobles, sin embargo, no se lograron obtener candidatas para ambas cepas y las pocas que se obtenían al ser verificadas por PCR se amplificaba mayoritariamente el gen silvestre de *rsmA*, observándose pocas copias del alelo mutante. Debido a esto, se tomaron como control cepas que ya se habían generado en el laboratorio en fondos genéticos no productores de alginato, la única diferencia eran los marcadores de selección usados en la mutagénesis. Se eligieron las cepas H3Gm (*EalgDrsmA*ΔCT) y *ErsmA*Δ::Sm, se extrajo su DNA genómico y se procedió a comprobar la mutación en *rsmA* que portaban mediante una reacción de PCR como se ha descrito anteriormente. Al verificar la mutantes, se observó que las cepas tenían coexistiendo copias del gen silvestre con el gen mutante (Figura 35). Estas cepas merodiploides pueden ser explicadas por la poliploidía del genoma de *Azotobacter vinelandii*. Observando lo que se ha reportado en estudios anteriores (Cocotl Yañez, 2006 y Reyes Valencia, 2009) donde se reportó la dificultad de obtener mutantes nulas (completamente segregadas) del gen *rsmA* posiblemente por tener un papel vital en la fisiología del microorganismo. Es importante mencionar que tomando en cuenta lo presentado anteriormente en la verificación de las mutantes dobles (Figura 31), no se observaron en las condiciones probadas, copias del gen silvestre de *rsmA*, sugiriendo que la mutación en *pycA* mantiene estable o favorece la obtención de mutantes nulas en *rsmA*.

Aun presentando merodiploidia, en las mutantes *rsmA* se observa un fenotipo interesante, ya que las colonias se observan blancas, robustas y opacas, confirmando la producción del polibetahidroxibutirato; la diferencia de crecimiento entre ambas cepas podría deberse al número de copias del gen silvestre de *rsmA* presente en mayor o menor medida (Figura 36).

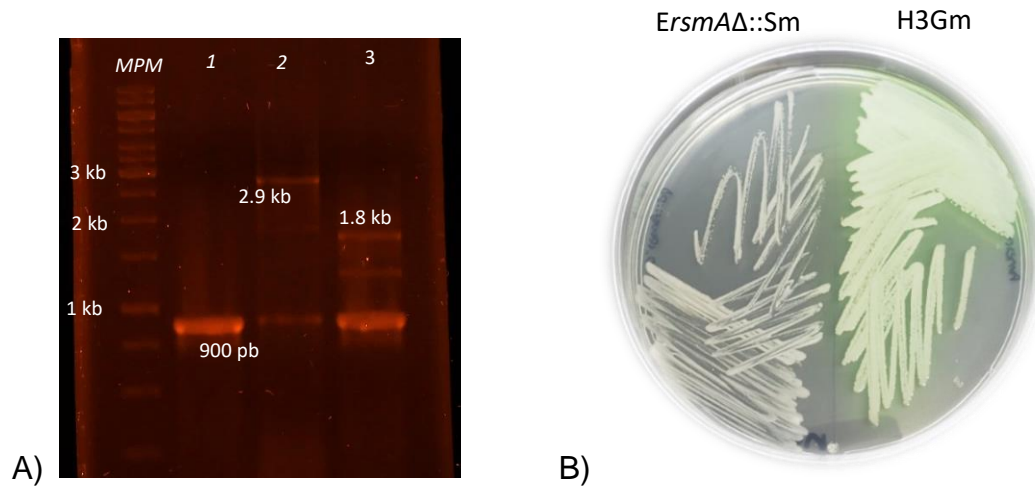


Fig. 35: A) Corrimiento electroforético para la verificación de las mutantes en *rsmA*. En el carril 1 se muestra el amplificado del gen *rsmA* (900 pb) en *EalgD*, en el siguiente carril se observa el gen silvestre de *rsmA* (900 pb) y el mutado con un casete de espectinomicina (2.9 kb) en *ErsmAΔ::Sm* y finalmente, se muestra también el gen silvestre de *rsmA* y el mutado con un casete de gentamicina (1.8 kb) en H3Gm. B) Crecimiento de las mutantes en *rsmA* sobre el medio PY sacarosa 2% por dos días.

