



Ministerio
de Educación
y Cultura



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY

Estudio del metabolismo de D-xilosa y su regulación en *Herbaspirillum* *seropedicae* Z69

Ana Karen Malán Courdin

Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas
PEDECIBA-Biología, Facultad de Ciencias
Universidad de la República

Montevideo – Uruguay
Marzo de 2023



Ministerio
de Educación
y Cultura



UNIVERSIDAD
DE LA REPUBLICA
URUGUAY

Estudio del metabolismo de D-xilosa y su regulación en *Herbaspirillum* *seropedicae* Z69

Ana Karen Malán Courdin

Tesis de Doctorado presentada al Programa de
Posgrado en Ciencias Biológicas, PEDECIBA-
Biología de la Universidad de la República, como
parte de los requisitos necesarios para la obtención
del título de Doctor en Ciencias Biológicas.

Director:

Dra. Silvia Batista

Codirector:

Dra. Susana Castro Sowinski

Montevideo – Uruguay

Marzo de 2023

Malán Courdin, Ana Karen

Estudio del metabolismo de D-xilosa y su regulación en *Herbaspirillum seropedicae* Z69 / Ana Karen Malán Courdin. - Montevideo: Universidad de la República, PEDECIBA-Biología, Facultad de Ciencias, 2023.

XIX, 135 p.: il.; 29, 7cm.

Director:

Silvia Batista

Codirector:

Susana Castro Sowinski

Tesis de Doctorado – Universidad de la República, Programa en Ciencias Biológicas, 2023.

Referencias bibliográficas: p. 102 – 111.

1. rutas no fosforilativas, 2. L-arabinosa, 3. *mhpD*, 4. *araB*, 5. *xylR*. I. Batista, Silvia, *et al.* II. Universidad de la República, Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas. III. Título.

INTEGRANTES DEL TRIBUNAL DE DEFENSA DE TESIS

Dra. Cora Chalar

Dra. Ana Ramón

Dra. Sonia Rodríguez

Montevideo – Uruguay

Marzo de 2023

A Agustín Malán (QEPD
23/3/23)

Agradecimientos

Quisiera agradecer especialmente a la Dra. Silvia Batista, por darme la oportunidad de realizar mi doctorado y toda mi carrera académica a su lado, por enseñarme todo, y por darme todo su apoyo, incluso más allá del trabajo.

También quiero agradecer a la Dra. Susana Castro-Sowinski por ser mi co-orientadora, por abrirme las puertas de su laboratorio y por enseñarme todo lo que me ha enseñado en este tiempo.

Por otro lado, quiero agradecer al Profesor Dr. Emmanuel de Souza, del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Federal de Paraná, en Curitiba, Brasil, por recibirme en una pasantía que fue muy importante para esta tesis. Y a la Dra. Thalita Tuleski por acompañarme en mi pasaje por este laboratorio, por su orientación en los experimentos de RNA-seq y en el análisis de datos, así como también por su trabajo en la construcción de las bibliotecas y secuenciación. También quiero agradecer a Helba Cirino por ayudarme a ensamblar el genoma de *H. seropedicae* Z69 y a los técnicos de secuenciación del departamento. Finalmente, quiero agradecer a mis amigos de la casa 4 que hicieron mi estadía en Curitiba más llevadera.

También quiero agradecerle a la Dra. Ana Inés Catalán, quien fue mi co-tutora de grado y maestría, por haberme abierto las puertas del laboratorio, por haberme enseñado a trabajar en la mesada y haberme acompañado todos estos años.

También le quiero agradecer especialmente a la gente del laboratorio de Microbiología Molecular del IIBCE, a Lucía Coimbra, Matías Giménez y Angeline Saadoun por estar compartiendo el trabajo de laboratorio codo a codo, por el apoyo y ayuda todas las veces que los necesité. También mi agradecimiento de todo el Departamento de BIOGEM del IIBCE por abrirme las puertas y darme la oportunidad de crecer y desarrollarme.

Vaya también mi agradecimiento a la gente de la Sección Bioquímica de Facultad de Ciencias, especialmente a César García por asesorarme y enseñar-

me a hacer RT-qPCR, y a Céllica Cagide y Juan Marizcurrena por enseñarme y acompañarme en el largo camino de la producción y producción de rXylR.

También quiero agradecer a Manuela Oribe por realizar algunas de las determinaciones de actividad β -galactosidasa.

Este trabajo fue financiado por la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) [POS_2016_1_129943], CAP (Beca de Finalización), el Programa de Desarrollo de las Ciencias Básicas (PEDECIBA) y CSIC (Iniciación a la investigación).

Finalmente, un agradecimiento muy especial a mi familia, a Joaquín por todo el aguante y motivación; y a Guille, que nació durante esta tesis, y que es una genia, que se ha tenido que aguantar todas las horas de mamá fuera de casa y que cuando llego me pregunta cómo están mis bacterias. A mis suegros y a mis padres, que han estado siempre, cuidando que nada nos falte.

RESUMEN

La D-xilosa es el segundo carbohidrato más abundante en la naturaleza. Se encuentra en alta proporción en la biomasa lignocelulósica, el subproducto renovable más abundante en el planeta. La biomasa es usualmente quemada para la generación de energía. Sin embargo, la misma contiene compuestos que constituyen una excelente oportunidad para producir biocombustibles de segunda generación y bio-productos con valor agregado, en el contexto de las biorrefinerías. Se han estudiado pocos microorganismos capaces de metabolizar la D-xilosa eficientemente. La búsqueda de nuevos microorganismos o de rutas catabólicas novedosas capaces de metabolizar esta pentosa forma parte de un área de investigación importante para la biotecnología acoplada a las cadenas agroindustriales.

Herbaspirillum seropedicae es una β -proteobacteria capaz de crecer en presencia de D-xilosa y acumular más del 50 % de su peso seco como poli-3-hidroxibutirato (PHB), biopolímero termoplástico y biodegradable. Para la degradación de D-xilosa emplea rutas no fosforilativas, cuyo primer paso está catalizado por la enzima D-xilosa deshidrogenasa dependiente de NAD^+ (G5B88.22805, *xylB*). El mutante $\text{Z69}\Delta\text{xylB}$ es capaz de crecer en D-xilosa, aunque con menor velocidad de crecimiento.

En esta tesis de doctorado, se identificaron las rutas metabólicas implicadas en el catabolismo de D-xilosa en *H. seropedicae* Z69 y $\text{Z69}\Delta\text{xylB}$ mediante RNA-seq, y el subsecuente análisis del fenotipo de varios mutantes apolares dirigidos en los genes identificados. De acuerdo a los resultados, *H. seropedicae* emplea rutas no fosforilativas para el catabolismo de D-xilosa. La porción inferior de este metabolismo involucra la co-expresión de dos rutas: la ruta de Weimberg que produce α -cetoglutarato y una ruta nueva recientemente descrita que sintetiza glicolato y piruvato. Esta nueva ruta parece ser muy importante para el catabolismo de D-xilosa, ya que el mutante en el último paso, $\text{Z69}\Delta\text{mhpD}$, fue capaz de crecer en esta pentosa luego de una extensa fase lag (40-50 horas). Por otro lado se identificó que el crecimiento en D-xilosa del mutante $\text{Z69}\Delta\text{xylB}$ es debido a la expresión de la L-arabinosa deshidrogenasa codificada por el gen *araB* (G5B88.05250) que puede utilizar D-xilosa como

sustrato.

Además, se estudiaron los mecanismos regulatorios implicados en el metabolismo de D-xilosa en *H. seropedicae* Z69. Se construyó el mutante apolar dirigido en el gen regulador *xylR*, Z69 Δ *xylR*, el cual presentó crecimiento reducido (50 %) en D-xilosa. Por otro lado, se identificó que, los genes *xylFGH*, que codifican para un transportador de D-xilosa del tipo ABC, y los genes *xylBD* y *xylC*, que codifican para las enzimas de la ruta no fosforilativa superior, se encuentran formando unidades transcripcionales (operones) diferentes. Luego, se observó que *xylR* estaría regulando positivamente la expresión de los genes *xylFGH*, *xylBD*, *xylC* y *xylR*, en presencia de D-xilosa o D-glucosa. Mientras que los genes *xylA* y *mhpD* (rutas no fosforilativas inferiores) y *araB* no estarían regulados por *xylR*. Finalmente, mediante ensayo de retardo en gel, del inglés *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA), se observó que rXylR se une a las regiones promotoras de los genes *xylFGH* y/o *xylR* y a la región promotora de los genes *xylBD* y que esta unión es fomentada por la presencia de D-xilosa.

Palabras claves:

rutas no fosforilativas, L-arabinosa, *mhpD*, *araB*, *xylR*.

Lista de figuras

1	Rutas no fosforilativas descritas para el catabolismo de la D-xilosa en diferentes microorganismos	4
2	Rutas fosforilativas descritas para el catabolismo de la D-xilosa en diferentes microorganismos: ruta oxo-reductiva y ruta de la D-xilosa isomerasa.	6
3	Organización de los dos operones <i>xyl</i> en <i>E. coli</i> , ambos regulados por XylR.	8
4	Organización del operón <i>xylAFGH</i> en <i>P. fluorescens SBW25</i> regulado por XutR.	10
5	Ruta no fosforilativa involucrada en el metabolismo de L-arabinosa en <i>H. seropedicae</i>	12
6	Algunos genes involucrados en el catabolismo de D-xilosa en <i>H. seropedicae</i> SmR1	14
1.1	Grupos de genes involucrados en el catabolismo de D-xilosa identificados en el genoma de <i>H. seropedicae</i> Z69.	30
1.2	Perfiles de crecimiento de <i>H. seropedicae</i> Z69, de los mutantes en los genes <i>xylB</i> y/o <i>araB</i> y las cepas complementadas	34
1.3	Actividad deshidrogenasa empleando NAD ⁺ como cofactor	35
1.4	Perfiles de crecimiento de <i>H. seropedicae</i> Z69 y de los mutantes en los genes <i>xylB</i> y/o <i>xylC</i>	36
1.5	Perfiles de crecimiento de <i>H. seropedicae</i> Z69, y de los mutantes en los genes <i>xylB</i> y/o <i>xylX</i>	37
1.6	Perfiles de crecimiento de <i>H. seropedicae</i> Z69, y de los mutantes en los genes <i>xylB</i> y/o <i>xylA</i>	38
1.7	Perfiles de crecimiento de <i>H. seropedicae</i> Z69, y de los mutantes en los genes <i>xylB</i> y/o <i>mhpD</i>	40

1.8	Perfiles de crecimiento de <i>H. seropedicae</i> Z69, y de los mutantes en los genes <i>xylB</i> y/o <i>galM</i>	41
1.9	Perfiles de crecimiento de <i>H. seropedicae</i> Z69, y de los mutantes en los genes <i>xylB</i> y/o <i>xk</i>	43
1.10	Cambio relativo de la expresión (<i>fold change</i>) de genes involucrados en el catabolismo de D-xilosa y/o L-arabinosa, determinado mediante RT-qPCR.	44
2.1	Perfiles de crecimiento de <i>H. seropedicae</i> Z69 y del mutante Z69 Δ <i>xylR</i>	65
2.2	Actividad D-xilosa deshidrogenasa (XDH) y xilitol deshidrogenasa (XOLDH)	66
2.3	Identificación de los operones <i>xyl</i> mediante RT-PCR	67
2.4	Cambio relativo de la expresión (<i>fold change</i>) calculado a partir de las RT-qPCR, para algunos de los genes implicados en el catabolismo de D-xilosa y/o de L-arabinosa	68
2.5	Actividad de los promotores <i>xyl</i>	69
2.6	Niveles de expresión (determinado por actividad β -galactosidasa) de los promotores de los genes <i>xylR</i> y <i>xylFGH</i>	70
2.7	SDS-PAGE de las cepas recombinantes crecidas en diferentes medios de cultivo a 37°C	72
2.8	Control por SDS-PAGE de las diferentes fracciones proteicas obtenidas a partir de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS crecida en medio auto-inductor ZYM5052 a 15°C o 37°C	73
2.9	Control por SDS-PAGE del proceso de solubilización de rXylR	74
2.10	Control por SDS-PAGE del proceso de purificación de rXylR por IMAC	75
2.11	Control por SDS-PAGE del proceso de replegado de rXylR por el método de goteo	76
2.12	EMSA, empleando rXylR replegada por el método de goteo y el fragmento de ADN (amplificado por PCR) que contiene las regiones promotoras <i>pxylR</i> y <i>pxylFGH</i>	77
2.13	EMSA	78
3.1	Rutas no fosforilativas empleadas para el catabolismo de D-xilosa y L-arabinosa en <i>H. seropedicae</i> Z69.	94

3.2	Modelo de regulación propuesto para el metabolismo de D-xilosa en <i>H. seropedicae</i>	95
A.1	Electroforesis en gel de agarosa 1 % (p/v) teñido con bromuro de etidio para ver la calidad de los ARN empelados para RNA-seq	113
B.1	Control de calidad del ARN purificado, mediante electroforesis en gel de agarosa 1 %	115
B.2	Curvas de desnaturalización de las qPCR de cada curva de eficiencia.	117
B.3	Curvas de desnaturalización de las qPCR de cada curva de eficiencia.	118
B.4	Curvas de desnaturalización de las qPCR de cada curva de eficiencia.	119
B.5	Ct obtenido para cada réplica (biológica y técnica) y su promedio para los genes normalizadores ensayados	120

Lista de tablas

1.1	Cebadores utilizados para la construcción de mutantes dirigidos apolares empleando la técnica de mutagénesis por delección-inserción mediada por <i>cross-over</i> -PCR	23
1.2	Cebadores utilizados para RT-qPCR	29
1.3	Resultado de los experimentos de RNA-seq: genes relacionados con el metabolismo de D-xilosa	32
1.4	Lista de mutantes generados en esta tesis	33
2.1	Cebadores utilizados para la construcción del mutante $Z69\Delta xylR$	54
2.2	Cebadores utilizados para la RT-PCR	55
2.3	Cebadores utilizados para RT-qPCR	56
2.4	Cebadores utilizados para amplificar las presuntas regiones promotoras de algunos genes implicados en el catabolismo de D-xilosa	58
2.5	Velocidad de crecimiento y duración de la fase lag en <i>H. seropedicae</i> Z69 y el mutante $Z69\Delta xylR$	65
A.1	Resumen de los resultados de calidad de secuenciación y mapeo de los experimentos de RNA-seq.	114
B.1	Control de calidad de los cebadores utilizados para la qPCR.	116
B.2	Ct obtenido en las RT-qPCR de los genes <i>recA</i> , <i>rpoA</i> y <i>xylF</i>	121
B.3	Ct obtenido en las RT-qPCR de los genes <i>recA</i> , <i>araB</i> y <i>mhpD</i>	122
B.4	Ct obtenido en las RT-qPCR de los genes <i>recA</i> , <i>xylA</i> y <i>xylC</i>	122
A.1	Principales características de los plásmidos utilizados en esta tesis.	127

Lista de siglas

Lista de siglas

αKGSA	α -cetoglutarato semialdehído
ADH	L-arabinosa deshidrogenasa
ADNc	ADN copia
ANI	<i>Average Nucleotide Identity</i>
Amp	Ampicilina
D-KDP	D-2-ceto-3-deoxi-pentonato
DO	Densidad óptica
EMSA	ensayo de retardo en gel, del inglés <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i>
HDOP	5-hidroxi-2,4-dioxo-pentanonato
IMAC	cromatografía de afinidad a metales inmovilizados
IPTG	isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
Km	Kanamicina
L-KDP	L-2-ceto-3-deoxi-pentonato
NTC	control (de PCR o qPCR) sin molde
Nal	Ácido Nalidíxico
ONPG	Orto-Nitrofenil- β -Galactósido
ORF	<i>marco abierto de lectura</i>
PGAP	<i>NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline</i>
PHB	poli-3-hidroxibutirato
RPKM	<i>Reads Per Kilobase per Million of mapped reads</i>
TB	<i>Terrific Broth</i>
Tc	Tetraciclina
U	Unidad de actividad enzimática
UA	Unidades de Absorbancia

X-gal 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido

XDH D-xilosa deshidrogenasa

XI D-xilosa isomerasa

XK D-xilulosa quinasa

XOLDH xilitol deshidrogenasa

XR D-xilosa reductasa

Tabla de contenidos

Lista de figuras	x
Lista de tablas	xiii
Lista de siglas	xv
Introducción	1
Metabolismo de D-xilosa en microorganismos	3
Rutas no fosforilativas	3
Rutas fosforilativas	5
Genes implicados en el metabolismo de D-xilosa	6
Regulación del metabolismo de D-xilosa	7
Regulación de los operones <i>xyl</i> en <i>E. coli</i>	8
Regulación del operón <i>xyl</i> en <i>P. fluorescens</i>	9
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	11
Metabolismo carbonado	11
Metabolismo de D-xilosa	13
Objetivos	15
Objetivo general	15
Objetivos específicos	15
1 Elucidación de las rutas metabólicas implicadas en el catabo-	
 lismo de D-xilosa en <i>H. seropedicae</i>	17
1.1 Materiales y Métodos	18
1.1.1 Cepas y condiciones de cultivo	18
1.1.2 Técnicas de Biología Molecular	19
1.1.3 Secuenciación y anotación del genoma de <i>H. seropedicae</i>	
Z69	19

1.1.4	Transcriptómica	20
1.1.5	Construcción de mutantes y análisis de su capacidad de crecer en diferentes fuentes carbonadas	22
1.1.6	Ensayos de complementación	24
1.1.7	RT-qPCR	26
1.2	Resultados	29
1.2.1	Secuenciación y anotación del genoma de <i>H. seropedicae</i> Z69	29
1.2.2	Transcriptómica	30
1.2.3	Análisis del fenotipo de las cepas mutantes en genes pre- suntamente involucrados en el catabolismo de D-xilosa	33
1.2.4	Cuantificación de la expresión relativa de algunos genes de las rutas no fosforilativas, y el gen regulador <i>xylR</i> , mediante RT-qPCR	44
1.3	Discusión	45
1.3.1	Identificación de los genes involucrados en el catabolismo de D-xilosa en <i>H. seropedicae</i> Z69	45
1.3.2	Catabolismo de L-arabinosa	48
1.3.3	Otros comentarios sobre el mutante Z69 Δ <i>xylB</i>	49
1.3.4	Expresión de las rutas fosforilativas	50
2	Regulación del metabolismo de D-xilosa en <i>H. seropedicae</i>	52
2.1	Materiales y Métodos	53
2.1.1	Construcción del mutante Z69 Δ <i>xylR</i> y análisis de su fe- notipo	53
2.1.2	Identificación de los operones <i>xyl</i> por RT-PCR	55
2.1.3	Cuantificación de la expresión relativa de algunos genes presuntamente regulados por XylR, mediante RT-qPCR	56
2.1.4	Determinación de la expresión de los promotores <i>xyl</i> em- pleando fusiones génicas	57
2.1.5	Identificación de algunas de las regiones de ADN que reconoce XylR, mediante EMSA	58
2.2	Resultados	64
2.2.1	Construcción del mutante Z69 Δ <i>xylR</i> y análisis de su fe- notipo	64
2.2.2	Identificación de los operones <i>xyl</i> por RT-PCR	66

2.2.3	Cuantificación de la expresión relativa de algunos genes presuntamente regulados por XylR, mediante RT-qPCR	68
2.2.4	Determinación de la expresión de los promotores <i>xyl</i> empleando fusiones génicas	68
2.2.5	Identificación de algunas de las regiones de ADN que reconoce XylR, mediante EMSA	71
2.3	Discusión	80
2.3.1	Regulación del catabolismo de D-xilosa	80
2.3.2	Regulación del catabolismo de D-glucosa	85
2.3.3	Regulación del catabolismo de xilitol	86
2.3.4	Regulación del catabolismo de L-arabinosa	87
2.3.5	Identificación de algunas de las regiones de ADN que reconoce XylR, mediante EMSA	87
3	Discusión General	93
	Conclusiones	98
	Perspectivas	100
	Referencias bibliográficas	102
	Glosario	111
	Apéndices	112
	Apéndice A Transcriptómica	113
	Apéndice B RT-qPCR	115
	Anexos	123
	Anexo A Técnicas	124
A.1	Medios de cultivo	124
A.1.1	TY	124
A.1.2	LGI modificado	124
A.1.3	Luria-Bertani (LB)	125
A.1.4	Medio de cultivo auto-inductor ZYM5052	125
A.2	Plásmidos	126
A.3	Extracción de ADN genómico	128
A.4	Electroforesis en gel de agarosa	128

A.5 Extracción de ADN plasmídico	129
A.6 Transformación por <i>shock</i> térmico de <i>E. coli</i>	130
A.7 Preparación de células electrocompetentes de <i>H. seropedicae</i> . .	131
A.8 Determinación de actividad β -galactosidasa	131
A.9 SDS-PAGE	132
A.10 EMSA	134
A.11 Western Blot	134
A.12 Otros <i>buffers</i> utilizados en este trabajo	135

Introducción

Debido a la creciente preocupación mundial por el cambio climático, causado por el aumento en las concentraciones de gases de efecto invernadero, se han propuesto diferentes estrategias que permitan mitigar las emisiones de origen antrópico. En ese sentido se considera importante implementar tecnologías verdes, limpias y sustentables. Surge así, el concepto de biorrefinería, en donde se busca producir bio-combustibles y bio-productos con valor agregado, a partir de materias primas renovables. La estrategia de instalar cadenas agro-industriales también reduce la generación de residuos, ya que se busca aprovechar todos los subproductos, ya sea para la generación de energía eléctrica, producción de compuestos químicos finos con valor agregado y/o bioplásticos, entre otros (Domingues et al. [2021](#); Zhao et al. [2020](#)).

La biomasa lignocelulósica es la materia prima más abundante en la Tierra. Puede utilizarse para la producción de combustibles y productos químicos con alto valor agregado. Su aprovechamiento puede ser una alternativa a la utilización de los combustibles fósiles. La biomasa lignocelulósica proviene de residuos de las industrias agro-forestales o residuos municipales (como podas), y no compite con la producción de alimentos. Está formada por tres tipos de polímeros: celulosa (35-45 %), hemicelulosa (25-30 %) y lignina (15-30 %), fuertemente entrelazados por distintos tipos de interacciones químicas. La celulosa es un homopolímero de unidades de D-glucosa, unidas por enlaces 1,4- β -glicosídicos, constituido por largas cadenas de 7000 a 15000 unidades. Estas cadenas se unen entre sí por enlaces de hidrógeno intra e intermoleculares, generando una fuerte estructura cristalina, con zonas amorfas, altamente resistente. La hemicelulosa es un heteropolímero, con una estructura amorfa, compuesto principalmente por pentosas (D-xilosa y L-arabinosa), y en menor medida por hexosas (D-glucosa, manosa, galactosa, ramnosa). La lignina es un polímero fenólico heterogéneo con una estructura amorfa (Raj et al. [2022](#); Sohn et al. [2022](#)). Estos componentes de la pared celular están adheridos entre

sí, formando una fuerte estructura tridimensional, rígida y cristalina, resistente a la degradación microbiana. Para superar esta propiedad recalcitrante, es necesario el pre-tratamiento de la biomasa, previo a su transformación en bio-combustibles y bio-productos (Raj et al. 2022).

Los pre-tratamientos pueden ser físicos (mecánicos), químicos (usando ácidos diluídos, bases, o líquidos iónicos), físico-químicos (por ejemplo, explosión de fibras con una solución de amoníaco, explosión de vapor, o ultrasonido), o biológicos (empleando digestión con hongos o bacterias productoras de enzimas lignocelulolíticas). La finalidad del pre-tratamiento es romper la compleja estructura de la biomasa, aumentar la porosidad y accesibilidad a sus fibras, remover la lignina (al menos de forma parcial), y depolimerizar parcialmente la hemicelulosa. Después, es necesario realizar un post-tratamiento mediante sacarificación o hidrólisis enzimática para obtener los azúcares fermentables y una posterior detoxificación para remover los inhibidores presentes (Govil et al. 2020; Raj et al. 2022; Sohn et al. 2022). Luego de este proceso se obtiene una mezcla de azúcares fermentables que contienen D-glucosa, D-xilosa y L-arabinosa, y en algunos casos puede contener además manosa y galactosa en menor proporción (Maity, 2015). Estos azúcares se pueden transformar en bio-combustibles, como bioetanol, bio-butanol, hidrógeno, etc.; o en bio-productos con valor agregado con múltiples aplicaciones, como los bioplásticos, succinato, fumarato, malato, xilitol, arabitol, ácido D-xilónico, ácido glicólico, ácido láctico, glicerol, etc. (Domingues et al. 2021; Raj et al. 2022; Zhao et al. 2020).

En general, los microorganismos que se usan actualmente en la industria para la producción de bio-combustibles y bio-productos, son capaces de metabolizar eficientemente la D-glucosa, pero no así la D-xilosa. Además, se ha descrito el fenómeno de represión catabólica por D-glucosa, que no permite que algunos de los azúcares lignocelulósicos (D-xilosa y L-arabinosa) sean co-metabolizados, lo que enlentece los procesos de producción, aumentando los tiempos y costos (Luo et al. 2014).

En este contexto, el estudio de las rutas metabólicas y los mecanismos de regulación implicados en el catabolismo de la D-xilosa debería ser profundizado, ya sea en organismos ya identificados, o en nuevos aislamientos. Este conocimiento constituye un insumo necesario para el diseño de nuevas cepas modificadas genéticamente, empleando herramientas de ingeniería metabólica y biología sintética, mejoradas para su uso industrial. Por otro lado, la búsqueda de nuevos microorganismos, o nuevas enzimas para la utilización de

la D-xilosa, puede verse favorecida debido a la ampliación en las secuencias reportadas en las bases de datos, que al día de hoy es bastante limitada para algunas rutas metabólicas, como veremos más adelante.

En esta tesis se trabajó con *Herbaspirillum seropedicae*, una bacteria capaz de crecer en D-xilosa como única fuente carbonada, y metabolizarla eficientemente para la producción de poli-3-hidroxibutirato (PHB) (Malan, 2011, 2015). El PHB es un bio-polímero con propiedades termoplásticas, biodegradable y biocompatible, por lo que representa una alternativa a los plásticos de origen petroquímico (Govil et al. 2020). Hasta el momento su producción es más costosa que la de los plásticos convencionales. Para bajar los costos de producción es necesario continuar investigando y se han propuesto diferentes estrategias, como la utilización de materias primas de bajo costo (como residuos de otras industrias), el acoplado la producción de PHB a cadenas productivas ya existentes (dentro de las biorefinerías) y el uso de microorganismos bien adaptados que presenten un alto rendimiento de transformación de fuente carbonada en PHB. Para esto ultimo es necesario conocer las rutas de transformación de fuente carbonada en PHB, para así poder diseñar cepas con mejores capacidades productivas.

Hasta donde conocemos, esta tesis sería el primer trabajo en donde se estudia en detalle las rutas, los genes y las enzimas involucradas en el metabolismo de D-xilosa en *H. seropedicae*, pensando en optimizar la producción de PHB. Durante el transcurso de este trabajo se logró identificar nuevos genes (y enzimas) involucradas en el catabolismo de D-xilosa; además, se identificaron algunos de los posibles mecanismos de regulación implicados.

Metabolismo de D-xilosa en microorganismos

Hasta el momento se han descrito cinco rutas para el catabolismo de D-xilosa en microorganismos. Las mismas se detallan a continuación.

Rutas no fosforilativas

Se han descrito tres rutas no fosforilativas de degradación de D-xilosa, y todas comparten los tres primeros pasos, como se ve en la Figura 1 A. Esos pasos son: (i) la oxidación de la D-xilosa en D-xilonolactona por medio de la enzima D-xilosa deshidrogenasa (XDH), dependiente de NAD^+ o

NADP⁺; (ii) la hidrólisis de D-xilonolactona a D-xilonato, una reacción que puede ocurrir espontáneamente o mediada por la enzima D-xilonolactonasa; y (iii) la transformación por deshidratación del D-xilonato en D-2-ceto-3-deoxipentonato (D-KDP) por medio de la enzima D-xilonato deshidratasa. Desde este punto, el catabolismo puede seguir cualquiera de las tres rutas diferenciadas, denominadas como rutas no fosforilativas inferiores (rutas de Dahms, Weimberg o Watanabe) (Figura 1 B, C y D) (Ren et al. 2022).

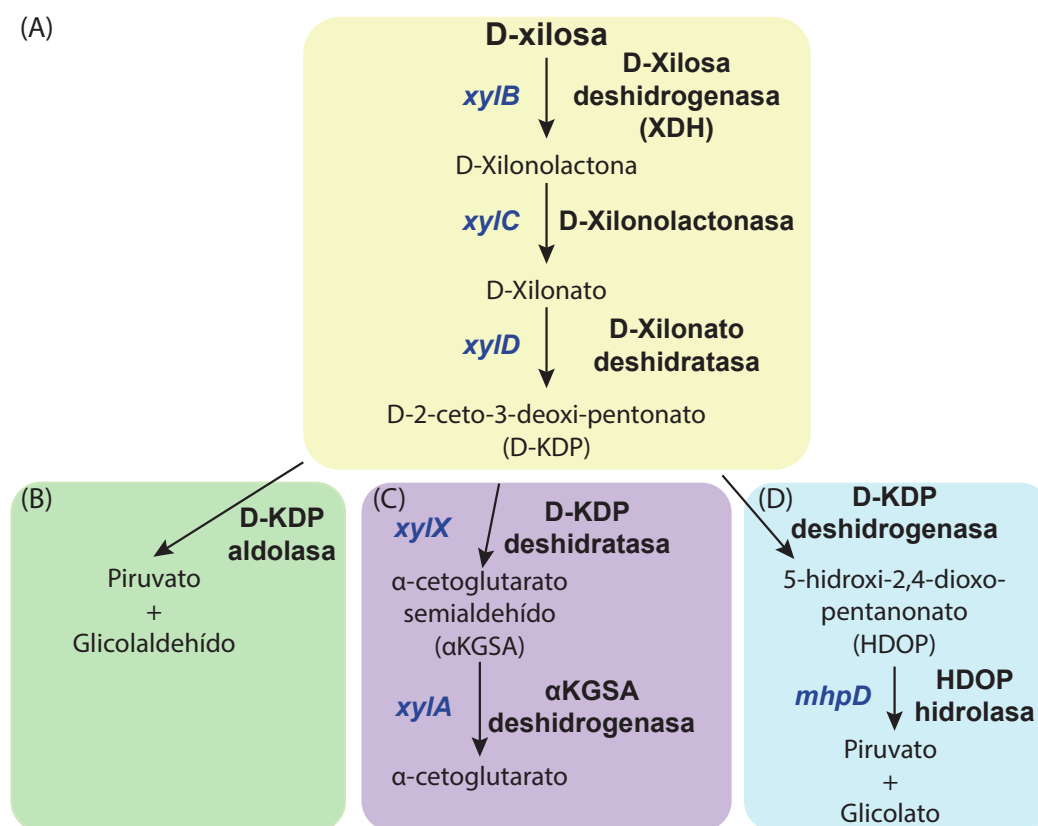


Figura 1: Rutas no fosforilativas descritas para el catabolismo de la D-xilosa en diferentes microorganismos. (A) Ruta no fosforilativa superior. Rutas no fosforilativas inferiores descritas por Dahms, 1974 (B), Weimberg, 1961 (C) y Watanabe et al. 2019 (D). En azul se muestra el nombre del gen que codifica para las enzimas involucradas en cada paso.

En la ruta de Dahms (Figura 1 B), originalmente descrita en una cepa de *Pseudomonas* no clasificada, el intermediario D-KDP se transforma directamente en piruvato y glicolaldehído por medio de una aldolasa (Dahms, 1974).

Otro posible destino del D-KDP es a través de la ruta de Weimberg (Figura 1 C) descrita en las bacterias *Pseudomonas frangi*, *Pseudomonas taiwanensis*,

Caulobacter crescentus, *Arthrobacter nicotinovorans* y en varias arqueas, incluyendo *Haloferax volcanii* y *Haloarcula marismortui* (Johnsen y Schonheit, 2004; Johnsen et al. 2009; Kohler et al. 2015; Mihasan et al. 2013; Stephens, Christen, Fuchs et al. 2007; Weimberg, 1961). En esta ruta, el D-KDP se transforma en α -cetoglutarato semialdehído (α KGSA) por medio de la enzima D-KDP deshidratasa. Luego el α KGSA se transforma en un intermediario del ciclo de Krebs, el α -cetoglutarato, por medio de la enzima α KGSA deshidrogenasa, dependiente de NAD(P)⁺.

Recientemente, Watanabe et al. 2019 describieron una nueva ruta en *Herbaspirillum huttiense*, en donde el D-KDP se transforma en 5-hidroxi-2,4-dioxopentanonato (HDOP), por medio de la enzima D-KDP deshidrogenasa. Según esta nueva ruta se obtiene piruvato y glicolato como productos finales, por acción de la enzima HDOP hidrolasa, tal como se muestra en la Figura 1 D.

Rutas fosforilativas

Dentro de las rutas que involucran la transferencia de grupos fosfato, o rutas fosforilativas, se ha descrito las dos vías que se describen a continuación.

Ruta oxo-reductiva

La ruta oxo-reductiva se encuentra comúnmente en levaduras, hongos filamentosos y otros eucariotas. Esta ruta transforma la D-xilosa en xilitol por medio de la enzima D-xilosa reductasa (XR) NAD(P)H dependiente, seguido de su oxidación a D-xilulosa, por la xilitol deshidrogenasa (XOLDH) que utiliza NAD⁺ como cofactor. En el último paso, la D-xilulosa se fosforila, mediante la D-xilulosa quinasa (XK), dando como producto final D-xilulosa-5-fosfato, que ingresa directamente a la vía de las pentosas fosfato (Zhao et al. 2020). En la Figura 2 se muestra un esquema de la vía.

Ruta de la D-xilosa isomerasa

La ruta de la D-xilosa isomerasa, y que involucra a la enzima con el mismo nombre (D-xilosa isomerasa (XI)), es la ruta clásica de bacterias, aunque últimamente se ha descrito también en algunos hongos y en un arquea de la especie *Halorhabdus* (Sutter et al. 2020). Esta ruta transforma directamente la D-xilosa en D-xilulosa, tal como se muestra en la Figura 2 (Zhao et al.

2020). Luego, la D-xilulosa se transforma en D-xilulosa-5-fosfato por medio de la D-xilulosa quinasa (XK), igual a como ocurre en la ruta oxo-reductiva.

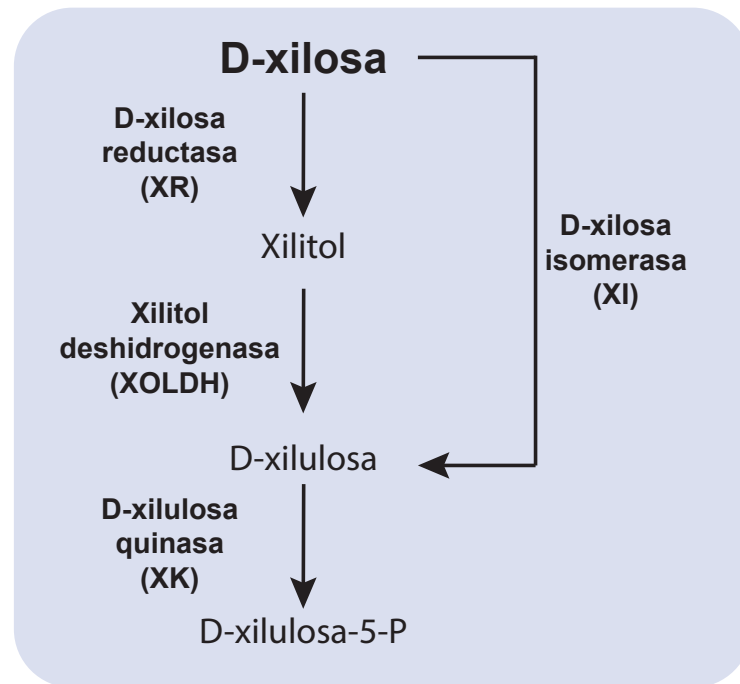


Figura 2: Rutas fosforilativas descritas para el catabolismo de la D-xilosa en diferentes microorganismos: ruta oxo-reductiva y ruta de la D-xilosa isomerasa.

Genes implicados en el metabolismo de D-xilosa

Debido a la variabilidad de rutas metabólicas involucradas en la oxidación de D-xilosa y del importante número de microorganismos capaces de metabolizarla, no se ha propuesto un ordenamiento único de genes. Igualmente, es posible realizar algunas generalizaciones.

Comenzaremos describiendo someramente los tipos de transportadores de D-xilosa. Ésta puede internalizarse empleando tres tipos de transportadores: (i) transportadores del tipo ABC, generalmente codificados por los genes *xylFGH*, (ii) transportadores MFS (*the major facilitator superfamily*), generalmente codificados por el gen *xylE* y, (iii) transportadores simport de azúcar-protón (*sugar-proton symporter*) codificado por el gen *xylT*, como ocurre en *Clostridium beijerinckii* (Zhao et al. 2020).

Respecto a la organización de los genes que codifican para las enzimas de la

ruta fosforilativa de la D-xilosa isomerasa (*xylA* y *xylB*, que codifican para las enzimas XI y XK respectivamente), pueden encontrarse juntos formando un operón, como ocurre en *E. coli* (Figura 3, Song y Park, 1997), o dispersos en el genoma como ocurre en *P. fluorescens* (Figura 4, Liu et al. 2015). Muchas veces estos genes se encuentran junto a los genes *xylFGH*, que codifican para el transportador de D-xilosa del tipo ABC, aunque no necesariamente forman un operón.

Por otro lado, los genes que codifican para las enzimas de las rutas no fosforilativas, pueden encontrarse todos dentro de un mismo operón, como ocurre con la ruta de Weimberg en *C. crescentus* (Stephens, Christen, Fuchs et al. 2007) o dispersos en el genoma, formando parte de varios *clusters*, como ocurre en el caso de *H. huttienne* (Watanabe et al. 2019). Este último presenta dos rutas no fosforilativas inferiores (Weimberg y Watanabe). En arqueas, donde la ruta no fosforilativa de Weimberg parecería ser la más común, los genes que codifican para la misma se encuentran dispersos en el genoma y varían entre especies, no existiendo un único orden.

En todos los casos, los genes *xyl*, involucrados en el catabolismo de D-xilosa, se encuentran regulados positiva o negativamente por diferentes proteínas de unión al ADN, codificadas por diferentes genes denominados *xylR*.

Regulación del metabolismo de D-xilosa

Se han descrito varias proteínas de unión a ADN que regulan la expresión de los genes involucrados en el metabolismo de D-xilosa, denominadas genéricamente XylR. En el caso de *C. crescentus*, *Bacillus subtilis*, *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* y *Streptomyces lividans* TK24, la proteína XylR reprime la transcripción de los genes *xyl* involucrados en el catabolismo de la D-xilosa. El mecanismo de represión involucra la unión de XylR a regiones del ADN localizadas inmediatamente después del sitio de inicio de la transcripción o a las regiones promotoras, inhibiendo la transcripción. En todos estos casos la presencia de D-xilosa anula la represión (Gartner et al. 1992; Heo et al. 2008; Ikawa et al. 2018; Stephens, Christen, Watanabe et al. 2007).

En el caso de *E. coli* y *P. fluorescens*, la proteína XylR actúa como un activador de la transcripción de los genes *xyl*. A continuación se detalla el funcionamiento de esta proteína en ambas bacterias.

Regulación de los operones *xyl* en *E. coli*

E. coli es capaz de catabolizar los principales carbohidratos presentes en la biomasa lignocelulósica (D-glucosa, L-arabinosa y D-xilosa). Sin embargo, no es capaz de metabolizar simultáneamente estos azúcares debido al proceso de represión catabólica por carbono. En presencia de estos tres azúcares, *E. coli* consume primero la D-glucosa, luego la L-arabinosa y finalmente la D-xilosa (Desai y Rao, 2010). Para el catabolismo de D-xilosa, *E. coli* emplea la ruta fosforilativa de la D-xilosa isomerasa (ver Figura 2), cuyas enzimas están codificadas por los genes *xylAB*. Tal como se muestra en la Figura 3, aguas arriba de estos genes y, en sentido contrario, *E. coli* presenta los genes *xylFGH* que codifican para un transportador de D-xilosa del tipo ABC. Contiguo a estos, se encuentra el gen *xylR* que codifica para el regulador de la transcripción de los genes *xyl* mencionados (Song y Park, 1997).

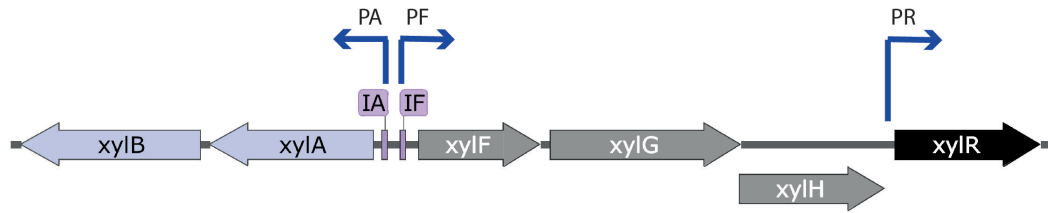


Figura 3: Organización de los dos operones *xyl* en *E. coli*, ambos regulados por XylR. IA e IF son las regiones a donde se une XylR, formando un lazo con el ADN, para promover la transcripción. Los promotores PA, PF y PR se muestran en azul.

Los genes *xylAB* y *xylFGHR* se encuentran formando dos unidades transcripcionales (ver Figura 3) separadas por 360 pb, y reguladas por los promotores PA y PF, respectivamente. Además, existe otro promotor débil, denominado PR, específico para dirigir la expresión de *xylR* (Song y Park, 1997). Los promotores PA y PF se activan o reprimen en presencia de D-xilosa o D-glucosa respectivamente; mientras que, la expresión del promotor PR es constitutiva. La expresión de los dos operones está regulada positivamente por el regulador transcripcional XylR, una proteína dimérica, que se activa al unirse a la D-xilosa (Song y Park, 1997). La delección del gen *xylR* anula completamente la expresión de los promotores PA y PF, causando un defecto en el transporte de D-xilosa y en el crecimiento de *E. coli* en esta fuente carbonada (Song y Park, 1997). Por otro lado, en ausencia de D-xilosa, XylR no se une al ADN, de modo que no sería capaz de activar la transcripción de los genes *xyl* (Ni et

al. 2013). XylR forma un dímero que se une a dos regiones del ADN (Ni et al. 2013), denominadas IA e IF, situadas a -37pb del inicio de la transcripción de los operones *xyl* (ver Figura 3). Las secuencias nucleotídicas de estos sitios contienen dos repeticiones directas (con consenso —gaAa-a-a-AAT—gaAa-a-a-AAT) (Song y Park, 1997).

