



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

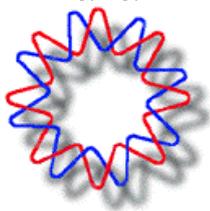
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA

**“IDENTIFICACIÓN DE GENES DE *Azotobacter vinelandii* CUYOS
PRODUCTOS INTERACCIONAN CON LA PROTEÍNA IIA^{Ntr}”**

**T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
P R E S E N T A
JOSÉ ALBERTO HERNÁNDEZ ELIGIO**

DIRECTOR DE TESIS: DRA. ELDA GUADALUPE ESPIN OCAMPO

CUERNAVACA, MORELOS. MARZO DEL 2007





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

El presente trabajo se llevo a cabo en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el Departamento de Microbiología Molecular bajo la dirección de la Dra. Elda Guadalupe Espín Ocampo.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Elda Guadalupe Espín por su excelente dirección, por compartir conmigo su enorme conocimiento, por su gran apoyo y enorme confianza.

Al Dr. Daniel Segura González por su sincero e incondicional apoyo en mi formación profesional.

Al mi comité tutorial compuestos por: Dr. Juan Miranda, Dr. Víctor H. Bustamante y Dra. Guadalupe Espín por sus buenos comentarios y recomendaciones para este trabajo.

Al jurado compuesto por:

Dr. Guillermo Gosset
Dra. Gloria Soberón
Dr. Ricardo Oropeza
Dra. Katy Juárez
Dra. Guadalupe Espín.

A mis compañeros de laboratorio: Dra. Cinthia Núñez, M. en C. Josefina Guzmán, Biol. Soledad Moreno; Biol. Yanet Romero, I. B. Q. Nashbly Rosas, Dr. Renato León y M. en C. Aristides Sampieri por su amistad; Eduardo Juárez y Pablo Juárez por su excelente labor en el laboratorio.

A los “merinos”: Dr. Enrique Merino, Mario (tocayo), Cristian (pollo loco), Paty, María, Viri, Rosy y Nancy por su amistad y hacer más fácil la vida en el laboratorio.

Al CONACyT por la beca otorgada en mis estudios de posgrado

DEDICATORIAS

A mis padres: María Eligio Cantoriano y Luciano Hernández Mares.

A mis hermanos: Saulo David, Josue Daniel y Flor de Dalia.

A mis amigos de y para toda la vida: Luary Martínez, Roberto Páez y David Gutiérrez.

A “Chuemy” Zuemy Rodríguez por su gran cariño y amistad.

A la Familia Arizmendi Rosillo.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
I.1 Generalidades de <i>Azotobacter vinelandii</i>	1
I.2 Poli- β -hidroxibutirato (PHB)	1
I.3 Función biológica del PHB en <i>Azotobacter vinelandii</i>	2
II. ANTECEDENTES	4
II.1 La biosíntesis de PHB en <i>A. vinelandii</i>	4
II.2 Regulación a nivel enzimático de la biosíntesis de PHB	4
II.3 Organización de los genes estructurales de la biosíntesis de PHB en <i>A. vinelandii</i>	5
II.4 El Sistema PTS ^{Ntr}	6
II.5 El Sistema PTS ^{Ntr} en <i>Azotobacter vinelandii</i> y su función en la regulación de la expresión del operón biosintético de PHB	8
II.6 Organización y conservación de los genes <i>orf107</i> y <i>orf284</i>	10
III. HIPOTESIS	12
IV. OBJETIVOS	14
IV.1 Objetivo general	14
IV. 2 Objetivos particulares	14
VI. MATERIALES Y METODOS	15
VI.1 Medios y condiciones de cultivo de las cepas de <i>A. vinelandii</i> y <i>E. coli</i>	16
VI.2 Reacciones de digestión de ADN	17
VI.2.1 Digestión para analizar por electroforesis el patrón de restricción	17
VI.2.2 Digestiones para purificar el inserto por electroforesis	17
VI.3 Electroforesis del ADN	17
VI.4 Reacciones de ligación	18
VI.5 Preparación de células competentes de <i>E.coli</i> DH5 α por el método de CaCl ₂	18
VI.6 Transformación en <i>E. coli</i> DH5 α	18
VI.7 Extracción de ADN plasmídico (“Miniprep”)	19
VI.8 Método de megaprimer para generar mutaciones puntuales (Modificado por Barik, S. y Galinski, 1991. Método de PCR)	20
VI.8.1 Amplificación y clonación del gen <i>ptsN</i> (<i>H68A</i>)	20

VI.9 Amplificación y clonación del gen <i>ptsN</i> silvestre	23
VI.10 Preparación de células competentes de <i>A. vinelandii</i>	25
VI.11 Transformación en <i>A. vinelandii</i>	25
VI.12 Cuantificación de PHB	25
VI.13 Determinación de proteína	26
VI.14 Ensayo de interacción in-vitro de proteínas “PULL DOWN”	27
VI.14.1 Expresión de la proteína IIA ^{Ntr} (H68A) de <i>A. vinelandii</i> en la cepa BL21 de <i>E. coli</i>	27
VI.14.2 Preparación de la proteína IIA ^{Ntr} (H68A) del Sistema de Expresión en <i>E. coli</i>	27
VI.14.3 Preparación de la columna de afinidad	28
VI.14.4 Inmovilización de la proteína IIA ^{Ntr} (H68A) en la columna de afinidad	28
VI.14.5 Preparación del extracto celular de <i>A. vinelandii</i>	29
VI.14.6 Captura de la proteína presa	29
VI.14.7 Elusión de las proteínas: IIA ^{Ntr} (H68A) y proteínas presas	30
VI.15 Purificación de ARN total de <i>A. vinelandii</i>	30
VI.16 Síntesis de ADN complementario	31
VI.17 Reacción en cadena de la polimerasa-Tiempo Real	31
VI.18 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)	32
VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	33
VII.1 Expresión de los genes <i>phbR</i> y <i>phbB</i> en las cepas mutantes del sistema PTS ^{Ntr}	33
VII.2 Caracterización del fenotipo de producción de PHB de las cepas mutantes en los genes <i>orf107</i> y <i>orf284</i>	35
VII.2.1 Análisis del producto de los genes <i>orf107</i> y <i>orf284</i>	35
VII.2.2 Expresión de los genes <i>phbR</i> y <i>phbB</i> en las cepas mutantes en los genes <i>orf107</i> y <i>orf248</i>	37
VII.2.3 Cuantificación de PHB en las cepas mutantes en los genes <i>orf107</i> y <i>orf284</i>	41
VII.3 Construcción del plásmido pALA8, que lleva el gen <i>ptsN</i> (H68A)	43

VII.4 Estudio del efecto del reemplazo del gen <i>ptsN</i> silvestre por una versión mutante, codificante de una versión no fosforilable	43
VII.5 Expresión de la proteína IIA ^{Ntr} (H68A)	48
VII.6 Ensayo de interacción <i>in-vitro</i> de proteínas “Pull-Down”	50
VIII. CONCLUSIONES	54
IX. PERSPECTIVAS	55
X. BIBLIOGRAFÍA	56
XI. APÉNDICE	61

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1 Fotografía de <i>Azotobacter vinelandii</i>	1
Fig. 2 Productos elaborados a partir de los PHAs	2
Fig. 3 Biosíntesis de PHB en <i>Azotobacter vinelandii</i>	4
Fig. 4 Organización del operón <i>phbBAC</i> en <i>Azotobacter vinelandii</i>	6
Fig. 5 Genes y proteínas del sistema PTS ^{Ntr}	7
Fig. 6 Sistema de fosfotransferasas PTS ^{Ntr}	7
Fig. 7 Organización del locus <i>rpoN</i> en diversas especies bacterianas	10
Fig. 8 Modelo hipotético de regulación del operón biosintético de PHB en <i>A. vinelandii</i>	13
Fig. 9 Obtención del gen <i>ptsN</i> (H68A)	21
Fig. 10 Clonación del gen <i>ptsN</i> (H68A) en pET24a para generar el plásmido pALA8	22
Fig. 11 Amplificación del gen <i>ptsN</i> silvestre	23
Fig. 12 Clonación del gen <i>ptsN</i> silvestre en pET24a para general el plásmido pALA7	24
Fig. 13 Expresión del gen <i>phbR</i>	33
Fig. 14 Expresión del gen <i>phbB</i>	34
Fig. 15 Secuencia de aminoácidos de la proteína hipotética ORF107 de <i>A. vinelandii</i>	36
Fig. 16 Secuencia de aminoácidos de la proteína hipotética ORF284 de <i>A. vinelandii</i>	38
Fig. 17 Expresión del gen <i>phbR</i>	39
Fig. 18 Expresión del gen <i>phbB</i>	40
Fig. 19 Cuantificación de PHB	41
Fig. 20 Fenotipo de opacidad (PHB) en las cepas mutantes en los genes <i>orf107</i> y <i>orf284</i>	42
Fig. 21 Cointegración del plásmido pALA8 en el cromosoma de <i>A. vinelandii</i>	44
Fig. 22 Amplificación del gen <i>ptsN</i> (H68A)	45
Fig. 23 Fenotipos de opacidad (PHB) de <i>A. vinelandii</i> crecidas en medio PY durante 4 días	46
Fig. 24 Cuantificación de PHB	47
Fig. 25 Expresión de la proteína IIA ^{Ntr} (H68A)	48

Fig. 26 Expresión de la proteína IIA^{Ntr}(H68A) 49

Fig. 27 Análisis de proteínas encontradas en el ensayo de interacción *in-vitro* de proteínas 50

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 Cuantificación de PHB en las cepas mutantes del sistema PTS ^{Ntr}	8
Tabla 2 Plásmidos usados en este trabajo	15
Tabla 3 Oligonucleótidos usados en este trabajo	15
Tabla 4 Cepas utilizadas en este trabajo	16
Tabla 5 Identidad de la proteína hipotética ORF107 de <i>A. vinelandii</i> con otras proteínas	35
Tabla 6 Identidad de la proteína hipotética ORF284 de <i>A. vinelandii</i> con otras proteínas	37

RESUMEN

Azotobacter vinelandii es una bacteria gramnegativa, de vida libre y fijadora de nitrógeno. Esta bacteria es interesante por su capacidad de producir un polímero de interés industrial, el poli- β -hidroxibutirato (PHB). En *A. vinelandii* los genes que participan en la biosíntesis de PHB se organizan en un operón tricistronico (*phbBAC*), 512 nucleótidos hacia arriba del operón y de manera divergente se encuentra el gen *phbR*. El gen *phbR* codifica para la proteína PhbR, la cual es un activador transcripcional del operón *phbBAC* y pertenece a la familia de activadores transcripcionales AraC. Recientemente, se encontró que el sistema de fosfotransferasas de nitrógeno (PTS^{Ntr}) controla la biosíntesis de PHB en *A. vinelandii*. Una mutación en el gen *ptsP* (I^{Ntr}, la primera proteína del sistema) abate la producción de PHB; de manera similar, una mutación en el gen *ptsO* (Npr, segunda proteína del sistema) disminuye drásticamente la síntesis de PHB. Sin embargo, una mutación en el gen *ptsN* (IIA^{Ntr}, última proteína del sistema) aumenta los niveles de PHB por arriba de los observados en la cepa silvestre. En experimentos de protección a nucleasa S-1 en la cepas mutantes del sistema PTS^{Ntr} los resultados sugieren que el sistema PTS^{Ntr} de *A. vinelandii* controla la síntesis de PHB a nivel transcripcional, los datos también sugieren que la proteína IIA^{Ntr} en su forma no fosforilada tiene un efecto negativo sobre la transcripción del operón *phbBAC*. Cabe señalar, que la proteína IIA^{Ntr} no presenta motivos de unión a ADN, por lo que su efecto negativo sobre el operón *phbBAC* puede ser a través de intermediarios. También, debido que en locus *rpoN-orf107-ptsN-orf284-ptsO* se encuentran los genes *orf107* y *orf284* no caracterizados, los productos de estos genes podrían estar involucrados en la regulación de la biosíntesis de PHB. Dado lo anterior, el objetivo de este trabajo fue identificar y caracterizar las posibles proteínas que interactúen con la proteína IIA^{Ntr} que intervienen en el control de la expresión del operón *phbBAC*. Para lograr esto, primero se llevaron a cabo experimentos de RT-PCR tiempo real para cuantificar el efecto de las mutaciones de los genes del sistema PTS^{Ntr} (*ptsP*, *ptsO* y *ptsN*) sobre la transcripción del operón *phbBAC* y para estudiar el efecto de las mutaciones en los genes *orf107* y *orf284* sobre la transcripción del operón *phbBAC*. Adicionalmente, se clonaron los genes *ptsN* y *ptsN H/A* (el cual lleva una mutación puntual que cambia el codón que codifica para el aminoácido histidina propuesto de fosforilación, por el aminoácido alanina que no se fosforila) en el vector de expresión pET24a para: 1. cointegrarlos en el cromosoma de *A. vinelandii* y evaluar el efecto de la proteína IIA^{Ntr} no fosforilada sobre la biosíntesis de PHB y 2. llevar a cabo experimentos de interacción *in-vitro* de proteínas con el sistema Pull-Down (Pierce). Los experimentos de RT-PCR tiempo real mostraron que el sistema PTS^{Ntr} controla a nivel transcripcional la biosíntesis de PHB, sugiriendo que la proteína IIA^{Ntr} en su estado no fosforilado ejerce un efecto negativo sobre la biosíntesis de PHB. Lo anterior, se comprobó al expresar la proteína IIA^{Ntr} no fosforilable en *A. vinelandii* y cuantificar la acumulación de PHB. Por último, los resultados de los experimentos de interacción *in-vitro* de proteínas revelaron a las proteínas enoil-CoA hidratasa/isomerasa y 4-aminobutirato aminotransferasa como posibles blancos de interacción con la proteína IIA^{Ntr} no fosforilada.

II. ANTECEDENTES

II.1 La biosíntesis de PHB en *A. vinelandii*

En *A. vinelandii* la síntesis de PHB se lleva a cabo en tres etapas enzimáticas. La primera reacción se da por la condensación de dos moléculas de acetil-CoA, la cual es catalizada por la enzima β -cetotilasa, obteniéndose como producto acetoacetyl-CoA (Ritchie y Dawes, 1969). En el segundo paso enzimático, la acetoacetyl-CoA es reducida por la acetoacetyl-CoA reductasa, utilizando NADPH y produciéndose D- β -hidroxibutiril-CoA, que es polimerizada por la PHB sintasa (Fig. 3) (Ritchie y Dawes, 1969).

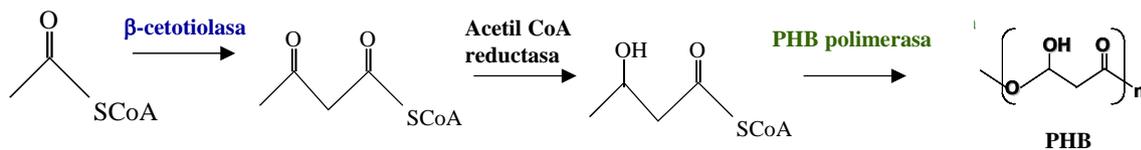


Fig. 3 Biosíntesis de PHB en *Azotobacter vinelandii*

II.2 Regulación a nivel enzimático de la biosíntesis de PHB

En general en las bacterias productoras de PHB, se presenta la acumulación del polímero en respuesta a una limitación para su crecimiento, principalmente por la falta de algún nutriente como: nitrógeno, fósforo, magnesio u oxígeno, y en presencia de un exceso de fuente de carbono y energía (Anderson y Dawes, 1990). Por estudios realizados en *A. vinelandii* y en *A. beijerinckii* se conoce que el control de la síntesis de PHB se presenta principalmente a nivel enzimático, controlando alostéricamente las enzimas de la vía de biosíntesis de PHB (Senior et al., 1972). Un punto de control importante es la actividad de la enzima β -cetotilasa. La β -cetotilasa es activada cuando la relación acetyl-CoA/CoA es alta, situación que se puede dar cuando se acumula NADH o NADPH como respuesta a la

baja concentración de oxígeno en el medio. Como NADH o NADPH inhiben las enzimas del ciclo de Krebs citrato sintasa e isocitrato deshidrogenasa, se disminuye el flujo de carbono hacia este ciclo, lo que genera un incremento de la relación acetil-CoA/CoA y por lo tanto la estimulación de la actividad de β -cetotiolasa (Senior et al., 1972). Estas condiciones también favorecen la actividad de la enzima que cataliza el segundo paso de la vía, la acetoacetil-CoA reductasa.