Sin embargo, a pesar de observarse un fenotipo típico productor de PHB se decidió no cuantificar la producción del polímero, pues el hecho de que ambas cepas tengan coexistiendo copias silvestres del gen, las hace genéticamente inestables para generar un resultado reproducible o significativo.

7.2.6. Producción de PHB en las mutantes generadas

Una vez obtenidas las mutantes, se cuantificó en cada una de ellas la producción del polímero en medio sólido PY suplementado con sacarosa al 2%; de acuerdo con la metodología descrita por Lowry (1951) para proteínas y para PHB por Law y Slepecky (1961).

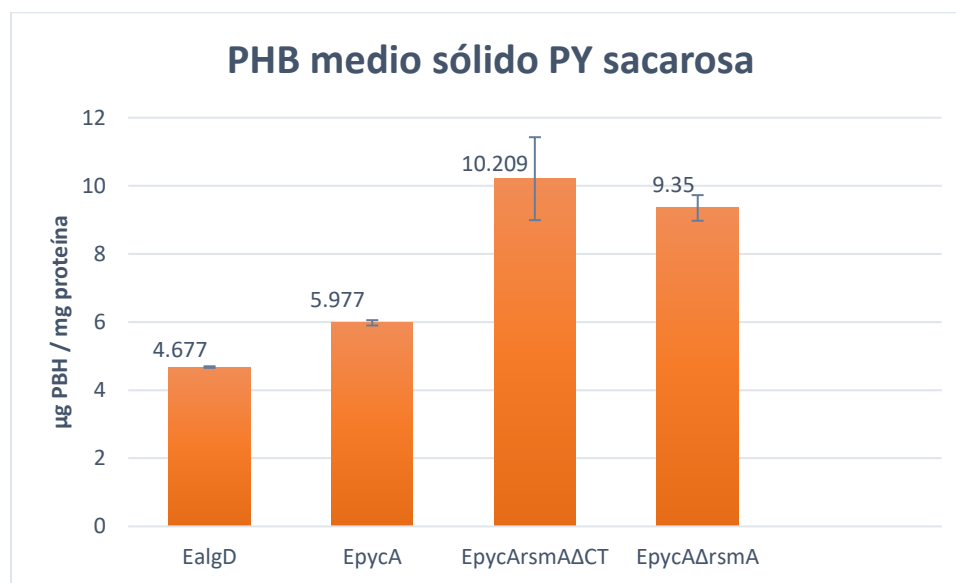


Fig. 36: Cuantificación de PHB en las mutantes generadas a partir de la cepa madre *EalgD*.

En la gráfica (Figura 37) se observa que en las mutantes dobles la producción de PHB es mayor, dos veces más, en comparación con la cepa silvestre *EalgD* y también hay aumento respecto a la mutante sencilla en *pycA*. Esto sugiere que sí existe una sinergia entre ambos reguladores negativos donde la cepa le da preferencia a la producción del polímero, el acetil-CoA se dirige hacia la síntesis de este, mientras que la proteína RsmA al estar inactiva favorece que los RNAs mensajeros necesarios para la síntesis del polímero estén libres para poder traducirse. Sin embargo, es importante mencionar que el crecimiento de estas cepas es más lento y las colonias son más pequeñas a comparación de las mutantes sencillas y la cepa silvestre, por lo que para fines de uso biotecnológico y producción

a mayor escala sería de interés estudiar diferentes condiciones de crecimiento en cuanto al medio de cultivo, a la fuente de carbono, concentraciones de oxígeno, etc.