La proteína XylR pertenece a una nueva familia de proteínas de unión al ADN. En el extremo C-terminal, contiene un dominio de unión al ADN del tipo AraC, compuesto por dos motivos hélice-giro-hélice (HTH); y en el dominio N-terminal contiene un dominio de unión a D-xilosa del tipo LacI/GalR. La unión a D-xilosa promueve un cambio conformacional que se transmite al dominio de unión al ADN. El dímero de XylR-D-xilosa es entonces capaz de unirse a los dos promotores (PA y PF), promoviendo la formación de un lazo con el ADN y, dirigiendo la expresión de los operones que se encuentran en sentidos opuestos (Ni et al. 2013).

Como se mencionó previamente, *E. coli* presenta represión catabólica por L-arabinosa. La misma está mediada por el factor de transcripción AraC, que cuando se une a L-arabinosa es capaz de reprimir la transcripción de los genes *xyl* (Desai y Rao, 2010). Se ha observado que, aumentando el nivel intracelular del factor de transcripción XylR, se puede eliminar la represión catabólica causada por la L-arabinosa, de modo que la bacteria modificada es capaz de co-utilizar L-arabinosa y D-xilosa (Groff et al. 2012). Más recientemente, estudiando células individuales de *E. coli*, se demostró que existen poblaciones mixtas y multimodales al crecer en una mezcla de L-arabinosa y D-xilosa. El orden jerárquico de consumo de estos carbohidratos no es tan estricto como se describe habitualmente, sino que más bien depende de las concentraciones de los mismos. Además, se observó que XylR unida a D-xilosa reprime los genes responsables del metabolismo de L-arabinosa, ya que es capaz de unirse a los promotores de los genes *araC* y *araB* (éste último codifica para la ribulosa-quinasa, enzima involucrada en el catabolismo de L-arabinosa) (Koirala et al. 2016).

Regulación del operón *xyl* en *P. fluorescens*

P. fluorescens posee un solo operón con los genes involucrados en el metabolismo de D-xilosa (Figura 4), en donde se encuentran el gen *xylA*, que codifica para XI y los genes *xylFGH* que codifican para el sistema de trans-

porte de D-xilosa del tipo ABC. Todos estos genes se transcriben en tándem bajo el control del promotor PA, inducible por D-xilosa. A su vez, aguas arriba se encuentra el gen *xutR*, que codifica para el regulador de la transcripción de la familia AraC. Este gen se encuentra bajo el control del promotor PR. Su expresión es constitutiva y no se afecta por la presencia/ausencia de D-xilosa. XutR posee una alta similitud de secuencia aminoacídica con XylR de *E. coli*, pero reconoce un motivo de ADN diferente y no forma un lazo para inducir la expresión de los genes *xylAFGH*. XutR, al igual que XylR de *E. coli*, forma un homodímero cuando interacciona con el ADN. En este caso un monómero se une a la secuencia PA-I y el otro monómero se une a la secuencia PA-II. En ausencia de D-xilosa, la interacción XutR/PA-II no es lo suficientemente fuerte para activar al promotor PA, por lo que no se da la transcripción de los genes *xylAFGH*. La región PA-I está superpuesta con el promotor PR, de modo que cuando XutR está unido a PA-I se reprime su expresión, aunque, a menudo XutR se desprende del ADN y queda expuesto el promotor PR desencadenando una expresión constante de *xutR* (Liu et al. 2015).

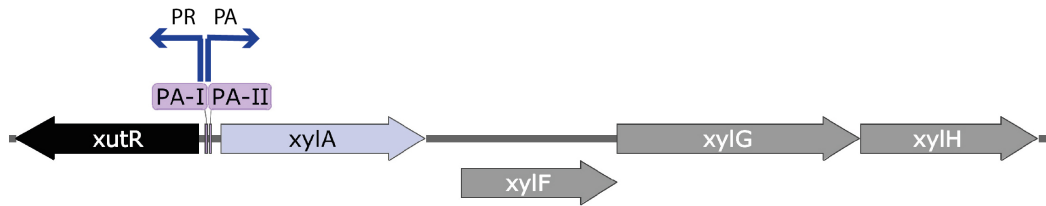


Figura 4: Organización del operón *xylAFGH* en *P. fluorescens* SBW25 regulado por XutR. PA-I e PA-II son las regiones a donde se une XutR.

P. fluorescens SBW25 posee dos genes que codifican para XK (*xutB1* y *xutB2*) de la ruta fosforilativa de oxidación de la D-xilosa. Estos se encuentran en otras regiones del genoma, alejadas de los genes *xyl* de la Figura 4. Los genes *xutB1* y *xutB2* se encuentran en diferentes *clusters*, junto a genes encargados del metabolismo de manitol y otros polioles no identificados. La regulación de la expresión del gen *xutB1* está mediada por el regulador de respuesta a manitol MltR, empleando D-xilulosa en vez de D-xilosa como inductor. Para activar la transcripción del gen *xutB1* en presencia de D-xilosa, el regulador XutR activa la expresión de los genes *xylAFGH* que codifican para el sistema que internaliza la D-xilosa y la transforman en D-xilulosa. Entonces, este metabolito, unido al regulador MltR, activa la expresión de *xutB1*. La expresión de *xutB2* no se ve afectada por la presencia de D-xilosa en el medio (Liu et al. 2015).

A continuación se presenta la información disponible sobre *Herbaspirillum seropedicae* y la forma en que metaboliza la D-xilosa.

Herbaspirillum seropedicae

Las bacterias de este género son Gram negativas, con forma de vibrio o helicoidal. Generalmente, las células poseen dos flagelos (aunque también pueden tener uno o tres) en uno o ambos polos. El diámetro celular es de 0,6 a 0,7µm y el largo varía según el medio de cultivo, desde 1,5 a 5µm (Baldani et al. 1986).

Las bacterias de la especie *H. seropedicae* crecen bien en un rango amplio de pH, desde 5,3 a 8,0. Su temperatura óptima de crecimiento es 34°C y no pueden duplicarse a temperaturas menores de 22°C o mayores a 37°C. No sobreviven en presencia de NaCl a concentraciones mayores al 2% y no necesitan vitaminas u otros nutrientes o cofactores para su crecimiento. Las cepas de esta especie suelen ser susceptibles a varios antibióticos, como el cloramfenicol, tetraciclina, gentamicina, kanamicina, eritromicina y estreptomycin, pero son resistentes a la penicilina. Además, tienen la capacidad de reducir nitrógeno atmosférico bajo condiciones de microaerobiosis (Baldani et al. 1986). En la naturaleza, a estas bacterias se las encuentra como endófitas de gramíneas, tales como caña de azúcar, sorgo, maíz, avena, etc. Además, promueven el crecimiento vegetal.

H. seropedicae puede consumir varios carbohidratos como D-glucosa, galactosa, D-xilosa y L-arabinosa, así como los polioles manitol, sorbitol, xilitol y glicerol como únicas fuentes de carbono (Baldani et al. 1986; Catalán et al. 2007). También consume ácidos orgánicos, como malato, fumarato, succinato, piruvato, citrato y el trans-aconitato (Baldani et al. 1986).

Metabolismo carbonado

A partir de las determinaciones bioquímicas de actividades enzimáticas realizadas en nuestro laboratorio (Unidad de Microbiología Molecular del IIB-CE) y por análisis de secuencia del genoma de la cepa SmR1, se determinó que *H. seropedicae* emplea la ruta de Entner-Doudoroff para el catabolismo de D-glucosa, y que además posee completos los ciclos de Krebs y del glioxilato. Como rutas biosintéticas utiliza la gluconeogénesis y la ruta de las pentosas fosfato. Además, no sería capaz de utilizar la vía glicolítica por carecer de la

enzima fosfo-fructoquinasa I (Pedrosa et al. 2011). Por otro lado, en lo que refiere al metabolismo de azúcares de cinco átomos de carbono, se sabe que la L-arabinosa se metaboliza siguiendo la ruta que se muestra en la Figura 5 (Mathias et al. 1989; Price et al. 2018). Esta ruta es análoga a la ruta de Weimberg descrita para el catabolismo de D-xilosa, presenta intermediarios no fosforilados y produce α -cetoglutarato, un importante intermediario del ciclo de Krebs.

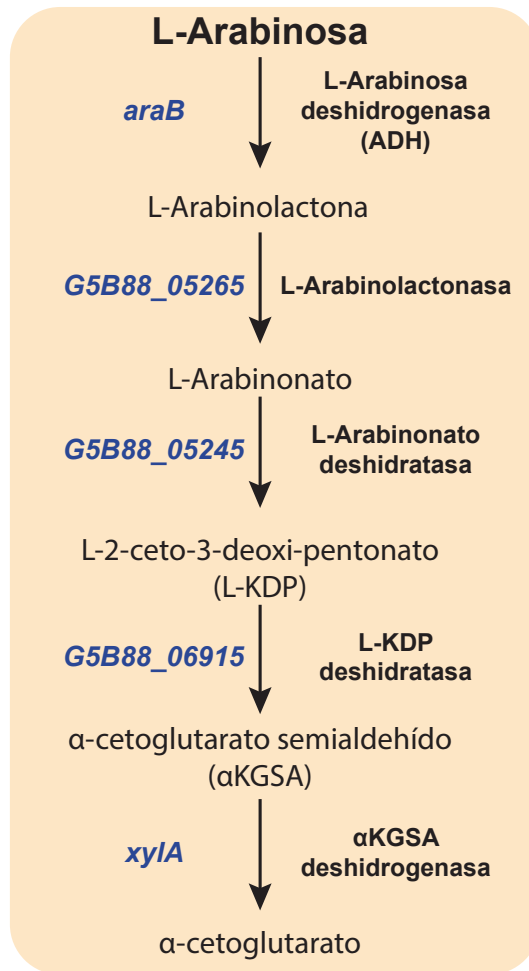


Figura 5: Ruta no fosforilativa involucrada en el metabolismo de L-arabinosa en *H. seropedicae* (Mathias et al. 1989; Price et al. 2018). En azul se muestran los genes de *H. seropedicae* Z69, según los resultados de secuenciación obtenidos en esta tesis, ver punto 1.2.1. Éstos son idénticos a los identificados en la cepa de referencia SmR1.

Metabolismo de D-xilosa

H. seropedicae crece en presencia de D-xilosa o xilitol como únicas fuentes carbonadas (Catalán et al. 2007). En el genoma de *H. seropedicae* SmR1 se encuentra anotado un *marco abierto de lectura* (ORF) candidato a codificar para la XOLDH (Hsero_3396, HSERO_RS17015, denominado *xoldh* en este trabajo) y dos ORFs para la XK (*xylB*, renombrados como *xk1* y *xk2* en este trabajo), que corresponderían a la ruta oxo-reductiva (Figura 2). Sin embargo, no se ha encontrado ningún gen candidato a codificar para la primer enzima de esta ruta, la D-xilosa reductasa (XR). En mi tesis de Maestría se construyó el mutante $Z69\Delta xoldh$. Este no presentó diferencias en el crecimiento en D-xilosa o en xilitol con respecto a la cepa salvaje, ni en la actividad XOLDH, determinada en extractos libres de células crecidas en xilitol, con respecto a la cepa salvaje en las mismas condiciones. Estos resultados sugieren, que el gen *xoldh* no codificaría para la XOLDH o que habría otras enzimas capaces de cumplir esa función, sin alterar el fenotipo del mutante (Malan, 2015; Malán et al. 2021).

A su vez, como se muestra en la Figura 6, en *H. seropedicae* SmR1, se encuentran anotados los genes que codifican para las enzimas que internalizan la D-xilosa: *xylF* (proteína periplasmática del sistema de transporte ABC de D-xilosa), *xylG* (ATPasa, forma parte del transportador del tipo ABC de D-xilosa) y *xylH* (transportador del tipo ABC, permeasa de D-xilosa) y un gen regulador: *xylR* (proteína reguladora de la transcripción del operón *xyl* de la familia AraC) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>, NC_014323). Contiguo a estos genes se encuentra el gen *fabG* (HSERO_RS22475, renombrado como *xylB* en este trabajo) que codifica para una XDH dependiente de NAD^+ (Malán et al. 2021) y los genes Hsero_4498 (HSERO_RS22480, renombrado como *xylD*) y Hsero_4499 (HSERO_RS22485, renombrado como *xylC*), que codificarían para una D-xilonato deshidratasa y D-xilonolactonasa, respectivamente. Todas estas enzimas forman parte de la ruta no fosforilativa superior mostrada en la Figura 1. En un estudio masivo empleando Tn-seq, Price et al. 2018 identificaron los ORFs Hsero_3877 (HSERO_RS19360) y Hsero_3871 (HSERO_RS19330) como genes candidatos a codificar para la enzima D-KDP deshidratasa y el gen Hsero_0147 (HSERO_00735, renombrado como *xylA* en este trabajo) para la enzima α -cetoglutarato semialdehído deshidrogenasa (últimas enzimas de la ruta no fosforilativa inferior de Weimberg). Cabe mencionar que este último gen

(y su correspondiente enzima) participarían en el catabolismo de L-arabinosa y D-xilosa.

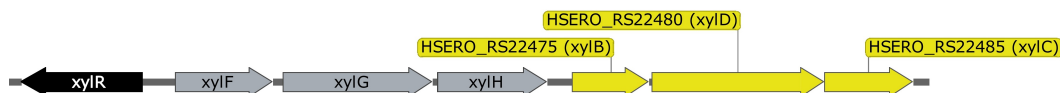


Figura 6: Algunos genes involucrados en el catabolismo de D-xilosa en *H. seropedicae* SmR1 (Malán et al. 2021; Pedrosa et al. 2011). Estos genes son idénticos a los que se encuentran en el *cluster* I de *H. seropedicae* Z69. Esta cepa se secuenció en esta tesis, ver resultados en Figura 1.1.

En el marco de mi tesis de Maestría, se trabajó con la cepa Z69 de *H. seropedicae* y se construyeron los mutantes apolares dirigidos $Z69\Delta xylB$ y $Z69\Delta xylD$. El mutante $Z69\Delta xylB$ presentó una reducción en el crecimiento (50 %), y de la actividad XDH (90 %, primer enzima de la ruta no fosforilativa superior) en presencia de D-xilosa comparado con la cepa salvaje cultivada en las mismas condiciones. A su vez, en extractos libres de células de $Z69\Delta xylB$, cultivada en presencia de D-xilosa como única fuente de carbono, se encontró actividad XOLDH. Esta actividad enzimática no se pudo detectar en extractos libres de células de la cepa salvaje crecida con D-xilosa como única fuente carbonada, pero si se pudo detectar en extractos libres de células de la cepa salvaje crecida con xilitol como única fuente carbonada (Malán et al. 2021). Por otro lado, el mutante $Z69\Delta xylD$ no presentó diferencias en el perfil de crecimiento en D-xilosa con respecto a la cepa salvaje, indicando que este gen no estaría involucrado en el metabolismo de D-xilosa o que habría otras enzimas capaces de cumplir esa función, sin afectar el fenotipo del mutante (Malán et al. 2021). Teniendo en cuenta estos resultados, consideramos que *H. seropedicae* Z69 emplea la ruta no fosforilativa de Weimberg para el catabolismo de D-xilosa.

Objetivos

Objetivo general

Identificar los genes y mecanismos de regulación implicados en el catabolismo de D-xilosa en *H. seropedicae* Z69, orientado a la optimización de la producción de PHB a partir de biomasa lignocelulósica.

Objetivos específicos

- Secuenciar y anotar el genoma de *H. seropedicae* Z69.
- Identificar, mediante RNA-seq, los genes implicados en el catabolismo de D-xilosa en *H. seropedicae* Z69 y en Z69 Δ *xylB* al crecer en presencia de D-xilosa como única fuente de carbono.
- Verificar la función de los genes identificados por RNA-seq en el catabolismo de D-xilosa, mediante la construcción de mutantes apolares dirigidos y el análisis de su fenotipo.
- Proponer un mapa metabólico para el catabolismo de D-xilosa en *H. seropedicae* Z69.
- Estudiar el rol regulatorio de XylR y su implicancia en el metabolismo de D-xilosa.
- Identificar el/los operón/es *xyl*.
- Identificar las regiones promotoras de estos operones o genes involucrados en el metabolismo de D-xilosa.
- Identificar bajo qué condiciones se expresan estos genes.
- Identificar algunas de las regiones del genoma a las que se une XylR mediante ensayo de retardo en gel, del inglés *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA)
- Proponer un modelo de regulación del metabolismo de D-xilosa en *H.*

seropedicae.

Capítulo 1

Elucidación de las rutas metabólicas implicadas en el catabolismo de D-xilosa en *H. seropedicae*

El objetivo de este capítulo es identificar todos los genes y enzimas involucradas en el catabolismo de D-xilosa en *H. seropedicae* Z69.

En primera instancia se secuenció, ensambló y anotó el genoma de *H. seropedicae* Z69 y se comparó con el de la cepa de referencia SmR1.

Como se mencionó anteriormente, en mi tesis de Maestría, se construyó el mutante Z69 Δ *xylB*, que presentó crecimiento reducido al ser cultivado en D-xilosa como única fuente carbonada. Esta cepa mutante presentó una muy baja actividad D-xilosa deshidrogenasa (XDH) en extractos libres de células comparado con la cepa salvaje, ambas crecidas en D-xilosa como única fuente carbonada. Además, la cepa mutante expresó la xilitol deshidrogenasa (XOLDH), no detectada en el extracto libre de células de Z69, cuando ambas cepas fueron cultivadas en presencia de D-xilosa como fuente carbonada. Entonces, surge una segunda pregunta, qué ruta(s) metabólica(s) (concretamente qué genes y qué enzimas) están siendo utilizadas por este mutante para el catabolismo de D-xilosa y si se expresa una ruta diferente a la expresada en la cepa salvaje. Para responder estas preguntas, en este capítulo se realizaron experimentos de transcriptómica, para identificar, mediante RNA-seq, los genes diferencialmente expresados en Z69 al crecer en D-xilosa respecto a la misma cepa crecida en

glicerol como control. Se eligió glicerol como fuente de carbono control ya que, en ensayos previos, no se detectó actividad XDH en extractos libres de células de Z69 crecida en LGI-glicerol, en cambio esta actividad estaba presente en extractos libres de células de Z69 crecida en presencia de D-glucosa (Malán et al. 2021). Además, por transcriptómica, se identificaron los genes diferencialmente expresados en $Z69\Delta xylB$ con respecto a la cepa salvaje, cuando ambas cepas fueron cultivadas en D-xilosa como única fuente carbonada. Luego, para verificar los resultados se construyeron mutantes apolares dirigidos en los genes de interés y se estudió su capacidad de crecer en diferentes fuentes carbonadas (D-xilosa, D-glucosa, L-arabinosa y xilitol).

Luego, se complementó la función del doble mutante $Z69\Delta xylB\Delta araB$ generado en este capítulo y se determinó la actividad XDH o L-arabinosa deshidrogenasa (ADH) en extractos libres de células de las cepas complementadas.

Por otro lado, se confirmaron las rutas metabólicas implicadas en el catabolismo de L-arabinosa, análogas a la rutas empleadas para el catabolismo de D-xilosa, mediante el análisis del fenotipo de algunos mutantes y la cuantificación relativa de la expresión de algunos genes por RT-qPCR.

1.1. Materiales y Métodos

1.1.1. Cepas y condiciones de cultivo

En esta tesis se trabajó con *Herbaspirillum seropedicae* Z69 aislada originalmente por Baldani et al. 1986 y actualmente disponible en el Centro de Recursos Biológicos Johanna Döbereiner (CRB-JD) con el número BR 14611. Además, se trabajó con el mutante $Z69\Delta xylB$ construido durante mi tesis de Maestría (Malan, 2015).

H. seropedicae y las cepas mutantes derivadas fueron cultivadas en medio TY (Anexo A.1.1) o LGI modificado (A.1.2) a 30°C con agitación orbital a 180rpm (excepto los casos en los que se indique otras condiciones de cultivo). Las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio LB (diluido al 1/2) (Anexo A.1.3) a 37°C con agitación orbital a 200rpm. Los antibióticos y otros sustratos de selección se prepararon a una concentración 1000x siguiendo las instrucciones del fabricante y se esterilizaron con filtros estériles de MCE (Starlab Scientific) con un tamaño de poro de 0,45µm. Se adicionaron al medio de cultivo luego de autoclavado a la concentración indicada en cada caso por los superíndices,

expresada en $\mu\text{g/mL}$.

Las cepas construidas en este trabajo se guardaron a -80°C en suspensión con glicerol 20 % (v/v).

La Densidad óptica $(\text{DO})_{600-620\text{nm}}$ se midió en el espectrofotómetro UV-1800 (Shimadzu).

1.1.2. Técnicas de Biología Molecular

El ADN genómico de *H. seropedicae* Z69 se purificó con el kit Quick DNA Fungal/Bacterial Miniprep (Zymo Research, Cat. No. D6005). En el caso de los clones mutantes, tanto de *H. seropedicae* como de *E. coli*, se prepararon lisados. Para ello se resuspendió una ansada de cultivo fresco crecido en medio sólido en 100 μL de agua libre de nucleasas. Esto se incubó 15 minutos a $95-100^{\circ}\text{C}$ y luego 20 minutos a -20°C . Finalmente se centrifugó a 16.000g por 10 minutos y se utilizó el sobrenadante para las reacciones de PCR descritas más adelante.

El ADN plasmídico se purificó empleando el protocolo de lisis alcalina (ver Anexo A.5).

Los productos de PCR, las perfiles de restricción, etc., se visualizaron bajo luz UV en el transiluminador, luego de realizada una electroforesis en gel de agarosa con tinción con Good View (SBS, Cat. No. HGV-2) (ver Anexo A.4).

1.1.3. Secuenciación y anotación del genoma de *H. seropedicae* Z69

El ADN genómico de *H. seropedicae* Z69 se purificó empleando el método fenol/cloroformo (según Anexo A.3). La calidad del ADN se evaluó en electroforesis en gel de agarosa (según Anexo A.4) y se reveló bajo luz UV luego de ser teñido con bromuro de etidio. La concentración de ADN se midió en Nanodrop.

El genoma fue secuenciado por el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Federal de Paraná, en Curitiba, Brasil. Para ello se empleó la plataforma MiSeq Illumina. Las bibliotecas se prepararon con el kit Nextera XT y para la secuenciación se utilizó MiSeq Reagent Kits v2.

Las lecturas obtenidas se filtraron y se ensamblaron con el programa CLC Genomics Workbench 7.5.5 empleando el genoma de *H. seropedicae* SmR1

(NC_014323) como referencia. Luego, el genoma de Z69 se subió al GenBank y se anotó automáticamente empleando *NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline* (PGAP) (Haft et al. 2018; Tatusova et al. 2016). El genoma de Z69 se comparó con los genomas de *H. seropedicae* SmR1 (NC_014323) y *H. huttiense* (NZ_CP037993.1) empleando *Average Nucleotide Identity* (ANI) (Rodriguez-R y Konstantinidis, 2016). A su vez, en el genoma de Z69 se buscaron genes involucrados en el catabolismo de D-xilosa por *tblastn* (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=tblastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). Como *query*, se emplearon las secuencias proteicas deducidas a partir de genes previamente identificados en otros microorganismos. Además, se consultó la información disponible en las bases de datos KEGG (Kanehisa, 2000) y MetaCyc (Caspi et al. 2016) para la cepa de referencia *H. seropedicae* SmR1.

1.1.4. Transcriptómica

Se cultivaron las cepas Z69 y Z69 Δ *xykB* en matraces Erlenmeyer de 250mL conteniendo 25mL de medio LGI suplementado con 30g/L de D-xilosa como fuente de carbono, y *buffer* MES 50mM para mantener el pH constante en 7,0. Como condición control se cultivó la cepa Z69 en LGI suplementado con 10g/L de glicerol como fuente de carbono. Cada matraz fue inoculado con un cultivo crecido por 24 horas en matraces Erlenmeyer de 125mL conteniendo 12mL de medio LGI con 10g/L de D-xilosa o glicerol. Estos últimos fueron inoculados con 1,2mL de pre-inóculo crecido por 24 horas en medio líquido TY. En todos los casos los cultivos se incubaron a 30°C a 120rpm. Cuando los cultivos alcanzaron una DO_{600nm} de 0,5 medida con el lector de microplacas multimodo TriStar LB 941 (Berthold Technologies GmbH & Co. KG), aproximadamente a las 14-15 horas de incubación, se transfirió una alícuota de 5mL de cultivo a un tubo libre de nucleasas e inmediatamente se adicionó 5mL de *RNAlater* (ThermoFisher Scientific). Se mezcló invirtiendo el tubo varias veces y las muestras se guardaron inmediatamente a -20°C.

Al momento de realizar la extracción de ARN las muestras se descongelaron en hielo y se centrifugaron por 5 minutos a 4.000g y 4°C. Se descartó el sobrenadante, el *pellet* se suspendió en 200 μ L de *buffer* de lisis (Tris-HCl 50mM, EDTA 20mM y SDS 0.1 %) y luego se adicionó 1mL de TRIzol (Invitrogen) a cada muestra. Estas se incubaron 5 minutos a temperatura ambiente, luego

se adicionó 300µL de cloroformo, se mezcló invirtiendo cada tubo varias veces y se incubó a temperatura ambiente durante 3 minutos más. Las muestras se centrifugaron 5 minutos a 14.000rpm. La fase acuosa se transfirió a un tubo nuevo y se precipitó con 2 volúmenes de isopropanol durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego, se centrifugó 5 minutos a 14.000rpm a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante y el *pellet* se lavó con etanol 70 % (v/v) 2 veces, centrifugando en las mismas condiciones. El *pellet* se secó en vacío. Finalmente el ARN se suspendió en 50µL de agua tratada con DEPC.

La calidad del ARN extraído se evaluó en electroforesis en gel de agarosa 1 % (p/v) con *buffer* TBE (A.4). La corrida se realizó a 70v por 30 minutos. En el gel se sembraron diferentes volúmenes de muestra diluida, la cual se mezcló con 2µL de Hi-Di formamida (ThermoFisher Scientific). El gel se observó en transiluminador bajo luz UV luego de ser teñido con bromuro de etidio. La concentración de ARN y ADN se midió en Nanodrop.

Las muestras fueron tratadas con Ambion DNaseI (ThermoFisher Scientific) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La depleción del ARNr, la construcción de las bibliotecas y la secuenciación fue realizada por Thalita Tuleski en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad Federal de Paraná en Curitiba, Brasil. Para ello, se empleó el kit MICROBExpress™ Bacterial mRNA Enrichment Kit (ThermoFisher Scientific) para quitar el ARNr. Luego, el ARNm resultante se utilizó para la construcción de las bibliotecas empleando el kit Ion total RNA-seq v2 for Whole Transcriptome Library Kit (ThermoFisher Scientific). Finalmente, la secuenciación se realizó en el equipo Next Generation sequencing platform Ion Proton™ System®- Life Technologies empleando los kits Ion PI Template OT2 200 Kit v3 y Ion PI Sequencing 200 Kit v3 (ThermoFisher Scientific) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se realizaron dos réplicas biológicas de cada condición.

Los datos se analizaron usando el programa CLC Genomics Workbench 7.5.5. Primero, se filtraron las lecturas quitando las de baja calidad y las correspondientes a ARNr. Las lecturas resultantes se mapearon contra el genoma de *H. seropedicae* SmR1 (NC_014323). El número de lecturas mapeadas únicas en regiones codificantes de cada condición fue analizado con el paquete DESeq2 (Love et al. 2014) de Bioconductor en R para calcular el fold-change y realizar los análisis estadísticos. Los genes con un $p_{adj} < 0,01$ se consideraron como diferencialmente expresados. El *Reads Per Kilobase per Million of mapped reads* (RPKM) fue calculado con el programa CLC Genomics Workbench

7.5.5.

1.1.5. Construcción de mutantes y análisis de su capacidad de crecer en diferentes fuentes carbonadas

Se construyeron los mutantes dirigidos apolares que se detallan en la Tabla 1.4 empleando la técnica de mutagénesis por delección-inserción mediada por *cross-over*-PCR descrita por Sukdeo y Charles, 2003. Para ello se diseñaron los cebadores mostrados en la Tabla 1.1 con el programa Primer-BLAST de NCBI (Ye et al. 2012) y el genoma de *H. seropedicae* SmR1 como molde. Los cebadores se adquirieron en Macrogen (Corea). Las reacciones de PCR 1 y 2 se realizaron con los cebadores 1_for y 1_rev o 2_for y 2_rev respectivamente, empleando Mango Mix (Bioline, Cat. No. 450030) según las instrucciones del fabricante y ADN genómico de *H. seropedicae* Z69 como molde. Se utilizó el siguiente programa de PCR: 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 58°C y 1 minuto a 72°C, con una extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos de las reacciones de PCR 1 y 2 se purificaron desde el gel luego de corrida la electroforesis empleando Agarose Gel DNA Extraction Kit (Roche, Cat. No. 11696505001) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La tercer reacción de PCR (PCR 3) se llevó a cabo con Velocity DNA polimerasa (Bioline, Cat. No. BIO-21098) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se emplearon los productos de PCR 1 y 2 purificados como molde y los cebadores 1_for y 2_rev. El programa de PCR fue de 5 minutos a 95°C, seguido de 30 ciclos de 1 minuto a 95°C, 30 segundos a 65°C y 1 minuto a 72°C, con una extensión final de 10 minutos a 72°C. El fragmento obtenido en el PCR 3 se clonó en el vector pK18*mobsacB* (Schaffer et al. 1994, Anexo A.2), previamente digerido con *Sma*I (Bioron, Cat. No. 250135S). Con estas mezclas de ligación se transformaron células competentes de *E. coli* TOP10 (ver Anexo A.6) y se seleccionaron las colonias blancas en placas de Petri conteniendo LB-Kanamicina (Km)⁵⁰-5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido (X-gal)²⁰. La presencia de inserto se verificó mediante PCR usando Mango Mix (Bioline, Cat. No. 450030) y los cebadores M13 (Invitrogen, Cat. No. 450030). EL ADN molde provino de 1 μ L de lisado preparado a partir de las colonias blancas.

Tabla 1.1: Cebadores utilizados para la construcción de mutantes dirigidos apolares empleando la técnica de mutagénesis por delección-inserción mediada por *cross-over*-PCR

Enzima/Gen	Cebador	Secuencia (5' - 3')
D-xilonolactonase	4499_1_for	TCTTCGATGGTTCGGACGAC
	4499_1_rev	GCCGTCCACCAGCGACAGGCACGTTGGCATGCGCACTTCAC
G5B88_22815	4499_2_for	TGCCTGTCGCTGGTGGACGGCCGGCTTTGTCCCAGTGACCAG
	4499_2_rev	GTCTGATGGGCCGTGAAGAA
D-KDP deshidratasa	3877_1_for	GCTCAAGCTGGCGACCAATA
	3877_1_rev	GCCGTCCACCAGCGACAGGCAATGCGCCTGGAGCGAAAA
G5B88_19620	3877_2_for	TGCCTGTCGCTGGTGGACGGCACGGTCAACTTCAGCGATCAGA
	3877_2_rev	AAGTCCCAGGCCCTTGTCATC
α KGSA deshidrogenasa	0147_1_for	ATCGCCTTCAACGAAAAGTGC
	0147_1_rev	GCCGTCCACCAGCGACAGGCAGCCGCCGATGTAGTTGTGTC
G5B88_00735	0147_2_for	TGCCTGTCGCTGGTGGACGGCCAAAACGCCAATCCGCTGG
	0147_2_rev	CCATCGCGGTCAAACCATTC
HDOP hidrolasa	mhpD_1_for	GGACTGGGTCTAGTTTCTCGG
	mhpD_1_rev	GCCGTCCACCAGCGACAGGCAACCATTCTGCTCTGGGCATCGAC
G5B88_06410	mhpD_2_for	TGCCTGTCGCTGGTGGACGGCGTCCTTGATATGCGCCGACAG
	mhpD_2_rev	TGTCGTGCAGAAGACGTCAA
L-arabinosa deshidrogenasa	ADH_1_for	ACATGGTGCGTATCTCGGAC
	ADH_1_rev	GCCGTCCACCAGCGACAGGCATTCTGGGGAGTGTGCTCAT
G5B88_05250	ADH_2_for	TGCCTGTCGCTGGTGGACGGCATCGTCGATGCCGGTTGG
	ADH_2_rev	TTGCAGCAGACCGACTTCAT
Aldosa 1-epimerasa	galM_1_for	GCGCAGTTTTTCCAGCAAAG
	galM_1_rev	GCCGTCCACCAGCGACAGGCACGGCAGACCACCGCTTATC
G5B88_22780	galM_2_for	TGCCTGTCGCTGGTGGACGGCGCCGAGGTTGCTGATGGTCAC
	galM_2_rev	GCATCAATGTGCTGGCCTC
D-xilulosa quinasa	xylB1_1_for	CGTACGACTACGTGACCCAG
	xylB1_1_rev	GCCGTCCACCAGCGACAGGCAGACCACGGCCTTGACCTC
xylB_1	xylB1_2_for	TGCCTGTCGCTGGTGGACGGCCTATACCAGCCCGACCCCT
	xylB1_2_rev	GTGATGTAGACCTGCTCCCG
D-xilulosa quinasa	xylB2_1_for	ATGTCTTCCACGCTGAACCA
	xylB2_1_rev	GCCGTCCACCAGCGACAGGCACAGGACGAGCTTGACTTCG
xylB_2	xylB2_2_for	TGCCTGTCGCTGGTGGACGGCGAATTCATCGCGTTCTCGC
	xylB2_2_rev	GCATAGCGCACCCGGATAGAT

Luego, estos plásmidos se movilizaron a *H. seropedicae* Z69 y Z69 Δ *xylB* por conjugación triparental empleando *E. coli* TOP10 (pK18*mobsacB*::PCR3) como cepa donadora y *E. coli* TOP10 (pRK2013) (Ditta et al. 1980) como cepa ayudante (ver Anexo A.2). Los transconjugantes se seleccionaron en placas de Petri conteniendo TY-Km⁵⁰-Ácido Nalidíxico (Nal)³⁰. Para inducir el doble evento de recombinación, se sembró una de las colonias transconjugantes en

un tubo conteniendo 5mL de medio TY y se incubó durante toda la noche. Este cultivo fue diluido 1/50 en medio TY y 100µL de esta suspensión celular fue rastrillada en placas de Petri conteniendo TY agar-sacarosa 15 % (p/v). Las colonias que crecieron se repicaron a placas de Petri conteniendo TY sólido y se verificó que las mismas hubiesen perdido la capacidad de crecer en TY-Km⁵⁰ sólido. La presencia de la mutación se determinó mediante PCR, siguiendo las condiciones del PCR 3 a partir de lisados de estas colonias y empleando Mango Mix (Bioline, Cat. No. 450030). Aquellos clones a partir de los cuales se logró amplificar un fragmento del tamaño esperado (menor que el obtenido a partir de la cepa salvaje) se secuenciaron en MacroGen (Corea) empleando el cebador 1_for. La identidad de los genes mutados se confirmó mediante blastn usando el genoma de *H. seropedicae* SmR1 como referencia.

Se estudió la capacidad de crecimiento de estos mutantes en medio LGI con diferentes fuentes de carbono (D-xilosa, L-arabinosa, D-glucosa o xilitol). Los cultivos se realizaron en placas estériles de 96 pocillos conteniendo 200µL de medio LGI-Nal³⁰ suplementado con la fuente de carbono indicada en cada caso. Cada pocillo se inoculó con 20µL de un cultivo crecido durante toda la noche en medio TY-Nal³⁰, el cual se centrifugó y suspendió en igual volumen de agua previo a la inoculación. En cada placa y para cada condición, siempre se incluyó el control con la cepa salvaje. Cada placa de 96 pocillos se incubó a 30°C en el equipo Varioskan Flash 4.00.51 (Thermo Scientific) y se midió la DO_{620nm} cada 2 horas. En los casos en los que se observaron diferencias interesantes, los cultivos se repitieron en tubos de ensayo conteniendo 5mL de medio LGI suplementado con la fuente de carbono indicada en cada caso y se midió la DO_{620nm} en el colorímetro fotoeléctrico ERMA Optical Works Modelo AE-22. En cada lote y para cada condición, se incluyó la cepa salvaje como control. En todos los casos, los cultivos se realizaron por triplicado y las barras de error corresponden al desvío estándar de las tres réplicas biológicas.

1.1.6. Ensayos de complementación

Se amplificó por PCR el gen *araB* usando las condiciones del PCR 3 y ADN genómico de *H. seropedicae* Z69 como molde. El amplicón obtenido se ligó al vector pBBR1MSC-2 (Kovach et al. 1995, Anexo A.2), previamente digerido con *Sma*I (Bioron, Cat. No. 250135S), empleando la ligasa T4 de ADN (ThermoFisher Scientific, Cat. No. EL0011) y siguiendo las recomendaciones

del fabricante. Con esta mezcla de ligación se transformaron células químicamente competentes de *E. coli* TOP10 (según Anexo A.6). Se seleccionaron las colonias blancas que crecieron en LB-Km⁵⁰-X-gal²⁰. Para determinar si el gen quedó clonado en el mismo sentido que el promotor *plac* contenido en el vector, se analizó el perfil de restricción del ADN plasmídico de las colonias seleccionadas luego de ser digerido con la enzima *EcoRI* (ThermoFisher Scientific, Cat. No. ER0275).

El plásmido pBBR1MSC-2::*araB* (con el gen clonado en el mismo sentido que el promotor *plac*) se transfirió a Z69Δ*xylB* y Z69Δ*xylB*Δ*araB* por conjugación triparental como se explicó previamente. Además, se transfirieron los vectores pBBR1MSC-2 y pBBR1MSC-2::*xylB* (Malán et al. 2021) a la cepa Z69Δ*xylB*Δ*araB*. Para confirmar la presencia del vector en los clones resultantes se purificó el ADN plasmídico según Anexo A.5 y el mismo se digirió con *EcoRI* (ThermoFisher Scientific, Cat. No. ER0275); el resultado se visualizó en electroforesis en gel de agarosa según el Anexo A.4.

El perfil de crecimiento en diferentes fuentes carbonadas de estos mutantes se analizó como se describió en el punto anterior (1.1.5).

Además, se determinó la actividad deshidrogenasa en extractos libres de células de las cepas complementadas crecidas en LGI-Km⁵⁰ suplementado con 30g/L de D-xilosa. Para ello, se creció un pre-inóculo de caldo TY-Km⁵⁰ por 24 horas, con el cual se inoculó un matraz Erlenmeyer de 250mL conteniendo 30mL de LGI-Km⁵⁰ suplementado con 10g/L de D-xilosa. Este matraz se incubó durante toda la noche. Con este cultivo se inoculó otro matraz Erlenmeyer de 2L con *buffles* conteniendo LGI-Km⁵⁰ suplementado con 30g/L de D-xilosa, el cual se incubó por 22 horas. Las células se colectaron por centrifugación (5.000g por 8 minutos). Cada *pellet* se lavó una vez con *buffer* fosfato de sodio 50mM a pH=7,6. Finalmente, aproximadamente 6g de *pellet* húmedo se suspendió en 5mL del mismo *buffer*.

Los extractos celulares se obtuvieron al romper las células con una prensa de French (Aminco) a una presión de 13.000psi. La suspensión obtenida se centrifugó en frío a 14.000rpm por 30 minutos (Catalán et al. 2007). El sobrenadante se fraccionó en varios tubos con 500μL aproximadamente y se guardó a -20°C hasta su utilización .

La actividad deshidrogenasa se estimó midiendo la aparición de NADH por aumento de la absorbancia a 340nm cada 0,2 segundos en la parte lineal; por lo tanto la actividad deshidrogenasa determinada corresponde a la actividad

de todas las enzimas presentes en el extracto que sean capaces de oxidar el sustrato ensayado (D-xilosa, L-arabinosa o D-glucosa). Los ensayos se llevaron a cabo en cubetas de cuarzo, con un volumen final de 1mL, en donde se adicionó 895µL de *buffer* fosfato de sodio 100mM a pH=7,6, 20µL de extracto celular (diluído 1/10 en el mismo *buffer*), 80µL NAD⁺ 50mM y 5µL de D-xilosa o L-arabinosa o D-glucosa 1M (Stephens, Christen, Fuchs et al. 2007). La reacción comenzó a monitorearse luego del agregado del carbohidrato. Todas las medidas se corrigieron descontando el NADH producido sin la presencia del azúcar (blanco). La actividad enzimática se estimó a partir de la curva de absorbancia en función del tiempo calculando la pendiente en la parte lineal de la misma. Una Unidad de actividad enzimática (U) se definió como la cantidad de enzima que se requiere para reducir 1µmol de NAD⁺ en 1 minuto. Cada medida se realizó por triplicado y los errores corresponden a la desviación estándar de los valores de actividad obtenidos en medidas independientes. La determinación de proteínas en cada extracto celular se realizó empleando el reactivo de Bradford (Sigma, Cat. No. B6916), siguiendo las instrucciones del fabricante y utilizando seroalbúmina bovina para la curva de calibración.

1.1.7. RT-qPCR

La extracción de ARN se realizó a partir de células de *H. seropedicae* Z69 crecidas en matraces Erlenmeyer de 250mL conteniendo 25mL de medio de cultivo LGI suplementado con 30g/L de D-xilosa o 30g/L de L-arabinosa y *buffer* MES 50mM a pH=7,0. Estos matraces se inocularon con el respectivo cultivo crecido en tubos conteniendo 5mL de LGI suplementado con 10g/L de D-xilosa o L-arabinosa por 24hs, de modo tal que la DO_{620nm} inicial fuera de aproximadamente 0,065. Estos tubos de ensayo fueron originalmente inoculados con cultivos crecidos durante toda la noche en tubos de ensayo conteniendo 5mL de medio rico TY. La extracción de ARN se realizó cuando la DO_{620nm} del cultivo llegó a aproximadamente 0,8.

Para aislar el ARN se utilizó el kit Quick-RNA Miniprep (Zymo Research, Cat. No. R1054) siguiendo las instrucciones del fabricante, salvo las modificaciones que se detallan a continuación. Se partió de 500µL de cultivo, las células se colectaron por centrifugación y se pretrataron con lizosima 0,4mg/mL en *buffer* TE (Tris-HCl 10mM; EDTA 1mM; pH=8) por 5 minutos a temperatura ambiente. En el paso final, se realizaron 2 eluciones de la misma columna,

de 50µL cada una. Se verificó la presencia de ADN contaminante por qPCR para el gen *xylF* utilizando 1µL de ARN como templado en las muestras de ARN eluídas. Por este motivo, se procedió a efectuar una segunda hidrólisis con DNAsaI suplementada en el kit. Para ello, se juntaron las dos eluciones de ARN (aproximadamente 88µL) en un tubo de 1,5µL libre de DNAsa/RNAsa y se adicionó 5µL de DNAsaI y 11µL de *DNA Digestion Buffer*. Se incubó 15 minutos a temperatura ambiente. Luego se continuó con el protocolo de purificación empleando el kit de extracción de ARN mencionado. Para ello se agregó 208µL de *buffer* de lisis y 312µL de etanol 100 %. Esta mezcla se transfirió a la columna Zymo-SpinIIIIG (verde) y se continuó con las instrucciones del fabricante hasta el final, en donde se realizaron 2 eluciones separadas de 50µL cada una. La calidad del ARN se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1 % (p/v) con hipoclorito de sodio 1 % (Aranda et al. 2012) y 3µL de Good View (SBS, Cat. No. HGV-2). La concentración de ARN se determinó por Nanodrop. La ausencia de ADN contaminante se verificó por qPCR para el gen *xylF* empleando 1µL de cada extracción de ARN diluida 1/30 en agua. La retrotranscripción reversa se realizó con el kit SensiFAST cDNA Synthesis Kit (Bioline, Cat. No. BIO-65053) siguiendo las instrucciones del fabricante. En cada reacción se agregó un volumen de muestra conteniendo 800ng de ARN. Se realizaron, además, los controles sin templado y sin retrotranscriptasa reversa.