II.3 Organización de los genes estructurales de la biosíntesis de PHB en *A. vinelandii*

Se han identificado tres genes estructurales de la biosíntesis de PHB: 1) *phbA*, codifica para la β -cetotiolasa (primer enzima en la vía de síntesis de PHB) (Segura et al., 2000); 2) *phbB*, codifica para la acetil-Co reductasa y 3) *phbC*, codifica para la PHB-sintasa (la segunda y tercera enzima de la vía) (Peralta-Gil, 2002).

Los genes *phbA*, *phbB* y *phbC* se encuentran organizados en operón (*phbBAC*), que se transcribe a partir de 2 promotores sobrepuestos pB1 y pB2. El sitio -10 del promotor pB2 sobrelapa el sitio -35 del promotor pB1 (Peralta-Gil et al, 2002). Hacia arriba del operón *phbBAC* y de manera divergente se encuentra el gen *phbR* que codifica para la proteína PhbR, la cual es un activador transcripcional de la familia de activadores transcripcionales AraC (Fig. 4).

El gen *phbR* se transcribe a partir de dos promotores pR1 y pR2, localizados a 61 y 139 nucleótidos antes del codón de inicio de la traducción. Arriba del codón de inicio de la traducción del gen *phbB*, en la posición -134 y -155, se encuentran 2 secuencias idénticas

de 18 nucleótidos de longitud, designadas R1 y R2. R1 y R2 se encuentran separadas por 3 nucleótidos; R1 sobrelapa el -10 del promotor pB2. Se propone que R1 y R2 son los sitios de unión del activador PhbR, por lo esta proteína podría actuar como activador del promotor pB1 al interactuar con la región -35, y como represor al sobrelapar completamente el promotor pB2 (Fig. 4) (Peralta-Gil et al., 2002).

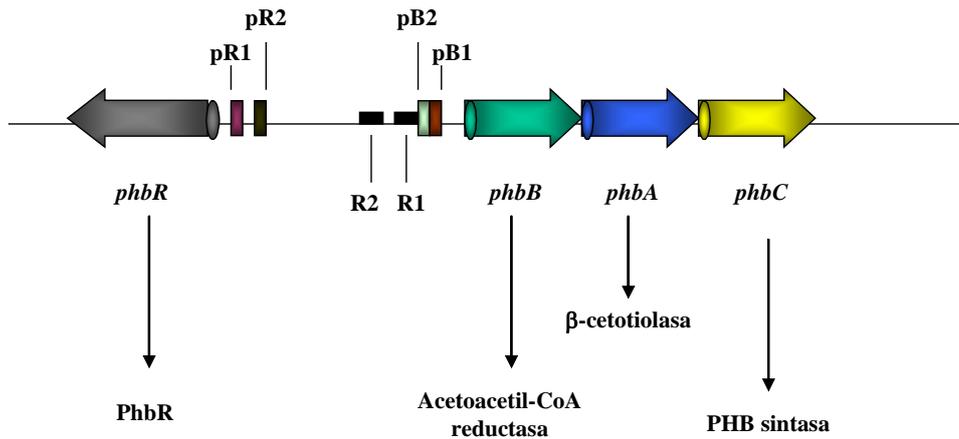


Fig. 4 Organización del operón *phbBAC* en *Azotobacter vinelandii*.

II.4 El Sistema PTS^{Ntr}

El Sistema de fosfotransferasas relacionado con el metabolismo de nitrógeno (PTS^{Ntr}) está presente en muchas especies de bacterias. Consiste en las proteínas: Enzima I^{Ntr}, Npr y IIA^{Ntr} que son homólogas de las enzimas I, Hpr y la IIA^{Glu} del sistema PTS que funciona en la entrada y fosforilación de varios azúcares entre ellos la glucosa en bacterias Gram positivas y Gram negativas (Postma et al, 1996). En *E. coli* y en diversas bacterias la enzima I^{Ntr} esta codificada por el gen *ptsP* (Reitzer et al, 1996; Segura y Espín, 1998; Tan et al, 1999). Además, los genes *ptsN* y *ptsO* codifican para las proteínas Npr y IIA^{Ntr} respectivamente, y se localizan de manera conservada en el locus *rpoN* debajo de este gen (Merric y Coppard, 1988). El gen *rpoN* codifica para el factor sigma 54; también, de manera conservada en este locus y en muchas especies bacterianas se encuentran los genes

orf107 y *orf284*, cuya función es desconocida. La localización de los genes *orf107* y *orf284* dentro del locus *rpoN-orf107-ptsN-orf284-ptsO*, hace suponer que el producto de estos podrían participar en el sistema PTS^{Ntr} (Fig. 5).

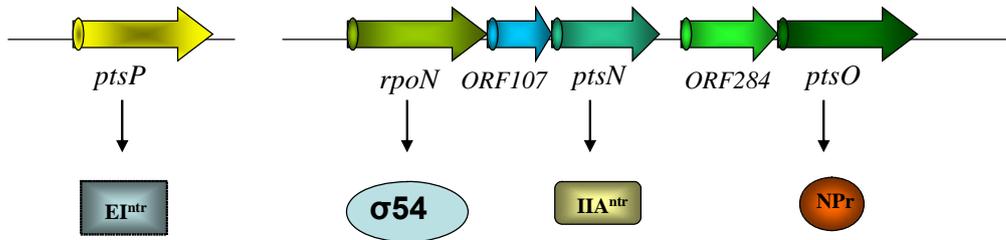


Fig. 5 Genes y proteínas del sistema PTS^{Ntr}

En *E. coli*, la enzima I^{Ntr} , NPr y IIA^{Ntr} forman una cadena de transferencia del grupo fosfato del fosfoenolpiruvato (PEP), en la que IIA^{Ntr} parece ser aceptor terminal (Fig. 6) (Rabus et al, 1999).

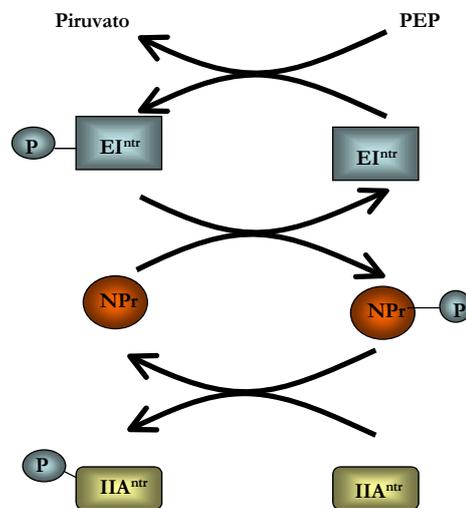


Fig. 6 Sistema de fosfotransferasas PTS^{Ntr} .

La proteína IIA^{Ntr} juega un papel como regulador en algunas especies bacterianas: en *E. coli* una mutante en *ptsN* (IIA^{Ntr}) muestra un bajo crecimiento en medio mínimo con nitrógeno orgánico como fuente nitrogenada (Powell et al, 1995); también, esta mutante presenta sensibilidad extrema a péptidos que contienen leucina. Adicionalmente, la proteína

IIA^{Ntr} en su estado no fosforilado es requerido para la desrepresión del operón *ilvBN* (Lee et al., 2005). En *Rhizobium etli*, la inactivación de *ptsN* afecta la producción de melanina (Michiels et al, 1998), mientras que en *Klebsiella pneumoniae* aumenta la transcripción de algunos promotores reconocidos por sigma 54 (Merrick y Coppard, 1988). En *Legionella pneumophila* la enzima I^{Ntr} esta involucrada en el control de la virulencia y en *Pseudomonas putida* el estado de fosforilación de la proteína IIA^{Ntr} regula la inhibición por la fuente de carbono del promotor *Pu* del plásmido TOL (Higa y Edelstein, 2001; Tan et al, 1999; Cases et al., 1999).

II.5 El Sistema PTS^{Ntr} en *Azotobacter vinelandii* y su función en la regulación de la expresión del operón biosintético de PHB

Una mutación en el gen *ptsP* (I^{Ntr}) de *A. vinelandii*, abate la producción de PHB (Segura y Espín, 1998). Recientemente se caracterizaron los genes *ptsN* y *ptsO* de *A. vinelandii* y se encontró que de manera similar a la mutación en *ptsP*, una mutante en *ptsO* disminuye drásticamente la síntesis de PHB, mientras que en una mutante en *ptsN* se aumentan los niveles de éste poliéster por arriba de los observados en la cepa silvestre (tabla 1).

Tabla 1. Cuantificación de PHB en las cepas mutantes del sistema PTS^{Ntr}.

Cepa	Genotipo	Contenido PHB ug(mg proteína ⁻¹)
UW136	Silvestre	303.16359 ±36.57
<i>ptsP</i>	<i>ptsP::miniTn5</i>	3.15429469 ±0.82
<i>ptsO</i>	<i>ptsO::km^r</i>	5.72105619 ±0.43
<i>ptsN</i>	<i>ptsN::km^r</i>	525.848929 ±39.05

Mutantes en los genes *ptsO* y *ptsP* afectan de manera negativa la transcripción de los genes *phbR* y *phbBAC*, mientras que en la mutante *ptsN* se observó un aumento en la transcripción de estos genes (Noguez et al, 2007). Por otro lado, se encontró que la

mutación *ptsN* suprime el efecto negativo sobre la síntesis de PHB de la mutación en *ptsP*; sin embargo, el efecto de la mutante *ptsO* fue sólo parcialmente suprimido por la mutación *ptsN*.

La información anterior muestra que el Sistema PTS^{Ntr} controla la síntesis de PHB a nivel transcripcional. Los datos también sugieren que la proteína IIA^{Ntr} en su forma no fosforilada, tiene un efecto negativo sobre la transcripción del operón *phbBAC*. Cabe señalar que IIA^{Ntr} no presenta motivos de unión a ADN, por lo cual su efecto puede ser a través de intermediarios. Además, la supresión parcial del efecto negativo de la mutación *ptsO* por la mutación *ptsN*, sugieren que la proteína Npr juega un papel positivo adicional sobre la síntesis de PHB.

Debido a que estos datos han sido deducidos por experimentos de protección a nucleasa S1- los cuales son semicuantitativos-, sería conveniente cuantificar de manera directa la expresión del operón *phbBAC* en las cepas mutantes del sistema PTS^{Ntr}. Es por esto que uno de los objetivos de este trabajo fue llevar a cabo experimentos de reverso transcripción y reacción en cadena de la polimerasa tiempo real (PCR-RT) para poder cuantificar el efecto de las mutantes en los genes del sistema PTS^{Ntr} en la expresión del operón *phbBAC*.

II.6 Organización y conservación de los genes *orf107* y *orf284*

La organización del locus *rpoN* en *A. vinelandii* muestra que además de los genes *rpoN*, *ptsN* y *ptsO* existen los marcos de lectura abierta *orf107* y *orf284* no caracterizados que se encuentran conservados de manera estructural en diversas especies bacterianas de las γ

proteobacterias como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *Xantomonas campestris* y de las δ proteobacterias como *Geobacter metallireducens* (Fig. 7).

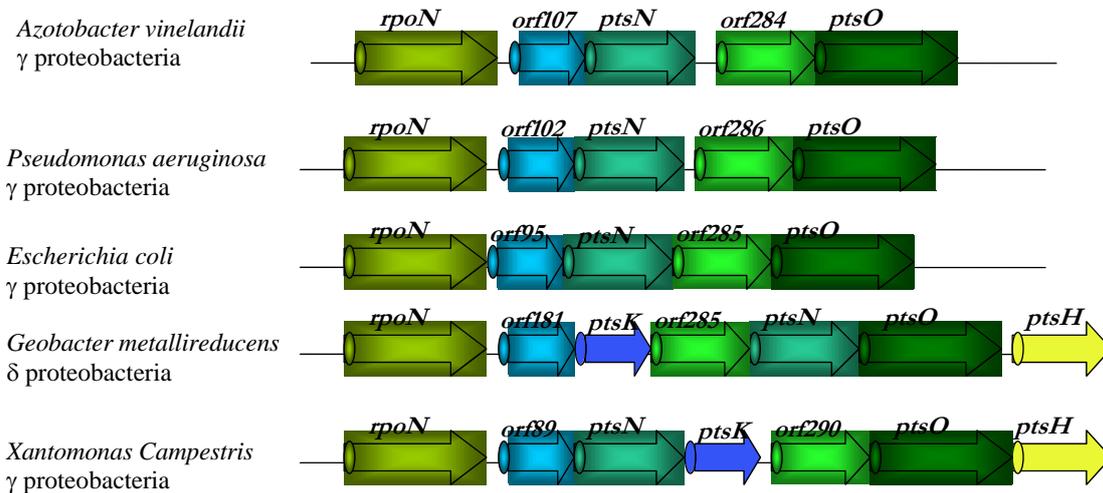


Fig. 7 Organización del locus *rpoN* en diversas especies bacterianas

Río abajo del gen *rpoN* en *A. vinelandii* se encuentra el gen *orf107* de 360 pb. Este marco de lectura abierta codifica para una proteína hipotética de 107 aminoácidos; sin embargo, sus homólogos en otras bacterias no han sido caracterizados. El alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la proteína ORF107 con el banco de datos, muestra que ésta presenta similitud a una proteína de ribosoma de *Bacillus subtilis*. Por otro lado, río abajo del gen *ptsN* se encuentra el gen *orf284* que codifica para una posible proteína de 284 aminoácidos. Los homólogos de la proteína hipotética ORF284 de *A. vinelandii* no han sido caracterizados y no se ha encontrado similitudes del ORF284 con otras proteínas caracterizadas y anotadas en el banco de datos.

En muchas especies bacterianas, algunos genes cuyos productos tienen funciones relacionadas (componentes de una vía biosintética o degradativa) se encuentran agrupados en operones. Al agrupar los genes en operones, las células se aseguran que si expresan una enzima (miembro de una vía metabólica) sus enzimas compañeras en la misma vía, también se encontrarán presentes para llevar a cabo su función (Watson et al., 1988). Dado a lo anterior y a que los genes *orf107* y *orf284* se localizan dentro del locus *rpoN* junto con los genes del sistema PTS^{Ntr} , en este trabajo se postula que los productos de los genes *orf107* y *orf284* podrían participar en la regulación de la biosíntesis de PHB.

III. HIPOTESIS

Con base a lo anterior, en este trabajo se proponen que la proteína IIA^{Ntr} interactúa con alguna proteína que regule la expresión del operón biosintético de PHB de *Azotobacter vinelandii*, dando como resultado los siguientes modelos:

-Fosfoenolpiruvato fosforila a la EI^{Ntr}, a su vez EI^{Ntr} fosforilada, transfiere su grupo fosfato a la enzima Npr. Npr puede fosforilar a la enzima IIA^{Ntr}. Pero IIA^{Ntr} en su estado no fosforilado puede interactuar con:

a) algún intermediario que regule a nivel transcripcional el gen *phbR*, regulando la actividad del promotor pB1 del operón biosintético *phbBAC*

b) algún intermediario que regule la actividad de promotor pB2 del operón *phbBAC*.

Los intermediarios entre IIA^{Ntr} no fosforilada y los promotores pB1 y pB2 pueden ser: a) un regulador negativo (represor) activado por la interacción con IIA^{Ntr} no fosforilada, ó b) un regulador positivo (activador) inactivado por la interacción con IIA^{Ntr} no fosforilada (Fig. 8). Cualquiera de las dos posibilidades daría como resultado una reducción significativa en la transcripción de los genes *phbR* y *phbBAC*.