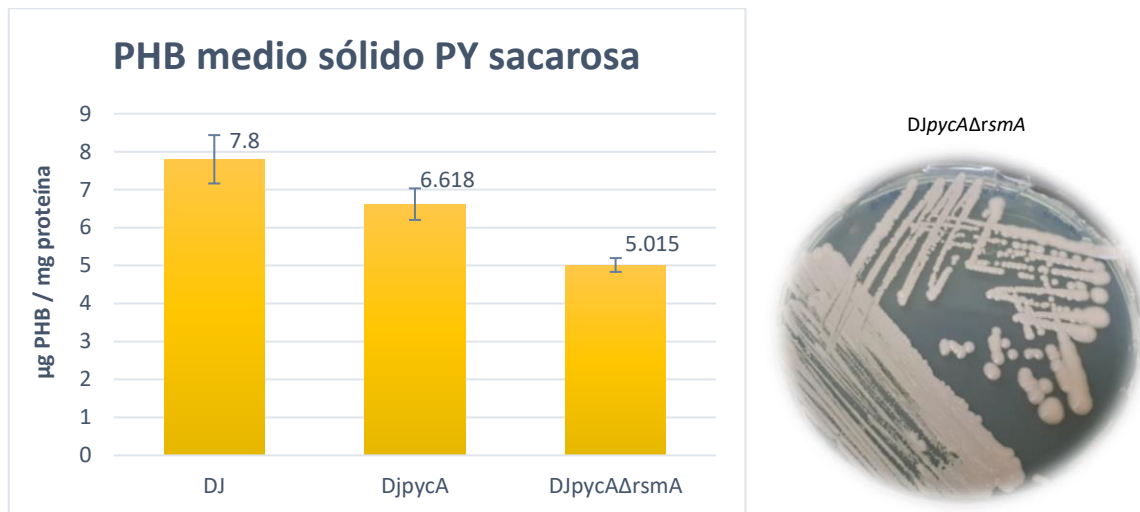


Fig. 37: Cuantificación de PHB en las mutantes generadas a partir de la cepa DJ.

En cuanto a la cepa DJ, con la mutación en la enzima piruvato carboxilasa no se tuvo el efecto esperado pues no hubo un aumento en la producción como fue reportado por Segura (2014); también se observa que contrario a la cepa E, la mutante doble *DJpycAΔrsmA* no aumenta la producción del polímero, sino que lo disminuye; sin embargo, el fenotipo de esta cepa se observa diferente al comúnmente expresado en cepas productoras de PHB, ya que las colonias no son duras sino suaves y el color no es blanco si no ligeramente rosa, sugiriendo que podría tratarse de algún otro compuesto que la bacteria está produciendo que por la coloración podrían ser carotenos.

7.2.7. Efecto de las fuentes de carbono sobre la producción de PHB:

Finalmente, para buscar aumentar aún más la producción de PHB en las mutantes generadas, recordando que el tipo de fuente de carbono y su presencia en exceso es un factor importante para generar una mayor producción de PHB. Se sembraron las mutantes en medio BS y medio PY sólido, suplementados con fuentes de carbono glucolíticas y gluconeogénicas: Succinato, Citrato de Sodio, Acetato de potasio, Malato, y Fructosa; incubadas a 30°C durante 5 días, registrando el crecimiento y fenotipo cada 24 horas.

Se observó que las cepas mutantes no fueron capaces de crecer ni de producir PHB en el medio BS con las diferentes fuentes de carbono (Fotos no mostradas), sugiriendo que en medio mínimo la piruvato carboxilasa es de vital importancia para la generación de oxalacetato y supervivencia del microorganismo.