Las qPCR se efectuaron en el Termociclador RotorGene 6000 (Corbett Research) empleando el kit SensiFAST SYBR no-ROX kit (Meridian Bioscience, Cat. No. BIO-98005). Se utilizaron las tiras de tubos de 0,1mL con tapa (SSI-bio, Cat. No. 3188-00), salvo para las curvas de eficiencia de los genes *rpoA*, *recA*, *xylF*, *mhpD* y *araB*, en donde se utilizaron las tiras de tubos de 0,1mL con tapa (Axigen, Cat. No. PCR-0104-C). El programa de qPCR consistió en un primer paso de 5 minutos a 95°C y 40 ciclos de 30 segundos a 95°C y 30 segundos a 60°C. Al final de cada ciclo se determinó la fluorescencia en el canal verde. Luego se realizó la curva de desnaturalización subiendo de 60°C a 99°C a 1°C por paso. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 10µL conteniendo 5µL de la mix SensiFAST SYBR no-ROX, 0,3µL de cada cebador (stock:10mM) y 4,4µL de ADNc diluído 1/30 en agua. Se realizaron tres réplicas biológicas y dos réplicas técnicas de cada una. En todas las qPCR se realizaron controles sin templado. Se evaluaron dos genes de referencia: *recA* y *rpoA* previamente validados por Pessoa et al. 2016. Se usó el gen *recA* como referencia por presentar menor dispersión entre las muestras (ver B.5). En la Tabla 1.2 se

detallan los cebadores utilizados para cada gen. Los mismos fueron diseñados con el programa Primer-BLAST (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) y se sintetizaron en Macrogen (Corea). Para cada juego de cebadores se realizaron las curvas de eficiencia con siete puntos por duplicado empleando 4,4µL de ADN genómico de *H. seropedicae* Z69 en diluciones seriadas 1/10. Para la cuantificación se emplearon los cebadores cuya eficiencia estaba entre 90 y 105 %, con una linealidad determinada por $R^2 > 0,980$; de acuerdo a lo recomendado por las guías MIQE (Bustin et al. 2009). Algunos de estos productos de qPCR se corrieron en electroforesis de agarosa (según Anexo A.4) para verificar la presencia de un único amplicón. En todos los casos se analizó la curva de desnaturalización para verificar la presencia de un único amplicón y la ausencia de dímeros de cebadores. En los casos que no se cumplieron estos controles de calidad, se diseñaron y sintetizaron nuevos cebadores y se repitió el procedimiento hasta encontrar un par que cumpliera con los requisitos (Bustin et al. 2009). Los resultados de las qPCR, las curvas de eficiencia y las curvas de desnaturalización se analizaron con el software Rotor-Gene Q - Pure Detection 2.3.1 (Qiagen).

El valor de cambio en la expresión de genes o "*fold change*" se calculó de la siguiente manera:

$$2^{-((Ct_{gen} - Ct_{recA}) - (Ct_{promedio_{gen}} - Ct_{promedio_{recA}}))} \quad (1.1)$$

Siendo:

Ct_{gen} = Promedio de los dos Ct obtenidos para el gen analizado en cada réplica biológica de Z69 crecida en L-arabinosa

Ct_{recA} = Promedio de los dos Ct obtenidos para el gen de referencia *recA* en cada réplica biológica de Z69 crecida en L-arabinosa

$Ct_{promedio_{gen}}$ = Promedio todos los Ct obtenidos para el gen analizado en el control: Z69 crecida en D-xilosa

$Ct_{promedio_{recA}}$ = Promedio todos los Ct obtenidos para el gen de referencia *recA* en el control: Z69 crecida en D-xilosa

Sobre los valores de dCt, calculados como ($Ct_{gen} - Ct_{recA}$), se realizó el *unpaired t test* con un α de 0,05, empleando el programa GraphPad Prism 6.01.

Tabla 1.2: Cebadores utilizados para RT-qPCR

Gen	Nombre del cebador	Secuencia (5'->3')
<i>recA</i>	recA_for	AATGCCCTGAAGTTCTACGC
	recA_rev	TGTTCTTGACGACCTTGACC
<i>rpoA</i>	rpoA_for	GCCGAATACTCGTCCCTGG
	rpoA_rev	CCTTCGCCTTCCTTCTTCAG
<i>xylR</i>	xylR_for_qPCR	GCATCGCTGGCCATATCTAC
	xylR_rev_qPCR	GGTCACTGCAATGATGCCTA
<i>xylC</i>	xylC_for_qPCR	GTCACAAGTTGCTGGGACTG
	xylC_rev_qPCR	GCCAGTACATCCAGCGTATAG
<i>xylA</i>	xylA_for_qPCR	TTGGACACAACCTACATCGGC
	xylA_rev_qPCR	GAAAGGGGTTTCGAAGAGCG
<i>mhpD</i>	mhpD_qPCR_for	TGTGGGCAATATCGGCAAGT
	mhpD_qPCR_rev	CCACTTCCCAGTCGGTCTTC
<i>araB</i>	ADH_qPCR_for	TGGAATACTGGAACGACCGC
	ADH_qPCR_rev	TGCCAGCTGATCGAACTGAA

1.2. Resultados

1.2.1. Secuenciación y anotación del genoma de *H. seropedicae* Z69

El genoma de *H. seropedicae* Z69 se subió al GenBank y se encuentra disponible con el número de acceso CP049334. El genoma de Z69 presenta 99,99% de ANI con el genoma de la cepa de referencia SmR1 y 86,99% con el genoma de *H. huttiense*.

La anotación automática realizada por PGAP identificó los genes que codifican para el transportador de D-xilosa del tipo ABC: *xylF*, *xylG* y *xylH* y el gen *xylR* que codificaría para un regulador transcripcional con motivos de unión al ADN. Sin embargo, no fue capaz de identificar ningún gen que codificara para las enzimas involucradas en las rutas no fosforilativas del catabolismo de D-xilosa. En la Figura 1.1 se muestran varios grupos de genes posiblemente involucrados en el catabolismo de D-xilosa y/o L-arabinosa. Los mismos fueron identificados por tblastn como se describió en 1.1.3 y estudiados de forma experimental en esta tesis.

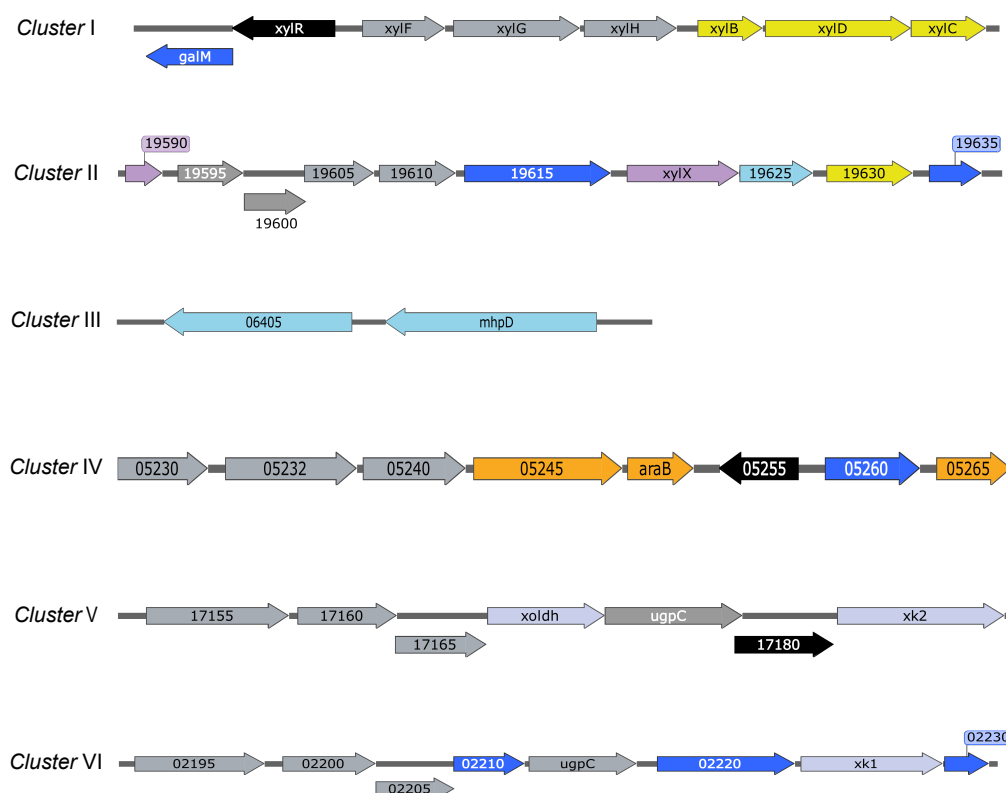


Figura 1.1: Grupos de genes involucrados en el catabolismo de D-xilosa identificados en el genoma de *H. seropedicae* Z69. En gris se muestran los genes que codifican para transportadores de diversos sustratos, en negro los que codifican para reguladores transcripcionales. En amarillo se destacan los genes que codifican para enzimas de la ruta no fosforilativa superior, en violeta y celeste los genes de las rutas no fosforilativas inferiores de Weimberg y Watanabe respectivamente, en azul se muestran otras enzimas aparentemente no relacionadas con el catabolismo de D-xilosa. La asignación de función de estos genes se realizó en base a los resultados experimentales obtenidos más adelante en la tesis. En el *cluster* IV se encuentran los genes involucrados del catabolismo de L-arabinosa (ruta no fosforilativa superior), mientras que los *clusters* V y VI estarían involucrados en el metabolismo del xilitol y/o ruta oxo-reductiva.

1.2.2. Transcriptómica

Al analizar los resultados obtenidos en los experimentos de RNA-seq de *H. seropedicae* Z69, se encontró que, cuando se cultivó la cepa en D-xilosa, ésta sobre-expresó 254 genes y disminuyó la expresión de 145 genes, en comparación con la misma cepa cultivada en glicerol como única fuente carbonada. Cuando

la cepa mutante Z69 Δ *xylB* creció en presencia de D-xilosa (comparado con los resultados obtenidos con la cepa salvaje cultivada en D-xilosa), se detectó la sobre-expresión diferencial de 127 genes y la disminución en la expresión de 220 genes. En la Tabla 1.3 se muestran los resultados de los genes involucrados en el catabolismo de D-xilosa discutidos en esta tesis. En el Apéndice A se muestran los resultados de los controles de calidad realizados en este experimento.

Tabla 1.3: Resultado de los experimentos de RNA-seq: genes relacionados con el metabolismo de D-xilosa en *H. seropedicae* Z69 crecida en D-xilosa cuando se compara con Z69 crecida en glicerol como única fuente carbonada y en Z69 Δ *xyIB* comparada con Z69, ambas crecidas en D-xilosa.

Enzima	Nombre del gen		Z69 en D-xylose vs Z69 en glicerol		Z69Δ <i>xyIB</i> vs Z69 ambas en D-xilosa		Anotación actual en Z69
	SmR1	Z69	log2FoldChange		log2FoldChange		
D-xilosa deshidrogenasa	HSERO_RS22475	G5B88.22805 (<i>xyIB</i>)	3,48	3,82E-07	-	-	SDR family oxidoreductase
D-xilonolactonasa	HSERO_RS22485	G5B88.22815 (<i>xyIC</i>)	2,99	4,08E-06	2,61	1,36E-15	amidohydrolase family protein
D-xilonato deshidratasa	HSERO_RS19370	G5B88.19630	-0,9	0,63	-0,0058	0,99	SMP-30/gluconolactonase/LRE family protein
	HSERO_RS22480	G5B88.22810 (<i>xyID</i>)	3,75	3,17E-15	2,07	8,54E-12	dihydroxy-acid dehydratase family protein
D-arabinonato deshidratasa	HSERO_RS16705	<i>alaD</i>	-1,88	0,00033	2,70	1,21E-11	dihydroxy-acid dehydratase
	HSERO_RS19355	G5B88.19615	4,45	5,59E-07	2,38	7,32E-12	Altronate dehydratase
D-KDP deshidratasa	HSERO_RS19360	G5B88.19620 (<i>xyIX</i>)	-1,97	1,19E-06	2,15	2,49E-10	Fumarylacetoacetate hydrolase family protein
αKGSa deshidrogenasa	HSERO_RS00735	G5B88.00735 (<i>xyIA</i>)	4,77	9,48E-26	-0,67	0,098	Aldehyde dehydrogenase (NADP(+))
D-KDP deshidrogenasa	HSERO_RS19365	G5B88.19625	1,30	0,015	1,49	0,00080	SDR family oxidoreductase
L-KDP deshidrogenasa	HSERO_RS06350	G5B88.06405	1,83	0,033	-1,38	0,082	SDR family oxidoreductase
HDOP hidrolasa	HSERO_RS06355	G5B88.06410 (<i>mhpD</i>)	2,83	8,95E-07	-1,88	0,0033	Fumarylacetoacetate hydrolase family protein
L-arabinosa deshidrogenasa	HSERO_RS05210	G5B88.05250 (<i>araB</i>)	3,96	4,84E-07	0,76	0,17	SDR family oxidoreductase
L-arabinolactonasa	HSERO_RS05225	G5B88.05265	1,41	0,19	3,02	2,24E-14	SMP-30/gluconolactonase/LRE family protein
L-arabinato deshidratasa	HSERO_RS05205	G5B88.05245	3,81	5,61E-22	0,23	0,70	dihydroxy-acid dehydratase
L-KDP deshidratasa	HSERO_RS06870	G5B88.06915	2,62	0,00034	-2,27	0,00026	Dihydrodipicolinate synthase family protein
aldosa 1-epimerasa	HSERO_RS22450	G5B88.22780 (<i>galM</i>)	-0,49	0,80	3,99	4,67E-15	Galactose mutarose
xilitol deshidrogenasa	HSERO_RS17015	G5B88.17170 (<i>xolDH</i>)	0,93	0,46	3,42	2,86E-17	NAD(P)-dependent alcohol dehydrogenase
D-xilulosa	<i>xyIB_1</i>	xyIB.1 (<i>ak1</i>)	1,30	0,13	0,086	0,95	xylokkinase
quinasa	<i>xyIB_2</i>	xyIB.2 (<i>ak2</i>)	0,34	0,86	3,17	3,84E-10	xylokkinase
D-xilosa isomerasa	HSERO_RS18790	G5B88.19045	-0,64	NA	0,23	NA	Sugar phosphate isomerase/ epimerase
Regulador de la transcripción	HSERO_RS22455	G5B88.22785 (<i>xyIR</i>)	0,83	0,27	2,74	6,21E-16	DNA-binding transcription regulator
Transportador del tipo ABC	<i>xyIF</i>	<i>xyIF</i>	5,07	9,73E-30	2,13	7,49E-11	D-xylose ABC transporter substrate-binding protein
	HSERO_RS22465	<i>xyIG</i>	4,99	2,46E-18	2,74	5,35E-19	D-xylose ABC transporter ATP-binding
	HSERO_RS22470	G5B88.22800 (<i>xyIH</i>)	4,25	1,88E-14	2,69	1,18E-18	Sugar ABC transporter permease

1.2.3. Análisis del fenotipo de las cepas mutantes en genes presuntamente involucrados en el catabolismo de D-xilosa

En la Tabla 1.4 se listan todas las cepas mutantes apolares dirigidas, construidas en este trabajo.

Tabla 1.4: Lista de mutantes generados en esta tesis

Nombre de la cepa	Genes eliminados	Enzima
<i>Z69Δ<i>xykB</i>Δ<i>araB</i></i>	G5B88_22805	D-xilosa deshidrogenasa y L-arabinosa deshidrogenasa
<i>Z69Δ<i>xyLC</i></i>	G5B88_22815	D-xilonolactonasa
<i>Z69Δ<i>xyLB</i>Δ<i>xyLC</i></i>	G5B88_22805 y G5B88_22815	D-xilosa deshidrogenasa y D-xilonolactonasa
<i>Z69Δ<i>xyLX</i></i>	G5B88_19620	D-KDP deshidratasa
<i>Z69Δ<i>xyLB</i>Δ<i>xyLX</i></i>	G5B88_22805 y G5B88_19620	D-xilosa deshidrogenasa y D-KDP deshidratasa
<i>Z69Δ<i>xyLA</i></i>	G5B88_00735	α KGSA deshidrogenasa
<i>Z59Δ<i>xyLB</i>Δ<i>xyLA</i></i>	G5B88_22805 y G5B88_00735	D-xilosa deshidrogenasa y α KGSA deshidrogenasa
<i>Z69Δ<i>mhpD</i></i>	G5B88_06410	HDOP hidrolasa
<i>Z69Δ<i>xyLB</i>Δ<i>mhpD</i></i>	G5B88_22805 y G5B88_06410	D-xilosa deshidrogenasa y HDOP hidrolasa
<i>Z69Δ<i>galM</i></i>	G5B88_22780	aldosa 1-epimerasa
<i>Z69Δ<i>xyLB</i>Δ<i>galM</i></i>	G5B88_22805 y G5B88_22780	D-xilosa deshidrogenasa y aldosa 1-epimerasa
<i>Z69Δ<i>xk1</i></i>	<i>xyLB_1</i>	D-xilulosa quinasa
<i>Z69Δ<i>xyLB</i>Δ<i>xk1</i></i>	G5B88_22805 y <i>xyLB_1</i>	D-xilosa deshidrogenasa y D-xilulosa quinasa
<i>Z69Δ<i>xk2</i></i>	<i>xyLB_2</i>	D-xilulosa quinasa
<i>Z69Δ<i>xyLB</i>Δ<i>xk2</i></i>	G5B88_22805 y <i>xyLB_2</i>	D-xilosa deshidrogenasa y D-xilulosa quinasa
<i>Z69Δ<i>xyLB</i>Δ<i>xk2</i>Δ<i>xk1</i></i>	G5B88_22805, <i>xyLB_2</i> y <i>xyLB_1</i>	D-xilosa deshidrogenasa y D-xilulosa quinasa

1.2.3.1. Rutas no fosforilativas

1.2.3.1.1. Primer paso de las rutas no fosforilativas

El primer paso de las rutas no fosforilativas está catalizado por la D-xilosa deshidrogenasa codificada por el gen *xylB* o por la L-arabinosa deshidrogenasa codificada por el gen *araB* para el catabolismo de D-xilosa o L-arabinosa respectivamente. Los mutantes $Z69\Delta xylB$ y $Z69\Delta araB$ fueron capaces de crecer en D-xilosa o L-arabinosa (Ver Figura 1.2). El doble mutante $Z69\Delta xylB\Delta araB$ no fue capaz de crecer en D-xilosa o L-arabinosa como única fuente carbonada (Figura 1.2). Las cepas complementadas del mutante $Z69\Delta xylB\Delta araB$, expresando los genes *xylB* o *araB* bajo el control del promotor constitutivo *plac*, recuperaron su capacidad de crecer en D-xilosa y L-arabinosa como únicas fuentes carbonadas, tal como se observa en la Figura 1.2. A su vez, las enzimas codificadas por los genes *xylB* o *araB* son capaces de utilizar D-xilosa, L-arabinosa o D-glucosa como sustratos, tal como se observa en las determinaciones enzimáticas efectuadas en los extractos libres de células de la Figura 1.3.

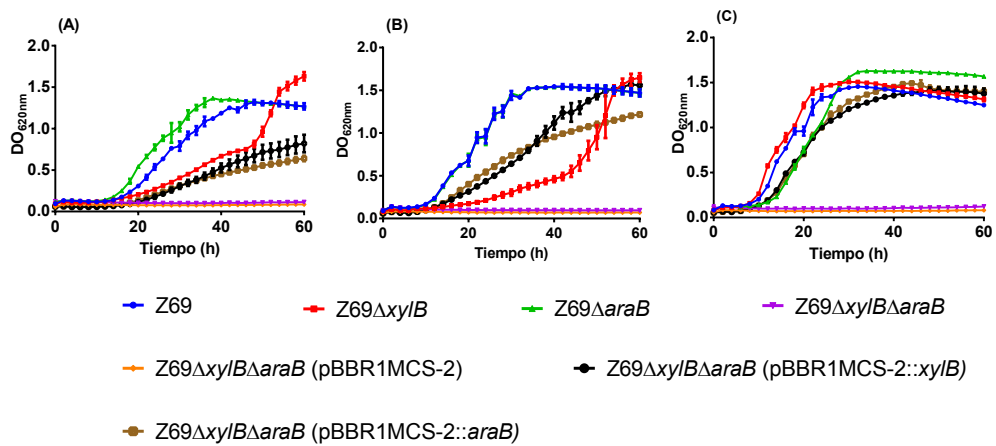


Figura 1.2: Perfiles de crecimiento de *H. seropedicae* Z69, de los mutantes en los genes *xylB* y/o *araB* y las cepas complementadas crecidas en medio LGI suplementado con (A) 30g/L de D-xilosa, (B) 10g/L de D-xilosa y (C) 10g/L de L-arabinosa.

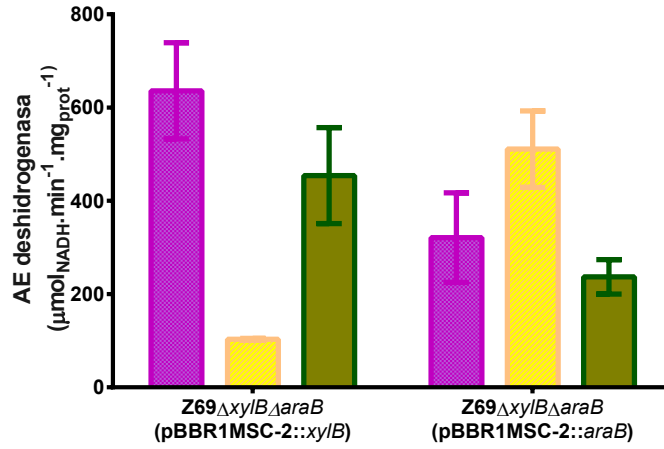


Figura 1.3: Actividad deshidrogenasa empleando NAD^+ como cofactor, determinada en extractos libres de células de las cepas complementadas crecidas en LGI suplementado con 30 g/L de D-xilosa empleando D-xilosa (magenta), L-arabinosa (amarillo) o D-glucosa (verde) como sustrato.

1.2.3.1.2. Segundo paso de las rutas no fosforilativas

Según la anotación del KEGG, la D-xilonolactonasa estaría codificada por el gen Hsero_3879 (HSERO_RS19370) en *H. seropedicae* SmR1. Este ORF es idéntico a G5B88_19630 en Z69.

El análisis de tblastn usando XylC de *C. crescentus* como *query* mostró que, en Z69, el ORF con mayor identidad proteica es G5B88_19630 (36 %), seguido de G5B88_05265 con 35 % de identidad. Este último ORF es idéntico a HSERO_RS05225 en SmR1, recientemente re-anotado por Price et al. 2018 como el codificante de la L-arabinolactonasa. Sin embargo, G5B88_19630, localizado en el *cluster* II (Figura 1.1), no fue inducido por D-xilosa en Z69 de acuerdo a los resultados de RNA-seq (Tabla 1.3).

Por otro lado se encuentra el ORF G5B88_22815 en Z69 (*xylC*, ubicado en el *cluster* I de la Figura 1.1), el cual sólo tiene un 15 % de identidad proteica con XylC de *C. crescentus*. La anotación automática de este gen por PGAP indica que codificaría para una proteína de la familia amidohidrolasas, perteneciente a la superfamilia de hidrolasas dependientes de metales. El ensayo por RNA-seq mostró que este ORF estaba sobre-expresado en Z69 cultivada en presencia de D-xilosa comparado con la expresión determinada en la misma cepa cultivada en glicerol, incluido como condición control. Estos datos sugieren que el ORF

G5B88_22815 estaría involucrado en el catabolismo de D-xilosa. Para verificar esta hipótesis se construyó el mutante $Z69\Delta xylC$, el cual presentó un perfil de crecimiento similar al de la cepa salvaje al ser cultivado en presencia de las distintas fuentes de carbono ensayadas (Figura 1.4). Sin embargo, el doble mutante $Z69\Delta xylB\Delta xylC$ fue capaz de crecer en D-xilosa luego de una extensa fase lag (40-50 horas) (Figura 1.4 A y B). Estos cultivos se repitieron en tubos de ensayo conteniendo 5mL de medio de cultivo, en dónde se observó que luego de la extensa fase lag el doble mutante $Z69\Delta xylB\Delta xylC$ era capaz de crecer y llegar a valores de DO_{620nm} similares a los obtenidos en la cepa salvaje en las mismas condiciones. Los perfiles de crecimiento del doble mutante en L-arabinosa, xilitol o D-glucosa no se vieron afectados respecto a la cepa salvaje crecida en las mismas condiciones (Figura 1.4 C, D y E).

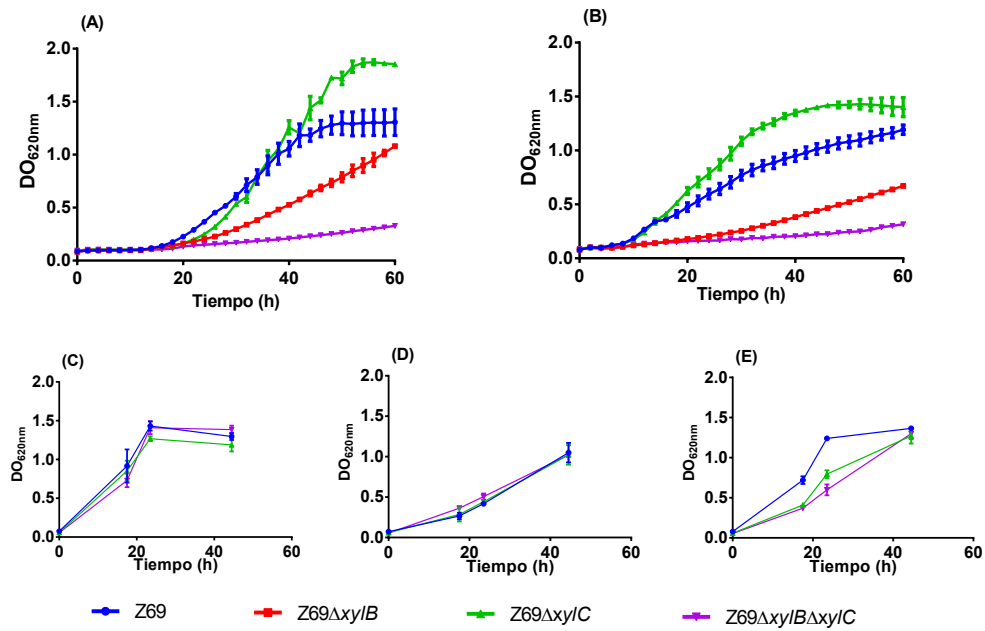


Figura 1.4: Perfiles de crecimiento de *H. seropedicae* Z69 y de los mutantes en los genes *xylB* y/o *xylC* en medio LGI suplementado con (A) 30g/L de D-xilosa, (B) 10g/L de D-xilosa, (C) 10g/L de L-arabinosa, (D) 10g/L de xilitol o (E) 10 g/L de D-glucosa.

1.2.3.1.3. Cuarto paso de la ruta de Weimberg

Según Price et al. 2018, la enzima D-KDP deshidratasa estaría codificada por el gen HSERO_RS19360 en *H. seropedicae* SmR1 (idéntico a G5B88_19620 (*xylX*) en Z69). Recientemente, Sutiono et al. 2020 verificaron que este gen efectivamente codifica la enzima D-KDP deshidratasa mediante la caracterización bioquímica *in vitro* de la proteína recombinante purificada. Además, este gen presenta 98 % de identidad proteica con C785_RS13680 de *H. huttiense*, cuya enzima tiene actividad D-KDP deshidratasa, verificada por ensayos bioquímicos realizados sobre la proteína recombinante purificada (Watanabe et al. 2019). De acuerdo a los resultados obtenidos por RNA-seq, el gen *xylX* se expresa en Z69 crecida en D-xilosa, pero su expresión es menor en comparación a Z69 crecida en glicerol (ver Tabla 1.3). A su vez, el mutante Z69 Δ *xylX* exhibió un crecimiento reducido en D-xilosa en comparación a Z69 como se muestra en la Figura 1.5.

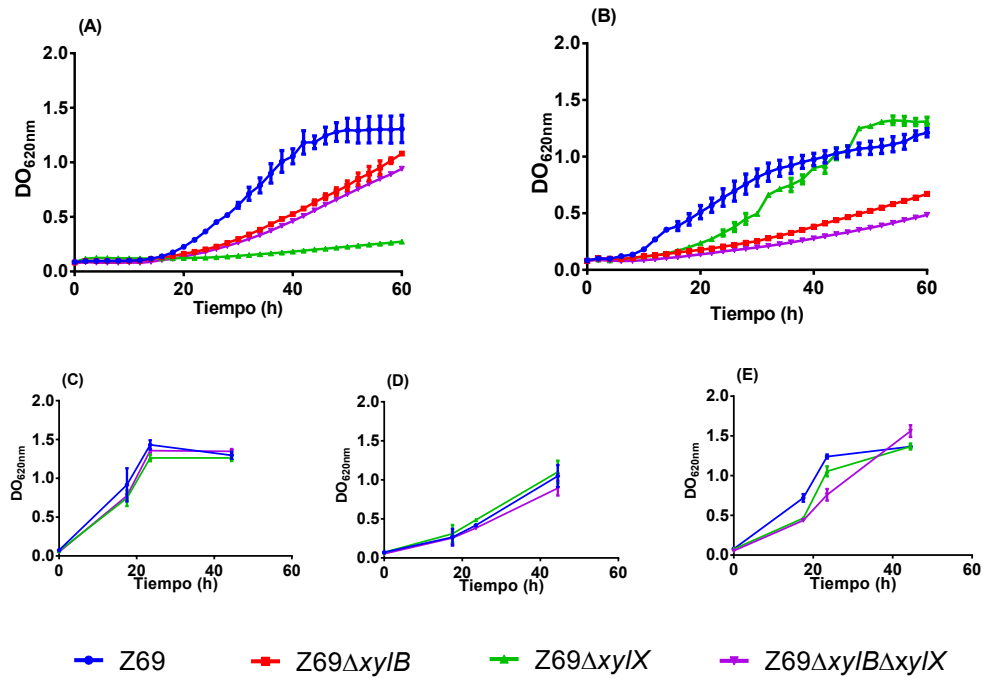


Figura 1.5: Perfiles de crecimiento de *H. seropedicae* Z69, y de los mutantes en los genes *xylB* y/o *xylX* en medio LGI suplementado con (A) 30g/L de D-xilosa, (B) 10g/L de D-xilosa, (C) 10g/L de L-arabinosa, (D) 10g/L de xilitol o (E) 10 g/L de D-glucosa.

1.2.3.1.4. Quinto paso de la ruta de Weimberg

El último paso de la ruta de Weimberg es compartido con la ruta del catabolismo de L-arabinosa. En él está involucrada una α KGSA deshidrogenasa codificada por el gen HSERO_RS00735 en *H. seropedicae* SmR1 (Price et al. 2018) idéntico a G5B88_00735 (*xylA*) en Z69. Los resultados obtenidos en los experimentos de RNA-seq mostraron que este gen está sobre-expresado en Z69 crecida en D-xilosa comparado con el control que incluye a la misma cepa cultivada con glicerol como fuente de carbono (Tabla 1.3). Por otro lado, el mutante Z69 Δ *xylA* presentó un crecimiento reducido en LGI suplementado con 30g/L de D-xilosa o 10g/L de L-arabinosa, tal como se muestra en la Figura 1.6.

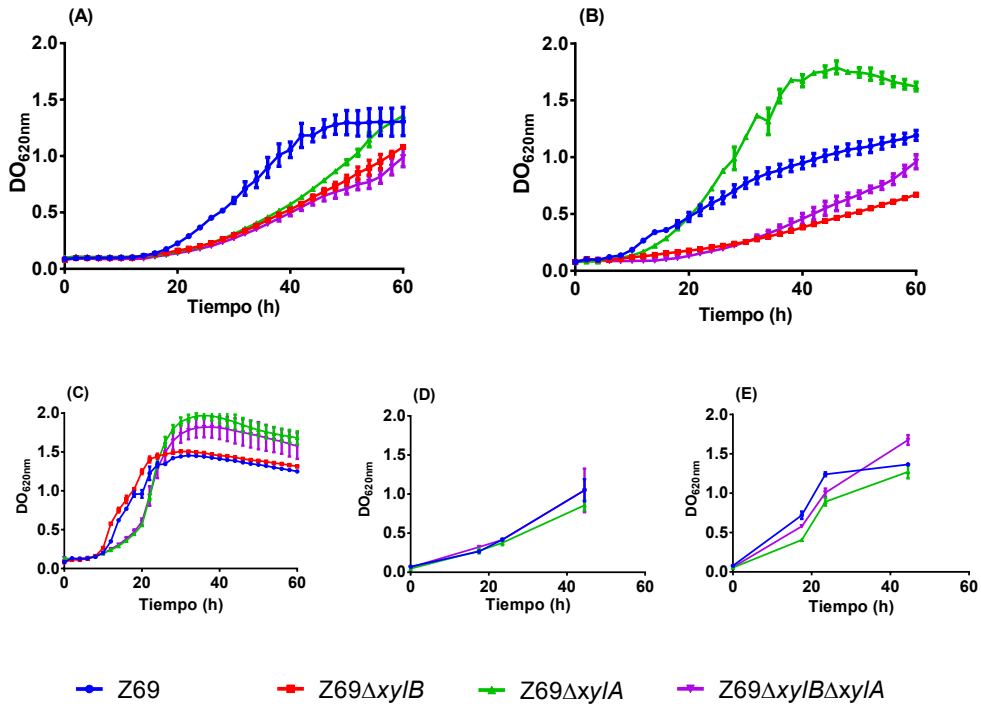


Figura 1.6: Perfiles de crecimiento de *H. seropedicae* Z69, y de los mutantes en los genes *xylB* y/o *xylA* en medio LGI suplementado con (A) 30g/L de D-xilosa, (B) 10g/L de D-xilosa, (C) 10g/L de L-arabinosa, (D) 10g/L de xilitol o (E) 10 g/L de D-glucosa.

1.2.3.1.5. Cuarto paso de la nueva ruta no fosforilativa inferior

Watanabe et al. 2019 describieron una nueva ruta no fosforilativa para el catabolismo de D-xilosa y L-arabinosa en *H. huttiense* (Figura 1). La D-KDP deshidrogenasa identificada por estos autores tiene 96 % de similitud aminoacídica con la proteína codificada por el gen G5B88_19625 de *H. seropedicae* Z69, mientras que la L-2-ceto-3-deoxi-pentonato (L-KDP) presenta 96 % de identidad aminoacídica con G5B88_06405. Ambos genes no fueron significativamente sobre-expresados en Z69 al crecer en presencia de D-xilosa comparada con el control en glicerol (Tabla 1.3). Además, la expresión del gen G5B88_19625 fue reprimida respecto al control en glicerol, indicando que la expresión de este gen no es inducida por D-xilosa o sus metabolitos. Sin embargo, se detectó la presencia de transcritos en las tres condiciones estudiadas, indicando que el gen G5B88_19625 está expresado en Z69 al crecer en presencia de D-xilosa, por lo que podría estar implicado en el catabolismo de esta pentosa.

1.2.3.1.6. Quinto paso de la nueva ruta no fosforilativa inferior

El último paso de esta ruta está catalizado por la HDOP hidrolasa. La enzima involucrada en este paso en *H. huttiense* presenta 95 % de identidad proteica con G5B88_06410 (*mhpD*) de Z69. En los experimentos de RNA-seq, este gen fue diferencialmente expresado en Z69 al crecer en D-xilosa comparado con el control en glicerol (Tabla 1.3). El mutante Z69 Δ *mhpD* fue capaz de crecer en D-xilosa como única fuente carbonada luego de una extensa fase lag (40-50 horas) (1.7 (A y B)). Estos cultivos se repitieron en tubos de ensayo conteniendo 5mL de medio de cultivo, en dónde se observó que luego de la extensa fase lag el mutante Z69 Δ *mhpD* fue capaz de crecer y llegar a valores de DO_{620nm} similares a los obtenidos en la cepa salvaje en las mismas condiciones. Los perfiles de crecimiento de esta mutante son similares a los de la cepa salvaje en las otras fuentes de carbono ensayadas (Figura 1.7 C, D y E).

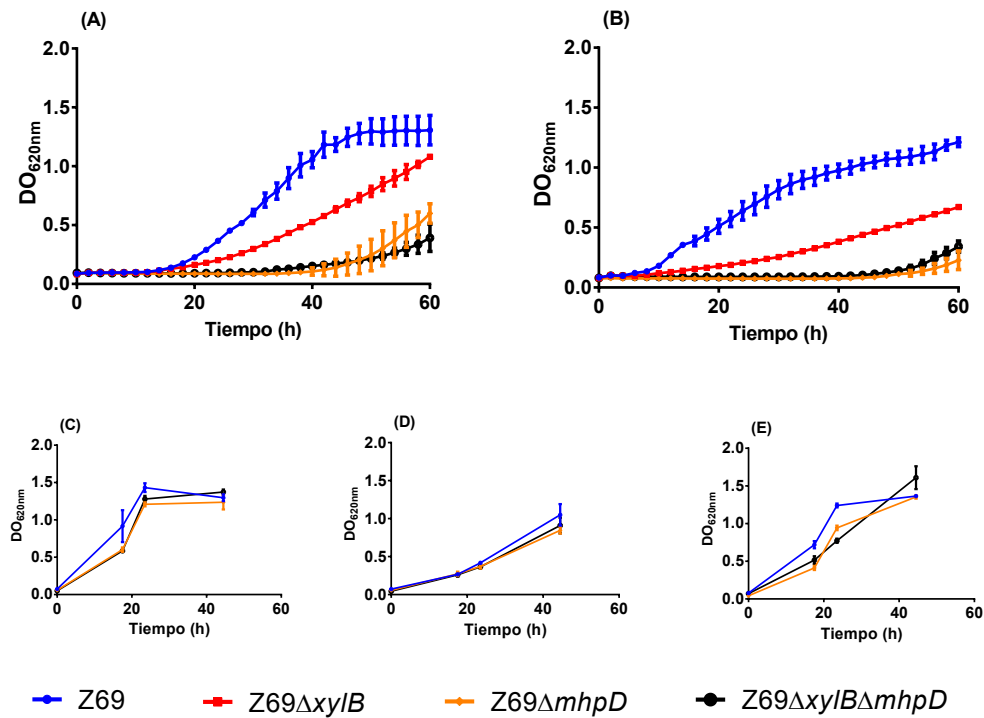


Figura 1.7: Perfiles de crecimiento de *H. seropedicae* Z69, y de los mutantes en los genes *xylB* y/o *mhpD* en medio LGI suplementado con (A) 30g/L de D-xilosa, (B) 10g/L de D-xilosa, (C) 10g/L de L-arabinosa, (D) 10g/L de xilitol o (E) 10 g/L de D-glucosa.

1.2.3.2. Otras alternativas

1.2.3.2.1. Aldosa 1-epimerasa

Como el mutante $Z69\Delta xylB$ es capaz de crecer en D-xilosa, se evaluó la posibilidad de que utilizara un camino alternativo, involucrado en la conversión de D-xilosa en L-arabinosa. En los experimentos de RNA-seq se detectó que el gen *galM*, que codifica para una aldosa 1-epimerasa, estaba sobre-expresado en $Z69\Delta xylB$ con respecto a la cepa salvaje, ambas crecidas en D-xilosa (ver Tabla 1.3). Sin embargo, el doble mutante $Z69\Delta xylB\Delta galM$ no presentó diferencias de crecimiento con respecto al mutante $Z69\Delta xylB$ cuando fueron cultivados en D-xilosa o D-glucosa tal como se observa en la Figura 1.8.

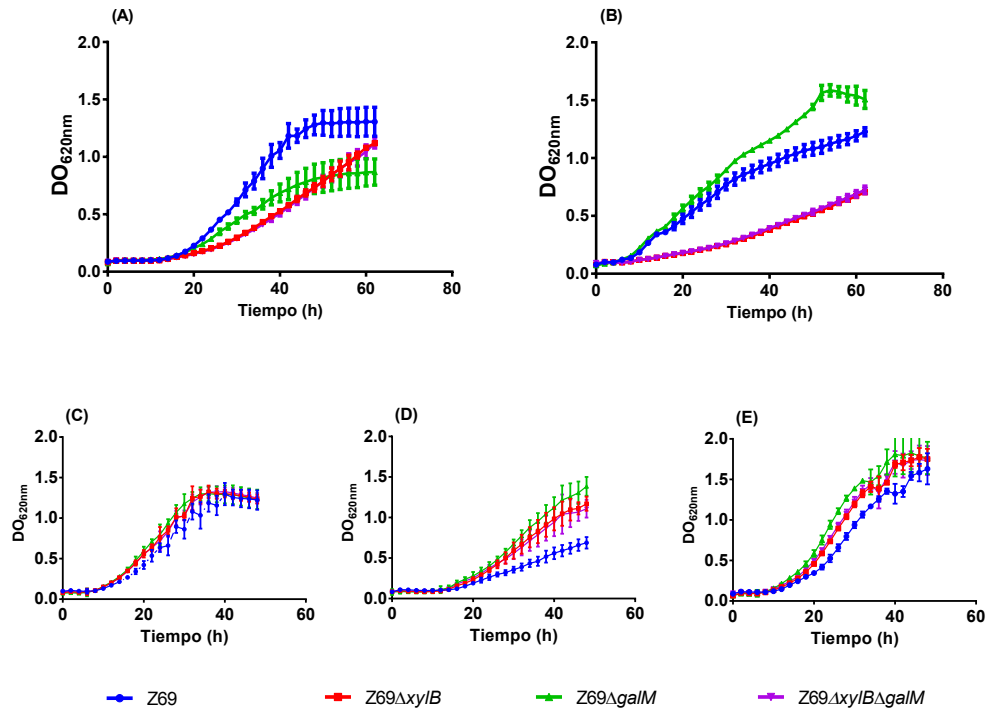


Figura 1.8: Perfiles de crecimiento de *H. seropedicae* Z69, y de los mutantes en los genes *xylB* y/o *galM* en medio LGI suplementado con (A) 30g/L de D-xilosa, (B) 10g/L de D-xilosa, (C) 10g/L de L-arabinosa, (D) 10g/L de xilitol o (E) 10 g/L de D-glucosa.