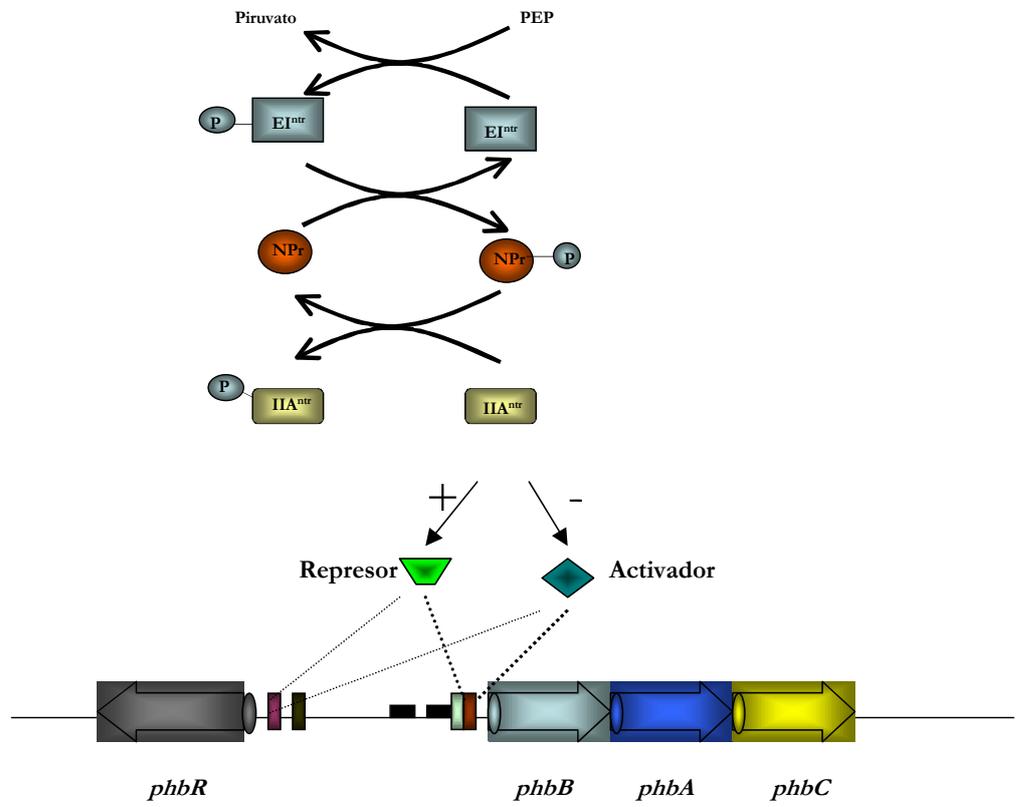


Fig. 8 Modelo hipotético de regulación del operón biosintético de PHB en *A. vinelandii*

IV. OBJETIVOS

IV.1 OBJETIVO GENERAL:

Identificar y caracterizar las posibles proteínas que interactúen con la proteína IIA^{Ntr} y que intervengan en el control de la expresión del operón biosintético de PHB *phbBAC*.

IV. 2 Objetivos particulares

-Llevar a cabo experimentos de reverso transcripción y reacción en cadena de la polimerasa tiempo real para:

a)cuantificar el efecto de las mutaciones de los genes del sistema PTS^{Ntr} (*ptsP*, *ptsO*, *ptsN*) sobre la transcripción del operón *phbBAC* y

b)estudiar el efecto de las mutaciones en los genes *orf107* y *orf284*, los cuales están localizados en el cluster *rpoN-orf107-ptsN-orf284-ptsO* sobre la transcripción del operón *phbBAC*.

-Llevar a cabo experimentos de interacción *in-vitro* de proteína-proteína para identificar la (s) posible (s) proteína (s) que interaccionen con IIA^{Ntr}.

-Evaluar la interacción de la (s) posible (s) proteína (s) encontrada (s) con IIA^{Ntr} y su participación en la regulación del operón *phbBAC*.

VI. MATERIALES Y METODOS

Tabla 2. Plásmidos usados en este trabajo

Plásmido	Característica	Referencia
pET24a	Vector de expresión (5310 pb) Km ^r	Novagen
pMOSBlue	Vector de clonación (2889 pb) Amp ^r	Amersham
pRN3	Derivado del pMOSBlue con el gen <i>ptsN</i> silvestre de <i>A. vinelandii</i> , Amp ^r	Noguez et al., 2007
pALA7	Derivado del pET24a con el gen <i>ptsN</i> silvestre de <i>A. vinelandii</i> , Km ^r	Este trabajo
pALA8	Derivado del pET24a con el gen <i>ptsN</i> (H68A) de <i>A. vinelandii</i> , Km ^r	Este trabajo

Tabla 3. Oligonucleótidos usados en este trabajo.

Oligonucleótido	Secuencia
ptsNup1	5'-GGCTTCATATGATCAGACTCGAAGACAT-3'
ptsN (H68A)	5'-GGGCGGGCGGCACGCAGGAATGGCCATG-3'
ptsNlow2	5'-CGGAACTCGAGCAGGCTCTTCTGTGC-3'
rhoFw	5'-GGAAATGGCCGAACAGATGG-3'
rhorev	5'-GATTTCTCGCCGCTTTTCG-3'
gyrAFw	5'-CCAGCAAGGGCAAGGTCTA-3'
gyrArev	5'-TCGTCCAGCGGCAACAGGT-3'
phbBFw	5'-TTCGCAATCCAAACGCAAAG-3'
phbBRev	5'-GTGCTCTCCCAATCGGTTAC-3'
phbRFw	5'-CCACATGCGTITGGTTTCTTG-3'
phbRRev	5'-TCTGCCCTAAGCGTCTCCTC-3'

Tabla 4. Cepas utilizadas en este trabajo.

Cepa	Características	Referencia
<i>Azotobacter vinelandii</i> UW136	Silvestre Nal ^r	Martínez- Salazar et al., 1996
<i>ptsP</i> -	Derivada de la UW136 con la mutación <i>ptsP::Tn5</i>	Segura and Espín, 1998
<i>ptsN</i> -	Derivada de la UW136 con la mutación <i>ptsN::Km^r</i>	Noguez et al., 2007
<i>ptsO</i> -	Derivada de la UW136 con la mutación <i>ptsO::Sp^r</i>	Noguez et al., 2007
<i>orf107</i> -	Derivada de la UW136 con con la mutación <i>orf107::Km^r</i>	Noguez et al., 2007
<i>orf284</i> -	Derivada de la UW136 con con la mutación <i>orf284::Km^r</i>	Noguez et al., 2007
UW12	Derivada de la UW136 con el plásmido pALA7 cointegrado	Este trabajo
UW74	Derivada de la UW136 con el plásmido pALA8 cointegrado	Este trabajo
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	<i>supE44 DlacU169hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 relA</i>	Hanahan et al., 1983
BL21	<i>hsdS gal (cIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene 1</i>	Sanbrook et al., 1989

VI.1 Medios y condiciones de cultivo de las cepas de *A. vinelandii* y *E. coli*

Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio LB (con la siguiente composición en g/L : peptona de caseína 10, cloruro de sodio 10, extracto de levadura 5 para medio líquido y suplementado con 15 de agar para medio sólido) y se incubaron a 37°C por 12 h. Por su parte, las cepas de *A. vinelandii* se crecieron a 30°C por 72 h en medio Medio BS (que tiene en g/L: MgCl₂ · 6H₂O 0.160, NaMoO₄ · 2H₂O 0.0002, FeSO₄ · 7H₂O 0.005, CaCl₂ · 2H₂O 0.073, Na₂SO₄ 0.183, K₂HPO₄ 0.8 y KH₂PO₄ 0.2). Los antibióticos usados para *E. coli* fueron: ampicilina 200 µg/ml y kanamicina 20 µg/ml en medio líquido o sólido. Para *A. vinelandii* fueron: ácido nalidíxico 15 µg/ml y kanamicina 1 µg/ml en medio líquido o sólido.

VI.2 Reacciones de digestión de ADN

VI.2.1 Digestión para analizar el patrón de restricción por electroforesis

Las digestiones de los plásmidos construidos en este trabajo formularon de la siguiente manera: ADN plasmídico 15-50 ng, enzima (*XhoI*, *NdeI* y *EcoRI*) (10 U), buffer (10x) 1 µl, H₂O aforar a un volumen total de 10 µl. Finalmente, la reacción se incubó por 1 h a 37°C.

VI.2.2 Digestiones para purificar el inserto por electroforesis

Las digestiones de los plásmidos se llevaron a cabo de la siguiente manera: ADN plasmídico 50 µl (15-20 ng/µl), enzima (*XhoI* o *NdeI*) 20 U, buffer (10x) 6 µl, H₂O 2 µl, el volumen final fue de 60 µl; la reacción se incubó por 1 h a 37°C.

VI.3 Electroforesis del ADN

Se prepararon geles de agarosa al 1% en solución amortiguadora de tris-acetatos (ver apéndice). Los pozos del gel fueron cargados de acuerdo a la concentración necesaria de la muestra de interés, más 1-2 µl de colorante. Una solución de ADN del fago λ digerido con las enzimas *HindIII* y *BamHI* (100 ng/µl), fue utilizada para calcular el tamaño de las bandas de ADN y su concentración. También se utilizó como marcador de peso molecular ADN 1 Kb *plus ladder* (Invitrogen). La electroforesis se corrió a 80 volts, por 45-60 min en solución amortiguadora de tris-acetatos al 1X. Posteriormente, el gel fue teñido con bromuro de etidio (0.5 µg/ml) durante 3-5 min, enseguida se lavó con agua por 5 minutos y posteriormente se observó en el transiluminador de luz UV, para visualizar el ADN (Sambrook et al., 1989).

VI.4 Reacciones de ligación

Una vez que se obtuvo el fragmento de ADN deseado, éste se ligó a un vector previamente digerido con una enzima de restricción en una relación molar 3 (inserto): 1 (vector). Se utilizó la enzima T4 ADN ligasa siguiendo las instrucciones del fabricante (Boehringer^{M.R.}). Las condiciones de ligación fueron las siguientes: se incubó la reacción por 12 h a 16°C, posteriormente se procedió a realizar transformación en *E.coli* (DH5 α).

VI.5 Preparación de células competentes de *E.coli* DH5 α por el método de CaCl₂

Se transfirió una colonia bacteriana a 5 ml de LB y se creció a 37°C por 16-20 h. Posteriormente, se inocularon 100 ml de LB líquido (en matraz de 250 ml) con 1 ml de este cultivo y se incubó a 37°C por 3 h, en agitación vigorosa hasta que se alcanzó una D.O.₆₅₀ de 0.4-0.5. Después, el cultivo se transfirió a tubos de polipropileno y se incubaron en hielo durante 10 min. Enseguida, la muestra se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min a 4°C (ultra centrífuga Beckman) y se recuperó el paquete celular. Éste se resuspendió en 30 ml de CaCl₂ 50 mM dejándose en hielo por 15 min. La muestra se centrifugó a 4000 rpm 10 min a 4°C y la pastilla se resuspendió en 3-5 ml de CaCl₂ 50 mM frío por cada 50 ml del cultivo original. Se hicieron alícuotas de 0.2 ml en tubos eppendorf de 1.5 ml y se mantuvieron a -70°C en solución de glicerol al 14 % hasta el momento de usarlas (Sambrook et al., 1989).

VI.6 Transformación en *E. coli* DH5 α

Se mezclaron 0.1 μ g de ADN con 0.2 ml de células competentes de *E. coli*. Esta mezcla se incubó en hielo por 30 minutos, posteriormente, se le dió un choque térmico a 42°C por 2 min y se volvió a incubar en hielo por 2 min. A la muestra se le adicionó 1 ml de medio LB

(sin antibiótico) y se creció a 37°C por 1 h, a 200 rpm. Después, se sembraron de 0.1 a 0.2 ml, en cajas con medio sólido LB y el antibiótico correspondiente (Sambrook et al., 1989).

VI.7 Extracción de ADN plasmídico (“Miniprep”)

Se realizó un inóculo con las células transformadas de *E. coli* en 3-5 ml de medio de cultivo LB (con el antibiótico respectivo). Se incubó toda la noche a 37 °C. Al día siguiente, se vertió el cultivo en un tubo eppendorf y se centrifugó por 1 min a 14,000 rpm, recuperando la pastilla celular. Ésta se resuspendió en 100 µl de solución I fría (ver apéndice) y se dejó reposar 5 min a temperatura ambiente. A la muestra se le agregaron 200 µl de la solución de lisis (sol. II), se mezcló el contenido por inversión. La mezcla se dejó reposar 5 min y posteriormente se agregaron 150 µl de solución III fría; se mezcló el contenido agitando suavemente en vortex en posición invertida durante 10 seg y se colocó en hielo 5 min. El tubo se centrifugó 10 min a 14,000 rpm, seguido se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo. Al tubo se le adicionó un volumen igual de fenol-cloroformo y se mezcló en vortex; después se centrifugó a 14,000 rpm por 2 min y se transfirió el sobrenadante a otro tubo eppendorf nuevo. Posteriormente, al tubo se le agregó un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y se agitó en vortex, centrifugando por 2 min a 14,000 rpm. El sobrenadante se volvió a transferir a otro tubo eppendorf nuevo y se adicionaron dos volúmenes de etanol absoluto, se agitó en vortex y se dejó reposar por 2 min a temperatura ambiente. El tubo se centrifugó 8 min a 14,000 rpm recuperando la pastilla la cual se lavó dos veces con etanol al 70 %. La pastilla se secó y finalmente se le adicionaron 15 µl de una solución de ribonucleasa (RNAsa) y se incubó a 37 °C por 30 min (Sambrook *et al.*, 1989).

VI.8 Método de megaprimer para generar mutaciones puntuales (Modificado por Barik, S. y Galinski, 1991. Método de PCR).

VI.8.1 Amplificación y clonación del gen *ptsN* (H68A)

El método de megaprimer, es una técnica importante para crear mutaciones en sitios específicos, usando la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Este método requiere de dos PCR's sucesivos, utilizando tres oligonucleótidos, uno de los cuales es interno y contiene la mutación de interés, generando así un megaprimer. El megaprimer obtenido, es usado en la siguiente (segunda) reacción de PCR, junto con el otro oligonucleótido para sintetizar así finalmente todo el producto mutagenizado.

Para construir el gen mutado *ptsN* (H68A), sobreexpresarlo y purificar el producto (proteína IIA^{Ntr}(H68A)) para llevar a cabo ensayos de interacción *in-vitro* de proteínas, se diseñó un oligonucleótido interno llamado ptsN (H68A) que lleva una mutación puntual en el codón que codifica para la histidina 68 (CAT) resultando en un codón que codifica ahora para una alanina (GCG):

En una primera reacción de PCR se utilizó como templado ADN plasmídico (pRN3) y los oligonucleótidos: ptsN (H68A) (10 pmol/ μ l) y ptsNup1 (10 pmol/ μ l). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: temperatura de desnaturalización 95 °C/1 minuto, temperatura de alineamiento 58 °C/45 segundos, temperatura de extensión 72 °C/1 minuto, 30 ciclos. Posteriormente, se le dio un ciclo más de extensión a 72 °C/10 minutos. En esta primera reacción se obtuvo el megaprimer del 200 pb. En la figura 9 b), carril 2 se muestra el fragmento de PCR esperado. En la segunda reacción de PCR, para amplificar el gen

completo *ptsN* (*H68A*) (ya mutagenizado) de *A. vinelandii* se utilizaron los oligonucleótidos: megaprimer de 200 pb (previamente purificado de gel $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) y *ptsN*low2 ($10 \text{ pm}/\mu\text{l}$) y como templado DNA plasmídico (pRN3). Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: temperatura de desnaturalización $95 \text{ }^\circ\text{C}/1$ minuto, temperatura de alineamiento $65 \text{ }^\circ\text{C}/1.30$ minutos, temperatura de extensión a $72 \text{ }^\circ\text{C}/1$ minuto, por 30 ciclos y por último, se le dio un ciclo más de extensión a $72 \text{ }^\circ\text{C}/10$ minutos. En esta segunda reacción de PCR se obtuvo el gen *ptsN* (*H68A*) completo de 486 pb, el cual se observa en la fig 9 b), carril 3.

