



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Sistema phbF-phbP en Azotobacter vinelandii

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

PABLO CANALES HERRERÍAS

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. ELDA GUADALUPE ESPIN OCAMPO

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

ÍNDICE

Introducción	2
<i>PHA</i>	2
<i>Azotobacter vinelandii</i>	3
<i>PHB</i>	4
<i>Fasinas</i>	5
<i>Regulación de Fasinas</i>	12
<i>Antecedentes en A. vinelandii</i>	15
Hipótesis	19
Objetivos	19
Resultados y Discusión	20
<i>Construcción de cepas de A. vinelandii</i>	20
<i>Fenotipo de producción de PHB</i>	21
<i>Cinética de acumulación de PHB</i>	22
<i>Microscopía electrónica</i>	25
<i>Efecto transcripcional de la mutación en phbF</i>	26
<i>Proteoma de los gránulos de PHB</i>	27
Discusión y Conclusiones	33
La fasina phbP	33
El regulador phbF	34
Métodos	37

<i>Procedimientos microbiológicos</i>	37
<i>Construcción de las mutantes <i>phbP1Δ</i> y <i>phbFΔ</i></i>	38
<i>Medición de PHB</i>	38
<i>Microscopía electrónica</i>	39
<i>RT-PCR Cuantitativo</i>	39
<i>Análisis proteómico del gránulo</i>	39
Bibliografía_____	41

INTRODUCCIÓN

PHA

El problema de la contaminación por plásticos, sumado al aumento en los precios del petróleo y a las altas tasas de emisión de dióxido de carbono, han provocado durante los últimos años un impulso en el desarrollo de los bioplásticos, un grupo de polímeros biodegradables que pueden tener características parecidas a las de los plásticos convencionales. Algunas bacterias pueden producir distintos tipos de monómeros, precursores de los plásticos, a partir de fuentes renovables. Para poder mejorar los procesos de producción de estos materiales es necesario entender la biología de los organismos productores y en particular los mecanismos celulares involucrados en estos procesos.

Entre los monómeros que se pueden producir se encuentran los hidroxialcanoatos, un grupo de moléculas de estructura variable (fig.1), que normalmente se encuentran en su estado polimerizado; los polihidroxialcanoatos (o PHA). Los PHAs son poliésteres formados por monómeros de hidroxialcanoatos, los cuales son polimerizados de manera lineal. A diferencia de los demás tipos de monómeros, la polimerización de los PHAs se realiza *in vivo* dentro de las células, mediante la formación de enlaces tipo éster entre los monómeros, y se almacena dentro de las mismas. Entre los bioplásticos, los PHAs tienen las características físicas y químicas más variables (Guo-Qiang Chen, 2010).

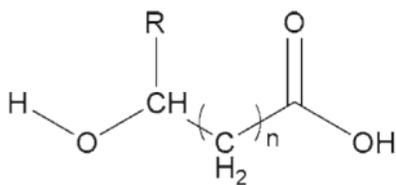


Figura 1. Hidroxialcanoato:

El número de carbonos n varía entre 0 y 5, y el grupo R puede ser alquil o bencil.

El primer reporte de un polímero como estos en células bacterianas es de 1926, cuando Maurice Lemoigne describió un poliéster aislado de *Bacillus megaterium*: el polihidroxibutirato (PHB), un miembro de la familia de los PHA, conformado por unidades de hidroxibutirato. Hoy sabemos que el PHB es el polímero de reserva de diversos grupos de bacterias que pueden producir y polimerizar al ácido [R]-3-hidroxibutírico.

Estos polímeros pueden ser sintetizados por muchas de las bacterias que habitan el suelo y por otras bacterias del mar o de climas extremos, las cuales se encuentran distribuidas en más de 90 géneros bacterianos (Guo-Qiang Chen, 2010). Los PHA tienen un interés biotecnológico gracias a que son un grupo de elastómeros y termoplásticos con propiedades parecidas a las del propileno y el polietileno, pero con la ventaja de ser totalmente biodegradables. La composición monomérica de estos polímeros determina sus características físicas, lo que ha permitido obtener una amplia gama de materiales, desde unos más duros y quebradizos hasta otros más suaves y flexibles. Hoy en día existen compañías que los utilizan a nivel industrial para fabricar diversos productos, que se producirían normalmente de plásticos derivados del petróleo; un ejemplo es el *Biopol*, un copolímero de hidroxibutirato y 3-hidroxivalerato (Espin, 2001).