1.2.3.3. Rutas fosforilativas

1.2.3.3.1. D-xilulosa quinasa

El último paso de las rutas fosforilativas (oxo-reductiva y D-xilosa isomerasa) involucra la enzima D-xilulosa quinasa (Figura 2). *H. seropedicae* Z69 contiene dos genes anotados como *xylB* (*xylB_1* y *xylB_2*, renombrados como *xk1* y *xk2* en este trabajo) que codificarían para la D-xilulosa quinasa según la anotación automática realizada por PGAP. Estos genes presentan 66 % de identidad nucleotídica y 54 % de identidad proteica entre ellos.

Cuando *H. seropedicae* Z69 se cultivó en presencia de D-xilosa, la expresión de estos genes no se vio modificada comparado con los niveles de expresión determinados en la condición control: Z69 cultivada en presencia de glicerol como única fuente carbonada (ver Tabla 1.3). Por otro lado, el gen *xk2* fue sobre-expresado en el mutante $Z69\Delta xylB$ con respecto a la cepa salvaje, ambas crecidas en D-xilosa, mientras que el gen *xk1* no modificó su expresión en este último experimento según se muestra en la Tabla 1.3. El crecimiento de los mutantes $Z69\Delta xk1$ y $Z69\Delta xylB\Delta xk1$ en las diferentes fuentes de carbono ensayadas no se vio afectado con respecto a sus cepas parentales (Figura 1.9). Sin embargo, el doble mutante $Z69\Delta xylB\Delta xk2$ exhibió un crecimiento reducido en D-xilosa respecto a $Z69\Delta xylB$ (Figura 1.9 A y B). A su vez, el crecimiento en D-xilosa o xilitol del triple mutante $Z69\Delta xylB\Delta xk2\Delta xk1$ fue reducido comparado con $Z69\Delta xylB$ o $Z69\Delta xylB\Delta xk2$, como se observa en la Figura 1.9.

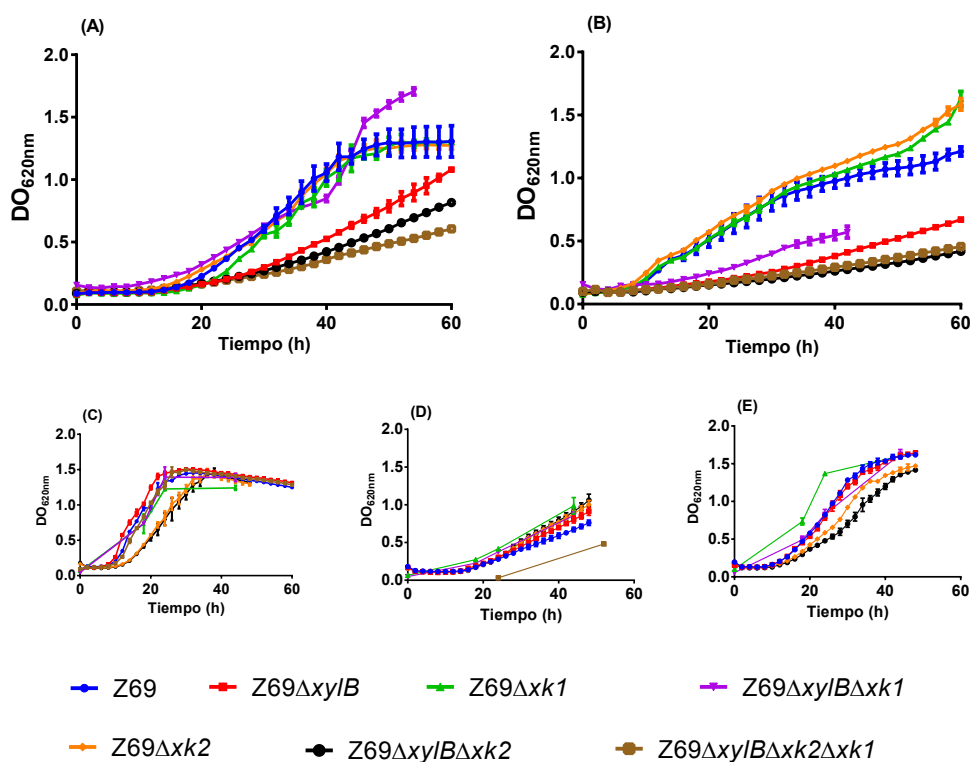


Figura 1.9: Perfiles de crecimiento de *H. seropedicae* Z69, y de los mutantes en los genes *xylB* y/o *xk* en medio LGI suplementado con (A) 30g/L de D-xilosa, (B) 10g/L de D-xilosa, (C) 10g/L de L-arabinosa, (D) 10g/L de xilitol o (E) 10 g/L de D-glucosa.

1.2.4. Cuantificación de la expresión relativa de algunos genes de las rutas no fosforilativas, y el gen regulador *xylR*, mediante RT-qPCR

Se cuantificó mediante RT-qPCR, el cambio en los niveles de expresión de algunos de los genes involucrados en el metabolismo de D-xilosa y/o L-arabinosa. En el Apéndice B se muestran los controles de calidad de los cebadores y del ARN empleado en este trabajo. Los resultados, mostrados en la Figura 1.10, indican que en *H. seropedicae* Z69 crecida en D-xilosa, la expresión de los genes *xylC* y *mhpD* es significativamente mayor, respecto a la misma cepa crecida en L-arabinosa. Por otro lado, la expresión del gen *araB*, involucrado en el catabolismo de L-arabinosa, es significativamente mayor en Z69 crecida en presencia de L-arabinosa, que en la misma cepa crecida en presencia de D-xilosa. Finalmente, no se detectaron diferencias significativas en los niveles de expresión de los genes *xylR* y *xylA* cuando Z69 creció empleando D-xilosa o L-arabinosa como única fuente carbonada.

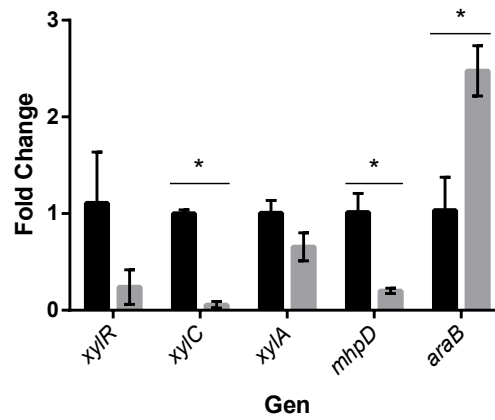


Figura 1.10: Cambio relativo de la expresión (*fold change*) de genes involucrados en el catabolismo de D-xilosa y/o L-arabinosa, determinado mediante RT-qPCR. En negro se muestran los valores para la cepa salvaje crecida en presencia de D-xilosa y en gris la misma cepa crecida en presencia de L-arabinosa.

1.3. Discusión

1.3.1. Identificación de los genes involucrados en el catabolismo de D-xilosa en *H. seropedicae* Z69

El estudio de las rutas no fosforilativas para el catabolismo de D-xilosa en bacterias, como las que se describen en la Figura 1, ha sido bastante reducido. El primer caso reportado fue el de la α -proteobacteria oligotrófica *C. crescentus* (Stephens, Christen, Fuchs et al. 2007). Recientemente, Watanabe et al. 2019 caracterizaron una colección de proteínas purificadas de *H. huttiense* producidas de forma recombinante, además de confirmar su expresión en el catabolismo de D-xilosa mediante RT-qPCR. La cepa de *H. huttiense* utilizada en el mencionado trabajo fue aislada a partir de agua de pozo en Japón, no es capaz de fijar nitrógeno atmosférico, y no hay reportes de su interacción con plantas como endófito (de Souza et al. 2013). Por otro lado, algunos de los genes involucrados en el catabolismo de D-xilosa y L-arabinosa en *H. seropedicae* SmR1 fueron recientemente re-anotados por Price et al. 2018, teniendo en cuenta los resultados obtenidos en sus experimentos de Tn-seq.

Este es el primer trabajo en donde se emplean los datos obtenidos mediante RNA-seq y el análisis del fenotipo de mutantes apolares dirigidos, diseñado para estudiar la expresión de las rutas no fosforilativas en *H. seropedicae* al crecer el D-xilosa como única fuente carbonada.

La organización de los genes involucrados en el metabolismo de D-xilosa en *H. seropedicae* es diferente a la descrita en *C. crescentus*. El *cluster* I (Figura 1.1), involucrado en la parte superior de las rutas no fosforilativas en las cepas SmR1 y Z69, es muy similar al identificado en *H. huttiense*, con un 90 % de identidad nucleotídica. En arqueas, los genes de la ruta de Weimberg están organizados de diversas maneras (Valdehuesa et al. 2018), todas diferentes a las encontradas en *H. seropediace*. Estudios comparativos de los genes involucrados en el metabolismo de D-xilosa en arqueas y en bacterias sugieren que las enzimas involucradas evolucionaron independientemente, ya que las secuencias proteicas son diversas e incluso la preferencia por el uso de cofactores es diferente (Valdehuesa et al. 2018).

1.3.1.1. Ruta no fosforilativa superior

De acuerdo a los resultados obtenidos en mi tesis de Maestría, el gen G5B88_22805 (renombrado como *xylB* en este trabajo), codifica para una D-xilosa deshidrogenasa dependiente de NAD^+ . El mutante $\text{Z69}\Delta\text{xylB}$ es capaz de crecer en D-xilosa, aunque con menor velocidad de crecimiento (ver Figura 1.2). Los resultados obtenidos en esta tesis indican que el crecimiento remanente de este mutante en D-xilosa es debido a la expresión de la enzima L-arabinosa deshidrogenasa codificada por el gen G5B88_05250 (renombrado como *araB* en este trabajo). Este gen se encuentra expresado en el mutante $\text{Z69}\Delta\text{xylB}$, aunque su expresión no se encuentra inducida con respecto a la cepa salvaje al crecer en D-xilosa (Tabla 1.3). Parecería ser que la expresión del gen *araB* es inducida por D-xilosa (ver *Z69* crecida en D-xilosa *vs* *Z69* crecida en glicerol en Tabla 1.3) y por la presencia de L-arabinosa (según los resultados de RT-qPCR, ver Figura 1.10). Los genes *xylB* y *araB* presentan una identidad nucleotídica del 63 % y una identidad aminoacídica del 46 % entre ellos. Cuando ambas deshidrogenasas son mutadas, el mutante resultante $\text{Z69}\Delta\text{xylB}\Delta\text{araB}$, no es capaz de crecer en D-xilosa o L-arabinosa como únicas fuentes carbonadas. Los ensayos de complementación, mostrados en las Figuras 1.2 y 1.3 confirman los resultados obtenidos por RNA-seq, indicando que ambas enzimas son capaces de reconocer ambas pentosas, aunque presuntamente con diferentes afinidades. De acuerdo con otros trabajos, XylB tendría mayor afinidad por la D-xilosa, mientras que la deshidrogenasa codificada por el gen *araB* tendría mayor afinidad por L-arabinosa (Watanabe et al. 2019). Esta promiscuidad y comportamiento dual que lleva a las enzimas a estar involucradas en el catabolismo de D-xilosa y L-arabinosa al mismo tiempo, ya había sido descrita en bacterias y arqueas (Lamble et al. 2003; Milburn et al. 2006; Nunn et al. 2010; Stephens, Christen, Fuchs et al. 2007; Watanabe et al. 2019).

Basándonos en las secuencias y en los datos de expresión (RNA-seq y RT-qPCR), las enzimas D-xilonolactonasa y D-xilonato dehidratasa estarían codificadas por los genes *xylC* (G5B88_22815) y *xylD* (G5B88_22810) respectivamente (*cluster* I, Figura 1.1). Sin embargo, el crecimiento en D-xilosa de los mutantes en estos genes no se vio afectado (Figura 1.4 y Malán et al. 2021), indicando que en su ausencia habría otros genes/enzimas que serían capaces de cumplir esa función sin alterar el fenotipo. En otras bacterias se ha observado

que las enzimas involucradas en el catabolismo de L-arabinosa son capaces de utilizar como sustrato los metabolitos correspondientes sintetizados durante el catabolismo de D-xilosa a través de las rutas no fosforilativas (Watanabe et al. 2006, 2019). De acuerdo con esta hipótesis, en nuestros experimentos de transcriptómica encontramos una mayor expresión del gen G5B88.05245 (que codificaría para la L-arabinonato deshidratasa de la vía del catabolismo de L-arabinosa, Figura 5), al comparar *H. seropedicae* Z69 crecida en D-xilosa con el control crecido en glicerol.

Por otro lado, los resultados obtenidos en este trabajo mediante RNA-seq indican que el gen G5B88.19615 (que codificaría para la D-arabinonato deshidrogenasa, *cluster* II, Figura 1.1) está sobre-expresado en Z69 al crecer en D-xilosa con respecto al control crecido en glicerol (Tabla 1.3); sugiriendo que podría estar implicado en el catabolismo de D-xilosa. Este gen, anotado como altronato deshidrogenasa, presenta 99 % de identidad aminoacídica con la D-arabinonato deshidratasa de *H. huttiense*. Sin embargo la enzima codificada por este gen de *H. huttiense* es incapaz de utilizar D-xilonato o L-arabinonato como sustratos, aunque el gen se encuentra expresado cuando la bacteria crece en D-xilosa o L-arabinosa (Watanabe et al. 2019). Por otro lado, Price et al. 2018 obtuvieron un valor de *fitness* < 2 para el gen HSERO_RS19355 (idéntico a G5B88.19615) en D-xilosa o L-arabinosa en los experimentos de Tn-seq realizados en *H. seropedicae* SmR1, indicando que la mutación en este gen no afectaría el crecimiento en estas fuentes de carbono. Esto podría indicar que el gen G5B88.19615 no estaría involucrado en el catabolismo de D-xilosa o L-arabinosa, aunque su expresión está inducida con respecto al control en glicerol. En los experimentos de Price et al. 2018 no se evaluó el crecimiento en D-arabinosa. Dado que *H. seropedicae* Z69 es capaz de crecer en D-arabinosa como única fuente carbonada luego de una extensa fase lag (50-60 horas, datos no mostrado), no descartaría la implicancia de este gen en el catabolismo del azúcar raro D-arabinosa.

1.3.1.2. Rutas no fosforilativas inferiores

Los genes involucrados en las rutas no fosforilativas inferiores se encuentran dispersos en los genomas de las cepas Z69 y SmR1, sin formar *clusters* u operaciones con otros genes implicados en el catabolismo de D-xilosa o L-arabinosa.

La nueva ruta descrita por Watanabe et al. 2019 parecería ser la preferida

por *H. seropedicae* Z69 al crecer en D-xilosa, ya que el mutante $Z69\Delta mhpD$ presenta una extensa fase lag (de 40-50 horas, Figura 1.7) antes de su crecimiento en esta pentosa.

En *H. seropedicae* Z69, la ruta de Weimberg también se encuentra expresada e involucrada en el catabolismo de D-xilosa. Sin embargo, no parecería ser esencial para el catabolismo de esta pentosa, ya que, los mutantes $Z69\Delta xylX$ y $Z69\Delta xylA$ fueron capaces de crecer empleando D-xilosa como única fuente carbonada, aunque a una velocidad menor que la de la cepa salvaje (Figuras 1.5 y 1.6). Según estos resultados, creemos que la ruta de Weimberg se expresa simultáneamente con la nueva ruta no fosforilativa inferior descrita por Watanabe et al. 2019. Esta hipótesis debería ser confirmada por análisis de flujos metabólicos empleando ^{13}C -D-xilosa, en donde, de acuerdo a la distribución isotópica, se podría determinar la contribución de cada ruta.

1.3.2. Catabolismo de L-arabinosa

H. seropedicae emplea una ruta análoga a la de Weimberg para el catabolismo de L-arabinosa, tal como se muestra en la Figura 5 (Mathias et al. 1989; Price et al. 2018). El primer paso de esta ruta está catalizado por la enzima L-arabinosa deshidrogenasa codificada por el gen *araB*. De acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis, el gen *araB* estaría inducido por la presencia de L-arabinosa en el medio de cultivo (Figura 1.10) y la deshidrogenasa que codifica podría tener mayor afinidad por L-arabinosa que la deshidrogenasa codificada por el gen *xylB* (Figura 1.3). Sin embargo, el mutante $Z69\Delta araB$ creció en L-arabinosa (Figura 1.2), indicando que este gen no es esencial para el crecimiento en L-arabinosa. Los resultados obtenidos en este trabajo indican que la deshidrogenasa codificada por el gen *xylB* sería capaz de catalizar este paso sin alterar el fenotipo del mutante. Cuando se anulan ambas deshidrogenasas en el mutante $Z69\Delta xylB\Delta araB$, éste ya no es capaz de crecer en L-arabinosa o D-xilosa, indicando que, en estas condiciones, no hay más enzimas con actividad D-xilosa o L-arabinosa deshidrogenasa.

El último paso de la ruta de Weimberg, catalizado por la enzima α KGSA deshidrogenasa y codificada por el gen *xylA*, es común en ambas rutas, para la degradación de D-xilosa y L-arabinosa. En esta tesis se confirmó, mediante RT-qPCR (Figura 1.10), que el gen *xylA* está expresado cuando Z69 crece en L-arabinosa, y que estaría involucrado en el catabolismo de L-arabinosa. Sin

embargo, este gen no sería esencial, ya que el mutante $Z69\Delta xylA$ fue capaz de crecer en L-arabinosa, aunque con un perfil diferente al de la cepa salvaje.

Por otro lado, en *H. huttiense* (Watanabe et al. 2019), el gen *mhpD* parecería estar involucrado en el catabolismo de L-arabinosa. Sin embargo, en *H. seropedicae* Z69, el gen *mhpD* no fue esencial para el crecimiento en L-arabinosa (Figura 1.7 C), y su expresión se encuentra disminuida cuando *H. seropedicae* Z69 crece en L-arabinosa respecto a la misma crecida en D-xilosa (Figura 1.10), confirmando que el gen *mhpD* y esta nueva ruta no estarían involucrados en el catabolismo de L-arabinosa, tal como había descrito originalmente por Mathias et al. 1989.

1.3.3. Otros comentarios sobre el mutante $Z69\Delta xylB$

Las D-xilosa y L-arabinosa deshidrogenasas modifican el grupo hidroxilo localizado en la posición C1 en estas pentosas. Cuando la D-xilosa se encuentra disuelta en agua, el equilibrio se desplaza hacia la forma β -D-xilopiranososa (Mikola et al. 1999), mientras que en el caso de la L-arabinosa se desplaza hacia α -L-arabinopiranososa (Brimacombe, 1973). En *H. seropedicae* Z69, el gen *galM* codificaría para la galactosa mutarotasa con actividad aldosa 1-epimerasa, que podría estar involucrada en la conversión de las α -aldosas en su correspondiente anómero β . Los resultados obtenidos al analizar los datos de RNA-seq mostraron que el gen *galM* está sobre-expresado en el mutante $Z69\Delta xylB$ comparado con la cepa salvaje al crecer ambas en D-xilosa como única fuente carbonada. Este resultado podría estar relacionado con la expresión de la L-arabinosa deshidrogenasa, requerida para el primer paso de la ruta no fosforilativa utilizada por $Z69\Delta xylB$. Quizás la L-arabinosa deshidrogenasa reconocería las α -aldosas y la mutarotasa transformaría la β -D-xilopiranososa hacia su conformación α . A su vez, la XDH reconocería los anómeros β , de modo que la expresión de la aldosa 1-epimerasa no sería necesaria para el crecimiento de Z69 en D-xilosa. Mediante el análisis del fenotipo del mutante $Z69\Delta xylB\Delta galM$ (Figura 1.8), no logramos confirmar esta hipótesis, ya que el doble mutante no presentó diferencias en el crecimiento en D-xilosa o L-arabinosa respecto a su cepa parental $Z69\Delta xylB$. Hasta el momento no sabemos cuál es el rol del gen *galM* en *H. seropedicae* Z69 y en el mutante $Z69\Delta xylB$.

1.3.4. Expresión de las rutas fosforilativas

La ruta de la D-xilosa isomerasa, encontrada clásicamente en bacterias (Figura 2), no estaría presente en *H. seropedicae* ya que no se pudo determinar dicha actividad enzimática en extractos libres de células (Malán et al. 2021). A su vez, la expresión del gen G5B88.19045 (idéntico a HSERO_RS18790 en la cepa SmR1, anotado como XI en la base de datos MetaCyc), no se vio inducida al crecer Z69 en presencia de D-xilosa respecto al control cultivado en presencia de glicerol (Tabla 1.3).

Por otro lado, la ruta oxo-reductiva (Figura 2), clásica de hongos y levaduras, podría estar involucrada en el catabolismo de D-xilosa en el mutante $Z69\Delta xylB$, ya que algunos de sus genes presuntivos se encuentran sobreexpresados en los experimentos de RNA-seq (Tabla 1.3) y se indujo la actividad XOLDH en $Z69\Delta xylB$ comparado con Z69, ambas crecidas en D-xilosa (Malán et al. 2021). Sin embargo, no se puede afirmar la expresión de la ruta completa, ya que no se pudo determinar la actividad XR ni se logró identificar ningún gen candidato a codificar para esta enzima (Malán et al. 2021). Hasta el momento no hay reportes de la expresión de la enzima XR o de la ruta oxo-reductiva completa en bacterias. Si bien existe un trabajo donde se reporta que *Gluconobacter oxydans* emplearía la ruta oxo-reductiva como alternativa a la ruta no fosforilativa utilizada principalmente, en este trabajo los autores no discuten la presencia de un gen que codifique para XR (Zhang et al. 2013). De todos modos no podemos descartar la expresión de una nueva XR en *H. seropedicae* que utilice otros cofactores o mecanismos.

El último paso de ambas rutas está catalizado por la enzima XK. De acuerdo a los datos de expresión determinados por RNA-seq (Tabla 1.3) y el fenotipo de los mutantes (Figura 1.9), podemos concluir que el gen *xk1* no está involucrado en el catabolismo de D-xilosa en *H. seropedicae* Z69, mientras que el gen *xk2* podría estar involucrado, especialmente en el mutante $Z69\Delta xylB$, en donde se vio inducida su expresión en comparación con la cepa salvaje empleada como control, ambas crecidas en D-xilosa. A su vez, el mutante $Z69\Delta xylB\Delta xk2$ redujo su crecimiento en D-xilosa respecto a $Z69\Delta xylB$, mientras que el crecimiento de $Z69\Delta xk2$ no disminuyó en comparación a Z69, ambas crecidas en D-xilosa. Estas enzimas también estarían involucradas en la degradación del xilitol cuando se utiliza como fuente de carbono. Ambas XK podrían tener una función redundante, ya que cuando se muta uno u otro gen no se observan

diferencias en el crecimiento en xilitol respecto a la cepa salvaje, mientras que si se mutan ambos genes ($Z69\Delta xylB\Delta xk2\Delta xk1$) el crecimiento se ve reducido. De todos modos, estos genes no serían esenciales, habiendo otro(s) genes capaces de cumplir esta función.

Capítulo 2

Regulación del metabolismo de D-xilosa en *H. seropedicae*

En la Figura 1.1 se muestra la organización de los genes involucrados en el catabolismo de D-xilosa. El análisis del genoma permitió identificar el *cluster* I, en donde se encuentran los genes *xylF*, *xylG* y *xylH*, que codificarían para un transportador de D-xilosa del tipo ABC. Además, en este *cluster* se encuentran los genes *xylB*, *xylD* y *xylC* que codifican para las enzimas de la ruta no fosforilativa superior implicada en el catabolismo de D-xilosa según los resultados obtenidos en el capítulo anterior. Aguas arriba a estos genes se encuentra el gen *xylR*, que codifica para un regulador de la transcripción con motivos de unión al ADN.

Para estudiar el rol regulatorio de XylR y su implicancia en el metabolismo de D-xilosa, se construyó el mutante apolar dirigido Z69 Δ *xylR*, se analizó su capacidad de crecer en diferentes fuentes carbonadas (D-xilosa, D-glucosa, L-arabinosa y xilitol) y se determinó la actividad XDH y XOLDH en extractos libres de células.

Para identificar si los genes presentes en el *cluster* I se encuentran dentro de una única unidad transcripcional (operón) o más de una, se realizaron experimentos de RT-PCR. Para ello, se extrajo el ARN de células de Z69 crecidas en D-xilosa como única fuente carbonada. Este ARN se utilizó para la síntesis de ADN copia (ADNc), y a partir del mismo se amplificaron por PCR las regiones intergénicas. Para ello se utilizaron cebadores específicamente diseñados para que, cada par de ellos, hibriden al final de un ORF y al principio del siguiente. En los casos en que se obtiene un amplicón puede decirse que

ambos genes se encuentran dentro del mismo ARNm y, por lo tanto forman parte de una misma unidad transcripcional u operón.

Para identificar algunos genes regulados por XylR se cuantificó la expresión relativa de varios genes implicados en el metabolismo de D-xilosa por RT-qPCR, usando el ARN extraído de Z69 y Z69 Δ *xylR*, ambas crecidas en D-xilosa.

Para identificar las regiones promotoras de los genes/operones *xylR*, *xylFGH* y *xylBD* y estudiar cómo responden éstos ante la ausencia de XylR, en presencia de D-xilosa en el medio de cultivo, se construyeron vectores donde se fusionaron los posibles promotores con el gen reportero *lacZ*, el cual codifica para la enzima β -galactosidasa. Estas construcciones se transformaron a células de Z69 y Z69 Δ *xylR* y, se determinó la actividad β -galactosidasa al crecer las cepas en D-xilosa.

Por último, para identificar algunas de las regiones del genoma a las que se uniría XylR, se realizó un ensayo de retardo en gel, del inglés *Electrophoretic Mobility Shift Assay* (EMSA). Para ello, se produjo de forma recombinante y purificó (sin éxito) la proteína rXylR. Finalmente, los EMSA se realizaron empleando el extracto total de la cepa recombinante de *E. coli* expresando rXylR y fragmentos de ADN conteniendo los potenciales promotores de los genes *xylR* y *xylFGH* o *xylB*.

2.1. Materiales y Métodos

2.1.1. Construcción del mutante Z69 Δ *xylR* y análisis de su fenotipo

El mutante Z69 Δ *xylR* se construyó empleando los cebadores mostrados en la Tabla 2.1 y la metodología descrita en 1.1.5, con algunas modificaciones que se describen a continuación. Para el PCR 3 se utilizó la mezcla para PCR Mango Mix (Bioline, Cat. No. BIO-25034), que contiene Taq Polimerasa, *buffer* de reacción y dNTPs. El amplicón obtenido se clonó en el vector pCR2.1-TOPO (Anexo A.2) con el kit TOPO TA Cloning (Invitrogen, Cat. No. 450030). Para verificar la presencia del inserto en los clones seleccionados, el ADN plasmídico purificado (según Anexo A.5) se digirió con *EcoRI* (TermoFisher Scientific, Cat No. ER0275), y los fragmentos producidos se analizaron por electroforesis (según Anexo A.4). De esta forma se identificaron los clones con el inserto del

tamaño esperado. Luego, el fragmento correspondiente al inserto se purificó desde el gel, empleando el kit Agarose Gel DNA Extraction (Roche, Cat. No. 11696505001) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Este inserto se subclonó en el sitio *EcoRI* del vector pK18*mobsacB* (Schafer et al. 1994, Anexo A.2). Con esta mezcla de ligación se transformaron células químicamente competentes de *E. coli* TOP10 (ver anexo A.6) y se seleccionaron las colonias blancas en placas de Petri con LB-Km⁵⁰-X-gal²⁰. La presencia de inserto se verificó por PCR, usando MangoMix (Bioline, Cat. No. BIO-25034), lisados celulares obtenidos a partir de las colonias blancas y los cebadores M13; para la PCR se siguió las condiciones especificadas en el kit Topo TA Cloning (Invitrogen, Cat. No. 450030). Finalmente, la construcción se transfirió a *H. seropedicae* Z69 por conjugación triparental y se indujo el doble evento de recombinación como se describió en 1.1.5. La presencia de la mutación en los clones seleccionados se determinó por PCR y análisis de secuencia del amplicón como se detalló previamente en 1.1.5.

Tabla 2.1: Cebadores utilizados para la construcción del mutante Z69 Δ *xylR*

Nombre	Secuencia (5' - 3')
xylR2_lower	GCCGTCCACCAGCGACAGGCAACCCTACTAGAACCGACACGA
xylR2_upper_EcoRI	GAATTCCCAGCCGGCGAGACCAG
xylR1_upper	TGCCTGTCGCTGGTGGACGGCTGCTTTTGCCACGCTCTGT
xylR1_lower_EcoRI	GAATTCGTTGAAGGGGACGATGACGAT

Se analizó el perfil de crecimiento de las cepas salvaje y mutante en diferentes fuentes carbonadas. El ensayo se realizó tal como se describió en 1.1.5. La velocidad de crecimiento corresponde a la pendiente calculada a partir de la regresión lineal que surge al graficar el tiempo en función del Ln(DO_{620nm}). La misma se calculó en la parte lineal del gráfico. La duración de la fase lag es el tiempo que transcurrió desde el inicio del cultivo hasta que el mismo ingresó en fase exponencial de crecimiento (la parte lineal mencionada).

También se determinaron las actividades XDH y XOLDH en Z69 y Z69 Δ *xylR*. La actividad XDH se determinó en extractos libres de células como se describió en 1.1.6 (en este caso los extractos no se diluyeron y no se empleó Km en el medio de cultivo). En los mismos extractos celulares se determinó la actividad XOLDH. Para esto se estimó la aparición de NADH, por medidas de absorbancia a 340nm cada 0,2 segundos en la parte lineal de la curva (condiciones de velocidad inicial). Se utilizó un volumen final de 1mL, en donde se

adicionó 850µL de *buffer* Tris-HCl 50mM a pH=8,5, 20µL de extracto celular, 20µL de NAD⁺ 50mM, 10µL de xilitol 1M y agua en cantidades necesarias (Jin y Jeffries, 2004). La reacción comenzó a cuantificarse luego del agregado del xilitol. Todas las medidas se corrigieron descontando el NADH producido independientemente del agregado de xilitol (actividad basal del extracto celular). El cálculo de Unidad de actividad enzimática (U) y la determinación de proteínas se realizó como se describió en 1.1.6.

2.1.2. Identificación de los operones *xyl* por RT-PCR

Se amplificó por PCR las regiones intergénicas de los genes presentes en el *cluster* I (Figura 1.1), empleando como templado el ADNc obtenido a partir del ARN de *H. seropedicae* Z69 crecida en D-xilosa (tal como se describió en 1.1.7). Para ello, se empleó MangoMix (Bioline, Cat. No. 450030) y las condiciones de PCR estándar. Se utilizaron los cebadores mostrados en la Tabla 2.2. El volumen final de cada reacción fue de 20µL y se utilizó 1µL de ADNc como molde (este ADNc provenía de una retrotranscripción realizada, según 1.1.7, a partir 500ng de ARN). Además, se realizó un control positivo para cada juego de cebadores empleando aproximadamente 20ng de ADN genómico de Z69 y, como control negativo se utilizó aproximadamente 40ng de ARN. También se realizaron los controles sin templado. Se realizaron tres réplicas biológicas. Los amplicones se visualizaron en electroforesis de agarosa 1 % y tinción con Good View (SBS, Cat. No. HGV-2) (según anexo A.4).

Tabla 2.2: Cebadores utilizados para la RT-PCR

Región intergénica	Nombre	Secuencia (5'->3')
1 - <i>galM</i> - <i>xylR</i>	<i>galM</i> .2.for	TGCCTGTCGCTGGTGGACGGCGCCGAGGTTGCTGATGGTCAC
	<i>galM</i> .2.rev	GCATCAATGTGCTGGCCTC
2 - <i>xylR</i> - <i>xylF</i>	<i>pxylR</i> .for	GCTAGAAGCTTGTGCATCAGCGCCAATACGGT
	<i>pxylR</i> .rev	CGTGCATCGATGAAGAGCAACGCAATCCGGT
3 - <i>xylF</i> - <i>xylG</i>	<i>xylF</i> .for	CCTACAACGCCCAGTATGACA
	<i>xylF</i> .rev	GATAGACGCCGAGAGGATCT
4 - <i>xylG</i> - <i>xylH</i>	<i>xylG</i> .for	ACTTCGTCAACGACAACCTGA
	<i>xylG</i> .rev	CACCGACAGGTCGATTTCAC
5 - <i>xylH</i> - <i>xylB</i>	<i>fabG1</i> for	GCCGGCAACATGGGCGAACTGGA
	<i>fabG1</i> rev	GCCGTCCACCAGCGACAGGCAGCCGGCGAGGCTGCGATAGAGG
6 - <i>xylB</i> - <i>xylD</i>	<i>fabG2</i> for	TGCCTGTCGCTGGTGGACGGCCCCCGAAGAAGAGGCCGAAATCC
	<i>fabG2</i> rev	GCGGTGGGGCGGCGGCAGTT
7 - <i>xylD</i> - <i>xylC</i>	4498.2 for	TGCCTGTCGCTGGTGGACGGCATGCTGGTCAGCGAGGAAGAG
	4498.2 rev	GAGCAGGGTGTTGGCGTCATCGT
8 - <i>xylC</i> - <i>G5B88_22820</i>	4499.2.for	TGCCTGTCGCTGGTGGACGGCCGGCTTTGTCCCAGTGACCAG
	4499.2.rev	GTCTGATGGGCCGTGAAGAA

2.1.3. Cuantificación de la expresión relativa de algunos genes presuntamente regulados por XylR, mediante RT-qPCR

La extracción de ARN se realizó a partir de células de *H. seropedicae* Z69 y del mutante Z69 Δ *xylR* crecidas en LGI suplementado con 30g/L de D-xilosa, tal como se detalla en 1.1.7. La retrotranscripción y las qPCR se realizaron tal como se describió previamente en 1.1.7. Se emplearon los cebadores de las Tablas 1.2 y 2.3. La calidad de los cebadores se determinó como se detalla en 1.1.7.

Tabla 2.3: Cebadores utilizados para RT-qPCR

Gen	Nombre del cebador	Secuencia (5'->3')
<i>xylF</i>	XylF_qPCR_for	TCCTATGACCGCCTGATCCT
	XylF_qPCR_rev	GGGCTTCAAGGCCTTCATCT

El valor de cambio en la expresión de genes o "fold change" se calculó de la siguiente manera:

$$2^{-((Ct_{gen}-Ct_{recA})-(Ct_{promedio_{gen}}-Ct_{promedio_{recA}}))} \quad (2.1)$$

Siendo:

Ct_{gen} = Promedio de los dos Ct obtenidos para el gen analizado en cada réplica biológica de Z69 crecida en D-xilosa

Ct_{recA} = Promedio de los dos Ct obtenidos para el gen de referencia *recA* en cada réplica biológica de Z69 crecida en D-xilosa

$Ct_{promedio_{gen}}$ = Promedio todos los Ct obtenidos para el gen analizado en el mutante Z69 Δ *xylR* crecido en D-xilosa

$Ct_{promedio_{recA}}$ = Promedio todos los Ct obtenidos para el gen de referencia *recA* en el mutante Z69 Δ *xylR* crecido en D-xilosa

Sobre los valores de dCt, calculados como ($Ct_{gen} - Ct_{recA}$), se realizó el *unpaired t test* con un α de 0,05, empleando el programa GraphPad Prism 6.01.

2.1.4. Determinación de la expresión de los promotores *xyl* empleando fusiones génicas

Las potenciales regiones promotoras de los genes *xylR*, *xylF* y *xylB* se amplificaron por PCR empleando Mango Mix (Bioline, Cat. No. 450030) y ADN genómico de *H. seropedicae* Z69 como molde. Se utilizaron los cebadores que se muestran en la Tabla 2.4 para obtener los amplicones detallados en la Figura 2.5 (A). Estos amplicones se clonaron en el vector pCR2.1-TOPO (Anexo A.2) con el kit TOPO TA Cloning (Invitrogen, Cat. No. 450030). La presencia del inserto se verificó por digestión con *EcoRI* (ThermoFisher Scientific, Cat No. ER0275) del ADN plasmídico previamente purificado según se describe en el Anexo A.5. Luego, las regiones promotoras se purificaron desde el gel de agarosa empleando el kit Agarose Gel DNA Extraction (Roche, Cat. No. 11696505001) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Las mismas se ligaron con el vector pMP220 (Spaink et al. 1987, Anexo A.2), el cual contiene el gen *lacZ* que codifica para la enzima β -galactosidasa sin promotor propio. Para ello, el vector se digirió previamente con *EcoRI*. La ligación se realizó empleando la ligasa T4 de ADN (ThermoFisher Scientific, Cat. No. EL0011) siguiendo las instrucciones del fabricante. Con esta mezcla de ligación se transformaron células químicamente competentes de *E. coli* TOP10 (según Anexo A.6). Para verificar la presencia del vector conteniendo el inserto en las colonias de *E. coli* TOP10 seleccionadas, se extrajo su ADN plasmídico (según A.5), se digirió con *EcoRI* y se realizó una electroforesis en gel de agarosa (según A.4) para visualizar los fragmentos obtenidos. El sentido de la inserción se verificó por secuenciación del ADN plasmídico, en el servicio de secuenciación de Macrogen, empleando los cebadores *xylR_for*, *xylFGH_for* o *fabG1_ClaI_rev*.

Con las construcciones seleccionadas se transformó, por electroporación, células electrocompetentes de *H. seropedicae* Z69 y *Z69 Δ *xylR**. La preparación de células electrocompetentes se realizó según Mostafa et al. 2002 (ver Anexo A.7). Las mismas se electroporaron con el equipo MicroPulser (Bio-Rad, usando el programa EcI y siguiendo las instrucciones del fabricante). Luego de la electroporación, las células se suspendieron en 1mL de medio TY y se incubaron a 30°C y 180rpm por 3 horas. Se sembró en superficie rastrillando 100 μ L de la suspensión celular en placas de Petri conteniendo TY-Tetraciclina (Tc)¹⁰-X-gal²⁰. Para verificar la presencia del plásmido en las colonias resultantes se analizó el perfil de restricción con *EcoRI* (ThermoFisher Scientific, Cat No.

ER0275) del ADN plasmídico (Anexo A.5) previamente extraído de las mismas. En el caso de la construcción pMP220::pxylB, la presencia del plásmido se verificó por PCR, realizado con lisados de las colonias empleando MangoMix (Bioline, Cat. No. 450030) y los cebadores tetA (GCTACATCCTGCTTGCCCTTC y CATAGATCGCCGTGAAGAGG) que amplifican un fragmento del gen de resistencia a Tc.

Tabla 2.4: Cebadores utilizados para amplificar las presuntas regiones promotoras de algunos genes implicados en el catabolismo de D-xilosa

Nombre	Secuencia (5' - 3')
pxylR_for	GCTAGAAGCTTGTTCATCAGCGCCAATACGGT
pxylR_rev	CGTGCATCGATGAAGAGCAACGCAATCCGGT
pxylFGH_for	GCTAGAAGCTTGAAGCGAATGCCCCAAAAGG
pxylFGH_rev	CGTGCATCGATTCTTGGGATTCTTGGCGTCTG
fabG1for_HindIII	GCTTTCGGTTAAGCTTGGGCAACATGGGCGAACTGGA
fabG1rev_ClaI	TAAACATTCCATCGATGCCGGCGAGGCTGCGATAGAGG

Para las determinaciones de actividad β -galactosidasa, las cepas salvaje y mutante Z69 Δ *xylR* transformadas con las construcciones arriba descritas, se incubaron durante 24 horas en tubos conteniendo 5mL de medio TY-Tc¹⁰ (pre-cultivo). Con 100-200 μ L de pre-cultivo, se inocularon tubos conteniendo 5mL de medio LGI-Tc¹⁰ suplementado con la fuente de carbono indicada en cada caso. Estos cultivos se incubaron entre 16 y 22 horas de modo que la DO_{600nm} final alcanzara un valor entre 0,5-1,2. La actividad β -galactosidasa se determinó según el protocolo descrito por Miller, 1972, con las modificaciones de Poole et al. 1994, según se describe en el Anexo A.8.

2.1.5. Identificación de algunas de las regiones de ADN que reconoce XylR, mediante EMSA

2.1.5.1. Producción y purificación de XylR recombinante

El gen *xylR*, con el uso de codones optimizado para su expresión en *E. coli*, se envió a sintetizar, clonado en el vector pET14b(+) (Anexo A.2), en GenScript (www.genscript.com). El vector sintetizado se denominó pET14b(+):rXylR. Con el mismo se transformaron células químicamente competentes de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS (Studier, 1991) y *E. coli* BL21 (DE3). Las transformaciones se sembraron en superficie rastrillando diferentes volúme-

nes de la suspensión celular en placas de Petri conteniendo LB-Ampicilina (Amp)¹⁰⁰. Las cepas transformadas se almacenaron con glicerol al 20 % y a -80°C.

2.1.5.1.1. Elección de las condiciones de expresión

Elección del medio de cultivo para la expresión. En una primera instancia, se evaluaron distintos medios de cultivo que aseguraran una buena expresión de la proteína XylR recombinante (rXylR). Además, se trabajó con el vector recombinante transformado en dos cepas de expresión. Para ello, varias colonias de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS y *E. coli* BL21 (DE3), recientemente transformadas con pET14b(+):rXylR, se cultivaron en 5mL de LB-Amp¹⁰⁰ durante toda la noche (pre-cultivos). Con 50μL de estos pre-cultivos se inocularon tubos de centrifuga de base cónica estériles conteniendo 5mL de medio ZYM5052-Amp¹⁰⁰ (composición en Anexo A.1.4). Se tomaron muestras a dos tiempos de incubación.

Por otro lado, se ensayó el medio de cultivo *Terrific Broth* (TB) (Amresco, Cat. No. J869-500G) conteniendo isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) como inductor de la expresión de rXylR. Con 100μL del pre-cultivo en LB-Amp¹⁰⁰ se inocularon tubos de centrifuga de base cónica estériles conteniendo 5mL de medio TB-Amp¹⁰⁰. Cuando el cultivo alcanzó una DO_{600nm}=1 (aproximadamente 3-4 horas), se agregó IPTG a diferentes concentraciones finales: 100μM o 200μM. Se tomaron muestras en el momento previo al agregado de IPTG, y a diferentes tiempos luego de la inducción. A todas las muestras de cultivo se le determinó la DO_{600nm}, y cada alícuota (de 200μL) se centrifugó a temperatura ambiente a 12.000g por 1 minuto; el *pellet* se guardó a -20°C. Estos *pellets* celulares se analizaron por SDS-PAGE. Para ello, cada *pellet* se suspendió en agua, de modo que la DO_{600nm} fuera de 5Unidades de Absorbancia (UA)/μL, intentando tener aproximadamente la misma concentración de proteínas en cada muestra. Las muestras se trataron como se describe en el Anexo A.9 y se sembró 5μL de cada suspensión en los geles de SDS-PAGE para determinar la aparición de la proteína recombinante.