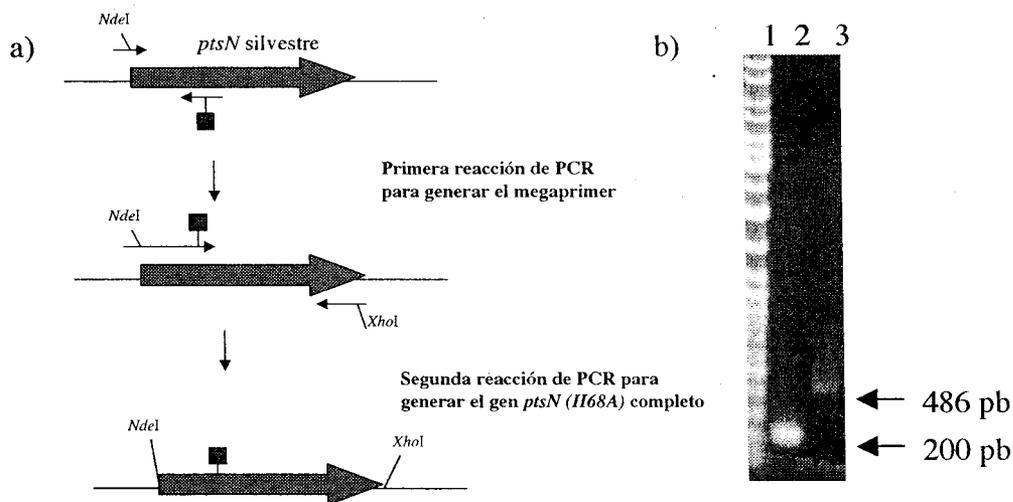


Fig. 9 Obtención del gen *ptsN* (*H68A*). a) Secuencia de reacciones de PCR, primero utilizando el oligonucleótido mutado (flecha con cuadro) generando un megaprimer. El megaprimer es utilizado en una segunda reacción para amplificar al gen *ptsN* (*H68A*) completo. B) Carril 1: DNA ladder mix, carril 2: megaprimer 200 pb, carril 3: *gen ptsN H/A* 486 pb.

El producto de PCR, fue purificado y digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* para su clonación dirigida en el vector de expresión pET24a (previamente digerido con las mismas enzimas). Con el producto de la digestión del fragmento *ptsN* (*H68A*) y del vector

pET24a se llevó a cabo una reacción de ligación, la cual se introdujo en la cepa DH5 α de *E. coli*, seleccionando las transformantes en medio LB con kanamicina.

Para encontrar las clonas correctas se realizó un análisis de restricción con las enzimas *Nde*I y *Xho*I con ADN plasmídico purificado de varias colonias. Como se observa en la figura 10 b), carril 3, con la digestión el plásmido pET24a/*ptsN* (H68A) se fragmenta en 2 bandas de 5, 226 pb y 470 pb que es el patrón esperado. Este plásmido fue denominado pALA8.

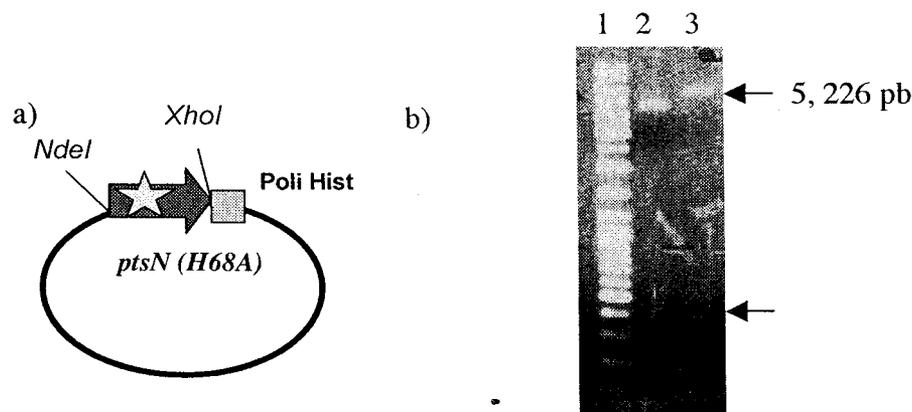


Fig. 10 Clonación del gen *ptsN* (H68A) en pET24a para generar el plásmido pALA8
 a) Mapa del plásmido con sus sitios de restricción, la estrella dentro del gen representa la mutación y el cuadro después del gen la etiqueta de histidinas.
 b) Análisis electroforético del plásmido pALA8. Carril 1: DNA ladder mix, carril 2: DNA plasmídico de la clona 1 sin digerir, carril 3: DNA plasmídico de la clona 1 digerido con *Nde*I y *Xho*I.

El plásmido pALA8 se mandó a secuenciar para cerciorarnos que el gen *ptsN* (H68A) llevara la mutación en el codón seleccionado y que la clonación del gen *ptsN* (H68A) no hubiera cambiado el marco del lectura de los codones que codifican para las 6 histidinas. El reporte de la secuencia indicó que el codón se había cambiado como se esperaba.

VI.9 Amplificación y clonación del gen *ptsN* silvestre

Con la finalidad de utilizar la proteína IIA^{Ntr} como control en la cointegración del plásmido pALA8 en *A. vinelandii*, el gen *ptsN* se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos ptsNup1 (10 ng/ μ l) y ptsNlow2 (10 ng/ μ l); se usó como templado DNA plasmídico (pRN3). El primer oligonucleótido contiene un sitio para el corte de la enzima *NdeI*; mientras que el segundo oligonucleótido, contiene un sitio para el corte de la enzima *XhoI* y elimina el codón de terminación de la traducción. El objetivo de añadir los sitios *NdeI* y *XhoI*, es dirigir la clonación de este gen en el vector pET24a permitiendo la adición de una secuencia de nucleótidos que codifican para 6 histidinas al extremo 3' del gen (extremo carboxilo de la proteína IIA^{Ntr}).

Las condiciones de la amplificación fueron las siguientes: temperatura de desnaturalización 95 °C/1 minuto, temperatura de alineamiento 58 °C/1 minuto, temperatura de extensión 72 °C/1 minuto, por 30 ciclos. Posteriormente, se le dio un ciclo final de extensión a 72 °C/10 minutos. En la figura 11 se muestra el PCR obtenido, en el carril 2 se muestra la banda esperada de 486 pb.

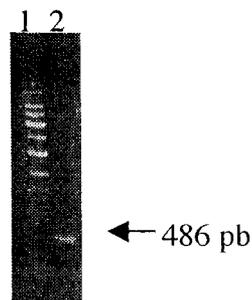


Fig. 11 Amplificación del gen *ptsN* silvestre. Carril 1: DNA ladder mix, carril 2: *ptsN* silvestre de 486 pb.

Este fragmento, fue purificado y digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*. Por separado, el vector pET24a fue digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*. Con el producto de la digestión del fragmento *ptsN* silvestre y del vector pET24a se llevó a cabo una reacción de ligación, la cual se introdujo en la cepa DH5 α de *E. coli*, seleccionando las transformantes en medio LB con kanamicina.

Para encontrar las clonas correctas se realizó un análisis de restricción con las enzimas *NdeI* y *XhoI* con ADN plasmídico purificado de varias colonias. Como se observa en la figura 12 b), carril 1, con la digestión el plásmido pET24a/*ptsN* silvestre se fragmenta en 2 bandas de 5, 226 pb y 470 pb, que es el patrón esperado. Este plásmido fue denominado pALA7.

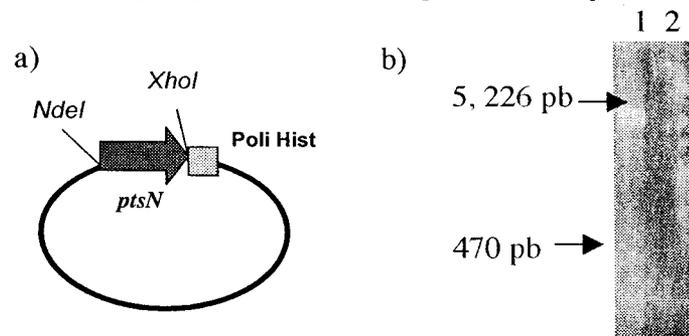


Fig. 12 Clonación del gen *ptsN* silvestre en pET24a para generar el plásmido pALA7. a) Mapa del plásmido con sus sitios de restricción. El cuadro después del gen, representa la etiqueta de histidinas. b) Análisis electroforético del plásmido pALA7. Carril 1: DNA plasmídico de una colonia digerido con *NdeI* y *XhoI*, carril 2: DNA Ladder mix.

El plásmido pALA7 fue secuenciado a partir del oligonucleótido T7 localizado hacia arriba del operador *lacI* en el vector. El análisis de la secuencia indica que no hay mutaciones en el gen *ptsN* silvestre y que éste quedó en el marco de lectura correcto bajo el control del promotor T7 y con la fusión de las 6 histidinas en el carboxilo terminal en el producto.

VI.10 Preparación de células competentes de *A. vinelandii*

Como primer paso se cultivaron las cepas de *A. vinelandii* 2 veces en medio CM (Medio de Competencia, el cual contiene los mismos reactivos que el medio BS excepto $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) incubándola por 48 h a 30 °C. Después se recolectaron todas las células para inocular 50 ml de medio CM líquido. Se incubó a 30 °C por 48 h a 200 rpm. Posteriormente se recolectaron las células por centrifugación a 4,000 rpm. por 10 min, se lavaron las células con MgSO_4 10 mM. Finalmente se resuspendieron las células en 2 ml de medio CM con 16 mM de MgSO_4 .

VI.11 Transformación en *A. vinelandii*

Se mezclaron 0.1 ml de células competentes de *A. vinelandii* con 10 μg de ADN. Esta mezcla se incubó por 1 h a 30 °C, sin agitación. Después, se platearon las células en cajas con medio CM sólido, dejando incubar por 48 horas a 30 °C. Posteriormente, con un asa de siembra se levantaron las células en 0.5 ml de medio CM líquido; enseguida se platearon 0.1 ml en medio Burk con kanamicina 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

VI.12 Cuantificación de PHB

Para cuantificar PHB en las cepas mutantes y silvestre, se partió de células crecidas en medio PY sólido suplementado con sacarosa al 2%, por 96 hrs a 30 °C. Las células se levantaron de la placa de PY y se resuspendieron en 1 ml de agua destilada en un tubo eppendorf de 1.5 ml; enseguida, se centrifugó la muestra celular por 5 min a 13,000 rpm y se decanto el sobrenadante. La pastilla celular se resuspendió en Hipoclorito comercial al 30 % (Cloralex) y se incubo por 30 min a 30 °C. Terminado el tiempo de incubación, se

centrifugó la muestra por 5 min a 13,000 rpm y se decantó el sobrenadante. La pastilla se lavó sucesivamente con 1 ml de agua, 1 ml de alcohol y 1 ml de acetona, secándola al final. La pastilla de PHB se resuspendió en 1 ml de ácido sulfúrico concentrado y se incubó por 10 min a 95 °C. Por último, se leyó la D.O._{235 nm} para estimar la formación de ácido crotónico (P.M. 86) . Para cuantificar la concentración de PHB se utilizó la ecuación de Lambert-Beer :

$$C=A/Eb$$

donde:

C= concentración ($\mu\text{g/ml}$)

A= absorbancia (nm)

E=Coefficiente de extinción del ácido crotónico ($15\ 600\ \text{l mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

b= longitud de la celda (1 cm)

VI.13 Determinación de proteína

La cuantificación de proteína se realizó por el método de Lowry. Los ensayos se realizaron por duplicado. El procedimiento fue el siguiente: se tomó 1 ml de caldo de cultivo y se centrifugó a 13, 000 rpm por 5 min, a la pastilla se le adicionó 1 ml de MgSO_4 10 mM para lavar las células. Posteriormente, se centrifugó la muestra por 5 min a 13,000 rpm y se eliminó el sobrenadante. El paquete celular se resuspendió en 1 ml de H_2O . Se tomó una alícuota de 200 ul de células y se aforo a 1000 ul con H_2O . Por separado se preparó solución reactiva (ver apéndice) y se le agregó 5 ml de ésta solución a las células diluidas (con la solución reactiva se lisaron las células). La mezcla se agitó y se dejó reposar por 10 min; posteriormente, a la mezcla se le agregó 0.5 ml de folin diluido (1 volumen de folin +

2 volúmenes de H₂O) y se dejó reposar esta mezcla por 30 min. Por último se midió la absorbancia a 595 nm. Simultáneamente se corrió una curva de calibración utilizando un patrón de albúmina con las siguientes concentraciones en ug/ml: 10, 25, 50, 100, 200 y 400 (ver apéndice).

VI.14 Ensayo de interacción *in-vitro* de proteínas “PULL DOWN”

VI.14.1 Expresión de la proteína IIA^{Ntr}(H68A) de *A. vinelandii* en la cepa BL21 de *E. coli*

El plásmido pALA8 (*ptsN* (H68A)) se introdujo en la cepa BL21 de *E. coli* para la expresión del gen *ptsN* (H68A); La cepa transformada se creció en medio LB por 12 hrs y se usó para inocular al 1 % de este cultivo otro matraz con medio LB. El segundo cultivo se incubó a 37 °C y 250 rpm hasta una D.O._{600 nm} de 0.2 –0.4 nm. Una vez alcanzada la D.O. deseada, se indujo la expresión del gen *ptsN* (H68A) agregando al cultivo IPTG a una concentración final de 300 µm/ml. El cultivo inducido se incubó por 3 hrs a 37 °C y 250 rpm. Terminado el tiempo de incubación, se cosecharon las células y se procedió al protocolo de lisis celular.

VI.14.2 Preparación de la proteína IIA^{Ntr}(H68A) del sistema de expresión en *E. coli*

Las células crecidas e inducidas fueron cosechadas en tubos eppendorf de 1.5 ml. La pastilla celular, fue resuspendida con 1 ml de buffer TBS (por 5 ml de cultivo original, el buffer TBS contiene: Tris 25 mM y Cloruro de Sodio 0.15 M a un pH de 7.2); seguido, se centrifugó por 5 min a 10, 000 rpm y se decantó el sobrenadante. El paquete celular se resuspendió en 200 µl de TBS frío (por 5 ml de cultivo original) y se le agregó 200 µl de la solución de lisis (proporcionada por el kit^{Pierce}), ésta mezcla se incubó en hielo por 30 min.

Terminado el tiempo de incubación, la muestra se centrifugó por 10 min a 13,000 rpm. El sobrenadante (extracto proteico) se separó a un tubo nuevo y se le agregó Imidazol a una concentración final de 40 mM. Se procedió a equilibrar la minicolumna de afinidad (resina con perlas de agarosa con cobalto).

VI.14.3 Preparación de la columna de afinidad

Para equilibrar la minicolumna, se preparó una solución de lavado con 1 volumen de buffer TBS y 1 volumen de solución de lisis; adicionalmente, a esta solución se le agregó Imidazol a una concentración final de 40 mM. Por otro lado, se agregó 50 μ l de resina (de cobalto) a cada minicolumna usada, se tapó la parte de abajo y se le agregó 40 μ l de solución de lavado; seguido, se tapó la parte de arriba de la columna y se agitó manualmente varias veces. La minicolumna se destapó por arriba y por abajo, y se colocó en un tubo de lavado para centrifugarlo por 30 seg a 4,000 rpm. El lavado de la resina se llevó a cabo 5 veces.