Respecto al medio PY, las mutantes crecieron, pero no fueron capaces de producir PHB en presencia de las fuentes de carbono gluconeogénicas; de manera interesante, en presencia de fructosa en el medio, se observó que todas las cepas mostraron buen crecimiento y producción de PHB a los 2 días de incubación, siendo las mutantes dobles las que se observan más blancas y robustas (**Figura 39**). Lo cual sugiere que la fructosa podría ser una buena fuente de carbono para aumentar la producción del polímero que podría explicarse por la forma en que *A. vinelandii* asimila la fructosa.

PY Fructosa 5 días

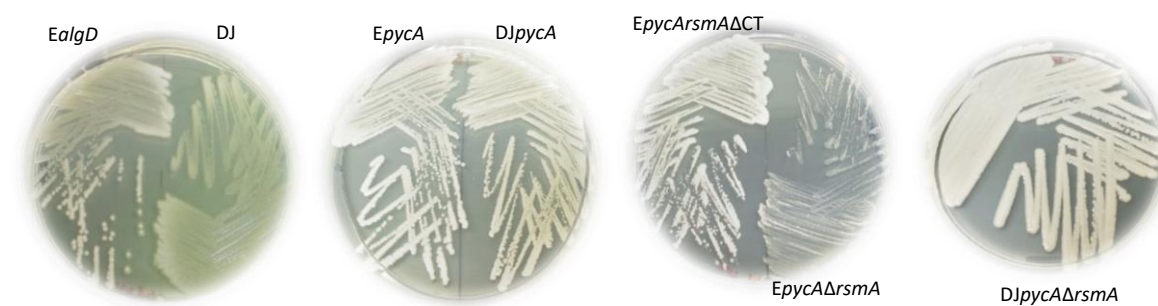


Fig. 38: Fenotipo de las cepas madres y mutantes crecidas en medio PY con fructosa.

8. DISCUSIÓN

La mayoría de las investigaciones previamente hechas sobre la producción de PHB en *A. vinelandii* han surgido a partir de la cepa UW136 (DJ), la cual no es capaz de producir alginato debido a una mutación generada natural causada por transposición en el gen *algU* que codifica para el factor sigma AlgU. En el presente trabajo se decidió utilizar esta cepa junto con otra no productora de alginato, derivada de la silvestre AEIV, generando una mutación en el gen *algD*, esencial biosintético en la vía de producción de alginato y no en un regulador transcripcional como lo es el factor sigma E (AlgU), teniendo así una cepa con un fondo genético más limpio, ya que no se está adicionando una mutación extra en un regulador que podría interferir en la realización e interpretación de resultados.

La razón de utilizar ambas cepas fue el hecho de que en el equipo de investigación se trabaja principalmente con la cepa AEIV y se tomó a la cepa DJ como referencia. La importancia de usar cepas no productoras de alginato radica en que diversos estudios proponen que el microorganismo y sus sistemas de regulación dan preferencia a la síntesis de alginato, antes que a la de PHB.

De acuerdo con los resultados presentados se observan diferencias en los fondos genéticos utilizados. Las mutaciones generadas en la cepa DJ, tanto en *pycA* como *pycArsmA*, presentan un efecto diferente a lo esperado. La mutante DJ*pycA* no generó un aumento en la producción de PHB como se había reportado con anterioridad por Segura y Espín (2004), esto podría deberse al tipo de mutación generada en este trabajo, las condiciones de crecimiento o al comportamiento atípico que puede presentar la cepa DJ por la convergencia de diversas mutaciones. En la mutante doble *pycArsmA* tampoco hay un aumento en la producción de PHB con los dos reguladores negativos presentados, al contrario, parece que hay una disminución en la producción del polímero, además la cepa muestra un color ligeramente naranja o rosa; esto puede ser explicado por las mutaciones ya generadas en la cepa, ya que no se comprende completamente cómo se relacionan estas con el regulador transcripcional previamente mutado. El cambio de color en la mutante podría tratarse de una producción de carotenos o de algún otro pigmento,

pues en cepas de *Azotobacter chroococcum* se ha reportado que puede producir pigmentos grises, negros, marrones, etc. donde se han observado colonias de color amarillo o marrón, que podrían deberse al menos a melaninas y carotenos, estos últimos generalmente son reconocidos como oxidantes y pueden tener un papel en la minimización del estrés oxidativo (Robson L., et. al, 2015).