Elección de la temperatura de expresión. También se evaluaron diferentes temperaturas de incubación para asegurar una buena expresión de rXylR. Para ello, se trabajó con el medio ZYM5052, el cuál fue elegido de

acuerdo a los resultados obtenidos en el punto anterior (ver 2.2.5.1). Se ensayaron dos temperaturas de crecimiento (15°C y 37°C). Para realizar el cultivo a 37°C se tomaron aproximadamente 20 colonias de una transformación realizada el día anterior y se inoculó un matraz Erlenmeyer de 250mL conteniendo 25mL de LB-Amp¹⁰⁰ suplementado con 4g/L de glucosa. Este matraz se incubó por 8 horas aproximadamente y el cultivo se utilizó para inocular un matraz Erlenmeyer de 2L conteniendo 200mL de ZYM5052-Amp¹⁰⁰ (DO_{600nm} inicial de 0,4). Este último se incubó por 21-22 horas a 37°C y 200rpm.

Para la expresión de rXylR a baja temperatura, 20 colonias de una transformación del día anterior se inocularon en un matraz Erlenmeyer de 2L conteniendo 200mL de ZYM5052-Amp¹⁰⁰. El mismo se incubó 2,5 horas con agitación orbital a 37°C y 200rpm, luego se bajó la temperatura a 15°C y se incubó a 200rpm durante cuatro días.

Los diferentes cultivos para la expresión de rXylR, se procesaron tal como se describe a continuación. Cada cultivo se centrifugó a 5.000g por 10 minutos a 4°C. Las células se suspendieron en *buffer* Tris-HCl 20mM, pH 7,4 suplementado con NaCl 500mM. En cada caso se agregó 5mL de *buffer* por cada gramo de *pellet*. Las células se lisaron por sonicación en baño de hielo empleando pulsos de 2 segundos (con 50% de potencia) y 3 segundos de espera, durante un tiempo total de 15 minutos; el procedimiento se repitió (total 30 minutos). Los extractos celulares se centrifugaron a 4°C por 5 minutos a 5.000rpm. Con este procedimiento el *pellet* resultante contiene los restos celulares y los cuerpos de inclusión (como se verificó posteriormente en 2.2.5.1), mientras que el sobrenadante contiene la fracción total. Este sobrenadante se volvió a centrifugar a 14.000rpm por 30 minutos a 4°C, obteniéndose en el *pellet* la fracción insoluble y en el sobrenadante a la fracción soluble. Todas las fracciones se analizaron por SDS-PAGE según Anexo A.9. Las fracciones insolubles presentes en los *pellets* se solubilizaron con agitación en urea 8M.

Como la proteína rXylR se obtuvo en forma insoluble (ver 2.2.5.1), a continuación se describen las diferentes estrategias de solubilización y repliegado empleadas en esta tesis.

2.1.5.1.2. Ensayos de solubilización de rXylR

Solubilización por cambio de pH. Con un tip, se tomó una alícuota pequeña del *pellet*, conteniendo los cuerpos de inclusión, y se mezcló con 4mL

de *buffer* TBS (composición en Anexo [A.12](#)) y Tween20 al 1 %. Se adicionó 160µL de NaOH 1N (pH final 12). Luego, el pH se bajó lentamente a 8,5-9, con agitación suave, mediante el agregado de 40µL de HCl 6N gota a gota.

Solubilización con SDS. Con un tip, se tomó una alícuota pequeña del *pellet*, contiendo los cuerpos de inclusión, y se colocó con 1mL de *buffer* TBS-SDS 0,2 %. Se incubó con agitación 1,5 horas a temperatura ambiente.

Solubilización con urea 8M. Con un tip se tomó una alícuota pequeña del *pellet*, contiendo los cuerpos de inclusión y se suspendió en 1mL de *buffer* TBS-urea 8M. Se incubó en frío con agitación por 3 días.

En todos los casos la mezcla resultante se centrifugó a 14.000rpm por 30 minutos a 4°C; el *pellet* contendría las proteínas insolubles y el sobrenadante las proteínas solubilizadas. Ambas fracciones se guardaron a -20°C. Todas las fracciones se analizaron en SDS-PAGE según Anexo [A.9](#). Previo a su análisis, los *pellet* se suspendieron en urea 8M con agitación.

2.1.5.1.3. Replegado de rXylR

En los experimentos descritos más arriba se determinó que rXylR se encuentra insoluble en los cuerpos de inclusión. Para la producción de rXylR se optó por usar la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS en medio auto-inductor ZYM5052 a 37°C. Luego de elegir la mejor condición de solubilización de rXylR (ver [2.2.5.2](#)), se trabajó en su replegado siguiendo dos estrategias: el replegado en columna (que además incluye la purificación de la proteína) y el replegado por el método de goteo. Ambas estrategias se describen a continuación.

Replegado y purificación en columna. Los restos celulares y los cuerpos de inclusión conteniendo a rXylR, provenientes de 200mL de cultivo, se incubaron en 25mL de TBS suplementado con urea 8M por 20 horas, a 4°C y con agitación. Luego, esta suspensión se centrifugó a 14.000rpm por 30 minutos a 4°C. El sobrenadante se filtró por membrana de 0,45µm. Al mismo, se le adicionó imidazol 1M hasta llegar a una concentración final de 20mM y, se procedió a purificar rXylR por cromatografía de afinidad a metales inmovilizados (IMAC). Para ello, se utilizó 3mL de resina de Ni-NTA Agarose

(Invitrogen, Cat. No. R901-01). La misma se equilibró con 10mL de H₂O y luego con 15mL de Tris-HCl 20mM (pH=7,4) suplementado con NaCl 500mM, imidazol 20mM y urea 8M. La resina escurrida se mezcló con la muestra y se permitió la adsorción de rXylR a la resina incubando en lote, con agitación por 1,5 horas a 4°C. La resina incubada con la muestra se escurrió y, luego se procedió a lavar con *buffer* Tris-HCl 20mM a pH=7,4 suplementado con NaCl 500mM, imidazol 20mM y concentraciones decrecientes de urea hasta llegar a 0mM de urea. Finalmente, rXylR se eluyó con 15mL de Tris-HCl 20mM a pH=7,4, suplementado con NaCl 500mM e imidazol 500mM. El eluato se concentró utilizando un centrífugo de corte 30kDa y se cambió el *buffer* por Tris-HCl 10mM, pH=7,3. Luego de la purificación, la resina se regeneró con 15mL de *buffer* MES 20mM a pH=5,0, suplementado con NaCl 100mM. Las alícuotas de todos los pasos de purificación se analizaron por SDS-PAGE según Anexo A.9.

Replegado por el método de goteo. Aproximadamente 0,68g del *pellet*, conteniendo los cuerpos de inclusión, se incubaron con 3,4mL de TBS suplementado con urea 8M por 22 horas a 4°C y con agitación. Luego, esta suspensión se centrifugó a 14.000rpm por 30 minutos a 4°C. Se tomó 200μL de sobrenadante, se colocó en un vaso de bohemía con agitación, se mantuvo en hielo, y se agregó lentamente, y de a gotitas, 8mL de *buffer* Tris-HCl 10mM a pH=7,3, hasta llegar a una concentración final de urea de 0,2M. Luego, esta suspensión se centrifugó a 14.000rpm por 30 minutos a 4°C. Es de esperar que en el *pellet* se encuentren las proteínas insolubles que se agregaron y en el sobrenadante las proteínas replegadas solubles. El sobrenadante se filtró por membrana de 0,45μm y se concentró empleando un centrífugo de 30kDa de corte. La fracción obtenida se guardó a -20°C con glicerol 50 %. Todas las fracciones se guardaron a -20°C hasta su análisis por SDS-PAGE según Anexo A.9. Los *pellets* se suspendieron en urea 8M previo a la electroforesis.

Con las proteínas purificadas y replegadas por goteo (ver Resultados en 2.2.5.3) se realizó un EMSA según Anexo A.10. La obtención de los fragmentos de ADN para el EMSA se describe a continuación.

2.1.5.2. Producción de las regiones promotoras

El ADN conteniendo las regiones promotoras del gen *xylR* y del operón *xylFGH* se amplificó por PCR usando los cebadores pxylR_rev y pxylFGH_-

rev; los mismos se muestran en la Tabla 2.4. La región promotora de los genes *xyIBD* se amplificó por PCR con los cebadores fabG1for (GCCGG-CAACATGGGCGAACTGGA) y fabG1rev (GCCGTCCACCAGCGACAGG-CAGCCGGCGAGGCTGCGATAGAGG) (Malán et al. 2021). En ambos casos, para la amplificación se utilizó la mezcla MangoMix (Bioline, Cat. No. 450030), bajo condiciones de PCR estándar. La correcta amplificación de los productos de PCR se verificó por electroforesis en gel de agarosa (según Anexo A.4).

2.1.5.3. Ensayos de EMSA

Las reacciones de unión ADN-proteína se realizaron en un volumen final de 10µL conteniendo 2µL de *buffer* de unión 5x (Tris-HCl 50mM, a pH 7,4, suplementado con KCl 750mM, DTT 0,5mM y EDTA 0,5mM), 2µL de producto de PCR (aproximadamente 1,4µg de ADN), 1µL de extracto total (o rXylR replegada por el método de goteo), 1µL de D-xilosa 1M y agua en cantidades necesarias. Las reacciones se incubaron a 22°C por 30 minutos. Luego, se agregó, a cada tubo de reacción, 10µL de H₂O y 4µL de Purple Loading Dye 6x (New England Biolabs, Cat. No. B7025). Finalmente, los componentes de las mezclas de unión se separaron mediante electroforesis nativas con geles de acrilamida 6 %, empleando TAE 0,5x como *buffer* de corrida (ver Anexo A.10 para más detalles).

Se realizó un Western Blot para identificar la cola de histidinas de la proteína recombinante rXylR, y así verificar la co-localización de rXylR con el ADN (según Anexo A.11). Para el mismo, se sembró 4µL de la dilución mencionada en el párrafo anterior, por pocillo. Los 20µL restantes se utilizaron para realizar la separación en el gel nativo, que luego, se tiñó con Good View y posteriormente con Azul Brillante de Coomassie R250, según Anexo A.10. La tinción con Good View se empleó para visualizar el ADN, y la tinción con Coomassie para visualizar las proteínas.

2.2. Resultados

2.2.1. Construcción del mutante Z69 Δ *xylR* y análisis de su fenotipo

Según el análisis del genoma de *H. seropedicae* Z69, el gen *xylR* se encuentra en el *cluster* I (Figura 1.1) y está anotado como un regulador de la transcripción por unión a regiones específicas del ADN. La secuencia proteica deducida de XylR presenta 70 % de identidad con XutR de *P. fluorescens* SBW25 y 46 % con XylR de *E. coli* K12. Ambas proteínas activan la transcripción de los genes *xyl* (Liu et al. 2015; Song y Park, 1997).

Para determinar el rol de XylR en *H. seropedicae* Z69, se construyó la cepa mutante Z69 Δ *xylR* y se analizó su perfil de crecimiento. La misma creció en LGI suplementado con D-xilosa o D-glucosa, aunque presentó menor velocidad de crecimiento que la cepa salvaje (Figura 2.1 y en la Tabla 2.5). En algunos casos, Z69 Δ *xylR* presentó una fase lag más extensa, tal como se muestra en la Figura 2.1 y en la Tabla 2.5. El crecimiento del mutante no se vio afectado al crecer en L-arabinosa o xilitol como únicas fuentes carbonadas, comparado con la cepa Z69.

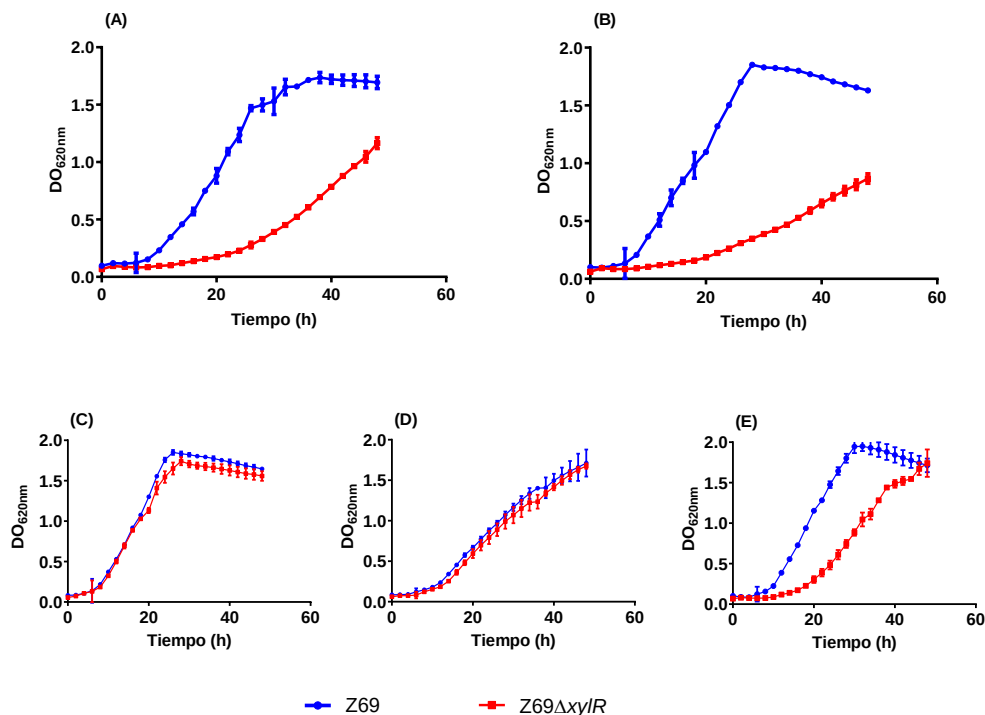


Figura 2.1: Perfiles de crecimiento de *H. seropedicae* Z69 y del mutante Z69 Δ *xylR*. Los ensayos se realizaron en medio LGI suplementado con (A) 30g/L de D-xilosa, (B) 10g/L de D-xilosa, (C) 10g/L de L-arabinosa, (D) 10g/L de xilitol o (E) 10g/L de D-glucosa.

Tabla 2.5: Velocidad de crecimiento y duración de la fase lag en *H. seropedicae* Z69 y el mutante Z69 Δ *xylR* al crecer en placa de 96 pocillos con diferentes fuentes de carbono.

Medio de cultivo	<i>H. seropedicae</i> Z69		Z69 Δ <i>xylR</i>	
	Velocidad de crecimiento (h ⁻¹)	Duración de la fase lag (h)	Velocidad de crecimiento (h ⁻¹)	Duración de la fase lag (h)
LGI-D-xilosa 30g/L	0,15	6	0,072	8
LGI-D-xilosa 10g/L	0,21	6	0,063	6
LGI-D-glucosa 10g/L	0,18	4	0,12	8

A su vez, se determinó la actividad XDH y XOLDH en extractos libres de células de las cepas mutante y salvaje. En la Figura 2.2 se observa que la actividad XDH disminuyó drásticamente en el mutante Z69 Δ *xylR* con respecto a la salvaje, mientras que la actividad XOLDH aumentó considerablemente en extractos libres de células obtenidos a partir de las cepas crecidas en presencia de D-xilosa como única fuente carbonada.

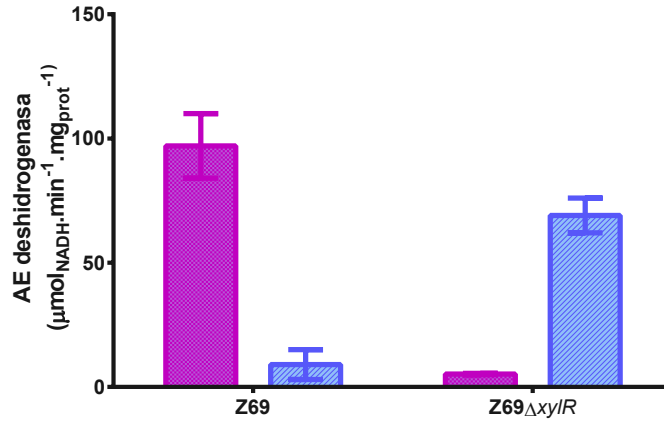


Figura 2.2: Actividad XDH (magenta) y XOLDH (azul). Las actividades se determinaron en extractos libres de células de Z69 y Z69Δ*xylR*, crecidas en medio LGI suplementado con 30 g/L de D-xilosa como única fuente carbonada.

2.2.2. Identificación de los operones *xyl* por RT-PCR

Con la intención de determinar si los genes *xyl* del cluster I (Figura 1.1) se encuentran todos dentro del mismo operón o unidad transcripcional, se realizó el experimento de RT-PCR descrito en 2.1.2. En la Figura 2.3 B se muestran los amplicones obtenidos, separados mediante electroforesis en gel de agarosa. En este experimento se emplearon cebadores de avance que hibridan al final de un ORF y de retraso que hibridan al comienzo del siguiente, de modo que se amplificó la región intergénica. En los casos en los que se obtuvo amplificación a partir del ADNc se puede decir que esos genes están co-transcriptos en un sólo ARNm, mientras que si no se obtiene amplificación es porque esos genes no estaban co-transcriptos en un mismo ARNm. Según los resultados de amplificación (Figura 2.3 B) y tal como se esquematiza en la Figura 2.3 A, los genes *xyl* se encontrarían formando parte de varios operones. Por un lado estaría el operón *xylFGH* que contiene los genes que codifican para el transportador de D-xilosa del tipo ABC, luego identificamos el operón *xylBD* con algunos de los genes involucrados en la ruta no-fosforilativa superior, y finalmente, el gen *xylC* se encontraría en forma independiente, sin formar parte de este operón.

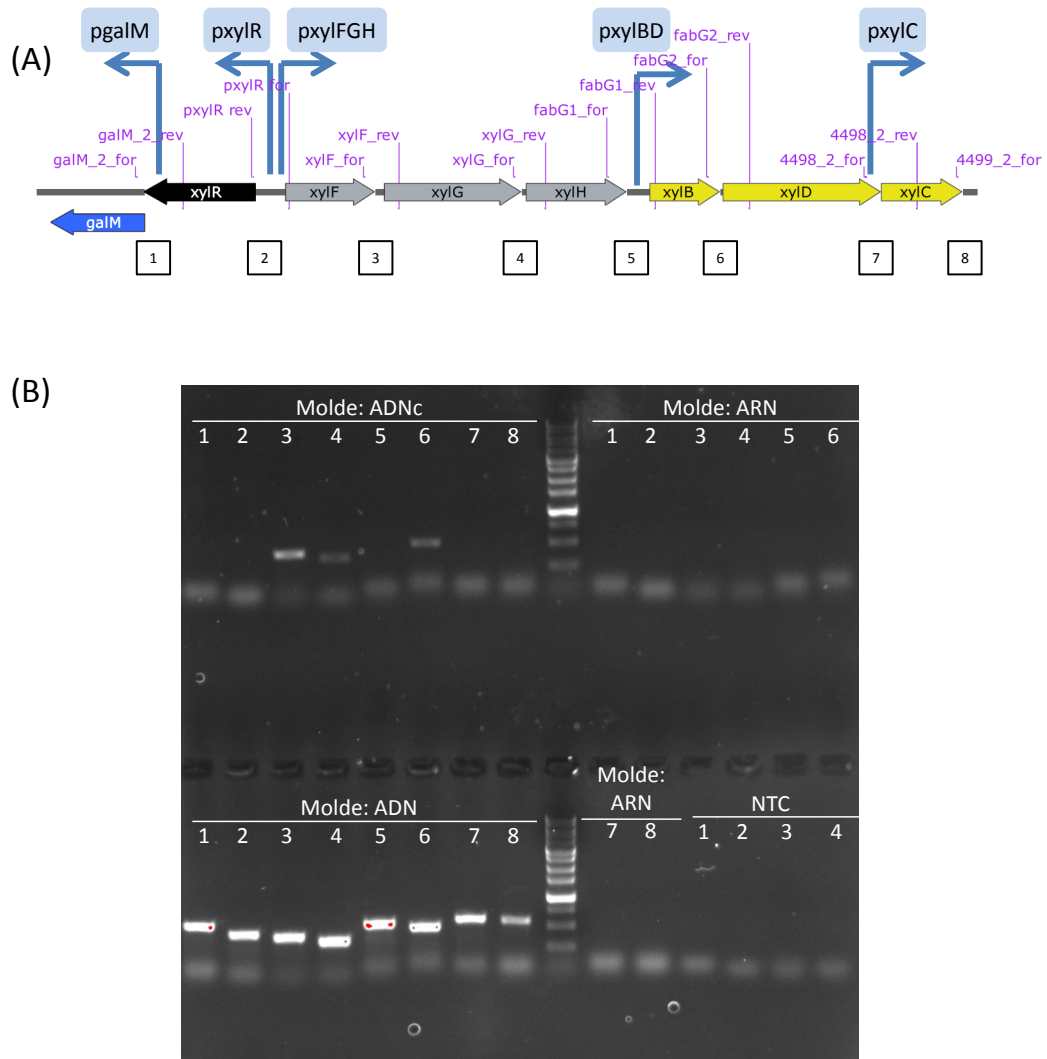


Figura 2.3: Identificación de los operones *xyl* mediante RT-PCR. (A) Se muestra la organización de los genes y las posibles regiones promotoras (flechas azules). También se indica donde hibridan los cebadores (en violeta) utilizados para las reacciones de PCR mostradas en la parte B. (B) Electroforesis en gel de agarosa de las amplificaciones por PCR de las regiones intergénicas marcadas con los números del 1 al 8 en la parte A. Se utilizó el ADNc obtenido a partir del ARN de *H. seropedicae* Z69 crecida en LGI suplementado con 30g/L de D-xilosa. Para el control positivo se utilizó ADN de Z69 como molde y para el control negativo el ARN. Además, se incluyeron algunos control (de PCR o qPCR) sin molde (NTC). Sobre cada carril se indica qué se utilizó como molde para la PCR y los números indican la región intergénica analizada.

2.2.3. Cuantificación de la expresión relativa de algunos genes presuntamente regulados por XylR, mediante RT-qPCR

Se cuantificó, mediante RT-qPCR, el cambio en los niveles de expresión de algunos de los genes involucrados en el metabolismo de D-xilosa y/o L-arabinosa. En el Apéndice B se muestran los controles de calidad de los cebadores y del ARN empleado en este trabajo. Los resultados, mostrados en la Figura 2.4, indican que en el mutante Z69 Δ *xylR* la expresión de los genes *xylF* y *xylC* disminuyó, respecto a la cepa salvaje en las mismas condiciones. Por otro lado, la expresión de los genes involucrados en las rutas no-fosforilativas bajas (*xylA* y *mhpD*) y en el metabolismo de L-arabinosa (*araB*) de las cepas mutante y salvaje no presentaron diferencias significativas.

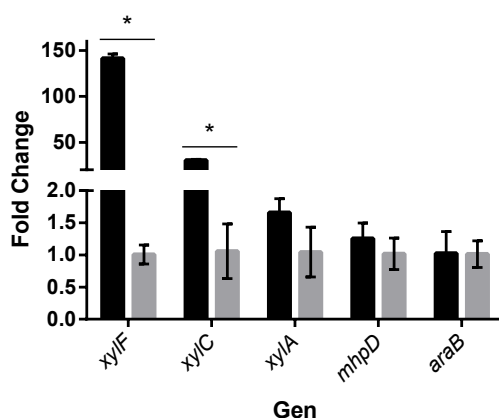


Figura 2.4: Cambio relativo de la expresión (*fold change*) calculado a partir de las RT-qPCR, para algunos de los genes implicados en el catabolismo de D-xilosa y/o de L-arabinosa. Las barras negras y grises representan los valores determinados para las cepa salvaje y mutante Z69 Δ *xylR*, respectivamente; ambas crecidas en D-xilosa.

2.2.4. Determinación de la expresión de los promotores *xyl* empleando fusiones génicas

Se estudió la capacidad de dirigir la expresión de los promotores *xyl* clonando las diferentes regiones presuntamente promotoras del gen *xylR* y el operón *xylFGH* (mostradas en la Figura 2.5 A) y determinando la actividad β -galactosidasa en *H. seropedicae* Z69 y Z69 Δ *xylR*, tal como se describió en

2.1.4. Los resultados se muestran en la Figura 2.5 B y C.

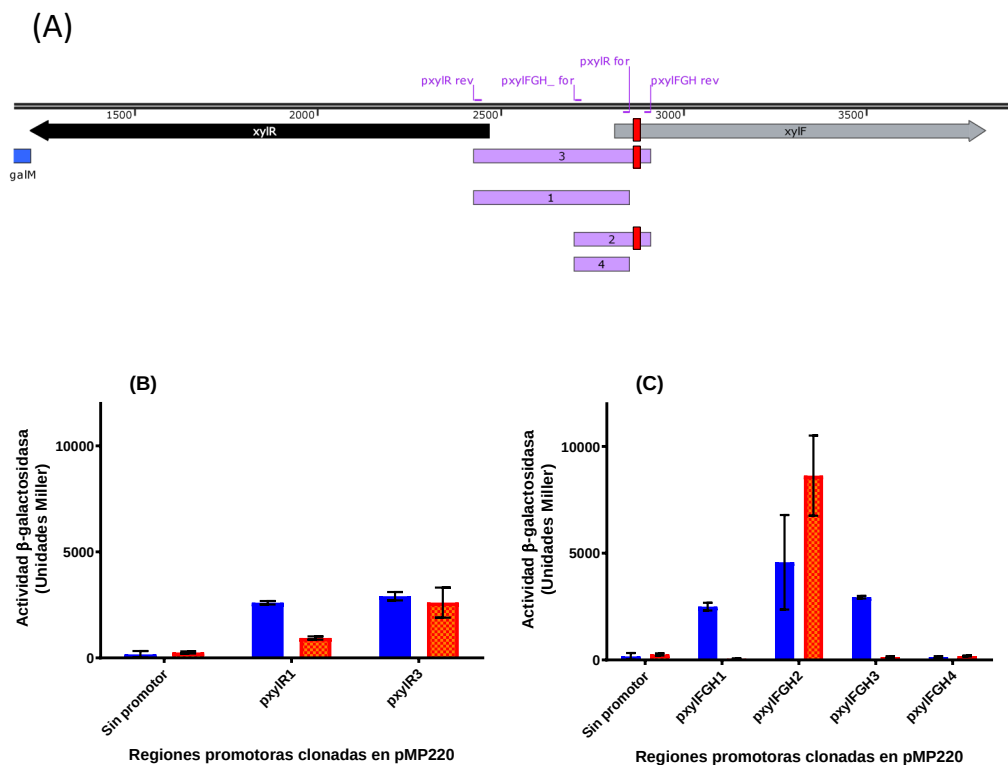


Figura 2.5: Actividad de los promotores *xyl*. (A) En violeta se muestran las presuntas regiones promotoras clonadas, en rojo se indica donde se encuentra la secuencia Kozak. (B y C) Actividad β -galactosidasa determinada en células de *H. seropedicae* Z69 (en azul) y Z69 $\Delta xylR$ (en rojo) transformadas con el vector pMP220 conteniendo las presuntas regiones promotoras en el sentido de los genes *xylR* (B) o *xylFGH* (C). Las células se crecieron en medio LGI suplementado con 30g/L de D-xilosa. En el eje de las X se indica cual fragmento, de los mostrados en la parte A, fue clonado como potencial promotor.

Las regiones 1 y 3 clonadas en el sentido de *pxylR* (*pxylR1* y *pxylR3*) generaron expresión del gen *lacZ* en Z69 y en Z69 $\Delta xylR$ crecidas en D-xilosa, aunque la expresión del promotor 1 fue menor en el caso de la cepa mutante (Figura 2.5 B).

De acuerdo a los resultados mostrados en la Figura 2.5 C, las regiones promotoras 1 y 3, clonadas en el sentido del operón *xylFGH* (*pxylFGH1* y *pxylFGH3*), indujeron la expresión de la enzima β -galactosidasa en la cepa

salvaje crecida en D-xilosa y la misma no fue detectada en $Z69\Delta xylR$, en las mismas condiciones. Con la región promotora 4 (pxylFGH4) no se detectó expresión del gen reportero en ninguna de las cepas ensayadas, mientras que la región 2 (pxylFGH2) generó una expresión muy alta, tanto en la cepa salvaje como en el mutante $Z69\Delta xylR$, ambos crecidos en D-xilosa.

Para estudiar bajo qué condiciones se expresan los genes *xylR* y el operón *xylFGH*, y verificar que esta expresión es dependiente de XylR, se determinó la actividad β -galactosidasa en *H. seropedicae* Z69 y $Z69\Delta xylR$ transformadas con pMP220 conteniendo la región promotora 3 en ambos sentidos. Se eligió esta región promotora por ser la más amplia e inducir la expresión del gen reportero, aunque se podría haber elegido la región 1.

La expresión de pxylR-*lacZ* fue mayor que la del control sin promotor en todas las condiciones ensayadas, tanto en la cepa salvaje como mutante (Figura 2.6 A). Además, la expresión fue claramente inducida cuando se empleó D-xilosa o D-glucosa como única fuente carbonada en la cepa salvaje, comparada con la misma, crecida en las otras fuentes de carbono ensayadas (L-arabinosa, xilitol o glicerol). Esta inducción no se observó en el mutante $Z69\Delta xylR$, indicando que el aumento de la expresión, detectada en presencia de D-xilosa o D-glucosa, parecería ser dependiente de XylR.

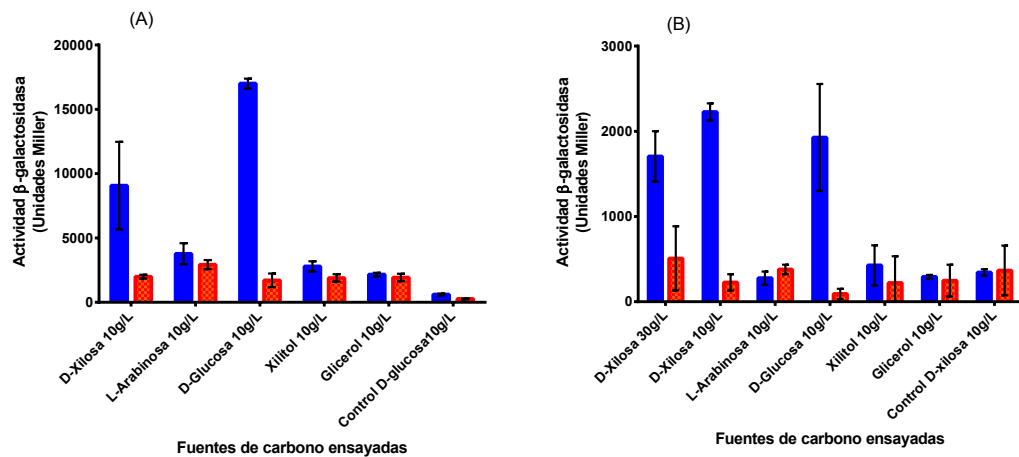


Figura 2.6: Niveles de expresión (determinado por actividad β -galactosidasa) de los promotores de los genes *xylR* (A) y *xylFGH* (B), determinadas en células de *H. seropedicae* Z69 (azul) y $Z69\Delta xylR$ (rojo), transformadas con el vector pMP220 conteniendo la región promotora 3 (clonada en el sentido de los genes estudiados), crecidas en LGI suplementado con las diferentes fuentes de carbono indicadas en el eje de las X. El control corresponde a la expresión basal del plásmido sin promotor en la fuente de carbono indicada en el eje de las X.

Por otro lado, se analizó la expresión de la fusión *pxylFGH-lacZ* (Figura 2.6 B). En este caso, se indujo la expresión β -galactosidasa en la cepa salvaje crecida en D-xilosa o D-glucosa comparado con la misma, crecida en las otras fuentes de carbono ensayadas (L-arabinosa, xilitol o glicerol). La expresión del gen reportero fue claramente menor en el mutante *Z69 Δ xylR* cultivado en las mismas condiciones (D-xilosa o D-glucosa), indicando que la expresión detectada en presencia de D-xilosa o D-glucosa sería dependiente de XylR.

También, se clonó la presunta región promotora del gen *xylB*, pero no se logró detectar expresión del gen reportero *lacZ*, determinada en los ensayos de actividad β -galactosidasa en *H. seropedicae* Z69, ni en *Z69 Δ xylR*, ambas crecidas en D-xilosa como única fuente carbonada.

2.2.5. Identificación de algunas de las regiones de ADN que reconoce XylR, mediante EMSA

2.2.5.1. Producción recombinante de XylR y elección de las condiciones de expresión de la proteína recombinante

En primera instancia se estudió la expresión de rXylR en dos cepas. Se utilizó la cepa de expresión *E. coli* BL21 (DE3) por ser la más utilizada en la bibliografía para la producción de XylR recombinante (Liu et al. 2015; Ni et al. 2013). Además, se estudió la expresión en *E. coli* BL21 (DE3) pLysS, que expresa la lizosima T7 permitiendo reducir la expresión basal de la proteína recombinante.

Estas cepas se ensayaron en dos medios de cultivo: ZYM5052 y TB suplementado con IPTG, a 37°C. Como se observa en la Figura 2.7 se obtuvo una expresión visible de rXylR en *E. coli* BL21 (DE3) pLysS en medio auto-inductor ZYM5052, a las 21 horas de cultivo (A carril 2). También se detectó la producción de rXylR en TB conteniendo 200 μ M de IPTG (A carriles 4, 5 y 6), resultando mayor la expresión a las 2,5 horas luego de la inducción con IPTG.

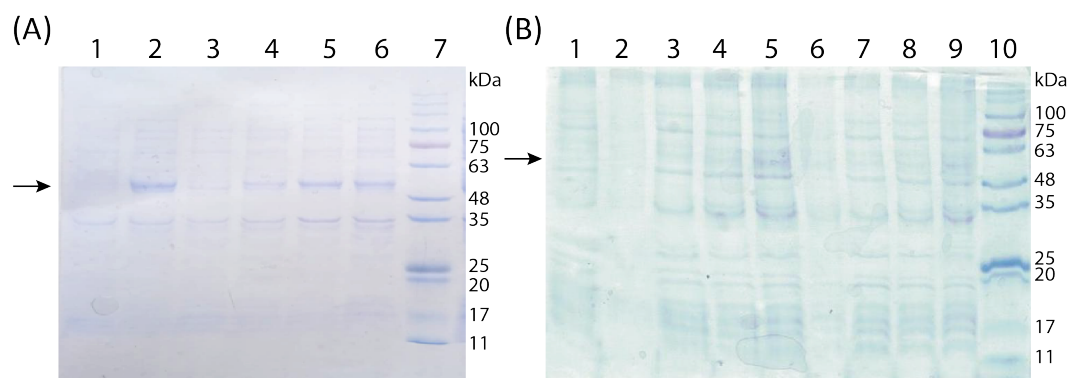


Figura 2.7: SDS-PAGE de las cepas recombinantes crecidas en diferentes medios de cultivo a 37°C. (A) *E. coli* BL21 (DE3) pLysS en medio auto-inductor ZYM5052 (carril 1: a 4 horas de iniciado el cultivo y, carril 2: a 21 horas de iniciado el cultivo) y, en medio TB con 200µM de IPTG (carril 3: previo a la inducción con IPTG; carriles 4, 5 y 6 con 1, 2,5 y 21 horas luego de la inducción). Carril 7: Marcador de tamaño molecular. (B) *E. coli* BL21 (DE3) en medio auto-inductor ZYM5052 (carril 1: a 3 horas de iniciado el cultivo y, carril 2: a 24 horas de iniciado el cultivo), en medio TB con 200µM de IPTG (carril 3: previo a la inducción con IPTG; carriles 4, 5 y 6 con 1, 2,5 y 24 horas luego de la inducción) y, en medio TB con 100µM de IPTG (carril 7: previo a la inducción con IPTG y, carriles 8 y 9 con 1 y 2,5 horas luego de la inducción). Carril 10: Marcador de tamaño molecular. La flecha indica dónde debería estar rXylR.

En *E. coli* BL21 (DE3) parece no haber una gran expresión de rXylR de acuerdo a lo que se observa en la parte B de la Figura 2.7. De acuerdo a estos resultados se eligió a *E. coli* BL21 (DE3) pLysS y el medio ZYM5052 para seguir trabajando.

Una vez establecida la cepa de expresión y el medio de cultivo, se ensayaron dos temperaturas de crecimiento y producción. Como se muestra en la Figura 2.8, rXylR se produce como proteína insoluble en las condiciones ensayadas. Los resultados sugieren que se obtiene una mayor expresión de la proteína a alta temperatura (37°C vs 15°C). Además, como se observa en la SDS-PAGE de la fracción que contiene los restos celulares (Figura 2.8 B, carril 2), se ve que rXylR se colecta junto a los mismos. Por otro lado, visualmente, se aprecia que el *pellet* de esta fracción tiene un color y una textura diferente a la esperada. Se observan los restos celulares que sedimentaron primero en la centrifugación y luego, más arriba, los cuerpos de inclusión (datos no mostrados). Por todo lo anteriormente expuesto, se continuó trabajando con esta fracción que incluye los restos celulares y los cuerpos de inclusión.

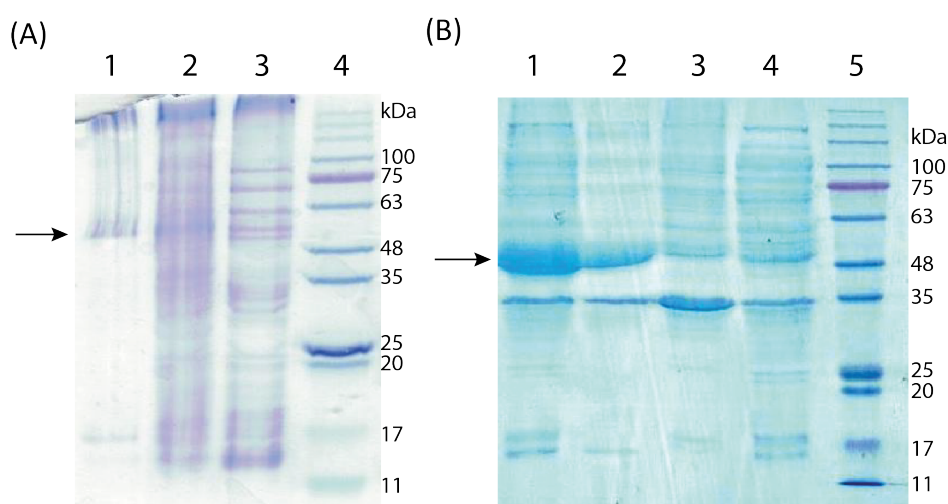


Figura 2.8: Control por SDS-PAGE de las diferentes fracciones proteicas obtenidas a partir de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS crecida en medio auto-inductor ZYM5052 a 15°C (A) o 37°C (B). (A) Carril 1: Restos celulares y cuerpos de inclusión. Carril 2: Fracción insoluble. Carril 3: Fracción soluble. Carril 4: Marcador de peso molecular. (B) Carril 1: Extracto total obtenido luego de sonicar. Carril 2: Restos celulares y cuerpos de inclusión. Carril 3: Fracción insoluble. Carril 4: Fracción soluble. Carril 5: Marcador de tamaño molecular. La flecha señala a rXylR.

2.2.5.2. Elección de las condiciones de solubilización de rXylR

Debido a que no fue posible producir rXylR de forma soluble, se ensayaron diferentes condiciones para solubilizarla a partir de los cuerpos de inclusión obtenidos de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS crecida en medio auto-inductor ZYM5052 a 37°C. Como se observa en la Figura 2.9 sólo el SDS 0,2% y la urea 8M lograron solubilizar a rXylR. La solubilización con cambio de pH no fue efectiva, ya que la mayoría de rXylR persistió en la fracción insoluble (carril 1, Figura 2.9).

Cabe mencionar que no se logró solubilizar rXylR con concentraciones de urea menores a 8M (datos no mostrados).

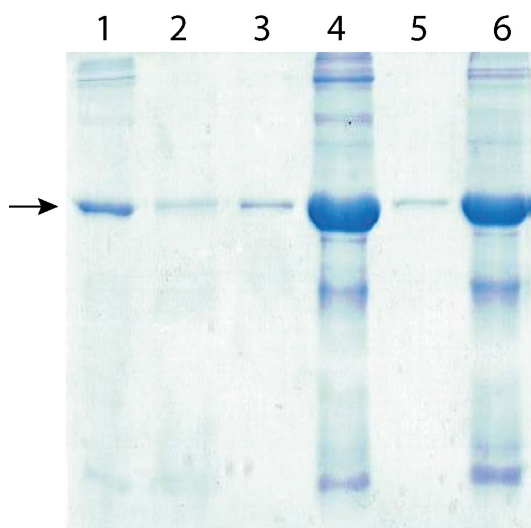


Figura 2.9: Control por SDS-PAGE del proceso de solubilización de rXylR. Las diferentes fracciones solubilizadas se centrifugaron y se analizó el perfil proteico de las fracciones (soluble e insoluble) obtenidas luego de esa centrifugación. Carriles 1 y 2: proteínas insolubles y solubilizadas por cambio de pH. Carriles 3 y 4: proteínas insolubles y solubilizadas con SDS 0,2%. Carriles 5 y 6: proteínas insolubles y solubilizadas con urea 8M. La flecha señala a rXylR.

2.2.5.3. Replegado y purificación de rXylR

En función de los resultados obtenidos en el punto anterior, se decidió solubilizar rXylR con urea 8M a partir de la fracción que contiene los restos celulares y los cuerpos de inclusión. Luego se trabajó en su replegado siguiendo dos estrategias: el replegado en columna (que además incluye la purificación de la proteína) y el replegado por el método de goteo. Los resultados de ambas estrategias se muestran a continuación.

2.2.5.3.1. Replegado y purificación en columna

Como se describió en 2.1.5.1, las proteínas contenidas en la fracción que contiene los restos celulares y cuerpos de inclusión se solubilizaron con urea 8M. A partir de ahí se intentó purificar rXylR por IMAC. En el proceso de purificación se realizó el replegado en columna al ir disminuyendo la concentración de urea, hasta 0M, en el proceso de lavado. En la Figura 2.10 se muestra el perfil electroforético de SDS-PAGE de cada alícuota colectada durante el proceso de purificación, incluyendo el replegado en columna. Como se puede observar, una gran proporción de rXylR se solubilizó con urea 8M (carril 2). Sin embargo, no fue posible purificarla por IMAC, ya que la misma no se adsorbió a la columna y se eluyó en el percolado y en el primer lavado conteniendo urea 8M (carriles 3 y 4). Como esta estrategia de replegado y purificación no fue exitosa, se procedió a replegar rXylR empleando otro método.