VI.14.4 Inmovilización de la proteína IIA^{Ntr}(H68A) en la columna de afinidad

Para inmovilizar la proteína IIA^{Ntr}(H68A), la minicolumna equilibrada se destapó por la parte de arriba y se le agregó el extracto proteico de *E. coli* (el cual lleva la proteína IIA^{Ntr}(H68A)). La minicolumna fue cerrada y se incubó a 4 °C por 1 hr con agitación constante. Terminado el tiempo de incubación, se le removieron ambas tapas de la columna y se colocó en un tubo de colección para centrifugarla por 30 seg a 4,000 rpm. El extracto que paso a través de la columna fue guardado y marcado como “sobrenadante cebo”. Nuevamente se le colocó la tapa de abajo y se le agregaron 400 μ l de solución de lavado, invirtiendola varias veces. Se destaparon ambos lado de la minicolumna y se colocó en un

tubo de lavado; seguido, se centrifugó esta muestra por 30 seg a 4,000 rpm. El lavado de la minicolumna se repitió 5 veces.

VI.14.5 Preparación del extracto celular de *A. vinelandii*

La cepa mutante *ptsN*- de *A. vinelandii* se creció por 30 hrs en medio PY líquido suplementado con sacarosa al 2 %. El cultivo celular se transfirió a tubo eppendorf y se centrifugó por 5 min a 13,000 rpm. Para obtener el extracto proteico de *A. vinelandii*, la pastilla celular fue tratada con el mismo protocolo de lisis que *E. coli*.

VI.14.6 Captura de la proteína presa

La minicolumna (con la proteína IIA^{Ntr}(H68A)) fue destapada por arriba y se le agregó el extracto proteico de *A. vinelandii*. Seguido, se tapó la minicolumna y se incubó a 4 °C por 1 hr con agitación constante. Terminado el tiempo de incubación, se destapó la minicolumna y se colocó en un tubo de colección para eliminar las proteínas que no interaccionaron con IIA^{Ntr}(H68A) mediante centrifugación por 30 seg a 4,000 rpm. El extracto que pasó a través de la columna fue guardado y llamado "Sobrenadante presa". Por otro lado, a la minicolumna se le colocó la tapa de abajo y se le agregaron 400 µl de solución de lavado, invirtiendo varias veces la minicolumna. Se destaparon ambos lados de la minicolumna y se colocó en un tubo de lavado; seguido, se centrifugó ésta muestra por 30 seg a 4,000 rpm. El lavado de la minicolumna se llevó a cabo 5 veces.

VI.14.7 Elución de las proteínas: IIA^{Ntr}(H68A) y proteínas presas

Para eluir las proteínas que interaccionaron con IIA^{Ntr}(H68A), se preparó un buffer de elución conteniendo solución de lavado e Imidazol a una concentración final de 290 mM. La minicolumna fue destapada por arriba y se le agregaron 250 µl del buffer de elución; nuevamente, la minicolumna fue tapada y se incubó por 5 min a 4 °C con agitación constante. Al final del tiempo de incubación, la minicolumna se destapó y se colocó en un tubo de colección, centrifugando la muestra por 1 min a 4,000 rpm. La solución que eluyó de la minicolumna, fue concentrada y guardada para analizarla por SDS-PAGE.

VI.15 Purificación de ARN total de *A. vinelandii*

Las cepas de *A. vinelandii* se crecieron en medio PY sólido, suplementado con sacarosa al 2 % por 30 hrs a 30 °C. De la placa de PY, se levantaron las células y se resuspendieron en 500 µl de solución A (la cual lleva: SDS 0.5 %, acetato de sodio 20 mM y EDTA 10 mM); seguido, a las células se les agregaron 500 µl de fenol ácido (pre-calentado a 60 °C) incubándolas por 5 min a 60 °C. Al terminar el tiempo de incubación, la muestra se centrifugó por 2 min a 12,000 rpm y la fase acuosa se pasó a un tubo limpio. A la fase acuosa se le agregó 1 ml de etanol absoluto agitando vigorosamente; después, se centrifugó el tubo por 5 min a 12,000 rpm. El sobrenadante del tubo fue decantado y al tubo se le agregó 1 ml de etanol al 70 %; el tubo se centrifugó por 5 min a 12,000 rpm y se decantó el sobrenadante. La pastilla se resuspendió en 400 µl de solución A y se le agregó 1 ml de etanol absoluto; seguido, se centrifugo la muestra por 5 min a 12,000 rpm, estos pasos se repitieron 2 veces mas. Por último, se dejó secar la pastilla y se resuspendió en 100 µl de agua con DEPC (dietil pirocarbonato) al 0.1 %.

VI.16 Síntesis de ADN complementario

Para sintetizar ADN complementario a partir de ARN, se llevó a cabo la siguiente mezcla: ARN total 1 µg, oligonucleótidos a 20 pm (*phbB*Rev, *phbR*Rev, *rho*Rev y *gyrA*Rev) y agua a 12 µl; esta mezcla fue incubada a 70 °C por 5 min; inmediatamente después, la mezcla fue colocada en hielo. A la mezcla de ARN y oligonucleótidos se le agregaron 4 µl de buffer de reacción (5X), 1 µl de inhibidor de ribonucleasa (20 u/µl) y 2 µl de dNTP's (10 mM); ésta mezcla, se incubó por 5 min a 37 °C. Terminado el tiempo de incubación, al tubo de reacción se le agregó 1 µl de reverso transcriptasa ^{Fermentas} (200 U/µl) y se incubó por 60 min a 42 °C. Por último, se detuvo la reacción con un choque de calor a 70 °C por 10 min.

VI.17 Reacción en cadena de la polimerasa-Tiempo Real

Para cuantificar la expresión de los genes *phbB* y *phbR*, se utilizaron los genes *rho* y *gyrA* como controles internos. Para los genes *rho*, *gyrA*, *phbB* y *phbR* se llevó a cabo la siguiente mezcla por triplicado de cada cepa (*ptsN*-, *ptsO*-, *ptsP*-, UW136, *orf107*- y *orf284*-): 10 µl de SYBRGREEN^{Applied Biosystem}, 1 µl de ADNcomplementario (5 ηg), 1 µl de oligonucleótido fw (250 nM), 1 µl de oligonucleótido Rev (250 nM) y 7 µl de agua estéril. Las mezclas fueron colocadas en una placa de 96 pozos y se colocó en el termociclador. Las condiciones para la PCR-RT fueron las siguientes: 1 ciclo a 95 °c. por 10 min., 1 ciclo a 95 °C por 15 segundos y 1 ciclo a 60 °C por 15 min; los dos últimos ciclos se repitieron 40 veces.

VI.18 Electroforesis de proteínas (SDS-PAGE)

Para llevar a cabo electroforesis de proteínas, se prepararon geles de poliacrilamida-sds al 14 % (ver apéndice). Los pozos del gel fueron cargados de acuerdo a la concentración

necesaria de la muestra de interés, más 1 volumen de buffer de carga (ver apéndice). Como marcador de peso molecular se utilizó SeeBlue plus2 Pre-Stained Standar ^{Invitrogen}. La electroforesis se corrió a 50 amperes, por 1 1/2 hrs en solución amortiguadora Tank (ver apéndice). Posteriormente, el gel fue teñido con una solución de azul de coomassie durante 1 hr, enseguida se lavó con una solución desteñidora por 30 min (ver apéndice). Por último, el gel fue secado para preservarlo.

VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

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

Para cuantificar la expresión de los genes *phbR* y *phbB* en las cepas mutantes del sistema PTS^{Ntr}, se llevaron a cabo experimentos de reverso transcripción PCR-RT; para llevar a cabo estos experimentos se crecieron las cepas de *A. vinelandii* en medio PY sólido suplementado con sacarosa al 2% por 30 horas. En la figura 13 se muestra el perfil de expresión del gen *phbR* en las cepas: UW136 (wt) y en las mutantes *ptsP*⁻, *ptsO*⁻ y *ptsN*⁻.

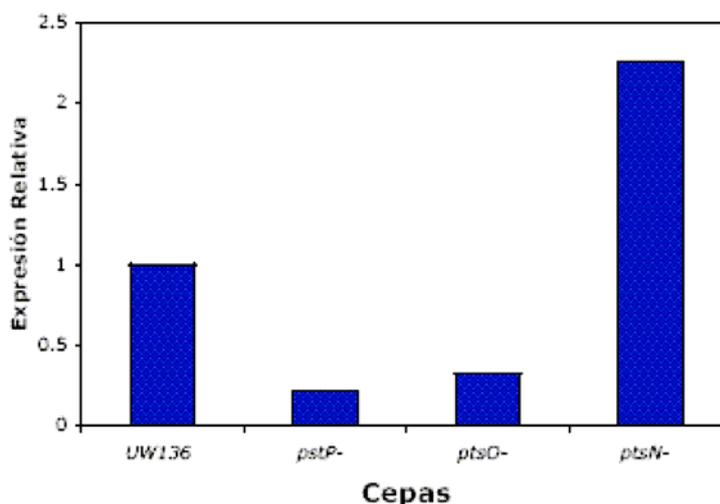


Fig. 13 Expresión del gen *phbR*

Como se esperaba, la mutación en el gen *ptsP* disminuye drásticamente la expresión del gen *phbR* (79 %), mientras que la mutación en el gen *ptsO* reduce significativamente la expresión de *phbR* (68 %). Por otro lado, la mutación en el gen *ptsN* afecta de manera positiva la expresión del gen *phbR* ya que aumenta más del doble que la cepa UW136 (125 %) (Fig. 13).

La expresión del gen *phbB* en las cepas silvestre y mutantes del sistema PTS^{Ntr} se muestra en la figura 14.

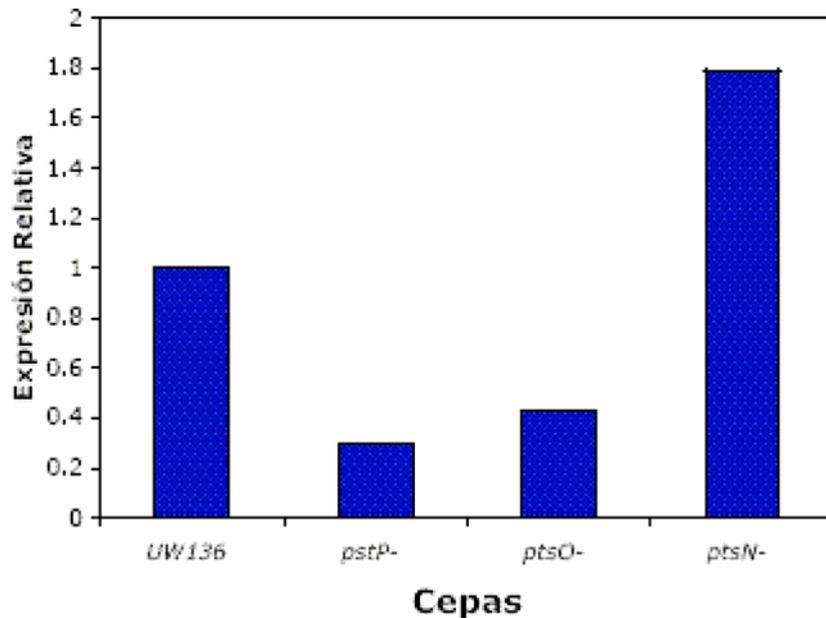


Fig. 14 Expresión del gen *phbB*

De manera similar a los resultados en la expresión de *phbR*, la mutación en los genes *ptsP* y *ptsO* afectan de manera negativa la expresión del gen *phbB* (71 % y 57 %, respectivamente). La expresión del gen *phbB* en ambas mutantes disminuye drásticamente con referencia a la cepa silvestre. Sin embargo, la mutación en el gen *ptsN* también afecta de manera positiva la expresión del gen *phbB* ya que aumenta casi el doble que la cepa silvestre (79 %).

La reducción de la transcripción de los genes *phbR* y *phbB* en las cepas mutantes en los genes *ptsP* y *ptsO*, correlacionan con los resultados obtenidos de la cuantificación de PHB en dichas cepas, donde la producción de PHB disminuye drásticamente (tabla 1). De igual

forma, el aumento en transcripción de los genes *phbR* y *phbB* en la cepa mutante *ptsN*⁻, se refleja en la cuantificación de PHB, donde la producción de dicho polímero aumenta de manera significativa. Estos resultados también confirman que el sistema PTS^{Ntr} controla a nivel transcripcional los genes *phbR* y *phbB*. y sugieren que el control de la expresión del gen *phbB* por el sistema PTS^{Ntr} es en parte un efecto indirecto a través del control de *phbR*.

VII.2 Caracterización del fenotipo de producción de PHB de las cepas mutantes en los genes *orf107* y *orf284*

VII.2.1 Análisis del producto de los genes *orf107* y *orf284*

El *orf107* codifica para una proteína hipotética de 107 aminoácidos; el alineamiento de la secuencia de aminoácidos con el banco de datos mostró que esta proteína presenta mayor identidad con proteínas hipotéticas de bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Oceanobacter* (tabla 5).

Tabla 5. Identidad de la proteína hipotética ORF107 de *A. vinelandii* con otras proteínas

Organismo	% identidad	Producto
<i>Pseudomonas mendocina</i>	87%	Proteína hipotética moduladora del factor sigma 54 proteína ribosomal S30EA
<i>P. aeruginosa</i>	86%	Proteína hipotética/ proteína asociada a ribosoma
<i>P. fluorescens</i>	77%	Proteína hipotética/ proteína asociada a ribosoma
<i>P. stutzeri</i>	77%	Proteína hipotética
<i>P. syringae</i>	76%	Proteína hipotética moduladora del factor sigma 54
<i>Oceanobacter sp.</i>	68%	Proteína hipotética/ proteína asociada a ribosoma
<i>Alcalinoborax burkumensis</i>	63%	Proteína hipotética moduladora del factor sigma 54
<i>Escherichia coli</i>	54%	Proteína hipotética moduladora del factor sigma 54

Para determinar si la proteína hipotética ORF107 presenta motivos presentes en otras proteínas, se llevó a cabo un análisis de la secuencia de aminoácidos con el programa SCANPROSITE. El resultado del análisis mostró lo siguiente: los residuos 4-7 (NISG) es un sitio potencial de N-glicosilación; los residuos 25-28 (SrIE), 57-60 (SgaE) y 100-102 (TaR) son potenciales sitios de fosforilación por Serina/treonina cinasas (fig. 15). Sin embargo, tanto la glicosilación como la fosforilación dependen del plegamiento de la proteína.

```

1 .      10 .      20 .      30 .      40 .      50
MQVNISGHQLDVTDALRDYVEEKISRLERHFDRITSVQVIMTVEKLKQKI
.
      60 .      70 .      80 .      90 .      100
EATLHVSGAEVVANAEHEDMYAAIDLLADKLDRQLIKHKEKQIERQQGA TAR

```

Fig. 15 Secuencia de aminoácidos de la proteína hipotética ORF107 de *A. vinelandii*. Los residuos en color morado representa el posible sitio de glicosilación. Los residuos en color verde representan los posible sitios de fosforilación.

Dado que en la mayoría de las especies bacterianas no se ha caracterizado la función de esta proteína (ORF107), se ha sugerido que podría tener un papel en la modulación del factor sigma 54 ya que se encuentra en el mismo locus (función sugerida en la anotación del gen)(Fig. 7). Adicionalmente, se encontró que el ORF107 presenta 80 % identidad con la región N-terminal de una proteína hipotética de *Bacillus subtilis*, la cual forma parte de proteínas ribosomales de la subunidad 30 S. Sin embargo, no se ha encontrado que mutaciones en los ortólogos del *orf107* tengan un fenotipo en el metabolismo de nitrógeno, carbono o en la síntesis de proteínas (Powell et al., 1995).

Por otro lado, el *orf284* de *A. vinelandii* codifica para una proteína hipotética de 284 aminoácidos. El alineamiento de la secuencia de aminoácidos con el banco de datos mostró que esta proteína (al igual que ORF107) presenta mayor identidad con proteínas hipotéticas homólogas de bacterias del género *Pseudomonas* (Tabla 6).