Los PHA representan una reserva de energía y carbono para la célula, y la mayoría de las veces se producen y acumulan en condiciones de estrés, como limitación de nitrógeno, oxígeno o fósforo, o cuando existe una fuente de carbono en exceso. Estos polímeros se clasifican por el número de átomos de carbono (que va de 4 a 14) y por el tipo de unidades monoméricas, que pueden producir homo o hetero-polímeros. Los PHA de 4 a 5 átomos de carbono se consideran de cadena corta (scl-PHA), mientras que los PHA de cadena media (mcl-PHA) tienen entre 6 y 14 átomos de carbono (Keshavars, 2010).

Inicialmente estos materiales se usaron para hacer botellas o envolturas para productos comunes, sin embargo sus altos costos de producción han limitado su uso hacia productos más especializados. Gracias a su biocompatibilidad, los PHA se han usado para construir implantes médicos, además de que se pueden diseñar para ser degradados en un tiempo deseado. En los últimos años se han utilizado también para diseñar partículas de entrega de fármacos tejidos específicas (Guo-Qiang Chen, 2010).

Azotobacter vinelandii

Entre los organismos productores de PHA se encuentra *Azotobacter vinelandii*, una bacteria que puede acumular PHB hasta un 90% de su peso seco. *A. vinelandii* es una bacteria gram-negativa que vive en aguas dulces y suelos. Es un organismo fijador de nitrógeno, proceso que realiza en condiciones aeróbicas. Esta bacteria pertenece a la familia *Pseudomonadaceae*, dentro de la clase de las gammaproteobacterias. Durante muchos años fue un modelo importante para análisis bioquímicos gracias a su muy alta producción de enzimas y a la buena calidad de las mismas, sin embargo más

recientemente los estudios se han enfocado a su capacidad de fijar nitrógeno en condiciones de vida libre, proceso que ocurre en presencia de concentraciones de oxígeno que normalmente inactivarían a la enzima nitrogenasa (Espin, 2001).

Sus células son excepcionalmente grandes (de 2 a 5 μm de diámetro) comparadas con el tamaño de la mayoría de las bacterias. *A. vinelandii* se caracteriza porque, por razones no muy claras, genera muchas copias de su cromosoma (entre 50-100 copias) en la fase de crecimiento tardía, de manera que el número de copias de su cromosoma varía dependiendo de la fase del ciclo de vida. Este organismo puede adaptar su metabolismo a diversas fuentes de nutrientes, y cuando se agotan las fuentes disponibles de carbono echa a andar un proceso de diferenciación a un quiste resistente a la desecación, por lo que también ha sido un buen modelo para estudiar la diferenciación celular, proceso mediante el cual se generan los quistes (Setubal, 2009).

El interés biotecnológico no se limita a la producción de PHB, ya que *A. vinelandii* tiene la capacidad de producir alginato, un polisacárido extracelular que es utilizado como agente gelificante y viscosificante en la industria farmacéutica y la alimenticia.

PHB

El PHB está compuesto de monómeros de hidroxibutirato, y su acumulación en gránulos intracelulares le sirve a la bacteria como energía de reserva. Su producción es activada en respuesta a la limitación de algún nutriente esencial, como por ejemplo el nitrógeno, mediante la activación de una ruta metabólica que toma acetil-CoA como sustrato para sintetizar PHB. La síntesis depende de tres pasos enzimáticos; el primer paso es la condensación de dos moléculas de acetil-CoA que realiza la β -cetotilasa, lo que genera una molécula de acetoacetil-CoA. Esta molécula es reducida por la cetoacil-CoA reductasa para generar hidroxibutiril-CoA, que es finalmente polimerizado por la PHB sintasa (Lenz, 2005).