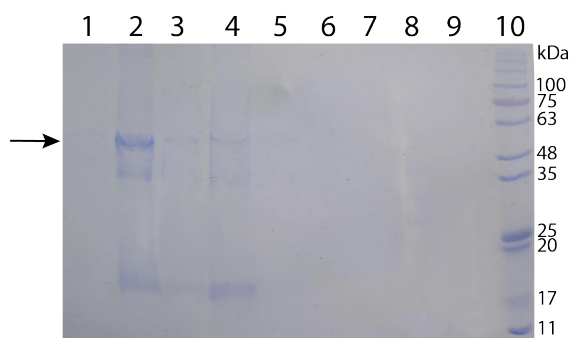


Figura 2.10: Control por SDS-PAGE del proceso de purificación de rXylR por IMAC. Carriles 1 y 2: proteínas insolubles y solubilizadas con urea 8M. Carril 3: percolado. Carriles 4, 5 y 6: Lavados con diferentes concentración de urea: 8M, 6M y 0M. Carril 7: eluato de la regeneración de la columna con MES 20mM a pH=5,0; NaCl 100mM, realizado luego de la elución de rXylR. Carril 8: rXylR concentrada con centricón de 30kDa de corte. Carril 9: Eluato del centricón. Carril 10: Marcador de tamaño molecular. La flecha señala a rXylR.

2.2.5.3.2. Replegado por el método de goteo

La proteína rXylR, solubilizada con urea 8M a partir de los restos celulares y cuerpos de inclusión, se replegó por el método de goteo, tal como se describe en 2.1.5.1. Como se observa en la Figura 2.11 A, luego de bajar la concentración de urea a 0,2M por adición de *buffer* por goteo, rXylR se obtuvo tanto en la fracción insoluble como soluble (carriles 5 y 6). En la parte B de la misma Figura se observan las proteínas recuperadas al finalizar esta estrategia de replegado y concentración de la proteína utilizando un centrífugo, en donde se observa que rXylR es la proteína predominante. Con esta alícuota de rXylR replegada y soluble se procedió a realizar el EMSA que se muestra en la Figura 2.12, en el cual no se pudo observar la formación del complejo ADN-proteína retardado.

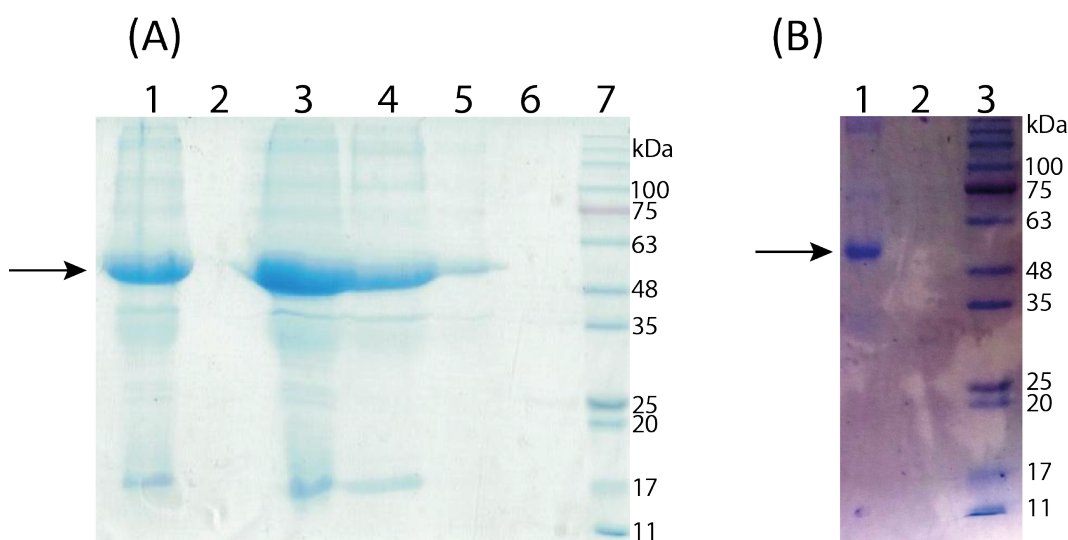


Figura 2.11: Control por SDS-PAGE del proceso de replegado de rXylR por el método de goteo. (A) Carril 1: Cuerpos de inclusión y restos celulares utilizados en este ensayo. Carril 2: Libre. Carril 3: proteínas solubilizadas con urea 8M. Carriles 4 y 5: proteínas insolubles y solubles luego de bajar la concentración de urea a 0,2M por el método de goteo. Carril 6: libre. Carril 7: Marcador de tamaño molecular. (B) Carril 1: rXylR luego de replegada por el método de goteo y concentrada con un centrífugo de 30kDa de corte. La flecha señala a rXylR.

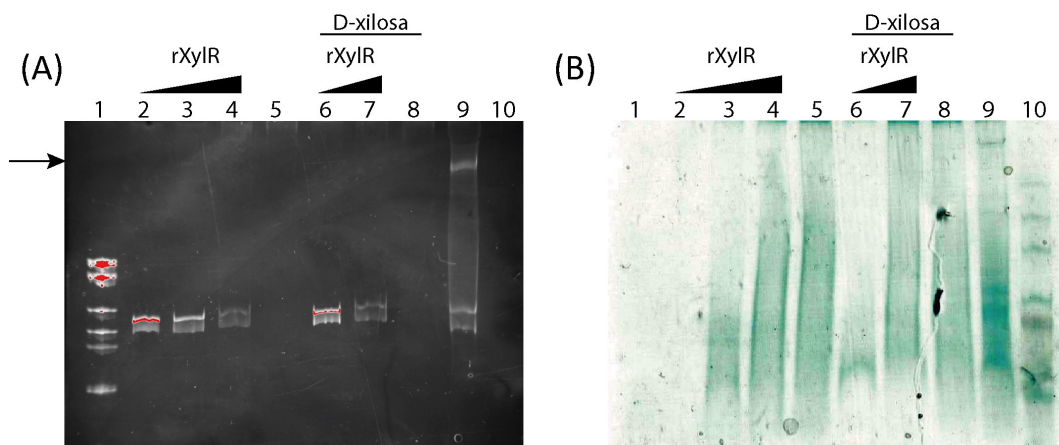


Figura 2.12: EMSA, empleando rXylR replegada por el método de goteo y el fragmento de ADN (amplificado por PCR) que contiene las regiones promotoras *pxylR* y *pxylFGH*, (A) teñido con GoodView y (B) con Azul Brillante de Coomassie R250 . Carril 1: Marcador de tamaño molecular DNA Hypper Ladder 100pb. Carriles 2 al 4: Producto de PCR con concentraciones crecientes de rXylR (0; 6 y 15µg respectivamente). Carril 5: Control negativo: 15µg de rXylR. Carriles 6 y 7: Producto de PCR con concentraciones crecientes de rXylR (6 y 15µg respectivamente) con D-xilosa 100mM. Carril 8: Control negativo: 15µg de rXylR con D-xilosa 100mM. Carril 9: Control positivo: Producto de PCR con extracto total (2.1.5.1). Carril 10: Marcador de tamaño molecular de proteínas. La flecha indica donde debería encontrarse el complejo ADN-rXylR.

2.2.5.4. EMSA

En este trabajo, rXylR no se pudo producir de forma soluble en *E. coli*, ni se logró purificar por IMAC. Además, en el EMSA realizado empleando rXylR solubilizada y replegada por el método de goteo (Figura 2.12) no se pudo observar la formación del complejo ADN-proteína retardado. Por todos estos motivos, el EMSA se realizó empleando el extracto total de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS expresando rXylR. Como control negativo se empleó un extracto de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS que no expresa rXylR.

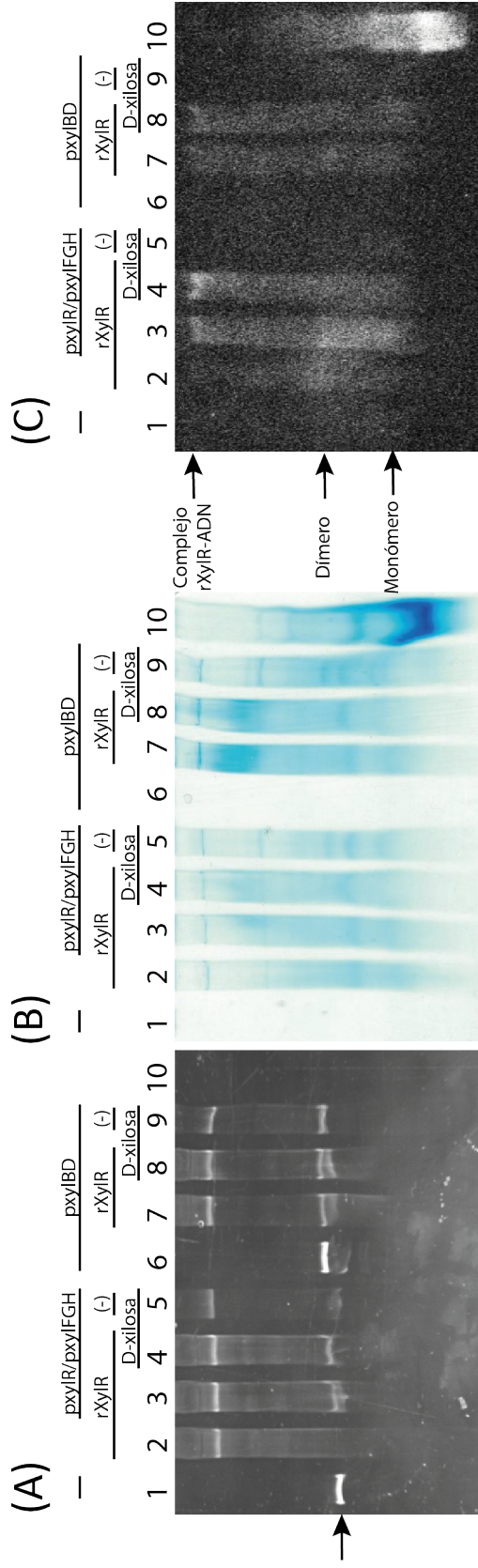


Figura 2.13: EMSA. (A) Revelado de los ácidos nucleicos con Good View, (B) revelado de las proteínas con Azul Brillante de Coomassie R250, (C) revelado de rXylR mediante Western Blot (se usaron anticuerpos dirigidos a la etiqueta de histidinas). Carril 1: control conteniendo el fragmento de PCR con las regiones promotoras de los genes *xylR* y *xylFGH*. Carril 2: control con el extracto total de *E. coli* expresando rXylR. Carriles 3 y 4: reacción de unión entre el extracto de *E. coli* expresando rXylR y el fragmento de ADN que contiene las regiones promotoras de los genes *xylR* y *xylFGH* en ausencia o presencia de D-xilosa respectivamente. Carril 5: reacción de unión control, entre el extracto de *E. coli* que no expresa rXylR y el fragmento de ADN que contiene las regiones promotoras de los genes *xylR* y *xylFGH* en presencia de D-xilosa. Carril 6: control con el fragmento de PCR que contiene la región promotora de los genes *xylR* y *xylFGH*. Carriles 7 y 8: reacción de unión entre el extracto de *E. coli* expresando rXylR y el fragmento de ADN que contiene la región promotora de los genes *xylR* y *xylFGH* en ausencia o presencia de D-xilosa respectivamente. Carril 9: reacción de unión control entre el extracto de *E. coli* que no expresa rXylR y el fragmento de ADN que contiene la región promotora de los genes *xylR* y *xylFGH* en presencia de D-xilosa. Finalmente, en el carril 10 se encuentra un control positivo para el Western Blot: la proteína DyP producida de forma recombinante por Célica Cagide. En (A) la flecha señala los productos de PCR conteniendo las regiones promotoras ensayadas y en (C) las flechas indican las distintas conformaciones de la proteína rXylR y la ubicación del complejo retrasado.

Según los resultados (carriles 5 y 9 de la Figura 2.13), no se observa la formación del complejo retrasado ADN-proteína, ni la señal de la cola de histidinas presente en rXylR en el Western Blot cuando se usó el extracto celular producido como control negativo. Según la Figura 2.13 A, en donde el gel se tiñó con Good View, se observan los productos de PCR, indicados con una flecha, conteniendo las regiones promotoras. Además, en los carriles donde se incluyó el extracto total de *E. coli* se puede observar una banda de alto tamaño molecular que podría corresponder al ADN genómico y un *smear* propio de la degradación del ADN de las células luego de sonicadas. Si bien se incluyó la misma cantidad de producto de PCR en cada carril, en los casos en los que hay extracto celular se observa una disminución de la señal, tal vez, debido a la degradación del ADN por las propias DNAsas del extracto. En ninguno de los casos se logra observar un retraso en la migración de bandas, por lo que esta tinción no sería lo suficientemente sensible o efectiva para ver la pequeña cantidad de ADN unido a rXylR. En la parte B de la Figura 2.13, las proteínas presentes en el mismo gel se tiñeron con Azul Brillante de Coomassie R250. En este caso no se observan diferencias entre los tratamientos, y como es de esperar, no hay proteínas en los carriles 1 y 6 en lo que sólo se incluyó el producto de PCR como control. En la parte C de la Figura 2.13 se muestra el resultado del Western Blot, en dónde se emplearon anticuerpos contra la cola de histidinas presente en rXylR. En este caso, según lo previsto, no se observa señal en los controles (extracto de *E. coli* sin la expresión de rXylR) (carriles 5 y 9) y en las reacciones conteniendo los productos de PCR sin extracto total (carriles 1 y 6). En los carriles 2, 3, 4, 7 y 8, conteniendo extracto total de *E. coli* expresando rXylR, se pueden observar varias bandas, dos de ellas (indicadas en la Figura) podrían corresponder al monómero y dímero de rXylR. Además, en los carriles 3 y 4 se observa el retraso en la migración de bandas cuando rXylR se unió a los fragmentos de ADN conteniendo las regiones promotoras de los genes *xylR* y *xylFGH*. En este caso la D-xilosa, presente en la reacción (carril 4) parecería favorecer la formación del complejo, ya que la banda retrasada aparece más fuerte y, hay menor señal en las bandas que corresponderían a rXylR libre, tanto del monómero como del dímero. En los carriles 7 y 8 también se observa el retraso en la migración de bandas de rXylR unida al fragmento de ADN que contiene el promotor de los genes *xylBD*. En este caso la D-xilosa, presente en la reacción (carril 8) también parecería favorecer la formación del complejo, aunque en menor medida que en el caso anterior. Finalmente en el carril 10

se observa un control conteniendo la proteína DyP con cola de histidinas purificada por Célica Cagide en la Sección de Bioquímica y Biología Molecular de Facultad de Ciencias. Como era de esperar, este control generó señal en el Western Blot (C) y con la tinción con Azul Brillante de Coomassie R250 (B), pero no generó señal con la tinción para ADN empleando Good View (A). Además, al tratarse de un gel nativo pueden verse las diferentes isoformas de la misma como ya había sido observado previamente.

2.3. Discusión

2.3.1. Regulación del catabolismo de D-xilosa

En esta tesis se estudió como están regulados los genes implicados en el catabolismo de D-xilosa en *H. seropedicae* Z69. En primera instancia, de acuerdo a la anotación automática del genoma por PGAP, se identificó el gen *xylR* (*cluster* I, Figura 1.1) que codificaría para un regulador de la transcripción. La proteína predicha, codificada por este gen, posee 419 aminoácidos, un dominio de unión al ADN del tipo AraC en el extremo C-terminal, con un hélice-giro-hélice, y un dominio de unión a D-xilosa en el extremo N-terminal. Generalmente, en estas proteínas la unión del ligando (D-xilosa) genera un cambio conformacional que lleva a un cambio de afinidad en la unión del regulador al ADN (Ni et al. 2013).

Según la bibliografía disponible, XylR puede actuar como activador o represor de la transcripción de los genes involucrados en el metabolismo de la D-xilosa. En *E. coli* y *P. fluorescens*, XylR actúa como un activador (Liu et al. 2015; Song y Park, 1997; ver), mientras que en otros reportes XylR actúa como un represor (Gartner et al. 1992; Heo et al. 2008; Ikawa et al. 2018; Stephens, Christen, Watanabe et al. 2007), con mecanismos y secuencia proteica bien diferentes a las de *H. seropedicae*. La proteína codificada por el gen *xylR* de *H. seropedicae* Z69 presenta 70 % de identidad aminoacídica con XutR de *P. fluorescens* SBW25 y 46 % con XylR de *E. coli* K12. En estas bacterias, la D-xilosa se cataboliza por la ruta de la D-xilosa isomerasa y los genes *xyl*, regulados por *xutR* o *xylR*, se encuentran formando uno o dos operones, respectivamente (Liu et al. 2015; Song y Park, 1997). En *H. seropedicae* Z69, la D-xilosa se cataboliza por una ruta diferente, y los genes que codifican para las enzimas de la vía están dispersos en el genoma, formando varios *clusters* (Figura 1.1).

En el *cluster* I, contiguo al gen *xylR*, encontramos agrupados los genes *xylFGH* que codifican para un transportador del tipo ABC y los genes *xylBD* y *xylC*, que codifican para enzimas de la ruta no fosforilativa superior. Según los resultados de RT-PCR (Figura 2.3), los genes *xylFGH* y *xylBD*, estarían formando parte de operones independientes, posiblemente regulados por promotores diferentes. Estos dos operones están separados por 263 pares de bases en donde perfectamente podría localizarse una región promotora para los genes *xylBD*. Sin embargo, cuando se clonó esta región en el vector pMP220, conteniendo el gen reportero *lacZ*, no se obtuvo expresión de la enzima β -galactosidasa (datos no mostrados). Por otro lado, luego de realizado el EMSA (Figura 2.13), se observó la formación del complejo retrasado, sugiriendo que rXylR se une a esa región promotora, lo que indicaría que allí podría, efectivamente, haber una región promotora con un sitio de unión a XylR. Que no se haya obtenido expresión en los ensayos de fusión con β -galactosidasa puede deberse a que la secuencia clonada no fue la correcta, ya que se incluyeron 57 pares de base del gen *xylB*. Para tener idea de dónde se encuentra la región promotora, habría que identificar el inicio de la transcripción del gen *xylB* mediante 5'RACE. Luego se podría clonar en pMP220 y realizar nuevamente el ensayo de expresión.

El gen *xylC*, que codificaría para la D-xilonolactonasa, no parecía estar co-transcripto con los genes *xylBD* (Figura 2.1.2), sugiriendo que este gen no se encontraría dentro del mismo operón. Esto nos sorprendió ya que las tres enzimas codificadas estarían involucradas en la misma ruta metabólica. Los genes *xylD* y *xylC* se encuentran contiguos, separados sólo por un nucleótido, en donde no habría una región promotora, aunque la misma podría encontrarse superpuesta con la región codificante del gen *xylD*. Además, la expresión del gen *xylC*, al igual que los otros genes del *cluster* I está regulada por XylR, tal como se observa en la Figura 2.4. Cabe mencionar que la hidrólisis de la D-xilonolactona puede ocurrir espontáneamente (Buchert y Viikari, 1988) y/o mediante otras enzimas, diferentes a XylC. Analizando el mutante Z69 Δ *xylC* encontramos que no se alteró su crecimiento en D-xilosa (Figura 1.4), indicando que la expresión de *xylC* no sería esencial para el catabolismo de D-xilosa. En este caso, también sería interesante determinar dónde se encuentra el inicio de la transcripción del gen *xylC* mediante 5'RACE, para confirmar los resultados obtenidos por RT-PCR y determinar dónde podría encontrarse la región promotora de este gen; esta región promotora podía estar superpuesta

con el gen *xylD*. Luego de identificada esta región, sería interesante clonarla en pMP220 y analizar la expresión del gen reportero *lacZ* en Z69 y Z69 Δ *xylR* al crecer en D-xilosa y otras fuentes carbonadas. También sería importante realizar un EMSA para determinar si XylR se une a esta región promotora y si efectivamente la expresión de *xylC* está directamente regulada por XylR o, si la misma está regulada por la acción de algún metabolito intermediario del catabolismo de D-xilosa producido luego de que XylR activara los genes *xylFGH* y *xylBD*.

Para estudiar el rol regulatorio del gen *xylR* se construyó el mutante Z69 Δ *xylR*, el cual creció en LGI-D-xilosa, aunque con menor velocidad de crecimiento que la cepa salvaje (Figuras 2.1 y Tabla 2.5), indicando que *xylR* intervendría en la regulación de los genes implicados en el catabolismo de D-xilosa.

En el capítulo anterior, (ver punto 1.2.3.1.1), se logró establecer que la oxidación de la D-xilosa, determinada en extractos libres de células de *H. seropedicae* Z69 cultivada en presencia de D-xilosa, proviene de la acción de dos enzimas: XylB y en menor proporción AraB. Entonces se intentó cuantificar los niveles de expresión, mediante RT-qPCR, de los genes *xylB* y *araB* (que codifica para una L-arabinosa deshidrogenasa capaz de utilizar también D-xilosa como sustrato), en las cepas salvaje y mutante Z69 Δ *xylR*, ambas crecidas en D-xilosa. La expresión de *xylB* no se pudo determinar ya que no se encontró ningún juego de cebadores con la eficiencia y especificidad adecuada (se ensayaron siete pares, datos no mostrados). Por otro lado, se logró determinar que los niveles de expresión del gen *araB* no se alteraron en Z69 Δ *xylR*, con respecto a Z69 (Figura 2.4). Según estos resultados, el gen *araB* no estaría regulado por XylR. En la Figura 2.2 se puede observar que la actividad de oxidación de la D-xilosa disminuyó drásticamente en el mutante Z69 Δ *xylR* con respecto a la cepa salvaje. Todos estos datos sugieren que la reducción de la actividad en Z69 Δ *xylR* sería consecuencia de una baja expresión de *xylB*. Así, podemos proponer que XylR sería un activador de la transcripción del gen *xylB*.

Como se observa en la Figura 2.4, XylR activa la expresión de los genes *xylFGH* y *xylC*, dado que en ausencia de XylR se reduce drásticamente la expresión de estos genes. La baja expresión de los genes que codifican para el transportador de D-xilosa y la ruta no fosforilativa superior explicarían la reducción del crecimiento en el mutante Z69 Δ *xylR* en D-xilosa.

Por otro lado, XylR no regula la expresión de las rutas no fosforilativas

inferiores, ya que la expresión de los genes *xylA* y *mhpD* no cambió en el mutante $Z69\Delta xylR$ con respecto a la cepa salvaje, ambas crecidas en D-xilosa (Figura 2.4). Los metabolitos procesados por las enzimas codificadas por estos genes provienen de varias rutas metabólicas, entre ellas del catabolismo de la L-arabinosa, lo que explicaría la ausencia de control de las rutas no fosforilativas inferiores por XylR.

Para estudiar la capacidad de dirigir la expresión de los promotores *xyl*, se clonaron diferentes regiones promotoras del gen *xylR* y del operón *xylFGH* (ver Figura 2.5 A), y se estudió la expresión del gen reportero *lacZ*, mediante la determinación de la actividad β -galactosidasa, en *H. seropedicae* Z69 y $Z69\Delta xylR$ crecidas en D-xilosa. Para el gen *xylR*, se clonaron dos fragmentos de ADN que, como era de esperar, generaron resultados similares, ya que se clonaron regiones lo suficientemente amplias que probablemente albergaban la región promotora. Los fragmentos 1 y 3 poseen 425pb y 484pb respectivamente, y para amplificarlos se utilizó el mismo cebador de retraso, que incorpora 43pb del ORF de *xylR*.

Para el operón *xylFGH* se ensayaron cuatro regiones promotoras de diferentes tamaños. Las regiones 1 y 3 dirigieron la expresión de la enzima β -galactosidasa en la cepa salvaje y no dirigieron la expresión en $Z69\Delta xylR$, ambas crecidas en D-xilosa. Esta misma respuesta se observó al cuantificar la expresión del gen *xylF* por RT-qPCR (Figura 2.4), por lo que podríamos decir que en estas regiones se encuentra la región promotora completa y el sitio de unión de XylR, y que es necesaria la presencia de XylR para que se exprese el operón *xylFGH*. La región promotora 4, que posee 110pb ubicadas aguas arribas del inicio del ORF y 41pb del mismo, no generó expresión del gen reportero, indicando que en este fragmento de ADN la región promotora no está completa y/o no se encuentra el sitio de unión de XylR, necesario para activar la transcripción del operón *xylFGH*. En cambio, cuando se estudió la región 2, que posee la misma región aguas arribas del ORF, más 100pb del ORF, se determinó una actividad β -galactosidasa más alta que en los otros casos, tanto en la cepa salvaje, como en el mutante $Z69\Delta xylR$, ambas crecidas en D-xilosa. En esta región del ORF se detectó la presencia de una secuencia Kozak, una secuencia consenso en vertebrados, para un fuerte inicio de la transcripción (Kozak, 1987). Quizás esta región no tenga ninguna función dentro del gen *xylF*, pero al estar clonada de esta manera, como promotora del gen reportero, podría ser la responsable de la fuerte inducción observada, que no corresponde

con la expresión del gen *xylF* cuantificada por RT-qPCR.

Para estudiar cómo responden los genes *xylR* y *xylFGH* a la presencia de diferentes fuentes carbonadas en el medio, en presencia o ausencia de XylR, se ensayó la actividad β -galactosidasa en las cepas Z69 y Z69 Δ *xylR* transformadas con las construcciones mencionadas anteriormente, conteniendo la región promotora 3, en ambos sentidos, fusionada con el gen *lacZ*.

Según los resultados mostrados en la Figura 2.6 A, la expresión de *pxylR-lacZ* en *H. seropedicae* Z69 está claramente inducida por la presencia de D-xilosa o D-glucosa en el medio, respecto a la misma cepa crecida en L-arabinosa, xilitol o glicerol, o al mutante Z69 Δ *xylR* crecido con las diferentes fuentes de carbono ensayadas. Esto sugiere que el gen *xylR* se autorregularía en presencia de D-xilosa o D-glucosa en el medio. Estos resultados son contradictorios a los resultados obtenidos por RNA-seq (ver capítulo anterior, Tabla 1.3), en donde no se observó diferencias significativas en los niveles de expresión del gen *xylR* cuando *H. seropedicae* Z69 creció en presencia de D-xilosa o glicerol. Cabe mencionar que en estos experimentos no se emplearon exactamente las mismas condiciones, ya que el experimento de RNA-seq se realizó a partir del ARN extraído de células crecidas con LGI suplementado con 30g/L de D-xilosa y DO_{600nm} final de 0,5; mientras que, las actividades β -galactosidasa se determinaron en células crecidas con LGI suplementado 10g/L de D-xilosa y DO_{600nm} final entre 1 y 1,4 (además las DO_{600nm} de cada experimento se midieron en equipos diferentes). Por otro lado, en los ensayos de RNA-seq (Tabla 1.3), se observó una sobre-expresión del gen *xylR* en el mutante Z69 Δ *xylB* respecto a la cepa salvaje, ambos crecidos en D-xilosa. Esta sobre-expresión va en línea con el aumento en la expresión de *pxylR-lacZ* por D-xilosa respecto a glicerol observado en la Figura 2.6 A. Es de esperar que en el mutante Z69 Δ *xylB*, deficiente en XDH, la D-xilosa se acumule en el interior celular debido a una reducción en el flujo catabólico por las rutas no fosforilativas. Este incremento en la concentración de D-xilosa en el interior celular podría aumentar la expresión del gen *xylR*, indicando que la expresión de *xylR* estaría activada por la presencia de D-xilosa.

Por otro lado, el promotor de los genes *xylFGH* indujo la expresión del gen reportero en Z69 crecida en D-xilosa o D-glucosa, comparado con la misma cepa crecida en L-arabinosa, xilitol o glicerol (Figura 2.6 B). Estos datos concuerdan con lo observado en los experimentos de RNA-seq (Tabla 1.3), en donde la expresión de los genes *xylF*, *xylG* y *xylH* fue significativamente mayor en Z69

crecida con D-xilosa, comparada con la misma crecida en glicerol. Además, la expresión de los genes dirigida por el promotor de *xylFGH* fue dependiente de la presencia de XylR, ya que en el mutante $Z69\Delta xylR$ transformado con la construcción *pxylFGH-lacZ*, la expresión del gen reportero no se indujo por D-xilosa o D-glucosa, respecto al control sin promotor (2.6 B). Estos resultados concuerdan con lo observado en los experimentos de RT-qPCR (Figura 2.4), en donde la expresión de gen *xylF* se redujo drásticamente en el mutante $Z69\Delta xylR$ respecto a la cepa salvaje, ambos crecidos en D-xilosa.

2.3.2. Regulación del catabolismo de D-glucosa

Los resultados hasta acá discutidos también sugieren que XylR está implicada en la regulación del metabolismo de la D-glucosa. Como se observó en la Figura 2.1, el mutante $Z69\Delta xylR$ presentó una reducción en el crecimiento en D-glucosa, con respecto a la cepa salvaje en las mismas condiciones. No sabemos si XylR regula en la expresión de las enzimas de la ruta de Entner-Doudoroff, implicada en el catabolismo de D-glucosa, o si las enzimas del metabolismo de D-xilosa, reguladas por XylR, intervienen también en la degradación de D-glucosa. De este modo, si los niveles de producción de estas enzimas bajan, afectaría negativamente el crecimiento de Z69 en presencia de D-glucosa. Para estudiar esta hipótesis, deberíamos comparar los niveles de expresión de los genes *xylBD* y *xylC* en células de Z69 crecidas en D-glucosa o D-xilosa, por RT-qPCR. Además, sería interesante cuantificar la expresión relativa de estos genes en $Z69\Delta xylR$ crecida en D-glucosa comparada con la cepa salvaje en las mismas condiciones, así como la expresión relativa de los genes que codifican para las enzimas de la ruta de Entner-Doudoroff en Z69 y $Z69\Delta xylR$, ambas crecidas en D-glucosa. Esta información podría ayudarnos a determinar si XylR interviene en la regulación de la expresión de los genes del catabolismo de D-glucosa.

Por otro lado, cuando se analizó la expresión de los promotores de *xylR* y *xylFGH* en *H. seropedicae* Z69 crecida en D-glucosa, se observó un aumento de la actividad β -galactosidasa, comparada con la misma cepa crecida en L-arabinosa, xilitol o glicerol (Figura 2.6). Además, esta expresión en D-glucosa no presentó grandes diferencias con los valores obtenidos al crecer Z69 en D-xilosa, dando indicios de la importancia de estos genes en el catabolismo de D-glucosa. A la luz de estos resultados, parecería ser que la D-glucosa, en

ausencia de D-xilosa, activa la expresión de los genes *xylR* y *xylFGH*. Esta expresión sería dependiente de XylR, ya que no se detectó un aumento de la actividad β -galactosidasa, como gen reportero, cuando se estudiaron las fusiones génicas en el contexto de la cepa mutante $Z69\Delta xylR$. Estos resultados sugieren que la D-glucosa también podría unirse a XylR y fomentar la unión de XylR a los promotores *xyl* para inducir la expresión de los genes del *cluster* I. Esta hipótesis debería ser confirmada por EMSA, analizando la afinidad de la unión rXylR-ADN en presencia y ausencia de D-glucosa.

Lo que resulta interesante destacar en este trabajo es que no se observa una represión de la expresión de los genes *xyl* por D-glucosa como ocurre en *E. coli* (Desai y Rao, 2010), sugiriendo que *H. seropedicae* sería capaz de metabolizar D-xilosa y D-glucosa al mismo tiempo. En este marco sería interesante realizar los ensayos de co-consumo de las fuentes carbonadas mencionadas. Si fuera así, sería de gran interés industrial porque tendríamos una cepa capaz de metabolizar eficientemente, y sin represión, los principales azúcares presentes en la biomasa lignocelulósica, y la misma podría emplearse para la producción de PHB teniendo en cuenta que esta cepa acumula altos niveles de este bioplástico en presencia de cada uno de estos azúcares (Malan, 2011).

2.3.3. Regulación del catabolismo de xilitol

El crecimiento del mutante $Z69\Delta xylR$ no se afectó en presencia xilitol respecto a la cepa salvaje en las mismas condiciones (Figura 2.1), lo que podría indicar que XylR no regula la expresión de los genes involucradas en el catabolismo del xilitol. Sin embargo, la actividad XOLDH, determinada en extractos libres de células del mutante $Z69\Delta xylR$ crecido en presencia de D-xilosa, aumentó considerablemente con respecto a la cepa salvaje en las mismas condiciones (Figura 2.2). Este mismo comportamiento se había observado en el mutante $Z69\Delta xylB$ (Malán et al. 2021). Hasta el momento, no hemos podido identificar el gen responsable de codificar para la/s enzima/s con actividad XOLDH (Malán et al. 2021). Con el objetivo de identificar la enzima con actividad XOLDH, y estudiar qué otros genes estarían regulados por XylR, se podrían realizar estudios de transcriptómica, por RNA-seq, a partir del ARNm de $Z69\Delta xylR$ crecida en D-xilosa, comparando con $Z69$ crecida en las mismas condiciones. Estos datos, a su vez, se podrían comparar con los obtenidos para el mutante $Z69\Delta xylB$ (en el capítulo anterior), lo que podría darnos una idea

de qué genes están efectivamente regulados por XylR y qué genes experimentan un cambio en su expresión debido al cambio en la expresión de otros genes y/o en la concentración de metabolitos que regulan su expresión.

2.3.4. Regulación del catabolismo de L-arabinosa

El crecimiento del mutante Z69 Δ *xylR* no se afectó al crecer en L-arabinosa como única fuente carbonada, comparado con la cepa salvaje en las mismas condiciones (Figura 2.1), lo que indicaría que XylR no interviene en la regulación de los genes implicados en el catabolismo de L-arabinosa. Además, y como era de esperar, la expresión relativa del gen *araB* (L-arabinosa deshidrogenasa) no mostró diferencia en células del mutante Z69 Δ *xylR* y Z69, crecidas en D-xilosa (Figura 2.4). Los genes *ara* (*cluster* IV, Figura 1.1) se encuentran en una región del genoma alejada del *cluster* I. Los genes para las enzimas de la ruta no fosforilativa superior del catabolismo de la L-arabinosa y un transportador del tipo ABC se encuentran en el *cluster* IV. Estos genes podrían estar regulados por una proteína (codificada por el ORF G5B88_05255) anotada como un regulador de la transcripción de la familia LysR, que se encuentra en el mismo *cluster*. Pero esta es otra hipótesis que debería ser abordada en el futuro.

2.3.5. Identificación de algunas de las regiones de ADN que reconoce XylR, mediante EMSA

Para analizar a qué regiones del genoma se une XylR, se decidió realizar un EMSA. Este ensayo permite estudiar la interacción ADN-proteína *in vitro*. Para ello, es deseable contar con la proteína pura para evaluar la interacción de la proteína de interés, sin la presencia de otras que pueden interferir, afectando la interacción ADN-proteína o interviniendo en el revelado del EMSA. En esta tesis se trabajó para obtener la proteína XylR recombinante, y se estudió su interacción con posibles regiones promotoras, obtenidas por PCR, en geles de retardo.

2.3.5.1. Producción de rXylR

Existen pocos reportes donde se informe que XylR actúa como proteína activadora de la transcripción. Ni et al. 2013 y Koirala et al. 2016 produjeron

XylR recombinante de *E. coli* usando el vector pET28a, conteniendo la etiqueta de histidinas en el extremo C-terminal y la cepa de expresión *E. coli* BL21 (DE); en ambos casos indujeron la expresión con IPTG, usando diferentes temperaturas de expresión; y obtuvieron la proteína en las fracciones solubles e insolubles. Por otro lado, XutR de *P. fluorescens*, se clonó en el vector pTrc99A, en donde se incluyó la etiqueta de histidinas en el extremo N-terminal y la expresión se realizó en *E. coli* BL21(DE3) por el agregado de IPTG, a 25°C (Liu et al. 2015). En esta tesis, en primera instancia se estudió la expresión de rXylR en dos cepas de *E. coli* (2.2.5.1). En BL21 (DE3) prácticamente no hubo expresión (Figura 2.7) a pesar de ser la cepa utilizada en la bibliografía para la producción de XylR recombinante (Koirala et al. 2016; Liu et al. 2015; Ni et al. 2013). En cambio, se obtuvo una buena expresión de rXylR en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS. Esta cepa expresa la lizosima T7, permitiendo reducir la expresión basal de la proteína recombinante (Studier, 1991). Esta cepa de expresión se diseñó para la expresión de proteínas que pueden resultar tóxicas (Bhatwa et al. 2021). En este caso, rXylR es un regulador transcripcional que se une al ADN, que podría reconocer el ADN de *E. coli* y alterar la expresión de sus genes, resultándole tóxica. Por eso, la cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLysS parecería ser más adecuada para la expresión producción de XylR recombinante.

En nuestro caso, se ensayaron dos medios de cultivo: ZYM5052 y TB con IPTG como agente inductor, y se usó el vector de expresión pET14b(+), donde la proteína recombinante se expresa bajo el promotor T7, reconocido por la ARN polimerasa del fago T7. El gen que codifica para esta polimerasa se induce por la presencia de lactosa o IPTG (Bhatwa et al. 2021). Con ambos medios de cultivo la estrategia es la misma, obtener una buena cantidad de biomasa de *E. coli* y luego inducir la expresión de rXylR, ya sea por el agregado del IPTG en el medio TB o, por el consumo de la glucosa del medio ZYM5052 y la posterior inducción de la producción de la proteína recombinante por la lactosa. De acuerdo a los resultados mostrados en la Figura 2.7 A, se eligió el medio de cultivo ZYM5052 para seguir trabajando, ya que se obtuvo mayor expresión de rXylR y porque este medio es más económico, y más práctico. En ZYM5052, el cultivo se inicia un día y se cosecha al día siguiente, cuando el cultivo llegó a su máximo crecimiento (a 37°C). En este caso, la inducción por lactosa ocurre de forma natural, luego de que *E. coli* consumió la D-glucosa y el glicerol presente en el medio. Además, la D-glucosa previene la inducción

temprana por lactosa. Por otro lado, los aminoácidos inhiben la inducción por lactosa durante la fase exponencial de crecimiento, y una alta tasa de aireación inhibe la inducción, aun a bajos niveles de lactosa (Studier, 2005).

Como se observa en la Figura 2.8, rXylR se produjo de forma insoluble, en cuerpos de inclusión. Según la bibliografía, la formación de los cuerpos de inclusión puede ser desencadenada por una alta tasa de producción de la proteína recombinante. Esto ocurre por el uso de promotores fuertes (promotores T7 y lac), plásmidos con alto número de copias, optimización del uso de codones, o cepas de *E. coli* modificadas para presentar una alta tasa de crecimiento (Bhatwa et al. 2021). También, cuando la tasa de síntesis de la proteína excede la habilidad de las células hospederas para manejar el correcto plegado, o la proteína le resulta tóxica, los niveles de proteína recombinante incorrectamente plegada aumentarán, y se agregarán en los cuerpos de inclusión (Bhatwa et al. 2021). Una estrategia ampliamente utilizada para aumentar la producción de la proteína soluble consiste en bajar la velocidad de crecimiento de *E. coli* y la tasa de producción de la proteína recombinante, disminuyendo la temperatura de crecimiento; esto además implica que la proteína se plegará más lento, y con ello se aumenta la probabilidad de tener un plegado correcto (Bhatwa et al. 2021). En nuestro caso, esta estrategia no fue útil, ya que rXylR se continuó produciendo en los cuerpos de inclusión (Figura 2.8 A). Como se obtuvo mayor cantidad de proteína recombinante a 37°C, y en menor tiempo de producción, se decidió seguir trabajando con esta condición.

Para obtener rXylR soluble, se podría intentar expresarla en otro vector, de diferente número de copias, o con la etiqueta de histidinas en el extremo C-terminal, o probando otras cepas de expresión. Además, se podrían ensayar otras etiquetas. A modo de ejemplo, se ha observado que, en algunos casos, la etiqueta de unión a maltosa (MBP) ayuda a un correcto plegado y solubilización de la proteína de interés (Paraskevopoulou y Falcone, 2018).

Siguiendo algunas de las posibles estrategias, se logró producir una gran cantidad de rXylR, pero siempre insoluble. Se procedió a solubilizar y replegar la proteína, intentando generar una proteína soluble que conserve las propiedades de interés. La producción de las proteínas recombinantes en cuerpos de inclusión, y su subsecuente solubilización es una estrategia viable e interesante, que permite generar un mayor volumen de producto, además, algunas veces el cuerpo de inclusión presenta casi exclusivamente la proteína de interés (Mital et al. 2021). Generalmente las proteínas recombinantes solubles representan un

30-40 % de las proteínas totales, mientras que los cuerpos de inclusión pueden contener hasta un 90 % de la proteína recombinante (Mital et al. 2021).

rXylR se solubilizó con urea y para el replegado se ensayaron dos estrategias: replegado en columna y por goteo. Para el replegado y purificación en columna se realizó una IMAC, en dónde se disminuyó la concentración de urea hasta 0M en el proceso de lavado. El objetivo de este procedimiento era purificar rXylR mediante IMAC, y replegarla progresivamente en la columna mediante la disminución de la concentración de urea. En este caso, como se observó en la Figura 2.10, rXylR no se adsorbió a la resina de la IMAC y eluyó en el percolado y en los primeros pasos de lavado. Podríamos pensar que la etiqueta de histidinas quedó escondida en el interior de la proteína y, que la cantidad de residuos histidínicos expuestos no alcanzó para interactuar con la resina. Pero al tratarse de la proteína desplegada por el uso de la urea, los residuos de histidinas estarían expuestos como para interactuar con la resina y, así necesariamente adsorberse a la misma. Otra hipótesis sería que rXylR, por algún problema en la construcción del vector recombinante, se estaría sintetizando sin la etiqueta de histidinas, pero según los resultados del Western Blot (Figura 2.13 C), rXylR posee la etiqueta de histidinas, ya que fue reconocida por los anticuerpos empleados en esta técnica.

También se buscó replegar la proteína por el método de goteo, donde se disminuye la concentración de urea lentamente, para permitir que rXylR se pliegue lentamente, favoreciendo así su correcto replegamiento. Como se observó en la Figura 2.11, una parte de rXylR se agregó y permaneció insoluble, pero fue posible recuperar una fracción de la proteína soluble y concentrarla de forma soluble. Con esta proteína se realizó el EMSA mostrado en la Figura 2.12, en dónde no se observó la formación del complejo ADN-proteína retrasado. Estos resultados indicarían que rXylR no se replegó correctamente, o que no hay interacción entre la misma y el ADN analizado. Cabe mencionar que rXylR parecería ser una proteína dimérica, según lo observado en el Western Blot (Figura 2.13 C), y tal como ocurre en otras bacterias (Liu et al. 2015; Song y Park, 1997). Así que, existe la posibilidad de que en el proceso de solubilización y replegado de la proteína, no hubiéramos logrado obtener el dímero.

2.3.5.2. EMSA

Debido a que no fue posible solubilizar y purificar rXylR en forma soluble, se realizó el EMSA empleando el extracto total de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS expresando rXylR. En el extracto total, rXylR se encuentra en los cuerpos de inclusión y probablemente también haya una fracción de proteína soluble, y es de esperar que esta proteína sea capaz de interactuar con el ADN y de formar el complejo ADN-proteína. Esta cantidad pequeña de rXylR sí podría ser detectada en el Western Blot ya que los anticuerpos presentan una alta sensibilidad, además de que son específicos para la etiqueta de histidinas. Utilizando el extracto total de proteínas se logró observar la formación del complejo ADN-proteína; en este caso se utilizó anticuerpos contra la etiqueta de histidinas en un Western Blot para identificar a la proteína recombinante en el gel de retardo.