Un punto de gran interés en las mutantes dobles *pycArsmA* tanto en la cepa DJ como en la *EalgD*, es el hecho de que ambas no presentan copias del alelo silvestre del gen *rsmA*. Como se mencionó anteriormente, es casi imposible obtener mutantes nulas donde el gen esté completamente segregado debido a la importancia fisiológica que este gen tiene, sin embargo, de manera interesante la mutación en la piruvato carboxilasa genera las condiciones ideales tal vez a nivel del metabolismo central, para compensar el efecto negativo de *rsmA* sobre la fisiología del microorganismo. Sería interesante estudiar la regulación de múltiples blancos de RsmA para entender la función que juega, no solo en el sistema de regulación GacS/GacA si no en general sobre la fisiología de *A. vinelandii*.

Por otra parte, los resultados obtenidos en la cepa parental *EalgD* fueron los esperados, lo que sugiere que la mutación en el gen *algD* y no en un regulador transcripcional como el factor sigma E, generan una cepa más estable genéticamente para estos fines.

De acuerdo con los datos, se puede afirmar que tanto RsmA como la enzima piruvato carboxilasa, tienen un efecto negativo en la síntesis del polímero y que, al mutar ambos genes en una misma cepa se observa la actuación sinérgica para que la producción del metabolito aumente; lo cual, podría ser explicado parcialmente a que la mutación en *pycA* aumenta la concentración del acetil-coA. Por otra parte, en *P. fluorescens* Takeuchi y colaboradores (2009) han reportado que mutaciones en *pycA* disminuye la expresión de los pequeños RNAs Rsm así como las concentraciones de algunos intermediarios del ciclo de Krebs, hecho que indirectamente promovería también la acumulación de acetil-CoA. Suponiendo que algo similar ocurra en *A. vinelandii* la disminución de los sRNAs Rsm podría compensarse por la ausencia de RsmA en la doble mutante. En otras palabras, en

la mutante doble la mutación en *rsmA* disminuiría el efecto negativo que podría ejercer la mutación *pycA* sobre la expresión de los pequeños RNAs, quedando únicamente el efecto de la mutación *pycA* sobre la acumulación de acetil-CoA. Al mismo tiempo, al ya no estar presente RsmA el ARN mensajero de *phbR* (así como los de los genes biosintéticos del operón) se traducen libremente.

En *P. fluorescens* también se reportó que en la mutante *pycA* se altera la expresión de los sRNAs de la familia Rsm cuando se crecen en intermediarios del ciclo de Krebs (como succinato y malato) como fuente de carbono, lo que a su vez afecta la síntesis de metabolitos secundarios. Para determinar si esto sucede en *A. vinelandii* sería interesante medir la expresión de los sRNAs en la mutante *pycA* crecidas en diferentes fuentes de carbono glucolíticas y gluconeogénicas; la expresión se podría hacer a través de fusiones transcripcionales *gusA* previamente construidas en el laboratorio donde se cuantifica la expresión mediante la actividad de la β -glucuronidasa; si la medición de la expresión se realiza sobre diferentes fuentes de carbono, nos podría aclarar en qué condiciones los sRNAs se expresan y actúan mejor sobre la proteína represora y también, si hay una relación directa de estos bajo la mutación de *pycA* sobre la producción de PHB. Por otra parte, en *A. vinelandii* se ha reportado la influencia de diferentes fuentes de carbono (glucolíticas y gluconeogénicas) sobre la expresión de los sRNAs, donde el succinato y fructosa parecen ser las fuentes de carbono que favorecen la expresión de los sRNAs, sin embargo, cuantificaciones de alginato en mutantes sRNAs-*rsm* crecidas en estas fuentes de carbono no muestran un efecto en la producción del polímero, lo que sugiere la existencia de factores adicionales que afectan su impacto en la producción de alginato (López-Pliego, et al., 2018).