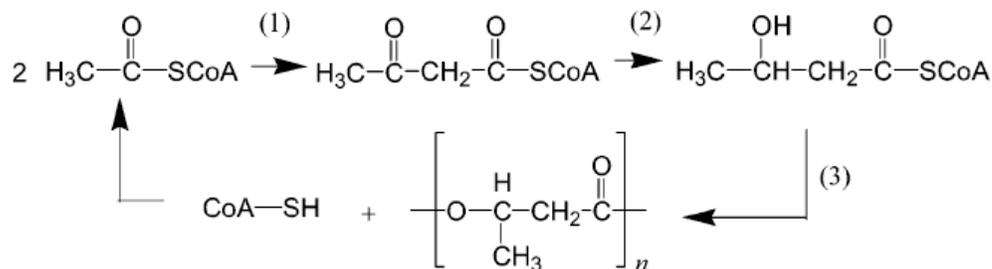


Figura 2. La síntesis de PHB consiste de tres pasos enzimáticos: la condensación de dos moléculas de acetil-CoA (1), la reducción de acetoacetil-CoA (2), y la polimerización (3).

Los genes de síntesis de PHB en *A. vinelandii* se encuentran en el operón *phbBAC* (*phbB*: β -cetotiolasa, *phbA*: acetoacetyl-CoA reductasa y *phbC*: PHB sintasa) cuya expresión es controlada por dos promotores sobrelapados. Si bien la síntesis del polímero se regula mediante el control de la actividad de la primera enzima de la vía, existen mecanismos transcripcionales de control adicionales. Uno de los reguladores es el sistema de dos componentes GacS-GacA, el otro es *phbR*, un regulador positivo de la familia de AraC cuyo gen se encuentra divergente al operón *phbBAC*.

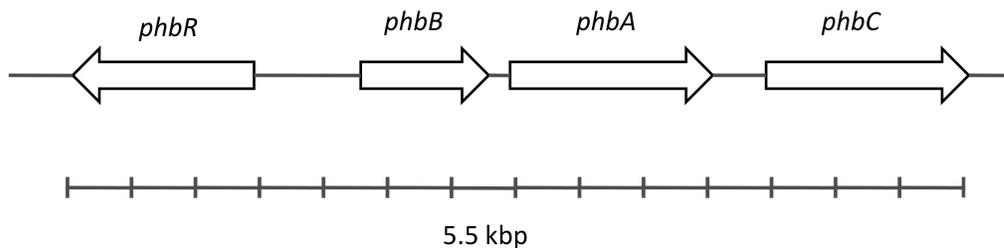


Figura 3. Operón de síntesis de PHB, conformado por: β -cetotiolasa (*phbB*), acetoacil-CoA reductasa (*phbA*) y PHB sintasa (*phbC*). Río arriba se encuentra el regulador *phbR*.

Fasinas

Los polihidroxicanoatos bacterianos se encuentran en inclusiones intracelulares, también conocidos como gránulos. Los polímeros son sintetizados por la enzima PHA sintasa, que en las bacterias se encuentra unida a la superficie de los gránulos de PHA. Originalmente se pensaba que los gránulos estaban casi totalmente cubiertos por una monocapa lipídica, sin embargo al purificarlos se vio que la cantidad de lípidos presentes estaba lejos de la cantidad necesaria para cubrir toda la superficie. Estos resultados dejaron abierta la pregunta de qué otros elementos estaban contribuyendo para formar la barrera anfipática entre los PHA hidrofóbicos y el citoplasma hidrofílico. Las proteínas parecían ser las candidatas más adecuadas, ya que existían reportes de proteínas asociadas al gránulo (Griebel *et al.*, 1968).

En 1994 se describió la proteína GA14 de *Rhodococcus ruber*, cuyo gen (*phaP*) se encuentra río abajo de la PHB-sintasa. Usando inmunolocalización, se demostró que GA14 se encuentra en la superficie de los gránulos y que su expresión depende de la síntesis de PHB, ya que su producción se veía disminuida en mutantes deficientes en la

producción de PHB. Esta pequeña proteína (14 kD) tenía un carácter anfifílico lo que concordaba con su capacidad para formar parte de la capa que cubre al gránulo. Además, en estudios anteriores se había observado que la cantidad de lípidos presentes en el gránulo no era suficiente para cubrirlo por completo, por lo que otras moléculas debían estar participando en el proceso. El análisis de la secuencia primaria de GA14 reveló dos dominios de aminoácidos hidrofóbicos y anfifílicos cerca del C-terminal, posibles responsables del anclaje a la monocapa lipídica. Las proteínas anfifílicas, sumadas a los lípidos y las sintasas, parecían ser elementos importantes en la estructura del gránulo, formando una interfase entre el citoplasma hidrofílico y el polímero hidrofóbico (Pieper-Furst, 1994).