Según los resultados obtenidos en el EMSA (Figura 2.13), XylR se uniría a las regiones promotoras de los genes *xylR* y/o *xylFGH* y a la región promotora de los genes *xylBD*. En ambos casos esta unión sería favorecida o reforzada con la presencia de D-xilosa. En el caso de los promotores de los genes *xylR* y *xylFGH* no sabemos a cuál de ellos se está uniendo ya que en el estudio se empleó un único fragmento de ADN conteniendo las dos regiones promotoras. Es de esperar que rXylR se esté uniendo a ambos promotores, ya que la expresión de estos genes se induce por XylR en *H. seropedicae*, como se demostró por RT-qPCR (Figura 2.4) y con los ensayos de expresión (Figura 2.6). Con estos resultados, podríamos sugerir que XylR, en ausencia de D-xilosa, se une débilmente a los promotores de los genes del *cluster* I y que en presencia de D-xilosa esta unión es más fuerte, activando la expresión de estos genes. Algo similar ocurre en *E. coli* y *P. fluorescens* (Liu et al. 2015; Song y Park, 1997). En estos casos, XylR (o XutR) se expresa de forma basal y se une débilmente a las regiones promotoras, no siendo capaz de activar la transcripción de los genes *xyl*. En presencia de D-xilosa, esta molécula refuerza la unión del activador transcripcional al ADN favoreciendo así la expresión de los genes *xyl*. Por otro lado, en estas bacterias, *xylR* es de expresión constitutiva, y el promotor de este gen no es sensible a D-xilosa o D-glucosa (Liu et al. 2015; Song y Park, 1997).

En nuestro caso, al trabajar con un extracto total de proteínas, no podemos descartar que otras proteínas de *E. coli* estén interviniendo o ayudando

a la unión de rXylR al ADN; aunque los estudios de EMSA realizados con el extracto total de la *E. coli* que no expresa rXylR, no muestran el efecto de retardo. Este experimento debería realizarse con rXylR pura. Por otro lado, se debería estudiar por EMSA, la interacción de rXylR con diferentes fragmentos de ADN conteniendo las regiones promotoras de los genes del *cluster* I, de tamaños menores a los empleados en esta tesis, para poder acercarnos a identificar el sitio de unión de XylR. Finalmente, para identificar con exactitud las secuencias de ADN a las que se une XylR se podrían realizar ensayos de *DNAseI footprinting*. Este ensayo habría que realizarlo, con los fragmentos de ADN empleados en el EMSA en donde se observa la unión de XylR al ADN.

Capítulo 3

Discusión General

La D-xilosa es un azúcar del grupo de las pentosas, y es el segundo carbohidrato más abundante en la naturaleza, luego de la D-glucosa. Se encuentra principalmente en la biomasa lignocelulósica, la cual, luego de hidrolizada, puede usarse como materia prima de bajo costo en procesos biológicos y/o químicos, como ser para la producción de bio-productos con valor agregado. De los componentes de la biomasa lignocelulósica, la D-xilosa es poco utilizada a nivel industrial. En parte, esto se debe a que los microorganismos utilizados clásicamente en los procesos industriales no la metabolizan eficientemente o presentan represión catabólica por sustrato. Por este motivo, es importante conocer las rutas metabólicas para el catabolismo de D-xilosa y los mecanismos regulatorios implicados, para así contribuir al futuro diseño de microorganismos que la utilicen eficientemente.

En esta tesis, en el Capítulo 1, se determinó que *H. seropedicae* Z69 emplea rutas no fosforilativas para el catabolismo de D-xilosa y L-arabinosa. Tal como se resume en la Figura 3.1, el primer paso de estas rutas está catalizado por las enzimas D-xilosa deshidrogenasa y L-arabinosa deshidrogenasa, codificadas por los genes *xylB* y *araB*. Ambas enzimas utilizan la D-xilosa y la L-arabinosa como sustratos, y estarían implicadas en el catabolismo de ambos azúcares. Algo similar ocurriría las siguientes enzimas de la ruta no fosforilativa superior en donde, al igual que en otras bacterias (Watanabe et al. 2006, 2019), las enzimas del catabolismo de L-arabinosa utilizarían como sustrato los correspondientes intermediarios del catabolismo de la D-xilosa. Luego, el intermediario D-KDP se cataboliza siguiendo la ruta de Watanabe (produciendo piruvato y glicolato), o siguiendo la ruta de Weimberg (produciendo

α -cetoglutarato) (Figura 3.1). De acuerdo al fenotipo del mutante $Z69\Delta mhpD$ (Figura 1.7), el catabolismo de la L-arabinosa se daría a través de la ruta de Weimberg; mientras que para el catabolismo de la D-xilosa se utilizaría principalmente la ruta de Watanabe. Estas afirmaciones deberían ser confirmadas, por ejemplo, mediante ensayos de análisis de flujos metabólicos, empleando ^{13}C -D-xilosa o ^{13}C -L-arabinosa como fuente carbonada. En esos ensayos, de acuerdo a la distribución isotópica se podría determinar la contribución de cada ruta. Además, este análisis se podría realizar con los mutantes $Z69\Delta xylA$ y $Z69\Delta mhpD$ para verificar si los genes mutados son los únicos involucrados en el último paso de cada ruta no fosforilativa inferior, en *H. seropedicae* Z69. Otra alternativa sería generar el doble mutante $Z69\Delta xylA\Delta mhpD$, el cual no debería crecer en D-xilosa o L-arabinosa.

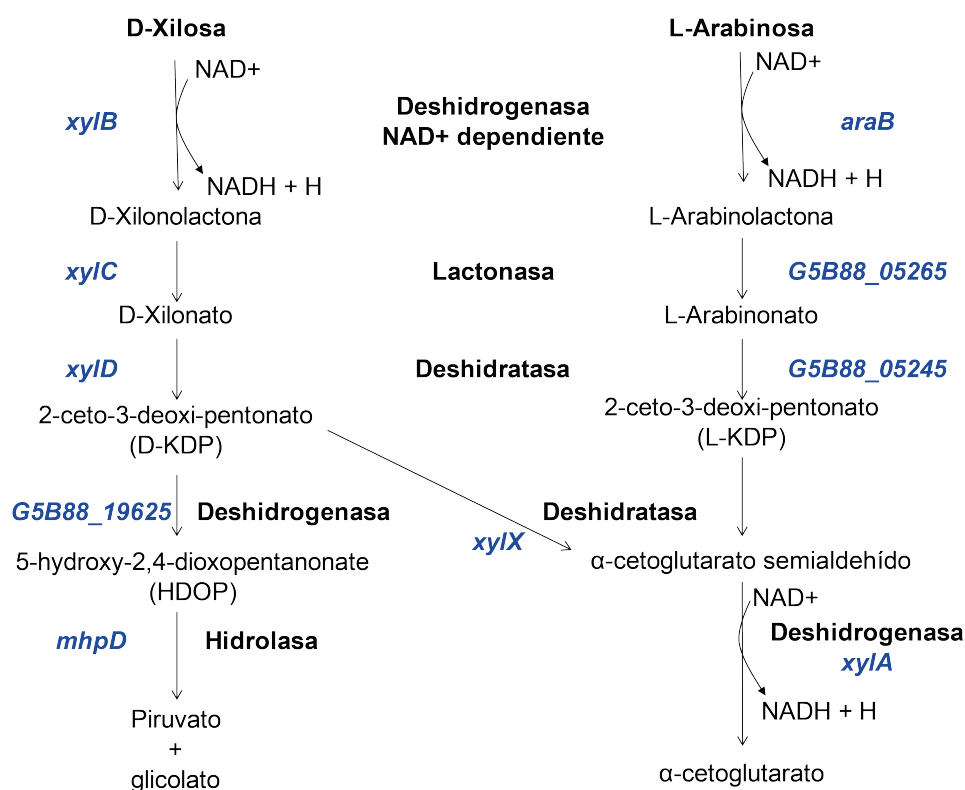


Figura 3.1: Rutas no fosforilativas empleadas para el catabolismo de D-xilosa y L-arabinosa en *H. seropedicae* Z69. En azul se muestra el nombre del gen que codifica para la enzima involucrada en ese paso.

En el Capítulo 2 se determinó que XylR es un activador de la transcripción, que en presencia de D-xilosa, se uniría a los promotores de los genes del *cluster* I (Figura 1.1), activando la expresión de los genes *xylFGH* (que codifican para

el transportador de D-xilosa), y los genes *xylBD* y *xylC* (que codifican para las enzimas de la ruta no fosforilativa superior) (ver Figura 3.2). Además, XylR sería capaz de activar su propia expresión en presencia de D-xilosa o D-glucosa. En ausencia de D-xilosa, la unión de XylR a las regiones promotoras no sería lo suficientemente fuerte como para activar la expresión de los genes del *cluster I*. Por otro lado, se observó que la D-glucosa también modularía esta interacción, activando la expresión de los genes del *cluster I*, de forma dependiente de XylR, dando indicios de que no existiría represión catabólica por D-glucosa, como se ha descrito en otras bacterias. De este modo, *H. seropedicae* Z69 parecería ser una buena candidata para la producción de bioproductos con valor agregado a partir de los azúcares presentes en la biomasa lignocelulósica.

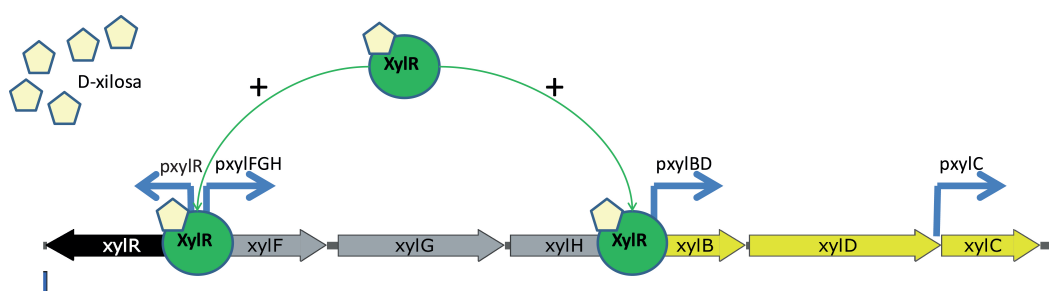


Figura 3.2: Modelo de regulación propuesto para el metabolismo de D-xilosa en *H. seropedicae*.

El objetivo general de esta tesis es profundizar en el conocimiento de *H. seropedicae* pensando en que podría ser utilizado como organismo productor de compuestos con valor agregado, por ejemplo PHB, al consumir D-xilosa como fuente de carbono. Por este motivo, se utilizó una concentración relativamente alta de D-xilosa (30g/L) en los cultivos en medio definido LGI, respetando la relación molar C/N=22, establecida como óptima para la producción de PHB a partir de D-glucosa como fuente carbonada (datos no publicados; gentileza de Ana Inés Catalán). Cuando *H. seropedicae* Z69 se cultivó en LGI suplementado con 30g/L de D-xilosa, el pH del medio disminuyó con la consiguiente muerte celular. Esta acidificación no se observó al bajar la concentración de D-xilosa a 10g/L, o cuando se utilizó 30g/L de D-glucosa, o cuando se tamponó eficientemente el medio de cultivo empleando MES 50mM a pH=7,0 (Malan, 2011). Esto sugiere que *H. seropedicae* Z69 estaría excretando ácidos orgánicos que acidifican el medio, posiblemente D-xilónico, como ocurre en otras bacterias (Raposo et al. 2017; Wang et al. 2016; Zhang et al. 2013). Debería corroborarse

la excreción de este compuesto, u otros, como por ejemplo, por HPLC-UV. La acumulación de D-xilónico podría deberse al desequilibrio redox producido por el exceso de fuente carbonada y/o la insuficiente regeneración de cofactores. También se ha reportado que la excreción de ácido D-xilónico sería debido a la sobre-expresión de la enzima XDH, conjuntamente con una expresión insuficiente de las enzimas involucradas en la degradación del ácido D-xilónico (Bañares et al. 2021). Esto concuerda con los resultados obtenidos en mi tesis de Maestría, en donde se observó que el mutante *Z69 Δ *xylB* no acidifica el medio LGI suplementado con 30g/L de D-xilosa. Además, *Z69 Δ *xylB* cultivada con 30g/L de D-xilosa presentó un mayor rendimiento de transformación de D-xilosa en PHB, indicando que esta cepa derivó el consumo de D-xilosa hacia la producción de PHB, sin generar "pérdidas" por la excreción de ácidos orgánicos (Malan, 2015). El D-xilonato (o ácido D-xilónico) es un bio-producto de gran interés, con múltiples aplicaciones en las industrias alimenticias, farmacéutica y de la construcción (He et al. 2021; Trichez et al. 2022). A pesar del gran interés que existe por el ácido D-xilónico, aún no se ha instalado su producción industrial, aunque se están desarrollando varios procesos microbianos para producirlo (Trichez et al. 2022).**

Por otro lado, existe un gran interés en la industria cosmética por el ácido glicólico o glicolato, producido por la ruta de Watanabe. Este ácido también puede utilizarse para la producción de polímeros biodegradables, como el poliglicolato y el poli(láctico-co-glicólico), con múltiples aplicaciones en la medicina y la industria del empaquetado. Actualmente, el ácido glicólico se produce a partir de combustibles fósiles (Cabulong et al. 2021) y sería interesante trabajar en su producción por métodos biológicos. Si bien no se ha estudiado la producción de este compuesto por *H. seropedicae*, es de esperar que el mismo se produzca, por las rutas metabólicas identificadas en este trabajo. Es más, *H. seropedicae* Z69 podría excretar ácido glicólico al crecer en presencia de 30g/L de D-xilosa y contribuir a la acidificación del medio de cultivo observada previamente. Sería entonces interesante confirmar la excreción de ácido glicólico (por HPLC-UV, por ejemplo), así como analizar su rendimiento de producción.

Hasta el momento no se ha desarrollado la producción industrial de bio-productos a partir de D-xilosa por microorganismos, empleando las rutas no fosforilativas. *C. crescentus*, en donde se identificaron originalmente los genes de la ruta de Weimberg, no parece ser una buena candidata para uso indus-

trial, ya que no estaría adaptada a crecer en presencia de altas concentraciones de D-xilosa. En el caso de *C. crescentus*, la velocidad máxima de crecimiento en este azúcar es de $0,11\text{h}^{-1}$, su crecimiento se inhibe con 20g/L de D-xilosa y excreta α -cetoglutarato al crecer en D-xilosa (Almqvist et al. 2018). Por otro lado, serían interesante expresar las rutas no fosforilativas en organismos de uso industrial. Si bien hay varios trabajos al respecto, aún no se han dado las condiciones para escalar el proceso (Domingues et al. 2021; Trichez et al. 2022). Estos datos demuestran la importancia y necesidad de profundizar en el conocimiento sobre las rutas involucradas en el catabolismo de D-xilosa, principalmente las rutas no fosforilativas, de las cuales hay muy pocos trabajos, y se conocen los genes involucrados en muy pocas bacterias. Los genes y las enzimas identificadas, luego, podrían expresarse en forma heteróloga en microorganismos de uso industrial. También podría realizarse la búsqueda de nuevos microorganismos bien adaptados a las altas concentraciones de azúcares y de inhibidores presentes en la biomasa lignocelulósica.

En este sentido, los resultados obtenidos en esta tesis son auspicios y posicionan a *H. seropedicae* Z69, como una buena candidata para la producción de bioproductos a partir de los azúcares presentes en la biomasa lignocelulósica. Esta cepa no es patógena (Monteiro et al. 2014), es de rápido crecimiento, y no presenta grandes requerimientos nutricionales, como vitaminas o cofactores (Baldani et al. 1986). Por otro lado, como quedó demostrado en esta tesis, es una cepa de fácil manejo en el laboratorio y existen herramientas de biología molecular disponibles que potencialmente podrían usarse para diseñar nuevas cepas modificadas, con mejores capacidades. Además, se conoce su genoma y las rutas metabólicas involucradas en la degradación de los principales azúcares de la biomasa lignocelulósica; y no presentaría represión catabólica por D-glucosa. Por otro lado, ahora que se conocen las rutas metabólicas implicadas en la degradación de D-xilosa, se podrían realizar modelados *in silico*, como análisis de balance de flujos, para identificar cuáles son las rutas metabólicas con mayor rendimiento para la producción de PHB o glicolato y detectar modificaciones genéticas que permitan obtener mejores resultados. Además, el conocimiento del metabolismo y los mecanismos de regulación, serán importantes a la hora de diseñar las estrategias para optimizar la producción de bioproductos a partir de la biomasa lignocelulósica.

Conclusiones

- *H. seropedicae* Z69 emplea rutas no fosforilativas para el catabolismo de D-xilosa y L-arabinosa.
- El gen *xylB* (G5B88_22805) codifica para la D-xilosa deshidrogenasa dependiente de NAD^+ , involucrada en el primer paso de las rutas no fosforilativas.
- El gen *araB* (G5B88_05250) codifica para la L-arabinosa deshidrogenasa dependiente de NAD^+ , capaz de utilizar D-xilosa como sustrato.
- La ruta de Watanabe, que involucra la expresión del gen *mhpD*, sería la preferida por *H. seropedicae* Z69 para el catabolismo de D-xilosa.
- Para el catabolismo de L-arabinosa, *H. seropedicae* emplearía la ruta de Weimberg.
- Los genes *xylFGH* del *cluster* I, que codificarían para el transportador de D-xilosa, se encuentran formando una única unidad transcripcional u operón, mientras que los genes que codifican para la ruta no fosforilativa superior se encuentran formando parte de dos unidades transcripcionales: *xylBD* y *xylC*.
- El gen *xylR*, ubicado en el *cluster* I, codifica para un regulador de la transcripción, capaz de activar la expresión de algunos genes involucrados en el catabolismo de D-xilosa.
- La expresión de los genes *xyl* del *cluster* I, está activada por la presencia de D-xilosa y es dependiente XylR.
- XylR no regula la expresión de los genes *xylA* y *mhpD* (rutas no fosforilativas inferiores), ni del gen *araB* involucrado en el catabolismo de L-arabinosa.
- XylR se une a las regiones promotoras de los genes *xylR* y/o *xylFGH* y *xylBD*. Esta unión es reforzada por la presencia de D-xilosa en el medio.
- No se observó represión por D-glucosa en la expresión de los genes in-

ducidos por los promotores de *xylR* y *xylFGH*, dando indicios de que no existiría represión catabólica por D-glucosa en *H. seropedicae* Z69.

Perspectivas

- Confirmar si *H. seropedicae* Z69 produce y excreta D-xilonato y/o glicolato al crecer en LGI suplementado con 30g/L de D-xilosa.
- Realizar análisis de flujos metabólicos empleando ^{13}C -D-xilosa o ^{13}C -L-arabinosa, en donde, de acuerdo a la distribución isotópica, se podría estimar la contribución de cada ruta al catabolismo de D-xilosa o L-arabinosa. Este mismo análisis se podría realizar en los mutantes $\text{Z69}\Delta\text{xylA}$ y $\text{Z69}\Delta\text{mhpD}$ para verificar que no hay otras enzimas capaces de realizar esa función.
- Construir el doble mutante $\text{Z69}\Delta\text{xylA}\Delta\text{mhpD}$ y estudiar su capacidad de crecer en D-xilosa, L-arabinosa y D-glucosa.
- Realizar modelados *in silico*, aplicando herramientas de biología de sistemas, por ejemplo análisis de balance de flujos, para estudiar cuáles son las rutas metabólicas con mayor rendimiento para la producción de PHB o glicolato en *H. seropedicae* a partir de D-xilosa, e identificar modificaciones genéticas que permitan obtener mejores resultados.
- Realizar ensayos de co-consumo de los diferentes azúcares lignocelulósicos (D-glucosa, D-xilosa, L-arabinosa).
- Estudiar la capacidad de *H. seropedicae* de crecer y producir bioproductos de interés (PHB, D-xilonato o glicolato), empleando biomasa lignocelulósica hidrolizada.
- Estudiar la tolerancia de *H. seropedicae* a los inhibidores presentes en la biomasa lignocelulósica.
- Identificar, mediante RNA-seq, todos los genes que cambian sus niveles de expresión en el mutante $\text{Z69}\Delta\text{xylR}$, comparado con la cepa salvaje, ambos crecidos en D-xilosa como única fuente carbonada.
- Cuantificar, mediante RT-qPCR, los cambios en los niveles de expresión de los genes que codifican para las enzimas de la ruta Entner Doudo-

roff, implicada en el catabolismo de D-glucosa en el mutante Z69 Δ *xylR*, comparado con la cepa salvaje, ambos crecidos en D-glucosa.

- Identificar el inicio de la transcripción de los genes *xyl* del *cluster* I mediante 5'RACE.
- Clonar las regiones promotoras de los genes *xylBD* y *xylC* en el vector pMP220, y transferir estas construcciones a *H. seropedicae* Z69 y Z69 Δ *xylR*, para poder estudiar cómo estos promotores dirigen la expresión del gen reportero *lacZ* cuando las cepas se cultivan en presencia de diferentes fuentes carbonadas (D-xilosa, L-arabinosa, D-glucosa).
- Producir rXylR de forma soluble y purificarla para poder realizar los EMSA con la proteína pura.
- Realizar los EMSA empleando fragmentos de ADN de diferentes tamaños, conteniendo las regiones promotoras de los genes *xylR*, *xylFGH*, *xylBD*, y *xylC*, en presencia y ausencia de D-xilosa o D-glucosa.
- Realizar ensayos de *DNAseI footprinting*, para identificar, *in vitro*, las regiones de ADN protegidas por rXylR, de modo de identificar los sitios de unión de XylR al ADN. Este ensayo habría que realizarlo en primera instancia, con los fragmentos de ADN empleados en el EMSA en donde se observó la unión de XylR al ADN.

Referencias bibliográficas

- Almqvist, H., Glaser, S. J., Tufvegren, C., Wasserstrom, L., y Lidén, G. (2018). Characterization of the Weimberg Pathway in *Caulobacter crescentus*. *Fermentation*, 4, 44. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020044>
- Aranda, P. S., LaJoie, D. M., y Jorcyk, C. L. (2012). Bleach gel: A simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*, 33, 366-369. <https://doi.org/10.1002/elps.201100335>
- Baldani, J. I., Baldani, V. L. D., Seldin, L., y Dobereiner, J. (1986). Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov., sp. nov., a Root-Associated Nitrogen-Fixing Bacterium. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 36, 86-93.
- Bañares, A. B., Nisola, G. M., Valdehuesa, K. N. G., Lee, W.-K., y Chung, W.-J. (2021). Understanding D-xylonic acid accumulation: a cornerstone for better metabolic engineering approaches. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 5309-5324. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11410-y>
- Beringer, J. (1974). R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology*, 84, 188-198.
- Bhatwa, A., Wang, W., Hassan, Y. I., Abraham, N., Li, X.-Z., y Zhou, T. (2021). Challenges Associated With the Formation of Recombinant Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli* and Strategies to Address Them for Industrial Applications. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9, 1-18. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.630551>
- Brimacombe, J. S. (Ed.). (1973). *Carbohydrate chemistry. Vol. 6 : a review of the literature published during 1972*. Royal Society of Chemistry. <https://books.google.com.uy/books?id=iKMQwwEACAAJ>
- Buchert, J., y Viikari, L. (1988). The role of xylonolactone in xylonic acid production by *Pseudomonas fragi*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 27, 333-336. <https://doi.org/10.1007/BF00251763>

- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Helleman, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., y Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55, 611-622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Cabulong, R. B., Bañares, A. B., Nisola, G. M., Lee, W.-K., y Chung, W.-J. (2021). Enhanced glycolic acid yield through xylose and cellobiose utilization by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 44, 1081-1091. <https://doi.org/10.1007/s00449-020-02502-6>
- Caspi, R., Billington, R., Ferrer, L., Foerster, H., Fulcher, C. A., Keseler, I. M., Kothari, A., Krummenacker, M., Latendresse, M., Mueller, L. A., Ong, Q., Paley, S., Subhraveti, P., Weaver, D. S., y Karp, P. D. (2016). The MetaCyc database of metabolic pathways and enzymes and the BioCyc collection of pathway/genome databases. *Nucleic Acids Research*, 44, D471-D480. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1164>
- Catalán, A. I., Ferreira, F., Gill, P. R., y Batista, S. (2007). Production of polyhydroxyalkanoates by *Herbaspirillum seropedicae* grown with different sole carbon sources and on lactose when engineered to express the *lacZlacY* genes. *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1352-1357.
- Cavalcante, V. A., y Dobereiner, J. (1988). A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. *Plant and Soil*, 108, 23-31. <https://doi.org/10.1007/BF02370096>
- Dahms, A. S. (1974). 3-Deoxy-D-pentulosonic acid aldolase and its role in a new pathway of D-xylose degradation. *Biochemical and biophysical research communications*, 60, 1433-9. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(74\)90358-1](https://doi.org/10.1016/0006-291x(74)90358-1)
- Desai, T. A., y Rao, C. V. (2010). Regulation of Arabinose and Xylose Metabolism in *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 1524-1532. <https://doi.org/10.1128/AEM.01970-09>
- de Souza, V., Piro, V. C., Faoro, H., Tadra-Sfeir, M. Z., Chicora, V. K., Guizelini, D., Weiss, V., Vialle, R. A., Monteiro, R. A., Steffens, M. B. R., Marchaukoski, J. N., Pedrosa, F. O., Cruz, L. M., Chubatsu, L. S., y Raittz, R. T. (2013). Draft Genome Sequence of *Herbaspirillum huttiense* subsp. putei IAM 15032, a Strain Isolated from Well Water. *Genome Announcements*, 1, 1-2. <https://doi.org/10.1128/genomeA.00252-12>

- Ditta, G., Stanfield, S., Corbin, D., y Helinski, D. (1980). Broad host range DNA cloning system for gram-negative bacteria: construction of a gene bank of *Rhizobium meliloti*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 77, 7347-7351.
- Domingues, R., Bondar, M., Palolo, I., Queirós, O., de Almeida, C. D., y Cesario, M. T. (2021). Xylose Metabolism in Bacteria—Opportunities and Challenges towards Efficient Lignocellulosic Biomass-Based Biorefineries. *Applied Sciences*, 11, 8112. <https://doi.org/10.3390/app11178112>
- Gartner, D., Degenkolb, J., Ripperger, J. A., Allmansberger, R., y Hillen, W. (1992). Regulation of the *Bacillus subtilis* W23 xylose utilization operon: interaction of the Xyl repressor with the xyl operator and the inducer xylose. *Molecular and general genetics : MGG*, 232, 415-22. <https://doi.org/10.1007/BF00266245>
- Govil, T., Wang, J., Samanta, D., David, A., Tripathi, A., Rauniyar, S., Salem, D. R., y Sani, R. K. (2020). Lignocellulosic feedstock: A review of a sustainable platform for cleaner production of nature's plastics. *Journal of Cleaner Production*, 270, 122521. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122521>
- Groff, D., Benke, P. I., Batth, T. S., Bokinsky, G., Petzold, C. J., Adams, P. D., y Keasling, J. D. (2012). Supplementation of Intracellular XylR Leads to Couitilization of Hemicellulose Sugars. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 2221-2229. <https://doi.org/10.1128/AEM.06761-11>
- Haft, D. H., DiCuccio, M., Badretdin, A., Brover, V., Chetvernin, V., Neill, K. O., Li, W., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Lu, F., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Zheng, C., Thibaud-Nissen, F., Geer, L. Y., ... Pruitt, K. D. (2018). RefSeq: an update on prokaryotic genome annotation and curation. *Nucleic Acids Research*, 46, D851-D860. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1068>
- He, T., Xu, C., Ding, C., Liu, X., y Gu, X. (2021). Optimization of Specific Productivity for Xylonic Acid Production by *Gluconobacter oxydans* Using Response Surface Methodology. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2021.729988>
- Heo, G.-Y., Kim, W.-C., Joo, G.-J., Kwak, Y.-Y., Shin, J.-H., Roh, D.-H., Park, H.-D., y Rhee, I.-K. (2008). Deletion of xylR gene enhances expression of xylose isomerase in *Streptomyces lividans* TK24. *Journal of*

- microbiology and biotechnology*, 18, 837-44. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18633279>
- Ikawa, Y., Ohnishi, S., Shoji, A., Furutani, A., y Tsuge, S. (2018). Concomitant Regulation by a LacI-Type Transcriptional Repressor XylR on Genes Involved in Xylan and Xylose Metabolism and the Type III Secretion System in Rice Pathogen *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 31, 605-613. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-17-0277-R>
- Jin, Y.-S., y Jeffries, T. W. (2004). Stoichiometric network constraints on xylose metabolism by recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic Engineering*, 6, 229-238. <https://doi.org/10.1016/j.ymben.2003.11.006>
- Johnsen, U., Dambeck, M., Zaiss, H., Fuhrer, T., Soppa, J., Sauer, U., y Schonheit, P. (2009). D-Xylose Degradation Pathway in the Halophilic Archaeon *Haloferax volcanii*. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 27290-27303. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.003814>
- Johnsen, U., y Schonheit, P. (2004). Novel Xylose Dehydrogenase in the Halophilic Archaeon *Haloarcula marismortui*. *Journal of Bacteriology*, 186, 6198-6207. <https://doi.org/10.1128/JB.186.18.6198-6207.2004>
- Kanehisa, M. (2000). KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. *Nucleic Acids Research*, 28, 27-30. <https://doi.org/10.1093/nar/28.1.27>
- Kohler, K. A. K., Blank, L. M., Frick, O., y Schmid, A. (2015). D-Xylose assimilation via the Weimberg pathway by solvent-tolerant *Pseudomonas taiwanensis* VLB120. *Environmental Microbiology*, 17, 156-170. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12537>
- Koirala, S., Wang, X., y Rao, C. V. (2016). Reciprocal Regulation of L - Arabinose and D-Xylose Metabolism in *Escherichia coli* (T. J. Silhavy, Ed.). *Journal of Bacteriology*, 198, 386-393. <https://doi.org/10.1128/JB.00709-15>
- Kovach, M. E., Elzer, P. H., Hill, D. S., Robertson, G. T., Farris, M. A., Roop, R. M., y Peterson, K. M. (1995). Four new derivatives of the broad-host-range cloning vector pBBR1MCS, carrying different antibiotic-resistance cassettes. *Gene*, 166, 175-6. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8529885>
- Kozak, M. (1987). An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic acids research*, 15, 8125-48. <https://doi.org/10.1093/nar/15.20.8125>

- Lamble, H. J., Heyer, N. I., Bull, S. D., Hough, D. W., y Danson, M. J. (2003). Metabolic Pathway Promiscuity in the Archaeon *Sulfolobus solfataricus* Revealed by Studies on Glucose Dehydrogenase and 2-Keto-3-deoxygluconate Aldolase. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 34066-34072. <https://doi.org/10.1074/jbc.M305818200>
- Liu, Y., Rainey, P. B., y Zhang, X.-x. (2015). Molecular mechanisms of xylose utilization by *Pseudomonas fluorescens*: overlapping genetic responses to xylose, xylulose, ribose and mannitol. 98, 553-570. <https://doi.org/10.1111/mmi.13142>
- Love, M. I., Huber, W., y Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15, 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
- Luo, Y., Zhang, T., y Wu, H. (2014). The transport and mediation mechanisms of the common sugars in *Escherichia coli*. *Biotechnology Advances*, 32, 905-919. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2014.04.009>
- Maity, S. K. (2015). Opportunities, recent trends and challenges of integrated biorefinery: Part I. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 43, 1427-1445. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2014.11.092>
- Malan, A. (2011). *Estudio de la producción de poli-3-hidroxibutirato en Herbaspirillum seropedicae Z69 a partir de azúcares presentes en la hemicelulosa*. <http://www.bib.fcien.edu.uy/files/etd/pasan/uy24-15241>
- Malan, A. (2015). *Estudio del metabolismo de xilosa en Herbaspirillum seropedicae Z69 orientado a optimizar la producción de poli-3-hidroxibutirato*.
- Malán, A. K., Tuleski, T., Catalán, A. I., de Souza, E. M., y Batista, S. (2021). *Herbaspirillum seropedicae* expresses non-phosphorylative pathways for D-xylose catabolism. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105, 7339-7352. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11507-4>
- Mathias, A. L., Rigo, L. U., Funayama, S., y Pedrosa, F. O. (1989). L-arabinose metabolism in *Herbaspirillum seropedicae*. *Journal of Bacteriology*, 171, 5206-5209. <https://doi.org/10.1128/jb.171.9.5206-5209.1989>
- Mihasan, M., Stefan, M., Hritcu, L., Artenie, V., y Brandsch, R. (2013). Evidence of a plasmid-encoded oxidative xylose-catabolic pathway in *Arthrobacter nicotinovorans* pAO1. *Research in Microbiology*, 164, 22-30. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.10.003>

- Mikkola, J.-P., Salmi, T., y Sjöholm, R. (1999). *Kinetic and mass-transfer effects in the hydrogenation of xylose to xylitol*. [https://doi.org/10.1016/S0167-2991\(99\)80166-9](https://doi.org/10.1016/S0167-2991(99)80166-9)
- Milburn, C. C., Lambie, H. J., Theodossis, A., Bull, S. D., Hough, D. W., Danson, M. J., y Taylor, G. L. (2006). The Structural Basis of Substrate Promiscuity in Glucose Dehydrogenase from the Hyperthermophilic Archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 14796-14804. <https://doi.org/10.1074/jbc.M601334200>
- Miller, J. H. (1972). *Experiments in Molecular Genetics* (J. H. Miller, Ed.). Cold Spring Harbor Laboratory. <https://books.google.com.uy/books?id=LcpqAAAAMAAJ>
- Mital, S., Christie, G., y Dikicioglu, D. (2021). Recombinant expression of insoluble enzymes in *Escherichia coli*: a systematic review of experimental design and its manufacturing implications. *Microbial Cell Factories*, 20, 208. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01698-w>
- Monteiro, R. A., Cruz, L. M., Wassem, R., Muller, M., Cardoso, R., de Oliveira Pedrosa, F., Chubatsu, L. S., James, E. K., y de Souza, E. M. (2014, noviembre). *Comparative Genomics of Herbaspirillum Species*. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-9203-0_9
- Mostafa, H. E., Heller, K. J., y Geis, A. (2002). Cloning of *Escherichia coli* *lacZ* and *lacY* Genes and Their Expression in *Gluconobacter oxydans* and *Acetobacter liquefaciens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 2619-2623. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.5.2619-2623.2002>
- Ni, L., Tonthat, N. K., Chinnam, N., y a Schumacher, M. (2013). Structures of the *Escherichia coli* transcription activator and regulator of diauxie, XylR: an AraC DNA-binding family member with a LacI/GalR ligand-binding domain. *Nucleic acids research*, 41, 1998-2008. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1207>
- Nunn, C. E., Johnsen, U., Schonheit, P., Fuhrer, T., Sauer, U., Hough, D. W., y Danson, M. J. (2010). Metabolism of Pentose Sugars in the Hyperthermophilic Archaea *Sulfolobus solfataricus* and *Sulfolobus acidocaldarius*. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 33701-33709. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.146332>
- Paraskevopoulou, V., y Falcone, F. (2018). Polyionic Tags as Enhancers of Protein Solubility in Recombinant Protein Expression. *Microorganisms*, 6, 47. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6020047>

- Pedrosa, F. O., Monteiro, R. A., Wassem, R., Cruz, L. M., Ayub, R. A., Colauto, N. B., Fernandez, M. A., Fungaro, M. H. P., Grisard, E. C., Hungria, M., Madeira, H. M. F., Nodari, R. O., Osaku, C. A., Petzler, M. L., Terenzi, H., Vieira, L. G. E., Steffens, M. B. R., Weiss, V. A., Pereira, L. F. P., ... Souza, E. M. (2011). Genome of *Herbaspirillum seropedicae* Strain SmR1, a Specialized Diazotrophic Endophyte of Tropical Grasses (P. M. Richardson, Ed.). *PLoS Genetics*, 7, e1002064. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002064>
- Pessoa, D. D. V., Vidal, M. S., Baldani, J. I., y Simoes-Araujo, J. L. (2016). Validation of reference genes for RT-qPCR analysis in *Herbaspirillum seropedicae*. *Journal of Microbiological Methods*, 127, 193-196. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.06.011>
- Poole, P. S., Blyth, A., Reid, C. J., y Walters, K. (1994). myo-Inositol catabolism and catabolite regulation in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*. *Microbiology*, 140, 2787-2795. <https://doi.org/10.1099/00221287-140-10-2787>
- Price, M. N., Wetmore, K. M., Waters, R. J., Callaghan, M., Ray, J., Liu, H., Kuehl, J. V., Melnyk, R. A., Lamson, J. S., Suh, Y., Carlson, H. K., Esquivel, Z., Sadeeshkumar, H., Chakraborty, R., Zane, G. M., Rubin, B. E., Wall, J. D., Visel, A., Bristow, J., ... Deutschbauer, A. M. (2018). Mutant phenotypes for thousands of bacterial genes of unknown function. *Nature*, 557, 503-509. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0124-0>
- Raj, T., Chandrasekhar, K., Kumar, A. N., y Kim, S. H. (2022). Lignocellulosic biomass as renewable feedstock for biodegradable and recyclable plastics production: A sustainable approach. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 158. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2022.112130>
- Raposo, R. S., de Almeida, M. C. M., da Conceição M.A. de Oliveira, M., da Fonseca, M. M., y Cesário, M. T. (2017). A *Burkholderia sacchari* cell factory: production of poly-3-hydroxybutyrate, xylitol and xylonic acid from xylose-rich sugar mixtures. *New Biotechnology*, 34, 12-22. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2016.10.001>
- Ren, Y., Eronen, V., Andberg, M. B., Koivula, A., y Hakulinen, N. (2022). Structure and function of aldopentose catabolism enzymes involved in oxidative non-phosphorylative pathways. *Biotechnology for Biofuels and Bioproducts*, 15, 147. <https://doi.org/10.1186/s13068-022-02252-5>

- Rodriguez-R, L. M., y Konstantinidis, K. T. (2016). The enveomics collection: a toolbox for specialized analyses of microbial genomes and metagenomes. *PeerJ Preprints*.
- Sambrook, J., Fritsch, E., y Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (Second Edi). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schafer, A., Tauch, A., Jager, W., Kalinowski, J., Thierbach, G., y Puhler, A. (1994). Small mobilizable multi-purpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK18 and pK19: selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*. *Gene*, 145, 69-73. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(94\)90324-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(94)90324-7)
- Sohn, Y. J., Son, J., Lim, H. J., Lim, S. H., y Park, S. J. (2022). Valorization of lignocellulosic biomass for polyhydroxyalkanoate production: Status and perspectives. *Bioresource Technology*, 360, 127575. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2022.127575>
- Song, S., y Park, C. (1997). Organization and regulation of the D-xylose operons in *Escherichia coli* K-12: XylR acts as a transcriptional activator. *Journal of Bacteriology*, 179, 7025-7032. <https://doi.org/10.1128/jb.179.22.7025-7032.1997>
- Spaink, H. P., Okker, R. J. H., Wijffelman, C. A., Pees, E., y Lugtenberg, B. J. J. (1987). Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* Sym plasmid pRL1JI. *Plant Molecular Biology*, 9, 27-39. <https://doi.org/10.1007/BF00017984>
- Stephens, C., Christen, B., Fuchs, T., Sundaram, V., Watanabe, K., y Jenal, U. (2007). Genetic analysis of a novel pathway for D-xylose metabolism in *Caulobacter crescentus*. *Journal of Bacteriology*, 189, 2181-2185. <https://doi.org/10.1128/JB.01438-06>
- Stephens, C., Christen, B., Watanabe, K., Fuchs, T., y Jenal, U. (2007). Regulation of D-xylose metabolism in *Caulobacter crescentus* by a LacI-type repressor. *Journal of Bacteriology*, 189, 8828-8834. <https://doi.org/10.1128/JB.01342-07>
- Studier, F. W. (2005). Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expression and Purification*, 41, 207-234. <https://doi.org/10.1016/j.pep.2005.01.016>
- Studier, F. (1991). Use of bacteriophage T7 lysozyme to improve an inducible T7 expression system. *Journal of Molecular Biology*, 219, 37-44. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90855-Z](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90855-Z)

- Sukdeo, N., y Charles, T. C. (2003). Application of crossover-PCR-mediated deletion-insertion mutagenesis to analysis of the bdhA-xdhA2-xdhB2 mixed-function operon of *Sinorhizobium meliloti*. *Archives of Microbiology*, 179, 301-304. <https://doi.org/10.1007/s00203-003-0532-9>
- Sutiono, S., Siebers, B., y Sieber, V. (2020). Characterization of highly active 2-keto-3-deoxy-L-arabinonate and 2-keto-3-deoxy-D-xylonate dehydratases in terms of the biotransformation of hemicellulose sugars to chemicals. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104, 7023-7035. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10742-5>
- Sutter, J. M., Johnsen, U., Reinhardt, A., y Schonheit, P. (2020). Pentose degradation in archaea: *Halorhabdus* species degrade D-xylose, L-arabinose and D-ribose via bacterial-type pathways. *Extremophiles*, 24, 759-772. <https://doi.org/10.1007/s00792-020-01192-y>
- Tatusova, T., DiCuccio, M., Badretdin, A., Chetvernin, V., Nawrocki, E. P., Zaslavsky, L., Lomsadze, A., Pruitt, K. D., Borodovsky, M., y Ostell, J. (2016). NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Research*, 44, 6614-6624. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw569>
- Trichez, D., Carneiro, C. V. G. C., Braga, M., y Almeida, J. R. M. (2022). Recent progress in the microbial production of xylonic acid. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 38, 127. <https://doi.org/10.1007/s11274-022-03313-5>
- Valdehuesa, K. N. G., Ramos, K. R. M., Nisola, G. M., Bañares, A. B., Cabulong, R. B., Lee, W.-K., Liu, H., y Chung, W.-J. (2018). Everyone loves an underdog: metabolic engineering of the xylose oxidative pathway in recombinant microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 102, 7703-7716. <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9186-z>
- Wang, C., Wei, D., Zhang, Z., Wang, D., Shi, J., Kim, C. H., Jiang, B., Han, Z., y Hao, J. (2016). Production of xylonic acid by *Klebsiella pneumoniae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100, 10055-10063. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7825-9>
- Watanabe, S., Fukumori, F., Nishiwaki, H., Sakurai, Y., Tajima, K., y Watanabe, Y. (2019). Novel non-phosphorylative pathway of pentose metabolism from bacteria. *Scientific Reports*, 9, 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36774-6>
- Watanabe, S., Shimada, N., Tajima, K., Kodaki, T., y Makino, K. (2006). Identification and Characterization of L-Arabinonate Dehydratase, L-2-Keto-

- 3-deoxyarabonate Dehydratase, and L-Arabinolactonase Involved in an Alternative Pathway of L-Arabinose Metabolism. *Journal of Biological Chemistry*, 281, 33521-33536. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606727200>
- Weimberg, R. (1961). Pentose oxidation by *Pseudomonas fragi*. *The Journal of biological chemistry*, 236, 629-35. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/13783864>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., y Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Zhang, M., Wei, L., Zhou, Y., Du, L., Imanaka, T., y Hua, Q. (2013). Genetic analysis of D-xylose metabolism pathways in *Gluconobacter oxydans* 621H. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40, 379-388. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1231-4>
- Zhao, Z., Xian, M., Liu, M., y Zhao, G. (2020). Biochemical routes for uptake and conversion of xylose by microorganisms. *Biotechnology for Biofuels*, 13, 21. <https://doi.org/10.1186/s13068-020-1662-x>

APÉNDICES

Apéndice A

Transcriptómica

En la Figura A.1 se muestra la calidad de los ARN empleados en para la secuenciación masiva (RNA-seq). En la Tabla A.1 se muestra la calidad de secuenciación y del mapeo de los experimentos de RNA-seq.