Tabla 6. Identidad de la proteína hipotética ORF284 de *A. vinelandii* con otras proteínas

Organismo	% identidad	Producto
<i>P. stutzeri</i>	88%	Proteína hipotética con P-loop de ATPasa
<i>P. fluorescens</i>	84%	Proteína hipotética
<i>Pseudomonas mendocina</i>	85%	Proteína hipotética
<i>P. aeruginosa</i>	83%	Proteína hipotética
<i>P. syringae</i>	83%	Proteína hipotética con P-loop de ATPasa
<i>P. putida</i>	83%	Proteína hipotética
<i>Escherichia coli</i>	50%	Proteína hipotética

Se llevó a cabo un análisis de la proteína hipotética ORF284 de *A. vinelandii* para encontrar motivos presentes en otras proteínas con el programa SCANPROSITE, el resultado del análisis mostró lo siguiente: los residuos 7-9 (SgR), 12-14 (SgK), 104-106 (TrR), 116-119 (SIaE), 152-154 (TIK), 204-207 (SgID), 241-243 (SnR) y 273-275 (SLK) son sitios potenciales de fosforilación por Serina/treonina cinasas; los residuos 8-15 (GrsgsGKS) presenta identidad con motivos que forman estructuras secundarias tipo P-loop que unen ATP/GTP; los residuos 99-102 (KRfS) son sitios potenciales de fosforilación por cinasas dependientes de cAMP y cGMP y por último los residuos 114-117 (NRSL) son posibles sitios de glicosilación (Fig. 16).

1 . 10 . 20 . 30 . 40 . 50
 MRVIIVSGRS^{GSGK}STALNVLEDNGFFCIDNLPVLLPELAERALLHTEL
 . 60 . 70 . 80 . 90 . 100
 LEPQVAVSIDARNLPSQLKRFPELLAEVRTRYILCDLLYLDADDKTL **KR**
 . 110 . 120 . 130 . 140 . 150
FSE**TRR**RHPLTNE_{NRSL}**AE**AIRDEGRLLTPIKDLADLKIDTTHLNLYQLR
 . 160 . 170 . 180 . 190 . 200
 D**TLK**LRLLNKPEPGTAFLIESFGFKKGMPVDADLVFDVRCLPNPYWKPD
 . 210 . 220 . 230 . 240 . 250
 RDF**SGLD**QPVADYLAVQPDVEEMYQDILTYLQKWLPRFAAS**NR**AYVTIAI
 . 260 . 270 . 280
^{GCTGGH}HRSVYLADRLGQALKQ**SLK**NVQVRHRDLC.

Fig. 16 Secuencia de aminoácidos de la proteína hipotética ORF284 de *A. vinelandii*. Los residuos en color verde representa el posible sitio de fosforilación. Los residuos subrayados representan el posible dominio de unión a ATP/GTP. Los residuos con formato superíndice representan a los posibles sitios de miristoilación. Los residuos en color amarillo representa al posible sitio de fosforilación por quinasas dependientes de cAMP y cGMP. Los residuos en subíndice representa al posible sitio de N-glicosilación.

Cabe señalar, que a pesar que esta proteína ORF284 presenta diversos sitios potenciales de modificación post-traducciona y un motivo P-loop, aún no se han caracterizado su función en *A. vinelandii* ni en sus homólogos en otras bacterias, por lo que se ha sugerido que pudiera tener un papel en la modulación del factor sigma 54 (función sugerida en la anotación del gen). Sin embargo, al igual que el orf107 no se ha encontrado un fenotipo en el metabolismo de nitrógeno y carbono (Powell et al., 1995).

Dado que no se les ha encontrado una función a las proteínas ORF107 y ORF284, en este trabajo se utilizaron mutantes en estos genes para caracterizar su efecto en la transcripción de los genes *phbR* y *phbB* y su fenotipo en cuanto a la biosíntesis de PHB.

VII.2.2 Expresión de los genes *phbR* y *phbB* en las cepas mutantes en los genes *orf107* y *orf248*

Con el objetivo de estudiar el efecto de las mutaciones en los genes *orf107* y *orf284* (los cuales están localizados en el cluster *rpoN-orf107-ptsN-orf284-ptsO*) sobre la transcripción de los genes *phbR* y *phbB* se llevaron a cabo experimentos de reverso transcripción y PCR-RT; para llevar a cabo estos experimentos se crecieron las cepas de *A. vinelandii* en medio PY sólido suplementado con sacarosa al 2% por 30 horas. La expresión de *phbR* en las cepas mutantes en los genes *orf107* y *orf284* se observan en la figura 17.

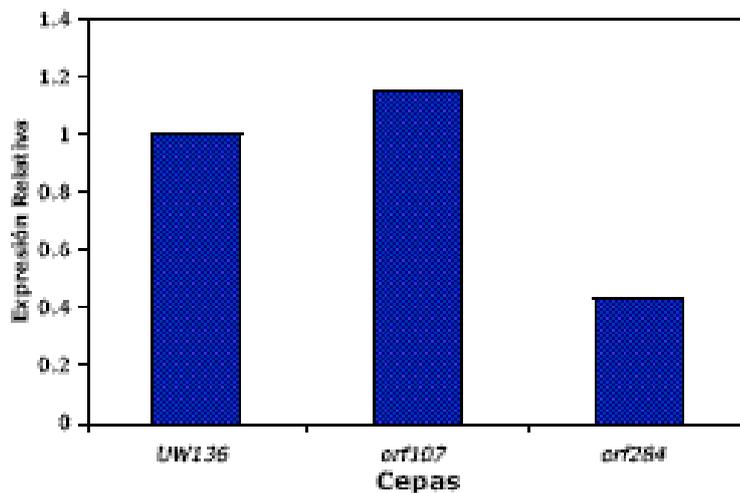


Fig. 17 Expresión del gen *phbR*

En la figura 17 se observa que la expresión del gen *phbR* en la cepa mutante *orf107* no cambia significativamente con respecto a la cepa silvestre; sin embargo, en la cepa mutante *orf284* se observa que la expresión del gen *phbR* disminuye hasta la mitad con respecto a la cepa silvestre.

Por otro lado, la figura 18 muestra la cuantificación de la expresión del gen *phbB* en las cepas mutantes en los *orf107* y *orf284*.

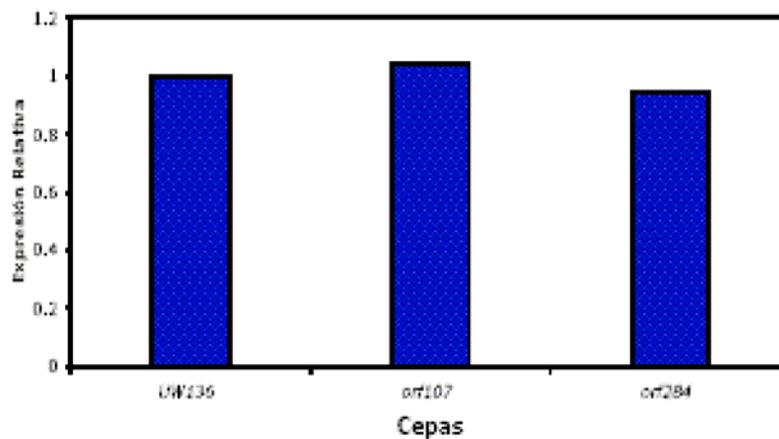


Fig. 18 Expresión del gen *phbB*

Como se observa en la figura 18, tanto en la cepa mutante *orf107* como en la cepa mutante *orf284* no se observan diferencias significativas en la expresión del gen *phbB* con respecto a la cepa silvestre.

Estos resultados sugieren que el gen *orf107* no participa en la regulación a nivel transcripcional de los genes *phbR* y *phbB*. Los resultados también muestran que la mutación en el gen *orf284* afecta de manera negativa la expresión del gen *phbR*; sin embargo, la reducción de la expresión de *phbR* no repercute en la expresión de *phbB*. Este comportamiento puede deberse a una degradación de ARNm en esa muestra (donde se reduce la expresión de *phbR*) y no a una regulación de la expresión de los genes *phbR* y *phbB*. Cabe señalar, que podría existir una regulación post-transcripcional del producto de los genes *orf107* y *orf284*, sobre PhbR y PhbB. Para estudiar esta posibilidad se cuantificó la acumulación de PHB en las cepas mutantes *orf107* y *orf284*.

VII.2.3 Cuantificación de PHB en las cepas mutantes en los genes *orf107* y *orf284*

Para corroborar los resultados de los experimentos de Reverso transcripción y Reacción en Cadena de la Polimerasa de las cepas mutantes en los genes *orf107* y *orf284* se cuantificó la acumulación de PHB en estas cepas. Las cepas fueron crecidas en medio PY sólido suplementado con sacarosa al 2 % por 96 horas. En la figura 19 se muestra la cuantificación de PHB.

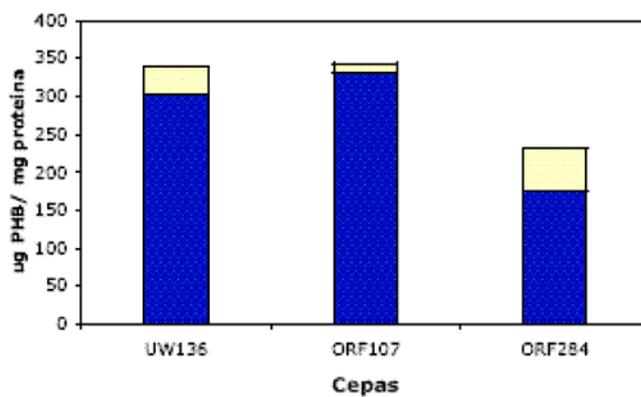


Fig. 19 Cuantificación de PHB. Las barras pequeñas indican la desviación estándar.

Los resultados de la cuantificación de PHB (fig. 19) muestran que la mutación en el gen *orf107* no tiene un efecto sobre la acumulación de PHB, ya que esta cepa produce cantidades similares de PHB a la cepa silvestre. Sin embargo, la mutación en el gen *orf284* reduce la acumulación de PHB, esta reducción es menor a la observada en el caso de las mutantes *ptsO* y *ptsP* (tabla 1). También, el fenotipo de opacidad de las cepas mutantes en los *orf107* y *orf284* muestra que no existen diferencias evidentes en la acumulación de PHB en ambas mutantes (Fig. 20).



Fig. 20 Fenotipo de opacidad (PHB) en las cepas mutantes en los genes *orf107* y *orf284*.

La caracterización de la cepa mutante en el gen *orf107*, muestran que su producto no parece participar en la regulación de la biosíntesis de PHB. Por tales motivos, en este trabajo se descarta que el producto del gen *orf107* esté participando en la regulación de la expresión de los genes de PHB.

Por otro lado, en la cepa mutante en el gen *orf284* se observa una disminución de la expresión de *phbR*, la cual no se ve reflejado en la expresión de *phbB*. Cabe señalar, que en repeticiones de experimentos de cuantificación de *phbR* en esta cepa mutante (datos no mostrados) los resultados fueron inconsistentes, de manera contraria a los observados en la cuantificación de *phbB*. La inconsistencia en las repeticiones de la cuantificación de *phbR* pudiera deberse a que los genes *rho* y *gyrA* (controles) no son buenos controles internos para cuantificar la expresión de *phbR* en esta cepa mutante *orf284*, por lo que sería interesante utilizar otros genes controles. Ahora bien, en la cepa mutante *orf284* se observa una disminución en la producción de PHB; sin embargo, esta reducción no es tan fuerte como en las cepas mutantes *ptsO* y *ptsP* (tabla 1). Dado que la mutación en el *orf284* no

presenta una disminución tan marcada de PHB como las mutantes *ptsO* y *ptsP*, se puede concluir que el producto de este gen tiene una participación menor en la regulación de los genes de PHB.

VII.3 Construcción del plásmido pALA8, que lleva el gen *ptsN* (H68A)

Debido a que la hipótesis de este trabajo es que la proteína IIA^{Ntr} en su estado no fosforilado interacciona con algún intermediario que regula a nivel transcripcional el gen *phbB*, se construyó el plásmido pALA8 que contiene el gen *ptsN* (H68A). El gen *ptsN* (H68A) lleva una mutación en el sitio propuesto de fosforilación, la mutación consiste en el cambio del codón que codifica para la histidina 68 por alanina, provocando que IIA^{Ntr}(H68A) se encuentre siempre en estado no fosforilado. Los detalles de la construcción del plásmido pALA8 se describen en la sección de materiales y métodos.

VII.4 Estudio del efecto del reemplazamiento del gen *ptsN* silvestre por una versión mutante, codificante de una versión no fosforilable

Los fenotipos de las cepas mutantes del sistema PTS^{Ntr} (*ptsO*, *ptsP* y *ptsN*) sugieren que la proteína IIA^{Ntr} en su estado no fosforilado afecta negativamente la acumulación de PHB. Con el objetivo de conocer si el estado de fosforilación de la proteína IIA^{Ntr} afecta la acumulación de PHB en *A. vinelandii*, se transformó la cepa UW136 con el plásmido pALA8, el cual lleva el gen *ptsN* que tiene un cambio de codón de una histidina por una alanina y no se replica en *A. vinelandii*; se seleccionaron colonias en las que ocurrió la cointegración del plásmido en su cromosoma.

El plásmido pALA8 puede cointegrarse de dos formas: en la primera, el plásmido se cointegra de la manera en que el gen *ptsN* (*H68A*) queda río arriba por lo que se espera que se exprese normalmente, mientras que el gen *ptsN* silvestre queda río abajo y sin promotor. En la segunda forma, el plásmido pALA8 cointegra de modo que el gen *ptsN* silvestre se expresa y el gen *ptsN* (*H68A*) queda sin promotor. La cointegración deseada es la primera como se muestra en la fig. 21 b. Cabe mencionar que la cointegración del plásmido pALA8 no afecta la expresión de los genes localizados río abajo de la cointegración.

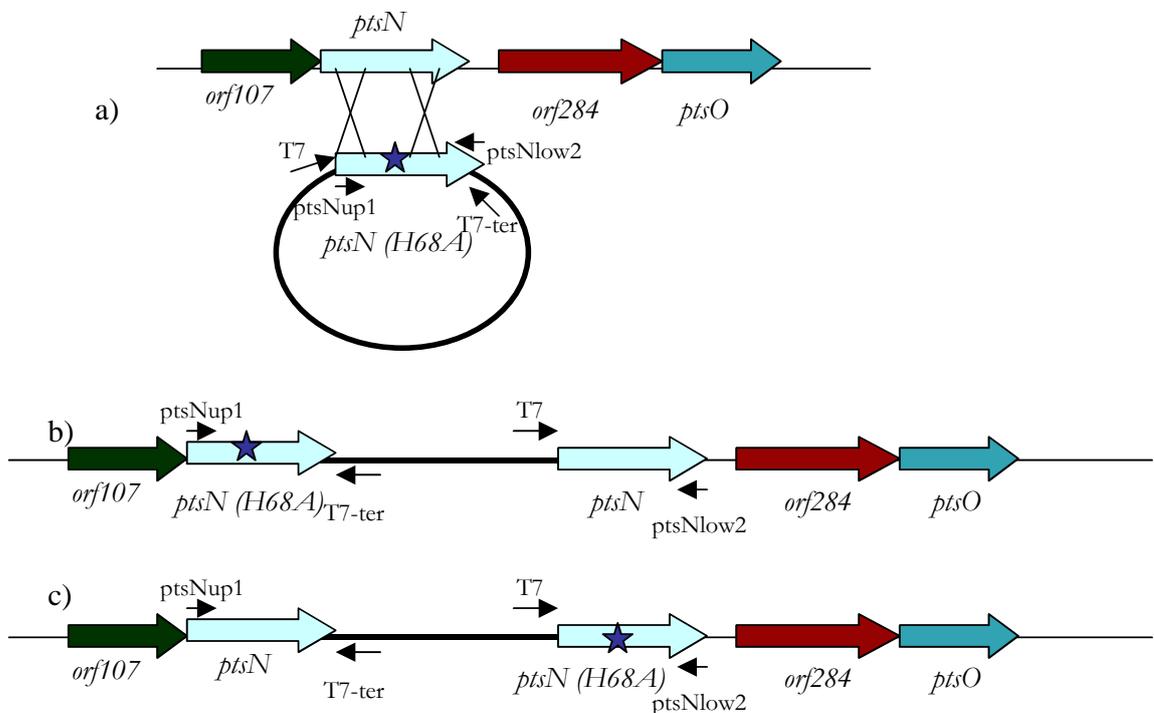


Fig. 21 Cointegración del plásmido pALA8 en el cromosoma de *A. vinelandii*. a) Formas de cointegración del plásmido pALA8. b) Primer arreglo genético del locus *rpoN-orf107-ptsN* (*H68A*)-*ptsN-orf284-ptsO* después de la cointegración del plásmido pALA8. c) Segundo arreglo genético del locus *rpoN-orf107-ptsN-ptsN* (*H68A*)-*orf284-ptsO* después de la cointegración del plásmido pALA8. La estrella en la figura representa el cambio de codón en el gen *ptsN*, el cual la hace no fosforilable. Las flechas representan los oligos utilizados.

