



ESTUDIO SOBRE EL MECANISMO DE CONTROL DE LA PRODUCCIÓN DE POLIÉSTERES POR EL SISTEMA PTS DE NITRÓGENO (PTS^{Ntr}) EN *Azotobacter vinelandii*.

Alberto Hernández, Raúl Noguez, Daniel Segura y Guadalupe Espín.

Instituto de Biotecnología UNAM. Av. Universidad 2001, Chamilpa, Cuernavaca Mor. Méx. alherel@ibt.unam.mx

Palabras clave: Plásticos biodegradables, fosfotransferasa de azúcares, proteína IIA^{Ntr}.

Introducción. Los polihidroxicanoatos (PHAs) son poliésteres naturales producidos por bacterias como material de reserva. Estos polímeros tienen aplicación industrial en la producción de plásticos biodegradables. Recientemente, en nuestro laboratorio se encontró que en *Azotobacter vinelandii*, una bacteria productora de PHAs, el Sistema de Fosfotransferasa de nitrógeno (PTS^{Ntr}) controla la biosíntesis de PHAs. Una mutación en el gen *ptsP* (que codifica para la proteína EI^{Ntr}, primer componente del sistema) abate la producción de PHAs. De manera similar, una mutación en el gen *ptsO* (Npr, segunda proteína del sistema) también disminuye la síntesis de PHAs. Sin embargo, la inactivación del gen *ptsN* (IIA^{Ntr}, última proteína del sistema) aumenta considerablemente la producción de estos polímeros. En *A. vinelandii* los genes que participan en la biosíntesis de PHB se encuentran organizados en el operón *phbBAC*, el cual es activado transcripcionalmente por la proteína PhbR (1). Resultados de experimentos de protección a nucleasas S-1 en las cepas mutantes del sistema PTS^{Ntr} sugerían que la proteína IIA^{Ntr} en su forma no fosforilada controla la producción de PHAs regulando la transcripción de los genes *phbBAC* (2). Cabe señalar, que la proteína IIA^{Ntr} no presenta sitios de unión a ADN, por lo que su efecto podría darse a través de intermediarios.

Dado lo anterior, los objetivos de este trabajo fueron: Determinar a qué nivel se da el control de la producción de PHAs por el sistema PTS^{Ntr} e identificar posibles intermediarios adicionales en esta regulación.

Metodología. Se llevaron a cabo experimentos de RT-PCR tiempo real para cuantificar el efecto de las mutaciones de los genes del sistema PTS^{Ntr} (*ptsP*, *ptsO* y *ptsN*) sobre la transcripción del gen *phbR* y del operón *phbBAC*. Adicionalmente, se clonaron los genes *ptsN* y *ptsN* H/A (conteniendo una mutación puntual que cambia el codón que codifica para el aminoácido histidina propuesto de fosforilación, por el aminoácido alanina que no se fosforila) en el vector de expresión pET24a. Los plásmidos resultantes se usaron para complementar una mutante *ptsN* de *A. vinelandii* y evaluar el efecto del estado de fosforilación de la proteína IIA^{Ntr} sobre la biosíntesis de PHAs. También se usaron para realizar experimentos de interacción *in-vitro* de proteínas con el sistema Pull-Down (Pierce).

Resultados y discusión. Los experimentos de RT-PCR tiempo real mostraron que el sistema PTS^{Ntr} controla la transcripción de los genes *phbBAC*. Al menos parte de esta regulación se da a través del control de la expresión de PhbR, ya que la transcripción de *phbR* también se vio afectada (fig.1). También sugieren que la proteína IIA^{Ntr} en su estado

no fosforilado ejerce un efecto negativo sobre la biosíntesis de PHB.

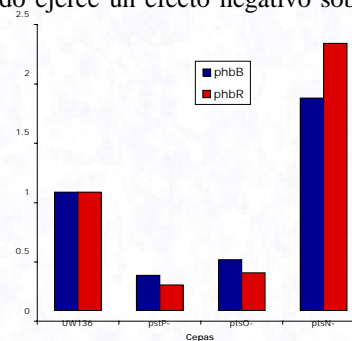


Fig. 1 Expresión de los genes *phbR* y *phbB* en las cepas mutantes del sistema PTS^{Ntr}.

Al expresar la proteína IIA^{Ntr} no fosforilable en *A. vinelandii* (UW74) y cuantificar la acumulación de PHB se comprobó que la proteína IIA^{Ntr} en su estado no fosforilado ejerce un efecto negativo sobre la biosíntesis de PHB (fig. 2).

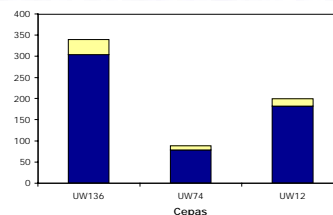


Fig. 2 Cuantificación de PHB en las cepas con la variante de la proteína IIA^{Ntr} no fosforilable.

Por último, los resultados de los experimentos de interacción *in-vitro* de proteínas revelaron a las proteínas enoil-CoA hidratasa/isomerasa y 4-aminobutirato aminotransferasa como posibles blancos de interacción con la proteína IIA^{Ntr} no fosforilada.

Conclusiones. 1.-En *A. vinelandii* el sistema PTS^{Ntr} controla a nivel transcripcional la expresión de los genes *phbR* y *phbB*. 2.-La proteína IIA^{Ntr} no fosforilada ejerce un efecto negativo sobre la biosíntesis de PHB. 3.-Las proteínas enoil-CoA hidratasa/isomerasa y 4-aminobutirato aminotransferasa son posibles blancos de interacción con la proteína IIA^{Ntr} no fosforilada.

Agradecimiento. A. Hernández por la beca CONACyT

Bibliografía.

- Peralta-Gil, M., Segura, D., Gúzman, 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 transcriptional activator phbR. *J. Bac.* 184(29):5672-5677.
- Noguez, R., Moreno, S., Segura, D., Hernandez, A., Juarez, K. and Espín, G. (2007). Genetic characterization of the *Azotobacter vinelandii* nitrogen-related phosphotransferase system (PTS-Ntr) and its role in regulating transcription of the polyhydroxybutyrate *phbBAC* biosynthetic operon. Publicación aceptada.