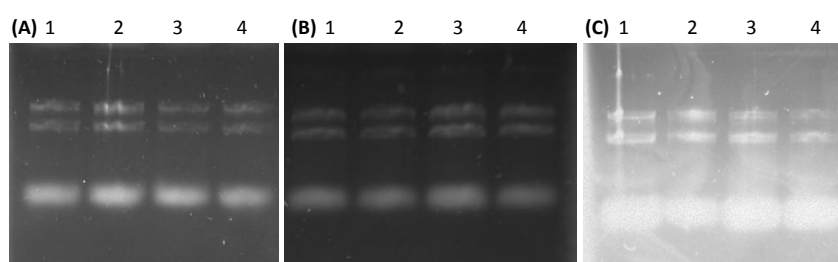


Figura A.1: Electroforesis en gel de agarosa 1 % (p/v) teñido con bromuro de etidio para ver la calidad de los ARN empelados para RNA-seq (A) ARN de Z69 crecida en LGI con 30g/l de D-xilosa (carriles 1 y 2: 0,3μL y 0,1μL de las submuestras de la réplica biológica 1. Carriles 3 y 4: 1μL y 0,1μL de las submuestras de la réplica biológica 2. Se secuenciaron las muestras de los carriles 2 y 4). (B) ARN de Z69Δ*xylB* crecida el LGI suplementado con 30g/L de D-xilosa (carriles 1 y 2: 0,2μL de las submuestras de la réplica biológica 3. Carriles 3 y 4: 0,2μL de las submuestras de la réplica biológica 4. Se secuenciaron las muestras de los carriles 1 y 3) (C) ARN de Z69 crecida en LGI suplementado con 10 g/L de glicerol (carriles 1 y 2: 0,5μL de las submuestras de la réplica biológica 5. Carriles 3 y 4: 0,5μL de las submuestras de la réplica biológica 6. Se secuenciaron las muestras de los carriles 1 y 3).

Tabla A.1: Resumen de los resultados de calidad de secuenciación y mapeo de los experimentos de RNA-seq. ¹con respecto a las lecturas depuradas. ²dentro de las lecturas mapeadas únicas.

Condición	Muestra	Total de lecturas	Lecturas depuradas	Porcentaje de lecturas luego de la depuración	Lecturas mapeadas únicas (incluye ribosomales)	Porcentaje de mapeadas únicas ¹	Porcentaje de ribosomales ²	Lecturas mapeadas únicas (sin ribosomales)
Z69 D-xilosa	1	9.855.532	8.554.608	87	2.507.892	29	0,02	2.507.327
	2	9.109.837	8.103.140	89	1.880.396	23	0,02	1.879.955
	3	16.659.636	14.380.775	86	3.302.199	23	0,04	3.300.929
Z69△ <i>xylB</i> D-xilosa	4	12.389.051	10.573.280	85	2.362.985	22	0,04	2.361.962
	5	9.924.649	8.521.162	86	2.247.527	26	0,01	2.247.259
Z69 glicerol	6	11.148.764	9.540.334	86	2.089.187	22	0,03	2.088.477

Apéndice B

RT-qPCR

En la Figura B.1 se muestra la calidad del ARN obtenido para cada muestra.

En la Tabla B.1 se muestran los valores de eficiencia y ajuste de las curvas (R) obtenidos para cada juego de cebadores empleados en la RT-qPCR (los cebadores se muestran en las Tablas 1.2 y 2.3). En las Figuras B.2, B.3 y B.4 se muestran las curvas de desnaturalización obtenidas en estas qPCR.

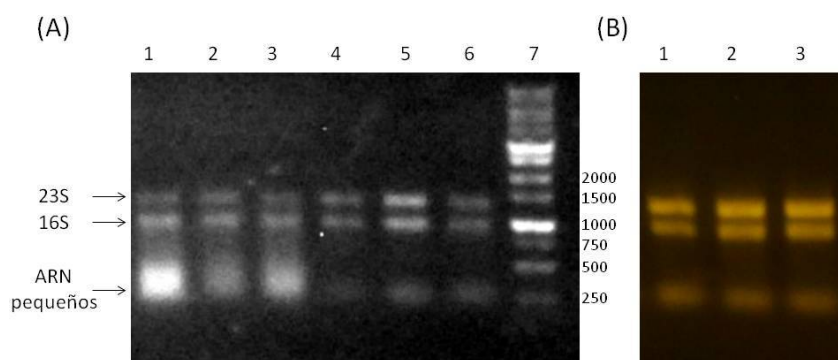


Figura B.1: Control de calidad del ARN purificado, mediante electroforesis en gel de agarosa 1 %. En todos los casos se sembró 5 μ L. (A) ARN de Z69 y Z69 Δ *xylR* crecidas en LGI suplementado con 30g/L de D-xilosa (carriles 1 a 6 respectivamente), carril 7: marcador de peso molecular 1kb DNA Ladder (Accuris Smart Check). (B) ARN de Z69 crecida el LGI suplementado con 30g/L de L-arabinosa (carriles 1 a 3).

Tabla B.1: Control de calidad de los cebadores utilizados para la qPCR.

Gen	Eficiencia	R
<i>recA</i>	1,03	0,99606
<i>rpoA</i>	0,95	0,99660
<i>xylR</i>	1,08	0,98774
<i>xylF</i>	1,02	0,99206
<i>xylC</i>	1,10	0,99246
<i>xylA</i>	1,10	0,99473
<i>mhpD</i>	0,89	0,99374
<i>araB</i>	0,98	0,99672

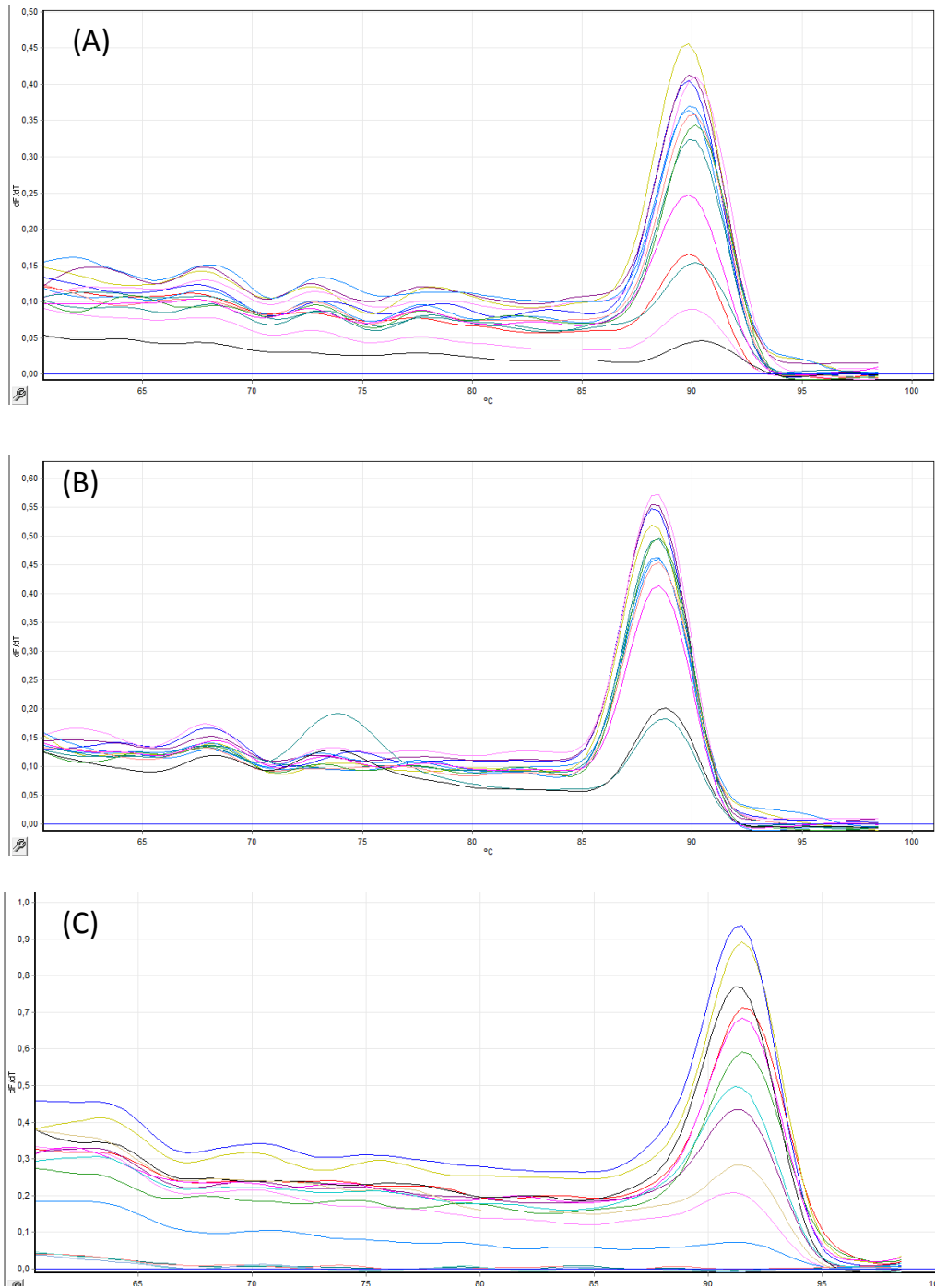


Figura B.2: Curvas de desnaturalización de las qPCR de cada curva de eficiencia. Gen (A) *recA*, (B) *rpoA* y (C) *xylR*.

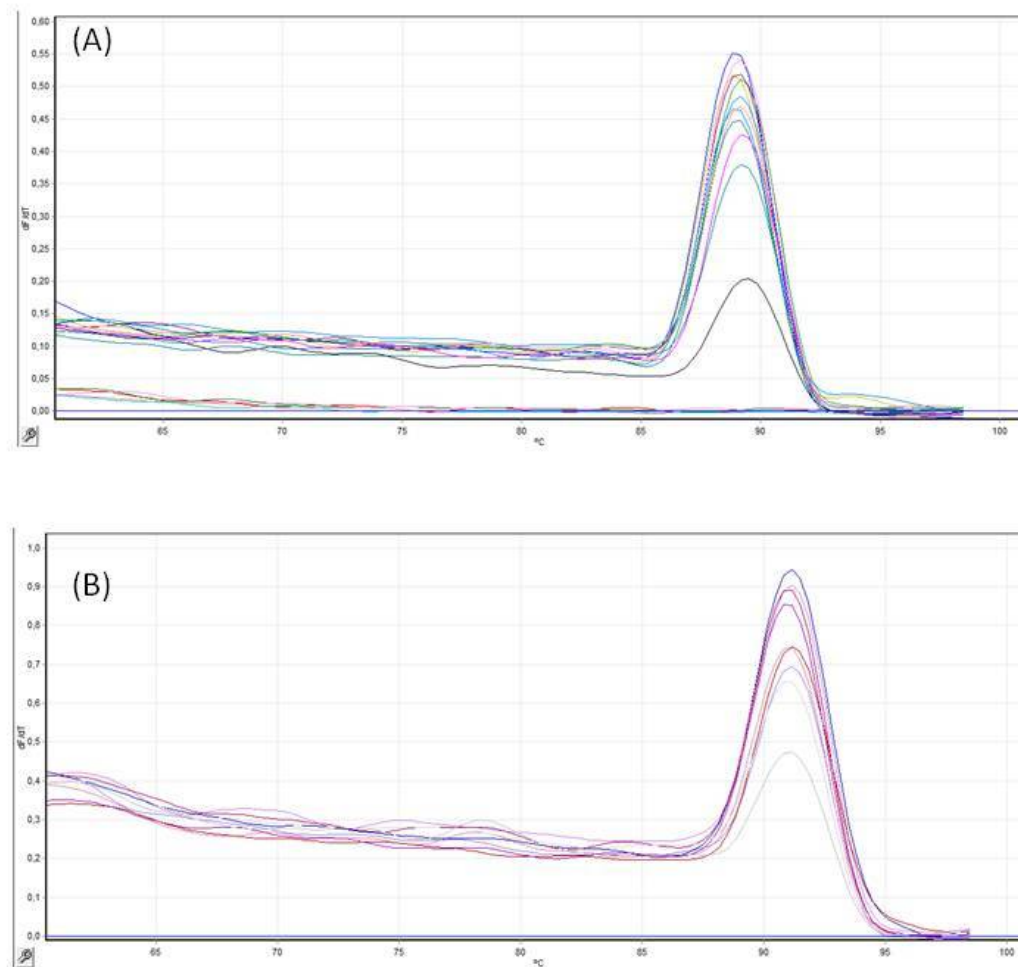


Figura B.3: Curvas de desnaturalización de las qPCR de cada curva de eficiencia. Gen (A) *xylF*, (B) *xylC*.

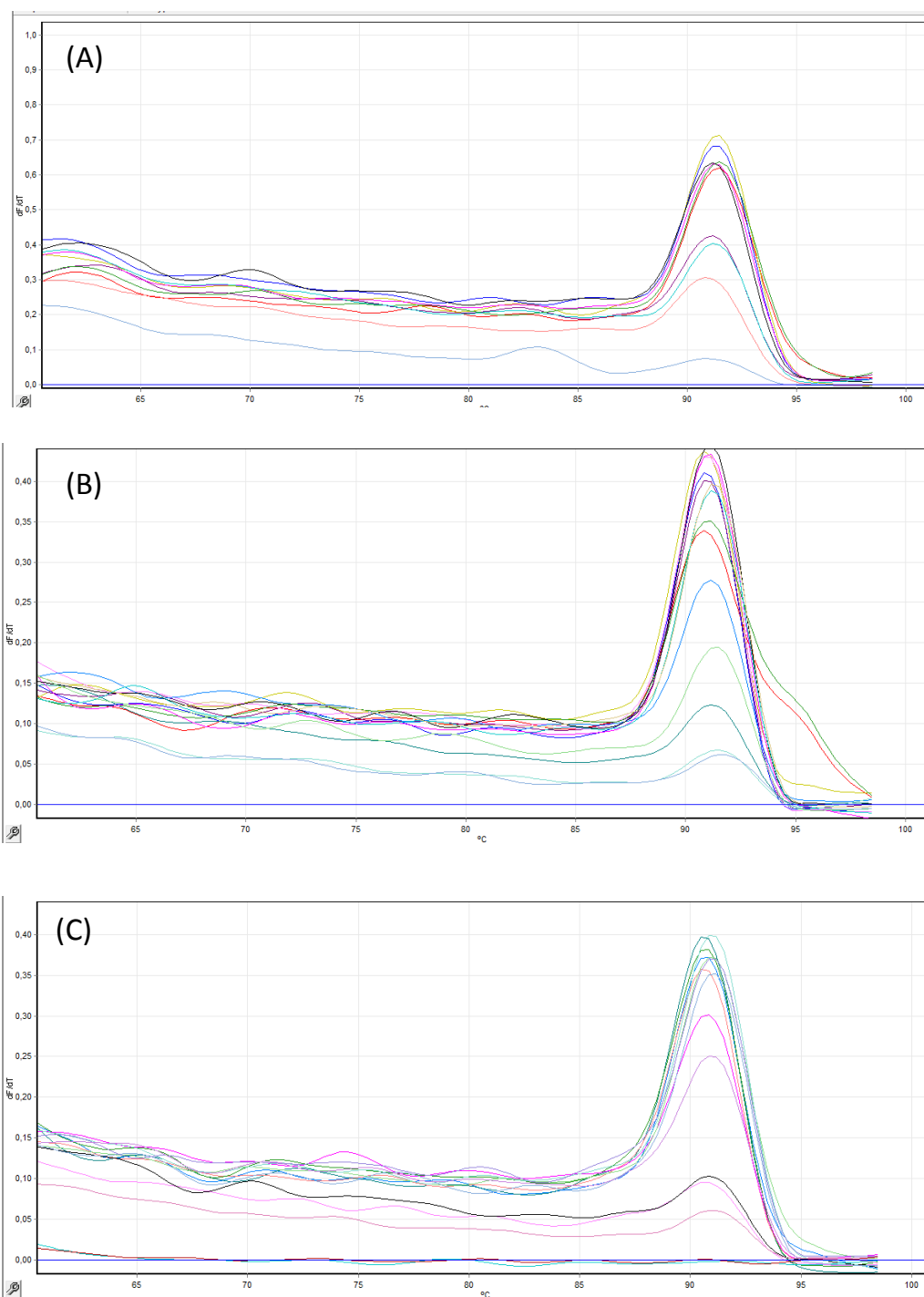


Figura B.4: Curvas de desnaturalización de las qPCR de cada curva de eficiencia. Gen (A) *xylA*, (B) *mhpD* y (C) *araB*.

Se ensayaron dos genes de referencia: *recA* y *rpoA* para los ADNc obtenidos a partir del ARN extraído de Z69 y Z69 Δ *xylR* crecidas en LGI suplementado con 30g/L de D-xilosa (B.2). Como se observa en la Figura B.5 el gen *recA* presentó menos diferencias entre las muestras y por eso se eligió como gen de referencia.

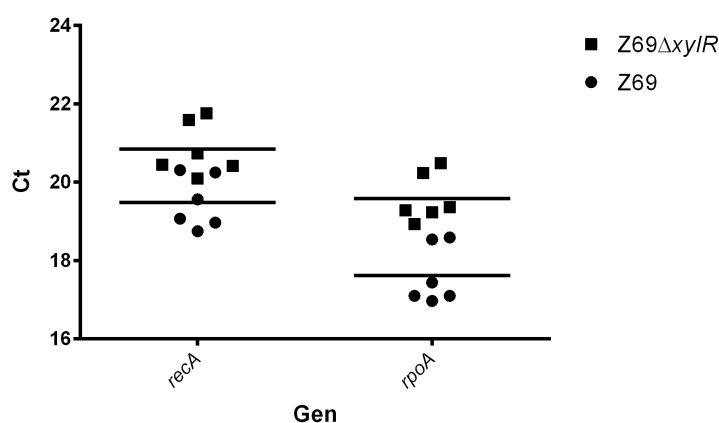


Figura B.5: Ct obtenido para cada réplica (biológica y técnica) y su promedio para los genes normalizadores ensayados en los ADNc obtenidos a partir del ARN de Z69 y Z69 Δ *xylR* crecidas en LGI suplementado con 30g/L de D-xilosa

En las Tablas B.2, B.3 y B.4 se muestran los Ct obtenidos para cada reacción realizada en RT-qPCR. Como se observa, en la mayoría de los casos, los controles sin retrotranscriptasa reversa amplificaron con un Ct cercano a 30. Esto puede deberse a una pequeña contaminación en los reactivos, ya que el control de retrotranscripción realizado con agua también amplifica. Previo a la retrotranscripción se realizaron reacciones de qPCR empleando el ARN diluido 1/30 como molde y no se obtuvo amplificación (datos no mostrados). De todos modos, estos datos no invalidan los resultados obtenidos, ya que, en la mayoría de los casos, los Ct de las muestras se encuentran a 10 Ct de distancia de los controles. Este dato nos indica que la diferencia de expresión entre los genes podría ser mayor a la reportada, ya que la misma se encuentra opacada por esta contaminación. De todos modos, estos resultados permiten cumplir con nuestros objetivos: ver si XylR afecta o no la expresión de los genes estudiados y cómo las diferentes fuentes carbonadas (D-xilosa o L-arabinosa) afectan la expresión de los genes de una u otra ruta metabólica.

Tabla B.2: Ct obtenido en las RT-qPCR de los genes *recA*, *rpoA* y *xylF* realizados en Z69 Δ *xylR* crecidas en LGI suplementado con 30g/L de D-xilosa. En esta corrida se incluyeron los controles sin retrotranscriptasa reversa (No RT control) y los controles sin molde para la reacción de retrotranscripción (NTC de RT) y para la reacción de qPCR (NTC de qPCR). NA: No hay amplificación

Condición	Muestra	Ct					
		<i>recA</i>		<i>rpoA</i>		<i>xylF</i>	
Z69 D-xilosa	1	19,07	18,97	16,14	16,08	16,8	16,66
	2	18,75	19,56	16	16,4	16,71	16,91
	3	20,25	20,31	17,7	17,65	17,84	17,94
Z69 Δ <i>xylR</i> D-xilosa	4	20,1	20,42	17,94	18,37	25,22	25,29
	5	20,74	20,45	18,49	18,2	25,25	25,1
	6	21,59	21,76	19,3	19,48	26,12	26,89
No RT control	1	NA		26,67		NA	
	2	28,91		26,19		27,02	
	3	30,41		28,25		28,86	
	4	28,74		27,93		NA	
	5	27,12		27,01		NA	
	6	30,08		30,13		37,04	
NTC de RT		30,11		28,37		28,93	
NTC de qPCR		NA		30,59		NA	

Tabla B.3: Ct obtenido en las RT-qPCR de los genes *recA*, *araB* y *mhpD* realizados en los ADNc obtenidos a partir del ARN de Z69 y Z69 Δ *xylR* crecidas en LGI suplementado con 30g/L de D-xilosa y Z69 crecida en LGI suplementado con 30g/L de L-arabinosa. En esta corrida se incluyeron los controles sin retrotranscriptasa reversa (No RT control) para el ARN de Z69 crecida en LGI suplementado con 30g/L de L-arabinosa y el control sin molde para la reacción de qPCR (NTC de qPCR). NA: No hay amplificación

Condición	Muestra	Ct					
		<i>recA</i>		<i>araB</i>		<i>mhpD</i>	
Z69 D-xilosa	1	19,64	19,57	23,67	23,44	21,07	21,25
	2	19,74	19,68	23,4	23,56	20,66	20,74
	3	20,82	21,04	24,02	24,03	22,15	22,18
Z69 Δ <i>xylR</i> D-xilosa	4	20,77	21,12	24,67	24,8	22,96	22,36
	5	21,31	21,33	24,96	24,22	22,48	22,54
	6	22,46	22,61	26,36	26,15	24,32	24,35
Z69 L-arabinosa	7	19,99	19,73	22,55	22,06	23,49	23,31
	8	19,62	19,63	21,84	22,04	23,32	23,53
	9	20,34	20,26	22,57	22,32	23,82	23,57
No RT control	7	30,15		31,69		31,21	
	8	30,96		32,73		35,85	
	9	NA		NA		29,71	
NTC de qPCR		NA		NA		NA	

Tabla B.4: Ct obtenido en las RT-qPCR de los genes *recA*, *xylA* y *xylC* realizados en los ADNc obtenidos a partir del ARN de Z69 y Z69 Δ *xylR* crecidas en LGI suplementado con 30g/L de D-xilosa y Z69 crecida en LGI suplementado con 30g/L de L-arabinosa. En esta corrida se incluyó el control sin molde para la reacción de qPCR (NTC de qPCR). NA: No hay amplificación

Condición	Muestra	Ct					
		<i>recA</i>		<i>xylA</i>		<i>xylC</i>	
Z69 D-xilosa	1	19,45	19,48	18,58	18,66	22,27	22,42
	2	19,27	19,51	18,8	18,97	21,94	22,41
	3	20,21	20,25	19,46	19,32	23,36	22,86
Z69 Δ <i>xylR</i> D-xilosa	4	20,63	20,63	20,64	20,89	29,13	28,92
	5	20,66	20,81	21,09	21,22	28,64	28,29
	6	22,41	22,4	21,82	21,84	29,41	29,78
Z69 L-arabinosa	7	19,37	19,39	18,88	18,98	26,35	26,03
	8	20,33	20,65	20,75	20,46	27,04	30,84
	9	19,69	19,79	19,7	19,85	25,98	26,27
NTC de qPCR		34,36		32,61	NA	31,36	34,69

ANEXOS

Anexo A

Técnicas

A.1. Medios de cultivo

Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave por 20 minutos a 121°C y 1,1 atm. A los medios sólidos se le adicionó 16g/L de agar previo a la esterilización.

A.1.1. TY

(Beringer, [1974](#))

Tryptona - 5g

Extracto de levadura - 3g

CaCl₂ - 0,1g

H₂O - c.s.p. 1 litro

A.1.2. LGI modificado

(Cavalcante y Dobereiner, [1988](#))

KH₂PO₄ - 11,9g

K₂HPO₄ - 2,13g

NH₄Cl - 2,14g

MgSO₄.7H₂O - 0,2g

CaCl₂.2H₂O - 0,02g

FeCl₃.6H₂O - 0,01g

Na₂MoO₄.2H₂O - 0,002g

H₂O - c.s.p. 1 litro

Se ajustó el pH=7,0 con NaOH

Las fuentes de carbono y el MES a pH=7 se autoclavaron por separado. Se prepararon a una concentración 1M y se adicionaron al medio LGI luego de autoclavado a las concentraciones indicadas en cada caso.

A.1.3. Luria-Bertani (LB)

(Sambrook et al. [1989](#))

Tryptona - 10g

Extracto de levadura - 5g

NaCl - 10g

H₂O - c.s.p. 1 litro

A.1.4. Medio de cultivo auto-inductor ZYM5052

(Studier, [2005](#))

Tryptona - 10g

Extracto de levadura - 5g

MgSO₄ 1M - 2mL

Oligoelementos 100x - 200μL

Solución 5052 25x - 40mL

Solución M 25x - 40mL

H₂O - c.s.p. 1 litro

Las soluciones M y 5052 se prepararon y autoclavaron por separado y se adicionaron al medio luego de autoclavado.

Solución 5052 (25x)

125g glicerol

12,5g glucosa

50g lactosa

H₂O - c.s.p. 1 litro

Solución M (25x)

88,8g Na₂HPO₄

85,1g KH₂PO₄

67g NH_4Cl
17,7g Na_2SO_4
 H_2O - c.s.p. 1 litro

A.2. Plásmidos

En la Tabla [A.1](#) se muestran las principales características de los plásmidos utilizados en esta tesis.

Tabla A.1: Principales características de los plásmidos utilizados en esta tesis.

Nombre	Características	Referencia
pK18 <i>mobsacB</i>	Plásmido mobilizable que contiene el gen <i>sacB</i> de toxicidad a sacarosa. No replicable en <i>H. seropedicae</i> . Km ^R	Schafer et al. 1994
pRK2013	Plásmido no movilizable que contiene los genes de transferencia. Km ^R	Dittia et al. 1980
pBRR1MSC-2	Vector de expresión conteniendo el promotor plac. Movilizable. Replicable en <i>H. seropedicae</i> . Km ^R	Kovach et al. 1995
pCR2.1-TOPO	Utilizado para el clonado de productos de PCR (TA cloning). Km ^R , Amp ^R	Invitrogen
pMP220	Utilizado para estudiar diferentes promotores empleando <i>lacZ</i> (beta-galactosidasa) como gen reportero. Replicable en <i>H. seropedicae</i> . Tc ^R	Spaink et al. 1987
pET14b(+)	Vector de expresión de proteínas recombinantes conteniendo la etiqueta de Histidinas (6x) en el extremo N-terminal precedida por un sitio de corte de trombina, bajo el promotor T7. Amp ^R	MilliporeSigma

A.3. Extracción de ADN genómico

1,5mL de cultivo de *H. seropedicae* Z69, crecido durante toda la noche en medio líquido TY, se centrifugó a 12.000g por 5 minutos. El *pellet* se lavó con 1,5mL de GET y luego se resuspendió en 500μL de GET. Se adicionó 2μL de lisozima y se incubó en estufa a 30°C por 2 horas. Después se adicionó 50μL de SDS (10 %) y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Luego se adicionó 6μL de pronasa y se incubó a 30°C durante toda la noche. Al día siguiente se adicionó 200μL de la mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), se mezcló bien y se centrifugó a 12.000g por 15 minutos. Se retiró la fase orgánica (la de abajo) y la fase acuosa se extrajo 2 veces más con cloroformo:alcohol isoamílico. Luego se pasó la fase acuosa a un tubo nuevo y se precipitó el ADN con 1 volumen de isopropanol. Se centrifugó a 12.000g por 15 minutos, el *pellet* se lavó con etanol 70 % y luego se secó al vacío. El *pellet* conteniendo el ADN purificado se resuspendió en 100μL de agua libre de DNAsas.

A.4. Electroforesis en gel de agarosa

(Sambrook et al. [1989](#)) Las electroforesis en geles de agarosa se realizaron en una cuba de electroforesis horizontal de la marca Sigma-Aldrich. Se prepararon geles de agarosa 1 %(p/v) en *buffer* TAE 1X. En cada carril se sembró diferentes volúmenes de muestras: 5μL en caso de reacciones de PCR, 3μL en caso de ADN plasmídico o 7μL en caso de restricciones (en los casos en lo que luego se deseaba aislar el fragmento de ADN se sembraron 40-50μL de muestra) previamente mezcladas con *buffer* de carga 1X (ThermoFisher, Cat. No. R0611). Como *buffer* de corrida se utilizó TAE 1x. Las electroforesis se desarrollaron a 90v por 30-60 minutos. El ADN se visualizó bajo luz UV, ya que se utilizaron como agentes intercalantes GelGreen (Biotium, **Cat. No. 41005**) incorporado en el gel a una concentración final de 0,67X o Good View (SBS, Cat. No. HGV-2) incorporado en el gel (2μL para 50mL de gel). Se utilizó el marcador de peso molecular 1Kb DNA Ladder (Accuris SmartCheck, **Cat. No. ACC-PR4100-100**) según las instrucciones del fabricante.

TAE 50X (*buffer* de electroforesis Tris-acetato/EDTA)

Tris base - 242g

Ácido acético glacial - 57mL

EDTA 0,5M pH=8,0 - 100mL

H₂O - c.s.p. 1 litro

TBE 5X (*buffer* de electroforesis Tris-borato/EDTA)

Tris base - 54g

Ácido bórico - 27,5g

EDTA 0,5M pH=8,0 - 20mL

H₂O - c.s.p. 1 litro

A.5. Extracción de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico se realizó según Sambrook et al. [1989](#) y se empleó el mismo protocolo para las diferentes cepas de *E. coli* y *H. seropedicae*. Para ello, las células se cultivaron durante toda la noche, en tubos conteniendo 5mL de medio LB o TY y el antibiótico adecuado. Luego, todas las células se colectaron por centrifugación a 12.000rpm por 1 minuto. Se descartó el sobrenadante. Las células presentes en el *pellet* se suspendieron en 300μL de solución I y 5μL de ARNasa 10mg/mL. Luego se agregó 300μL de solución II y se mezcló invirtiendo el tubo 4 veces. A continuación se agregó 300μL de cloroformo y luego 300μL de solución III. El tubo con la mezcla de reactivos se mezcló en vortex manteniendo el tubo con la tapa hacia abajo. Luego, se centrifugó a 14.000rpm por 10 minutos a 4°C, se transfirió la fase acuosa (la de arriba) a un tubo de 1,5mL limpio y se le agregó 660μL de isopropanol para precipitar el ADN. Se continuó centrifugando durante 30 minutos a 14.000rpm a 4°C y se descartó el sobrenadante. El *pellet* se lavó con etanol 70 % (v/v), se secó por centrifugación al vacío en un equipo de la marca Labconco (Inglaterra) y se resuspendió en 50μL de agua milliQ estéril.

Solución I

50mM glucosa

25mM Tris.Cl (pH=8,0)

10mM EDTA (pH=8,0)

Esterilizada en autoclave y guardada en heladera.

Solución II (solución de lisis)

Se prepara en el momento de su uso

0,2N NaOH (diluida de un stock 10N)

1 % SDS (diluido de un stock 10 % (p/v))

Solución III (solución de neutralización)

60ml acetato de potasio 5M

11,5ml ácido acético glacial

28,5ml H₂O

A.6. Transformación por *shock* térmico de *E. coli*

Las células químicamente competentes y la transformación se realizó según Sambrook et al. [1989](#).

Preparación de células químicamente competentes de *E. coli*

Para preparar las células químicamente competentes, se inoculó 300mL de medio LB con 5mL de un cultivo de *E. coli* TOP10 incubado durante toda la noche en medio LB a 30°C, a 200rpm. El cultivo se incubó a 30°C y agitación a 200rpm hasta que llegó a una DO_{600nm} de 0,2- 0,3 (aproximadamente 3 horas). Se colectaron las células por centrifugación a 5000rpm por 10 minutos y se lavaron en frío dos veces con 10mL de CaCl₂ 0,1M bajo las mismas condiciones de centrifugación. Finalmente, este *pellet* se suspendió en 5mL de CaCl₂ 0,1M y se incubó 1 hora en hielo. Luego se centrifugó, se descartó el sobrenadante y el *pellet* se suspendió en 2mL de CaCl₂ 0,1M - glicerol 20 % (v/v). Finalmente, se transfirieron volúmenes de 100µL de esta suspensión celular a tubos de microfuga de 1,5mL y se guardaron a -80°C durante un período máximo de 6 meses, hasta su posterior utilización.

Transformación de *E. coli* TOP10 químicamente competentes

Se adicionó la mezcla de ligación a las células químicamente competentes de *E. coli* TOP10 en condiciones asépticas. Se incubó en baño de hielo entre 20 y 40 minutos. Luego se incubó 2 minutos a 42°C y 2 minutos más en hielo. Inmediatamente se le agregó 1mL de medio LB a cada tubo de reacción y se incubó 1 hora a 37°C y con agitación a 200rpm. Finalmente, se sembró por rastrillado en superficie, 100µL de esta suspensión celular, en placas de Petri conteniendo medio LB sólido y el/los antibióticos adecuados. Las placas se incubaron 20 horas a 37°C. Además, se realizó un control negativo siguiendo el mismo protocolo pero sin la introducción de ADN foráneo.

A.7. Preparación de células electrocompetentes de *H. seropedicae*

Las células electrocompetentes se prepararon según la metodología descrita por Mostafa et al. 2002. Para ello, se inoculó un matraz Erlenmeyer de 250mL, conteniendo 25mL de medio TY, con 1mL de cultivo de *H. seropedicae* crecida toda la noche en un tubo conteniendo 5mL de medio TY. Cuando la DO_{550nm} del cultivo llegó a 0,5-0,8, éste se transfirió a tubos de centrifuga de base cónica y se incubó en hielo durante 15 minutos. Luego, el cultivo se centrifugó por 4 minutos a 6.000g y 4°C. Se descartó el sobrenadante. El *pellet* se lavó dos veces con 10mL de HEPES 1mM a pH=7,0 y una vez más con 5mL de glicerol 10 %. Finalmente, las células se suspendieron en 0,5mL de glicerol 10 %, se fraccionaron en alícuotas de 65µL en tubos de 1,5mL y se guardaron a -80°C hasta el momento de electroporar. Las soluciones se esterilizaron por autoclave y se utilizaron frías. Durante todo el protocolo las células se mantuvieron en frío (hielo o centrifuga refrigerada a 4°C).

A.8. Determinación de actividad β -galactosidasa

Se utilizó el protocolo descrito por Miller, 1972 con las modificaciones de Poole et al. 1994. Para ello, se tomó 1,5mL de cada cultivo y se centrifugó a 5000g por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se suspendió en 1,5mL de *buffer* Z. Se tomó 350µL de esta suspensión (en algunos casos se realizaron diluciones 1/10), se pasó a un tubo nuevo y se agregó 280µL de *buffer* Z. Además se adicionó 70µL de lisozima (5mg/mL en *buffer* Z suplementado con β -mercaptoetanol al 3,5 %). Se invirtió el tubo varias veces y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. Luego, se adicionó 15µL de EDTA 0,05M a pH=8,0, se invirtió el tubo varias veces y se incubó 15 minutos. Después, se agregó 7µL de SDS 1 % y se mezcló por inversión del tubo. Se equilibraron las muestras a 30°C por 15 minutos y luego se agregó 140µL de Orto-Nitrofenil- β -Galactósido (ONPG) (4mg/mL en *buffer* Z conteniendo β -mercaptoetanol al 0,35 %). Las muestras se siguieron incubando a 30°C hasta que las reacciones comenzaron a desarrollar el color amarillo. La reacción se detuvo mediante el agregado de 350µL de Na_2CO_3 1M. Se tomó el tiempo exacto que transcurrió

desde el agregado del ONPG hasta que se detuvo la reacción. Finalmente, las muestras se centrifugaron a 12.000g por 15 minutos y se leyó la absorbancia a 420nm del sobrenadante. También se leyó la DO_{600nm} del cultivo suspendido en *buffer* Z en el primer paso de este protocolo. Con estos datos se calculó la actividad β -galactosidasa de la siguiente manera:

$$Actividad\ \beta-galactosidasa(Unidades\ Miller) = \frac{Abs_{420nm} \cdot Vf \cdot 10^6}{DO_{600nm} \cdot 0,22 \cdot Vc \cdot t \cdot 4017,821} \quad (A.1)$$

Siendo:

Vf = Volumen final (1,215mL)

Vc = Volumen de cultivo empleado (0,35mL si no se diluyó el cultivo)

t = tiempo en minutos

La Unidad Miller se define como los nmoles de orto-nitro-fenol generados por minuto por mg de proteínas.

Este protocolo asume que 1mL de cultivo con $DO_{600nm}=1$ contiene 0,22mg de proteínas.

Buffer Z

0,06M Na_2HPO_4

0,04M NaH_2PO_4

0,01M KCl

0,001M $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

A.9. SDS-PAGE

Las electroforesis desnaturizantes (SDS-PAGE) se realizaron en una cuba vertical Mini Protean Tetra Cell, (BIORAD) con mini-geles de poliacrilamida de 1mm de espesor y 10 pocillos, conteniendo el gel separador debajo y el gel concentrador en la parte superior. Las muestras se prepararon con *buffer* de carga a una concentración final de 1x y se incubaron 15 minutos a 95°C previo al sembrado en el gel. En todos los geles se sembró 3 μ L del marcador de peso molecular pre-teñido AccuRuler RGB PLUS (Maestrogen, Cat. No. 02102-250). Las electroforesis se corrieron con *buffer* de corrida 1x a 70v por 20 minutos aproximadamente (hasta que las muestras entren en el gel sepa-

rador) y luego a 180-200v por 30-40 minutos. Los geles se tiñieron con Azul Brillante de Coomassie R250 durante toda la noche con agitación orbital y luego se decoloraron con solución decolorante (ácido acético glacial 7 %; etanol 20 %) incubando el tiempo necesario con agitación orbital.

Gel separador 12 %

1,7mL H₂O
2mL Acrilamida/Bis Acrilamida 30 %
1,25mL Tris 1,5M a pH 8,8
0,05mL SDS 10 %
0,03mL APS 10 %
0,0025mL TEMED

Gel concentrador 6 %

2,7mL H₂O
1mL Acrilamida/Bis Acrilamida 30 %
1,25mL Tris 0,5M pH 6,8
0,05mL SDS 10 %
0,03mL APS 10 %
0,005mL TEMED

***Buffer* de corrida (10x)**

144g glicina
10g SDS
30,2g Tris base
H₂O - c.s.p. 1litro

***Buffer* de carga (4x)**

30mM Tris a pH 6,8
25 % glicerol
0,1mg/mL Azul de bromofenol
 β -mercaptoetanol

A.10. EMSA

Los ensayos de EMSA se realizaron en una cuba de electroforesis vertical Mini Protean Tetra Cell, (BIORAD) con geles nativos de poliacrilamida al 6 % de 1mm de espesor y 10 pocillos. Se utilizó TBE 0,5x como *buffer* de corrida. Las electroforesis se corrieron una hora a 200V y se colocó un bloque refrigerante dentro de la cuba. Luego de la electroforesis se desmontó el gel y se colocó en una bañó con ácido acético glacial 7,5 % por 5 minutos con agitación orbital para fijar el ADN. Luego, el gel se enjuagó dos veces con agua y se tiñó con Good View (SBS, Cat. No. HGV-2), colocando 5µL de reactivo en 50mL de H₂O. Se incubó 20 minutos con agitación orbital protegido de la luz. Finalmente, el gel se enjuagó dos veces con agua y se expuso a luz UV para visualizar los fragmentos de ADN. Después de fotografiarlo en estas condiciones, el mismo gel se tiñó con Azul Brillante de Coomassie R250 y se destiñó como se detalla en [A.9](#).

Gel nativo 6 %

4,12mL H₂O
1,4mL Acrilamida/Bis Acrilamida 30 %
1,4mL *buffer* TBE 5x
0,075mL APS 10 %
0,0075mL TEMED

***Buffer* de electroforesis TBE 5x**

445mM Tris base
445mM Ácido bórico
5mM EDTA pH 8

A.11. Western Blot

Con el gel del EMSA se realizó un Western Blot. Para ello se transfirió a una membrana de nitrocelulosa HybondTM-c extra (Amersham, *Cat. No.*) usando el sistema dual de electroforesis en frío DCX-700 (C.B.S Scientific) y el *buffer* de corrida de SDS-PAGE 1x con etanol 10 %. La transferencia se realizó a 180mA por 2 horas siguiendo las instrucciones del fabricante. Luego de la transferencia, la membrana se lavó con PBS para sacar los restos de acrilamida.

Posteriormente, se bloqueó con leche descremada al 5 % en PBS-Tween20 0,1 % durante toda la noche con agitación orbital. El anticuerpo primario THETM His Tag Antibody, mAb, Mouse (10µg) GenScript se diluyó 1/5000 en PBS y se incubó por 1 hora. El anticuerpo secundario HRP se diluyó 1/5000 en PBS y se incubó durante 1 hora. La membrana se lavó dos veces con PBS-Tween20 0,1 % por 5 minutos con agitación orbital luego de cada paso de bloqueo o incubación con anticuerpo. El Western Blot se reveló con el kit de quimioluminiscencia Pierce ECL Western Blotting Substrate (Thermo Fisher, Cat. No. 32106) que contiene cloruro de tetrazolio nitro-blue (NBT) y sal de p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolifosfato (BCIP).

PBS a pH 7,5

80mM Na₂HPO₄

20mM NaH₂PO₄

100mM NaCl

A.12. Otros *buffers* utilizados en este trabajo

TBS a pH 7,6

20mM Tris

137mM NaCl

pH ajustado a 7,6 con HCl 1M