Para descartar la posibilidad de que la cointegración del plásmido pALA8 por sí solo y no el cambio del gen *ptsN* (*H68A*) por *ptsN* silvestre afectara la acumulación de PHB, se procedió a cointegrar por separado el plásmido pALA7 (*ptsN* silvestre) en la cepa UW136, dando como resultado la cepa UW12.

Las colonias transformadas fueron seleccionadas con kanamicina. Para elegir las colonias que recombinaron de la manera deseada, se amplificó por PCR el gen *ptsN* que quedó arriba utilizando los oligonucleótidos ptsNup1, T7-ter (fig. 21) y ADN cromosomal de las colonias transformantes; se confirmó por secuencia la presencia de la mutación H68A. En la figura 22 se observan los productos de la amplificación de 500 pb que posteriormente fueron purificados y secuenciados.

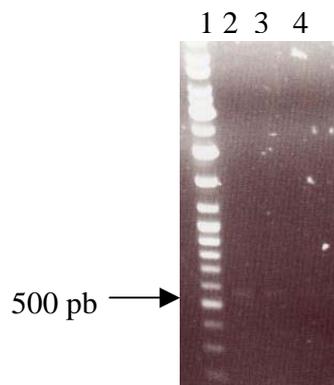


Fig. 22 Amplificación del gen *ptsN* (*H68A*). Carril 1: MPM 1 kb fermentas, carril 2: *ptsN* *H/A* de la cepa candidata UW4, carril 3; *ptsN* (*H68A*) de la cepa candidata UW5 y carril 4: *ptsN* (*H68A*) de la cepa candidata UW74.

El resultado de la amplificación y del análisis de la secuencia indicó que la cointegración se había llevado de manera que la versión *ptsN* (*H68A*) quedó bajo el control de su promotor en las tres cepas candidatas. Para conocer el fenotipo de estas cepas mutantes, se crecieron en medio PY sólido suplementado con sacarosa al 2 % por 96 horas. En la figura 23 se muestra el fenotipo de las cepas mutantes.

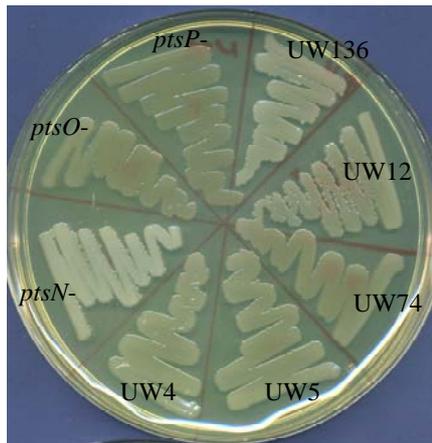


Fig. 23 Fenotipos de opacidad (PHB) de *A. vinelandii* crecidas en medio PY durante 4 días. UW136 es la cepa silvestre, las cepas mutantes del sistema PTS^{Ntr} son: *ptsP*⁻, *ptsO*⁻ y *ptsN*⁻. La cepa UW12 es la cepa UW136 complementada con el plásmido pALA7 (*ptsN* silvestre), y es utilizada como control. UW4, UW5 y UW74 son las cepas transformadas con el plásmido pALA8 (*ptsN* (H68A)).

Como se puede observar en la figura 23, la acumulación de PHB en las cepa UW136, *ptsN*⁻ y UW12 produce un fenotipo blanco opaco; mientras que la cointegración del plásmido pALA8 (*ptsN* (H68A)) en las cepas UW4, UW5 y UW74 produce un fenotipo menos opaco que las cepas UW136 y UW12. Lo anterior muestra que la proteína IIA^{Ntr}(H68A) (*ptsN* (H68A)) tiene un efecto negativo sobre el fenotipo de opacidad (PHB).

De las tres cepas se procedió a tomar la cepa UW74 y crecerla en medio PY sólido suplementado con sacarosa al 2 % por 96 horas y cuantificar la acumulación de PHB. La figura 24 muestra los resultados de la cuantificación de PHB.

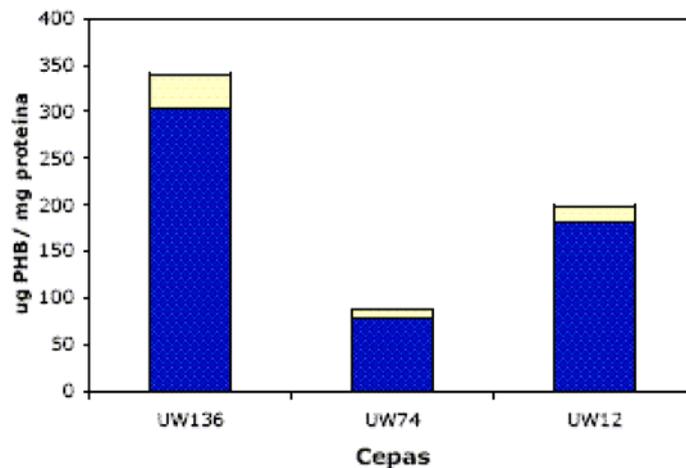


Fig. 24 Cuantificación de PHB. Las barras pequeñas indican la desviación estandar.

Como se esperaba, en la cepa UW74 la acumulación de PHB se vio afectada fuertemente; sin embargo, la mutación no abatió la acumulación de este polímero. Por otro lado, en la cepa control UW12 la acumulación de PHB disminuyó, pero esta disminución no fue tan fuerte a comparación de la cepa UW74.

Lo anterior muestra que la proteína $IIA^{Ntr}(H68A)$ tiene un efecto negativo en la acumulación de PHB (fig. 24). Cabe señalar que en la cepa UW74 no abatió al mismo nivel que las mutantes *ptsP* y *ptsO* la acumulación de PHB como se esperaba (tabla 1). Esto puede deberse a dos posibilidades: la primera posibilidad es que debido a que *A. vinelandii* es una bacteria poliploide, la cointegración del plásmido pALA8 no se llevó a cabo en todos los cromosomas de la bacteria por lo que aún existirían copias silvestres del gen *ptsN* expresándose, resultando en una baja acumulación de PHB. La segunda posibilidad es que, la copia del gen *ptsN* silvestre desplazada por el evento de cointegración aún presente una fuga de expresión.

Sin embargo, el efecto negativo sobre PHB en la cepa UW74 apoya la hipótesis de que la proteína IIA^{Ntr}(H68A) (en su estado no-fosforilado) regula de manera negativa la expresión de los genes de PHB. La identificación de los intermediarios entre la proteína IIA^{Ntr} no fosforilada y la región de regulación de los genes de PHB confirmaría esta hipótesis. Para buscar los intermediarios se llevaron a cabo experimentos de interacción *in-vitro* de proteínas.

VII.5 Expresión de la proteína IIA^{Ntr} (H68A)

Con la finalidad de llevar a cabo experimentos de interacción *in-vitro* de proteínas, el plásmido pALA8 se introdujo en la cepa BL21 de *E. coli*, seleccionando las transformantes en medio LB con kanamicina. De las colonias que fueron transformadas, se aisló una y se utilizó en primera instancia para hacer ensayos de expresión de la proteína IIA^{Ntr}(H68A). Para lo anterior, como se describe en materiales y métodos, se utilizaron 3 concentraciones del inductor IPTG (100ug/ml, 250 ug/ml y 500 ug/ml). Al final del tiempo de cultivo, las células fueron lisadas y con el extracto total se llevaron a cabo experimentos tipo SDS-PAGE. La figura 25 muestra estos resultados.

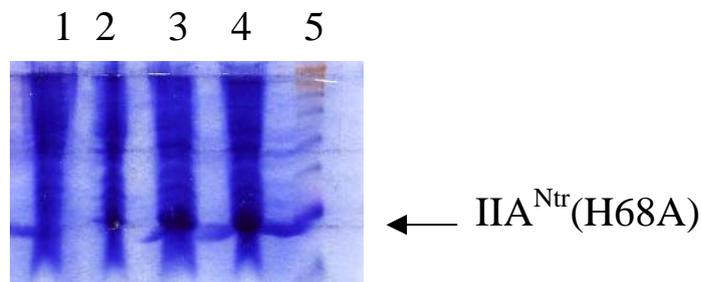


Fig. 25 Electroforesis en gel-sds de capas expresando IIA^{Ntr}(H68A)(extracto total). Carril 1: Extracto de células sin inducir, carril 2: extracto de células con 100 ug/ml de inductor, carril 3: extracto de células con 250 ug/ml de inductor, carril 4: extracto de células con 500 ug/ml de inductor y carril 5: MPM.

Como se observa en la figura 25, la proteína IIA^{Ntr} (H68A) se esta expresando en la cepa BL21. La expresión de esta proteína es dependiente de la concentración de IPTG, ya que aumenta su cantidad conforme aumenta la cantidad de inductor. Para futuros experimentos de expresión se estandarizó la concentración de inductor a 300 ug/ml. Dado que en algunos experimentos de clonación de otros genes en el mismo vector de expresión (pET24a) se encontró que los genes se expresaban, pero los productos se localizaron en cuerpos de inclusión y no eran funcionales, se procedió a realizar un experimento tipo SDS-PAGE con la fracción soluble de la cepa BL21 (con el plásmido pALA8) para descartar esta posibilidad. En la figura 26 se observa el gel desnaturalizante de proteínas con la fracción soluble.

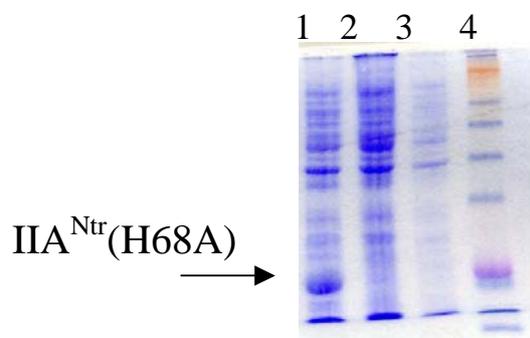


Fig. 26 Electroforesis en gel-sds que muestra la ubicación de la proteína IIA^{Ntr} (H68A) en la fracción soluble. Carril 1: fracción soluble de células inducidas, carril 2: fracción soluble de células sin inducir, carril 3: fracción soluble de células sin vector y sin inductor, carril 4: MPM.

El experimento anterior, muestra que la proteína IIA^{Ntr}(H68A) se encuentra en la fracción soluble (figura 26, carril 1). Esto nos dio la seguridad de que era factible utilizar la proteína IIA^{Ntr}(H68A) en experimentos de interacción *in-vitro* de proteínas (Pull-Down).

VII.6 Ensayo de interacción *in-vitro* de proteínas “Pull-Down”

Con la finalidad de buscar intermediarios entre la proteína IIA^{Ntr}(H68A) y la región de regulación de los genes de la biosíntesis de PHB, se llevó a cabo el ensayo de interacción *in-vitro* de proteínas como se describe en materiales y métodos. Para el ensayo se utilizó a la proteína IIA^{Ntr}(H68A) como cebo y extracto proteico de la cepa mutante *ptsN*- de *A. vinelandii* como presa. En la figura 27 se muestran las proteínas que eluyeron al final del ensayo, analizadas en SDS-PAGE.

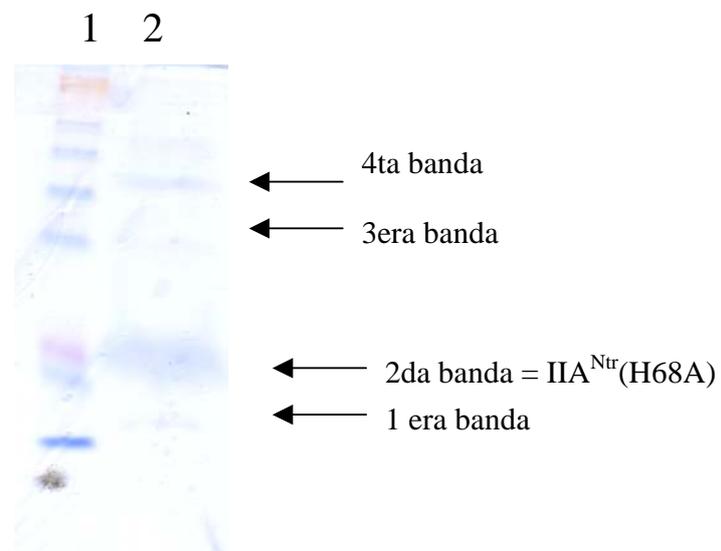


Fig. 27 Análisis electroforetico en gen SDS-PAGE de proteínas encontradas en el ensayo de interacción *in-vitro* de proteínas. Carril 1: MPM, carril 2: proteínas que posiblemente interaccionen con la IIA^{Ntr}(H68A).

En la figura 27, carril 2 se observan 4 bandas que corresponden a proteínas que eluyeron de la minicolumna en el ensayo Pull-Down, las cuales corresponden a proteínas de 8, 17, 36 y 50 kDa aproximadamente. Estas bandas fueron cortadas en condiciones de esterilidad y se

mandaron a secuenciar por el método de MALDI. El resultado de la secuenciación de las proteínas indicó lo siguiente: la primera banda de 8 kDa aproximadamente, no pudo ser secuenciada; la segunda banda de 17 kDa (aproximadamente) corresponde a la proteína IIA^{Ntr}(H68A), la tercera banda de 35 kDa (aproximadamente) corresponde a una proteína de *A. vinelandii* llamada **Enoil-CoA hidratasa/isomerasa** y la cuarta banda de 52 kDa (aproximadamente) es una proteína de *A. vinelandii* llamada **4-aminobutirato aminotransferasa**. En repeticiones de este experimento se lograron observar bandas del similar peso molecular que las encontradas en los resultados anteriores; sin embargo, en las repeticiones no se pudo identificar las proteínas por problemas de contaminación con queratinas. Es importante señalar que en el primer experimento no se utilizaron controles negativos para evitar interacciones inespecíficas de proteínas de *E. coli* y *A. vinelandii*; pero, en las repeticiones se utilizaron ambos controles negativos y las proteínas que se lograron identificar no se encontraron en los controles negativos.

La primera banda encontrada en el experimento anterior, aunque no pudo ser secuenciada, pudiera corresponder a la proteína Npr (que pertenece al sistema PTS^{Ntr}) ya que se encuentra en el tamaño aproximado del 9 kDa. En *E. coli*, se ha observado que la proteína Npr interacciona con la proteína IIA^{Ntr} fosforilándola, de modo que en *A. vinelandii* se podría confirmar esta interacción secuenciando esta banda (Lee et al., 2005).