Otra línea de estudio que podría generar conocimiento sobre el efecto de los sRNAs en *A. vinelandii* y PHB, sería sobreexpresar cada uno o en conjunto los sRNAs Rsm's en la mutante *pycA* para contrarrestar el efecto negativo que se sugiere tiene *pycA* sobre los pequeños RNAs, pues se esperaría que hubiera un aumento en la producción del polímero, y no solo por la mutación en *pycA* y su efecto metabólico con el acetil-coA. El efecto podría observarse de manera similar a la mutante doble

pycArsmA, pues así como RsmA no está presente para secuestrar a los RNAs mensajeros, el sobreexpresar los sRNAs podría inactivar completamente a la proteína RsmA que está presente; sin embargo, de acuerdo a los primeros resultados presentados en este trabajo donde se sobre-expresaron los RsmZ1 y RsmZ6 sRNAs para medir la producción de PHB, no se observó un efecto significativo, pues se sugiere que los sRNAs por sí solos no tienen gran presencia en la síntesis del polímero y que no son el principal actor del sistema Rsm para afectar la producción del polímero.

Con referencia a la importancia que tiene la fuente de carbono sobre la expresión de los sRNAs, sería interesante medir y comparar directamente la producción del polímero de las mutantes generadas crecidas en fuentes de carbono diferentes para encontrar las condiciones en las que las cepa podría aumentar la síntesis de PHB. Lo anterior podría ser parte de una estrategia para evaluar y escalar la producción para el posible desarrollo de un bioproceso atractivo con potencial de ampliación. La única fuente de carbono que presentó resultados interesantes fue la fructosa (en medio PY), observándose un rápido crecimiento y con un fenotipo más blanquecino evidenciando una buena producción de PHB, incluso a comparación de las cepas comúnmente crecidas en el medio con sacarosa; esto podría deberse al hecho de que *A. vinelandii* asimila de manera diferente estos dos azúcares, pues la glucosa es oxidada a través de la vía Entner-Doudoroff mientras que la fructosa se asimila a través del sistema PTS^{fru}, que tras su conversión en fructosa 1-6 bifosfato sigue la vía glucolítica Emben-Meyerhof; pues se ha encontrado la presencia de los genes *fruA*, *fruB* y *fruK* en el genoma del microorganismo (López-Pliego, 2018). Relacionado con este sistema, se encuentra el sistema PTS^{Ntr} que suele tener funciones reguladoras de metabolitos secundarios, en el caso de *A. vinelandii*, el sistema PTS^{Ntr} se ha visto relacionado con la producción de PHB y Alquiresorcinoles.

Finalmente, esto nos plantea que aún hace falta relacionar más puntos de control de cada sistema de regulación que está involucrado en la síntesis de PHB; pues, aunque el sistema Rsm es de gran importancia en *A. vinelandii*, parece que la

regulación es diferencial para la producción de alginato y PHB, por lo que es necesario ampliar la investigación.

9. CONCLUSIONES

- La sobreexpresión de los sRNAs Z1 y Z6 Rsm's no generan un cambio en la producción de PHB, sugiriendo que no están involucrados de manera directa en la cascada de regulación.
- Las mutaciones en la enzima piruvato carboxilasa y en la proteína represora RsmA, actúan sinérgicamente para que la producción de PHB aumente considerablemente en el fondo genético *EalgD*.
- La mutación en la *pycA* genera las condiciones adecuadas para obtener mutantes nulas en el gen *rsmA*.
- Utilizar fructosa como fuente de carbono en medio PY podría mejorar el crecimiento y la producción de PHB en las mutantes generadas.