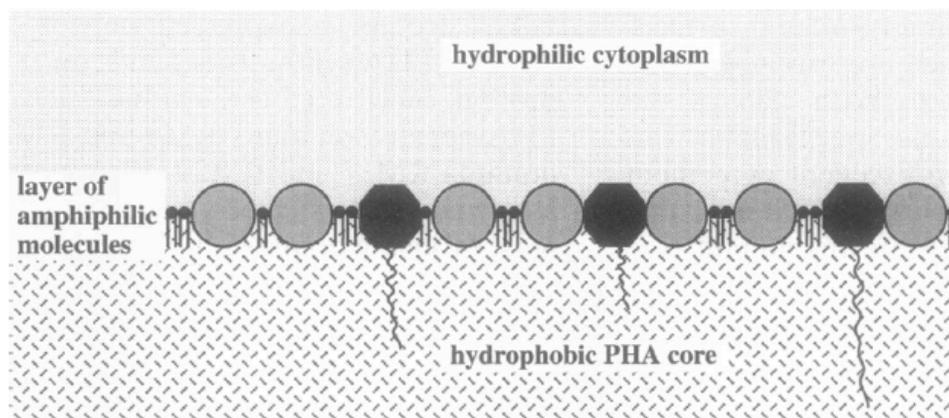


Figura 4. En la imagen se muestra la proteína GA14 (círculos grises), que junto con la sintasas (polígonos negros) y fosfolípidos forma una barrera anfipática entre el gránulo de PHA y el citoplasma (Pieper-Furst *et al.*, 1994).

En *Ralstonia eutropha* (también conocida como *Cupriavidus necator*) se encontró al gen *phaP*, cuya proteína (GA24) se unía a los gránulos de forma mayoritaria. En la secuencia de aminoácidos se encontraron dos segmentos de aminoácidos no hidrofílicos cerca del C-terminal, al igual que en la GA14 de *R. ruber*. Esta proteína de 24-kDa representaba el 5% de la proteína total de la célula y sólo se sintetizaba en células productoras de PHA en cantidades suficientes para cubrir los gránulos. Una cepa mutante para *phaP* forma, en su mayoría, células con un solo gránulo de PHA de gran tamaño. Esta mutante mostró una disminución en la acumulación de PHB y en la actividad de la sintasa (25% de la actividad normal). Cuando se complementó esta mutante usando un vector de inserción al azar se provocó la formación de muchos gránulos pequeños (Wieczorek *et al.*, 1995).

El siguiente paso era demostrar que efectivamente los dominios no hidrofílicos eran los responsables de la unión al gránulo. Con este fin se generó una proteína GA14 truncada en el extremo C-terminal y se demostró que no se unía a los gránulos ya que perdía sus dominios hidrofóbicos, usando una cepa recombinante de *E. coli* productora de PHB (Pieper-Furst, 1995). Para confirmar que los dominios hidrofóbicos del C-terminal eran efectivamente los responsables de la unión a los gránulos, se construyó una proteína de fusión compuesta de la proteína AcDH-II y el lado C-terminal de GA14, y se comprobó que ésta se unía eficientemente a los gránulos. En este trabajo se observó que la cepa recombinante de *E. coli*, con el operón de síntesis de PHB, formaba gránulos de PHB muy grandes, sin embargo, cuando se coexpresó la proteína GA14, se provocó la formación de gránulos más pequeños y en mayor número.

Las proteínas GA24 y GA14 fueron llamadas fasinas (en inglés *phasins*) por funcionar de forma análoga a las oleosinas, que forman una capa alrededor de las inclusiones de triacilglicerol en semillas y granos de polen, junto con una pequeña cantidad de fosfolípidos. Las oleosinas tienen un dominio hidrofóbico que da hacia el interior de la inclusión y dos dominios anfipáticos que se encuentran en la interfase entre los lípidos (hidrofóbicos) y el citoplasma (hidrofílico). En los gránulos de PHA es necesaria una barrera similar, de otra manera todo el PHA formaría un solo gránulo en la célula. Las fasinas deben cumplir con dos características: primero, tener una región que permita la unión al gránulo de manera selectiva, como las descritas para GA14 y GA24, y segundo, si son el componente dominante de la cubierta del gránulo, deben contribuir de manera significativa al total de proteína en células que han acumulado una gran cantidad de PHB; Los cálculos para GA24 de *R. eutropha* muestran que la proteína representa un 3-5 % de la proteína total de la célula (Steinbuechel *et al.*, 1995). Se ha estimado que las fasinas de *R. eutropha* son suficientes para cubrir todos los gránulos dentro de la célula.