La tercera banda encontrada en la posible interacción con IIA^{Ntr}(H68A) corresponde a la proteína enoil-CoA hidratasa/isomerasa, la cual pertenece a una superfamilia de enzimas llamadas crotonasas. Las crotonasas participan en una gran variedad de mecanismos, entre los cuales se encuentran: dehalogenación, hidratación, deshidratación, descarboxilación,

formación y corte de uniones C-C e hidrólisis de grupos thioester (Hazel et al, 2001). En particular, la enzima enoil-CoA hidratasa/isomerasa lleva a cabo la conversión de 2-trans-enoil-CoA en (S)-B-hidroxiacil-CoA en las vías de metabolismo de lípidos. Se ha reportado en cepas recombinantes de *Saccharomyces cerevisiae* que esta enzima, está involucrada en la degradación de lípidos, afecta la producción de intermediarios para la síntesis de PHA's (Robert et al., 2005). De manera similar, la enzima enoil-CoA hidratasa/isomerasa de *A. vinelandii* (no caracterizada) pudiera estar involucrada en la vía de degradación de lípidos con la finalidad de producir intermediarios para la biosíntesis de PHB. Si existiera interacción de IIA^{Ntr}(H68A) con la enoil-CoA hidratasa/isomerasa, IIA^{Ntr}(H68A) pudiera estar regulado negativamente la actividad de esta enzima por interacción con ella; lo anterior provocaría, una disminución en la producción de posibles intermediarios para la biosíntesis de PHA'S reflejándose en la acumulación de estos polímeros. Para comprobar esto, sería necesario confirmar esta interacción por medio de experimentos tipo "dos híbridos", junto con la medición de la actividad de esta enzima en diferentes mutantes del sistema PTS^{Ntr}, así como el efecto de una mutación en el gen de la enoil-CoA hidratasa/isomerasa sobre la síntesis de PHB.

Por último, la cuarta banda encontrada corresponde a la enzima 4-aminobutirato aminotransferasa. En *P. aeruginosa*, esta enzima participa en la vía de metabolismo de arginina; especialmente, la 4-aminobutirato aminotransferasa cataliza la formación de semialdehído succínico a partir de 4-aminobutirato (Voellmy et al., 1976). En *E. coli*, esta enzima participa en el metabolismo de putrecina, y su actividad aumenta cuando existe limitación de nitrógeno en el medio de cultivo (Schenider et al., 2002). En *A. vinelandii*, la 4-aminobutirato aminotransferasa no ha sido caracterizada; el gen que codifica para esta

enzima está localizado en un grupo de genes cuyos productos participan en el metabolismo de aminoácidos, lo que podría indicar que la 4-aminobutirato aminotransferasa esta involucrada en el metabolismo de nitrógeno. Ahora bien, la posible interacción de la proteína IIA^{Ntr}(H68A) con la enzima 4-aminobutirato aminotransferasa pudiera estar regulando su función en el metabolismo de nitrógeno; sin embargo, como se mencionó anteriormente para confirmar esta interacción habría que llevarse a cabo diversos experimentos adicionales.

Los experimentos de interacción *in-vitro* de proteínas pudiera mostrar que el sistema PTS^{Ntr}, en especial la proteína IIA^{Ntr} pudiera estar involucrada en la regulación a nivel post-transcripcional de enzimas que participan en el metabolismo de lípidos y aminoácidos. El objetivo al llevar a cabo experimentos de este tipo era encontrar uno (o más) posible regulador transcripcional que controlara la expresión del operón *phbBAC*, lo cual no se ocurrió. Una posible explicación al no encontrar un posible regulador transcripcional es que la concentración de reguladores transcripcionales en las células es baja y el ensayo *in-vitro* de proteínas se lleva a cabo en minicolumnas con microvolúmenes, lo que provocaría que al final del experimento se recuperaran cantidades mínimas de proteína que no se pueden observar en un gel de poliacrilamida. Para solucionar esto, sería conveniente llevar a cabo experimentos de interacción *in-vitro* con columnas de mayor volumen, así como tener mas concentrada la proteína cebo IIA^{Ntr}(H68A) y mayor cantidad de extracto proteico de *A. vinelandii*.

VIII. CONCLUSIONES

- La proteína IIA^{Ntr} de *A. vinelandii*, en su estado no fosforilado, ejerce un efecto negativo sobre la biosíntesis de PHB.
- El control de la síntesis de PHB por el sistema PTS^{Ntr} se da a nivel transcripcional sobre la expresión de los genes *phbR* y *phbB*.
- Las proteínas enoil-CoA hidratasa/isomerasa y 4-aminobutirato aminotransferasa son posibles blancos de interacción con la proteína IIA^{Ntr} no fosforilada.
- Tanto el análisis de la transcripción de los genes *phbR* y *phbB*, como la cuantificación de PHB en la cepa mutante *orf107*, sugieren que el producto de este gen no tienen una participación en la regulación de la biosíntesis de PHB.
- El análisis de la transcripción de los genes *phbR* y *phbB*, y la cuantificación de PHB en la cepa mutante *orf284*, sugieren que el producto de este gen tiene un efecto negativo sobre la biosíntesis de PHB, aunque este efecto es moderado.

IX. PERSPECTIVAS

- Comprobar la interacción *in-vivo* de la proteína IIA^{Ntr} con las enzimas enoil-CoA hidratasa/isomerasa y 4-aminobutirato aminotransferasa a través de experimentos con un sistema de “dos híbridos”.

- Continuar con los experimentos de interacción *in-vitro* de proteínas modificando condiciones para buscar el posible intermediario en el control de la transcripción de *phbR* y *phbB*, así como otras proteínas que interactúen con IIA^{Ntr}.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Anderson, A. and Dawes, E. A. (1990). Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54(4):450-472.
- Anderson, A. J., Koiv, V., Norman-Setterblad, C. and Pirhonen, M. (1999). Role of RpoS in virulence and stress tolerance of plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Microbiol.* 145: 6547-3556.
- Barik, S. and Galinski, M. S. (1991) Megaprimer method of PCR: increased template concentration improves yield. *Bio-Techniques.* 10:489-490
- Cases, I., Perez-Martin, J. and de Lorenzo, V. (1999). The IANtr (ptsN) protein of *Pseudomonas putida* mediates the C source inhibition of the sigma54-dependent Pu promoter of the TOL plasmid. *J. Biol. Chem.* 274:15562-8.
- Hanahan D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol.* 166:557-80.
- Hazel, M., Bening, M., Haller, T. and Gerlt, J. (2001). The crotonase superfamily: divergently related enzymes that catalyze different reactions involving acyl coenzymes a thioesters. *Acc. Chem. Res.* 34, 145-157
- Higa, F. and Edelstein, P. H. (2001). Potential virulence role of the *Legionella pneumoniae* *ptsP* ortolog. *Infect. Immun.* 69:4782-4789.
- Kennedy, C., and Toukdarian. (1987). Genetics of *Azotobacters*: applications to nitrogen fixation and related aspects of metabolism. *Ann. Rev. Microbiol.* 41:227-258.
- Lee, C., Koo, B., Cho, S., Kim, Y., Yoon, M., Peterkofsky, A. and Seok, Y. (2005). Requeriment of the dephospho-form of enzyme IANtr for derepression of *Escherichia coli* K12 *ilvBN* expression. *Mol. Microbiol.* 58:334-44

Madison, L. and Huisman, G. (1999). Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Rev.* 63:21-53

Martinez-Salazar, J. M., Moreno, S., Nájera, R., Boucher, J.C., Espín, G., Soberon, G and Deretic, V. (1996). Characterization of the genes coding for the putative sigma factor AlgU and its regulators MucA, MucB, MucC and MucD in *Azotobacter vinelandii* and evaluation of their roles in alginate biosynthesis. *J. Bacteriol.* 178:1800-1808.

Michiels, J., Van, S. T., D'hooghe, I., Dombrecht, B., Benhassine, T., Wilde, P. and Vanderleyden, J. (1998). The *Rizobium etli rpoN* locus: DNA sequence analysis and phenotypical characterization of *rpoN*, *ptsN* and *ptsA* mutants. *J. Bacteriol.* 180:1729-1740.

Merrick, M. J. and Coppard J. R. (1988). Mutations in genes downstream of the *rpoN* gene (encoding s54) of *Klebsiella pneumoniae* affect expression from s54-dependent promoters. *Mol. Microbiol.* 3:1765-1775.

Noguez, R., Moreno, S., Segura, D., Hernandez, A., Juarez, K. and Espín, G. (2007). Genetic characterization of the *Azotobacter vinelandii* nitrogen-related phosphotransferase system (PTS-Ntr) and its role in regulating transcription of the polyhydroxybutyrate *phbBAC* biosynthetic operon. **Publicación aceptada.**

Peralta-Gil, M., Segura, D., Gúzman, J., Servín-González, L. and Espín, G. (2002). Expression of the *Azotobacter vinelandii* Poly- β -Hydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on transcriptional activator *phbR*. *J. Bacteriol.* 184:5672-5677.

Postma, P. W., Lengeler, J. W. and Jacobson, G. R. (1996). Phosphoenolpyruvate: Carbohydrate phosphotransferase systems. In: *Escherichia coli* and *Salmonella* (cellular and molecular biology). Neidhardt F. C. N., Curtis, R., Ingraham, J.L., Lin, C.C., Brooks, K. L.,

Powell, B. S., Court, D. L. Inada, T., Nakamura, Y., Michotey, V., Cui, X., Reizer, A., Saiser, M. H. and Reizer, J. (1995). Novel proteins of the Phosphotransferase System encoded withing the *rpoN* operon of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 270:4822-4839.

Rabus, R., Reizer, A., Merric, M. J., Paulsen, I. and Saiser, M. H. (1999). Enzyme I^{ntr} from *Escherichia coli*, a novel enzyme of the phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system exhibiting strict specificity for its phosphoryl acceptor, *Npr*. *J. Biol. Chem.* 274:26185-26191.

Reitzer, J., Reizer, A., Merric, M., Plunkett III, G., Debra, J. R. and Saier, M. H. (1996). Novel phosphotransferase-encoding genes revealed by analysis of the *Escherichia coli* genome: a chimeric gene encoding an enzyme I homologue that possesses a putative sensory transduction domain. *Gene*. 181:103-108.

Ritchie, G.A. and Dawes, E. A. (1969). The non-involvement of acyl-carrier protein in poly-beta-hydroxybutyric acid biosynthesis in *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem J.* 112:803-5.

Robert, J., Marchesini, S., Delessert, S. and Poirier Y. (2005). Analysis of the B-oxidation of trans-unsaturated fatty acid in recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing a peroxisomal PHA synthase reveals the involvement of a reductase-dependent pathway. *Biochem. Biophys Acta* 1734 :169-177

Saad, B., Hirt, T. D., Welti, M., Uhlschmid, G. K., Neuenschwander, P. and Suter, U. W. (1999). Development of degradable polyesterurethanes for medical applications: in vitro and in vivo evaluations. *J. Biomed. Mater. Res.* 36:65-74.

Sadoff, H. L. (1975). Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriol Rev.* 39:516-39.

- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Press, Cold Spring Harbor. N.Y.
- Scheider, B., Ruback, S., Kiupakis, K., Kasbarian, H., Pybus, C. and Reitzer, L. (2002). The *Escherichia coli gabDTPC* operon: specific γ -aminobutyrate catabolism and nospecific induction. *J. Bacteriol.* 6976-6986.
- Segura, D. y Espín, G. (1998). Mutational inactivation of gene homologous to *Escherichia coli ptsP* affects poly-(3)-hydroxybutyrate accumulation and nitrogen fixation. *J. Bacteriol.* 180 (18):4790-4798.
- Segura, D., Vargas, E. and Espín, G. (2000). β -Ketothiolase genes in *Azotobacter vinelandii*. *Gene* 260:113-120.
- Segura D, Cruz T. and Espin G. (2003). Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly-beta-hydroxybutyrate synthesis. *Arch Microbiol.* 179:437-43.
- Senior, P., Beech, G., Ritchie, G. and Dawes, E. (1972). The role of oxygen limitation in the formation of poly-B-hydroxybutyrate during batch and continuous culture of *Azotobacter beijerinckii*. *Biochem. J.* 128: 1193-1201.
- Tan, M. W., Rahme, L. G., Sternberg, J. A., Tomkins, R. A. and Ausubel, F. M. (1999). *Pseudomonas aeruginosa* killing of *Ceanorhabditis elegans* used to identify *P. aeruginosa* virulence factors. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 96:2408-2413.
- Van Der Walle, G., De Koning, G., Weusthuis, R. And Eggink, G. (2001) Properties, modifications and applications of biopolyesters. *Adv. Biochem. Eng. Biotech.* 71: 263-291
- Voellmy, R. And Leisingger, T. (1976). Role of 4-aminobutyrate aminotransferase in the arginine metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 722-729

Watson, J. D., Hopkins, N. H., Roberts, J. W., Steitz, J. A. and Weiner, A. M. C. (1988). Molecular biology of the gene. The Benjamín/Cummings Publishing Company Inc. Fourt Edition, Vol. I pag. 195.

Williams, S., Martín, D., Horowitz, D. and Peoples, O. (1999). PHA applications: addressing the price performance issue I. Tissue engineering. *In. J. Biol. Macromol.* 25:111-121.

Zinn, M., Witholt, B. and Egli, T. (2001). Ocurrence, síntesis and medicañ application of bacterial polyhydroxyalkanoate. *Adv. Drug. Del. Rev.* 53: 5-21.

XI. APÉNDICE

Soluciones utilizadas en la extracción de ADN plasmídico

Solución I

Reactivo	Concentración
Tris · Cl (pH 8)	25 mM
EDTA (pH 8)	10 mM
Glucosa	50 mM

La solución se esterilizó a 120 °C por 20 minutos.

Solución II

Reactivo	Concentración
NaOH	0.2 N
SDS	2 %

Solución III, para 100 ml.

Reactivo	Volúmen
Acetato de Potasio (5 M)	60 ml
Ácido acético glacial	11.5 ml
H ₂ O	28.5 ml

Soluciones utilizadas en la extracción de ADN cromosomal

Solución amortiguadora TE (g/l).

Reactivo	Cantidad
Tris · Cl (10 mM)	1.57 g
EDTA (1 mM)	0.372 g

Se aforó a un litro y se ajustó a un pH de 7.4 con NaOH.

Solución CTAB 10 % / NaCl 0.7 M (g/l).

Reactivo	Cantidad
CTAB 10 %	100 g
NaCl (0.7 M)	40.9 g

Se aforó a un litro.

Electroforesis de ADN en gel de agarosa al 1 %

Solución amortiguadora de acetatos 10X. Para 1 litro.

Reactivo	Cantidad
Tris Base	48.4 g
Ácido acético glacial	22.48 ml
EDTA hidratado	37.22 g
H ₂ O	988 ml
Agarosa al 1%	1 Gramo de agarosa por cada 100 ml de tris acetato a 1X.

Electroforesis de proteína en gel de acrilamida al 14 %

Solución amortiguadora Tank 1 X. Para 1 litro.

Reactivo	Cantidad
Tris Base	12 g
Glicina	57.6 g
SDS 10 %	40 ml
H ₂ O	Aforar a 1 L

Mezcla para el gel de acrilamida al 14%.

Reactivo	Cantidad	
	Gel separador	Gel concentrador
Acrilamida al 30% y Bis-acrilamida 2.7 %	4.62 ml	0.67 ml
Tris-Cl 1.5 M pH 8.8	2.5 ml	-
Tris-Cl 0.5 M pH 6.8	-	1.25 ml
SDS 10 %	0.10 ml	0.050 ml
H ₂ O	2.72 ml	3 ml
Persulfato de Amonio 10 %	0.050 ml	0.025 ml
TEMED	0.005 ml	0.002 ml
Volumen Final	10 ml	5 ml

Solución para teñir el gel de acrilamida.

Reactivo	Volumen
Azul de Coomassie R-250 al 1%	31.25 ml
Matanol	125 ml
Ácido acético	25 ml
H ₂ O	aforar a 250 ml

Solución para desteñir el gel.

Reactivo	Volumen
Metanol	250 ml
Ácido acético	50 ml
H ₂ O	Aforar a 500 ml

Buffer de carga.

Reactivo	Volumen
Tris-Cl 0.5 M pH 6.8	2.5 ml
SDS 10 %	4.0 ml
Glicerol	2.0 ml
2-mercaptoetanol	1.0 ml
H ₂ O	Aforar a 10.0 ml

Solución reactiva para cuantificación de proteína por el método de Lowry

La solución reactiva para 100 ml contiene: 1 ml de solución C + 1 ml de solución B + 98 ml de solución A.

Solución	Reactivo
A	Na ₂ CO ₃ 2 % en NaOH 0.1 N
B	Tartrato de Na y K 2%
C	CuSO ₄ 1%

Curva Estandar y ecuación usada para la cuantificación de proteína