10. REFERENCIAS

1. Alexeyev, M. F., Shokolenko, I. N. y Croughan, T. P. (1995). Improved antibiotic-resistance gene cassettes and omega elements for *Escherichia coli* vector construction and in vitro deletion/insertion mutagenesis. *Gene*. 63-67.
2. Babitzke, P. y Romeo, T. (2007). CsrB sRNA family: sequestration of RNA-binding regulatory proteins. *Current Opinion in Microbiology*. 156-163.
3. Castañeda, M., Guzmán, J., Moreno, S. y Espín, G. (2000). The GacS Sensor Kinase Regulates Alginate and Poly-bHydroxybutyrate Production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*. 2624-2628.
4. Castañeda, M., Sánchez, J., Moreno, S., Núñez, C. y Espín, G., (2001). The Global Regulators GacA and σ^S Form Part of a Cascade That Controls Alginate Production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*. 6787-6793.
5. Cocotl-Yañez, M., Sampieri, A., Moreno, S., Núñez, C., Castañeda, M., Segura, D. y Espín, G. (2011). Roles of RpoS and PsrA in cyst formation and alkylresorcinol synthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology* 157, 1685–1693
6. Gao, R. y Stock, A. (2009). Biological insights from structures of two-component proteins. *Annu Rev Microbiol*, 133-154.
7. González, G., Meza, J. C., González, O., Córdova, J. A. (2013). Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: Plásticos de origen microbiano. *Rev. Int. Contam. Ambie.* 29 (1) 77-115.
8. Heeb, S. y 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.
9. Hendrick, J. (2006). The Family *Azotobacteraceae*. En M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K. H. Schleifer, & E. Stackebrandt, *The Prokaryotes*. 759-770.

10. Hernández-Eligio, A., Moreno, S., Castellanos, M., Castañeda, M., Núñez, C., Muriel-Millan, L. F. y Espín, G. (2011). RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology*. 1953-1963.
11. Hitchins, V. M y Sadoff, L. H., (1970). Morphogenesis of Cysts in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*. 492 – 498.
12. Jensen, H. L. (1954). *The Azotobacteriaceae*. Department of bacteriology, state laboratory of plant culture, Lyngby, Denmark. 195-214.
13. Lapouge, K., Schubert, M. F., y Haas, T. A. (2007). Gac/Rsm signal transduction pathway of γ -proteobacteria: from RNA recognition to regulation of social behaviour. *Molecular microbiology*, 241-253.
14. Law, J. H. y Slepecky, R. A. (1961). Assay of poly- β -hydroxybutyric acid. *J. Bacteriol.* 33–36.
15. López, L. (2018). Estudio del sistema rsm en *Azotobacter vinelandii* (Tesis doctoral). Centro de investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
16. López-Pliego, L., García Ramírez, L., Cruz-Gómez, E. A., Domínguez-Ojeda, P., López-Pastrana, A., Fuentes-Ramirez, L. E., Nuñez, C. y Castañeda, M. (2018). Transcriptional Study of the RsmZ-sRNAs and Their Relationship to the Biosynthesis of Alginate and Alkylresorcinols in *Azotobacter vinelandii*. *Molecular Biotechnology*.
17. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, (193), 265–275.
18. May, Compañ, G. F., (2016). Estudio del efecto de la sobreexpresión de los pequeños RNAs reguladores de la familia Rsm en la producción de alginato.

- (Tesis de maestría). Centro de investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
19. Morales, I. Paulina. (Septiembre de 2013). Generación y caracterización de mutantes rsmA en *Azotobacter vinelandii*. (Tesis de Maestría). Centro de investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Instituto de Ciencias. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México.
 20. Noar J. D. y Bruno-Bárcena J. M., (2018). *Azotobacter vinelandii*: the source of 100 years of discoveries and many more to come. *Microbiology*, (166), 421-436.
 21. Noguez, R., Segura, D., Moreno, S. (2008). Enzyme INtr, NPr and IANtr are involved in regulation of the poly- β -hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 244–54
 22. Peralta-Gil, M., Segura, D., Guzmán, J., Servín-González, L. y Espín, G. (2002). Expression of the *Azotobacter vinelandii* Poly- β -Hydroxybutyrate Biosynthetic phbBAC Operon Is Driven by Two Overlapping Promoters and Is Dependent on the Transcriptional Activator PhbR. *Journal of Bacteriology*. 5672-5677.
 23. Peralta-Gil, M., Segura, D., Guzmán, J., Servín-González, L. y Espín, G. (2002). Expression of the *Azotobacter vinelandii* Poly- β -Hydroxybutyrate Biosynthetic phbBAC Operon Is Driven by Two Overlapping Promoters and Is Dependent on the Transcriptional Activator PhbR. *Journal of Bacteriology*, 184, (20), 5672-5677.
 24. Pflüger-Grau, K. y Boris, G. (2010). Regulatory roles of the bacterial nitrogen-related phosphotransferase system. *Trends in Microbiology*, 18, (5).
 25. Punita, J., S., Reddy, M., y Das, H. (1989). Multiple Chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology*, 3133-3138.

26. Robson, R. L., Jones, R., Robson, R. M., Schwartz, A., Richardson, T. H. (2015). Azotobacter Genomes: The Genome of *Azotobacter chroococcum* NCIMB 8003 (ATCC 4412). *PLoS ONE*. 10 (6)
27. Romeo, T., Vakulskas, C. A. y Babitzke, P. (2013). Post-transcriptional regulation on a global scale: form and function of Csr/Rsm systems. *Environmental Microbiology*. 313-324.
28. Romero, Y., Peña, C., Rojas, A., Tortajada, M., Espín, G. y Segura, D. (2014). A polyhydroxybutyrate producing mutant of *Azotobacter vinelandii* lacking the regulatory proteins RsmA and Enzyme IIA^{Ntr} utilizes the carbon source more efficiently. *Bioplastics*. 23-31.
29. Sadoff, L. Harold. (1975). Encystment and Germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriological Reviews*. 516-539.
30. Sandercock, J. R. y Page, W. J. (2008). RpoS expression and the general stress response in *Azotobacter vinelandii* during carbon and nitrogen diauxic shifts. *J Bacteriol* 190, 946–953
31. Segura, D. y Espín, G. (2004). Inactivation of *pycA*, encoding pyruvate carboxylase activity, increases poly-β-hydroxybutyrate accumulation in *Azotobacter vinelandii* on solid medium. *Appl microbiol biotechnol*. (65), 414-418.
32. Segura, D.; Noguez, R. y Espín, G. (2007). Contaminación ambiental y bacterias productoras de plásticos biodegradables. *Biotecnología*, 14, 361-371. Obtenido de http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/libro_25_aniv/capitulo_31.pdf
33. Senior, J. P. y Dawes, E. A. (1973). The Regulation of Poly-P-hydroxybutyrate Metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem j*. (134), 225-238.
34. Setubal, J. C., dos Santos, P., Goldman, B. S., Ertesva g, H., Espín, G., Rubio, L. M., Valla, S., Almeida, N. F.,... Balasubramanian, D. (2009). Genome

- sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *J Bacteriol* 191, 4534–4545.
35. Takeuchi, K., Kiefer, P., Reimann, C., Keel, C., Dubuis, C., Rolli, J., Vorholt, J. A., Haas, D. (2009). Small RNA-dependent Expression of Secondary Metabolism Is Controlled by Krebs Cycle Function in *Pseudomonas fluorescens*. *The journal of biological chemistry*, 284, (50), 34976-34985.
36. Trejo, A., Moreno, S., Cocotl-Yañez, M. y Espín, G., (2017). GacA regulates the PTS^{Ntr}-dependent control of cyst formation in *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiology Letters*, 364.