Todas las fasinas que se han identificado hasta ahora están presentes en bacterias productoras de PHA, y comparten algunas características generales, como son: bajo peso molecular (la mayoría entre 11 y 25 kDa), carácter anfifílico, alta afinidad por las inclusiones de PHA, representar una fracción importante del total de proteína de la célula y localizarse en la superficie de los gránulos (Steinbuechel *et al.*, 1996). Muchos de los genes de las fasinas se encuentran en el cluster de los genes de síntesis de PHAs. Sus genes se expresan sólo en presencia de PHA acumulado en la célula, y sólo se sintetiza

la cantidad necesaria para cubrir esos gránulos, ya que no se encuentra fasina en el citoplasma.

Las proteínas asociadas al gránulo se han clasificado en cuatro grupos (Steinbuchel *et al.*, 1995):

I. PHA Sintetas: catalizan la formación de los enlaces éster entre los monómeros, se unen al gránulo a partir del inicio de la biosíntesis.

II. PHA Depolimerasas: responsables de la degradación de los poliésteres acumulados en la célula cuando las condiciones ambientales han cambiado. Estas proteínas del gránulo son completamente distintas a las depolimerasas extracelulares.

III. Fasinas: con una función parecida a la de las oleosinas de las plantas, en algunas bacterias representan la mayor fracción de las proteínas asociadas al gránulo. En algunas especies, sus genes se encuentran dentro del locus que codifica los genes de síntesis de PHA.

IV. Otras proteínas con funciones distintas a las de los tres grupos anteriores, como por ejemplo, de regulación.

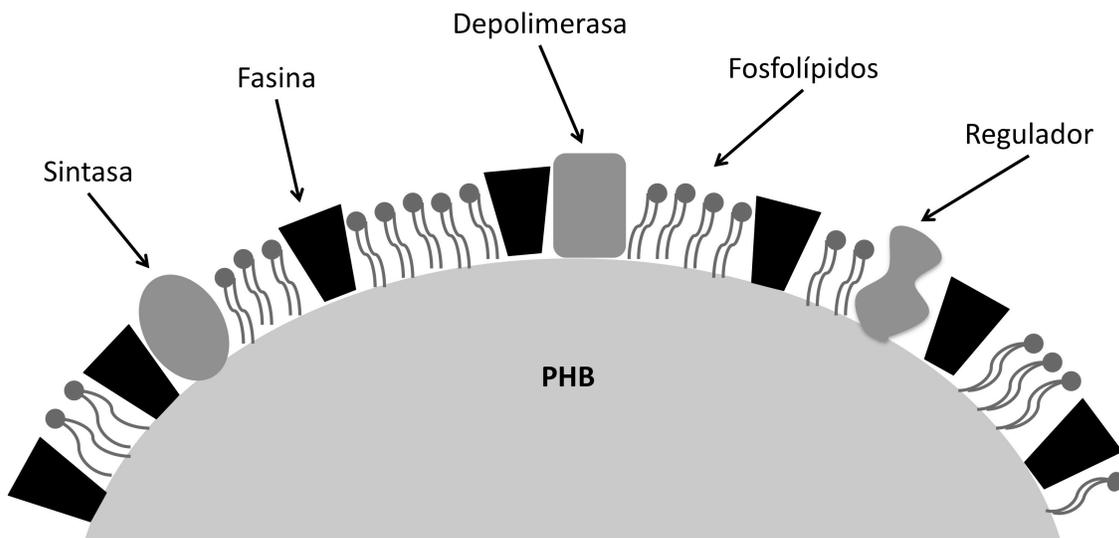


Figura 5. En este esquema se muestra un corte de un gránulo de PHB, cuya superficie se encuentra cubierta por una capa de distintas proteínas, así como fosfolípidos, estableciendo una barrera que mantiene al polímero hidrofóbico separado del citoplasma hidrofílico.

En bacterias deficientes en la producción de sus fasinas predominantes se han encontrado que muchas otras proteínas se unen de manera inespecífica a los gránulos, por lo que otra de las funciones de las fasinas debe ser impedir la unión inespecífica de otras proteínas. El mismo efecto se observa en recombinantes de *E. coli* que pueden sintetizar PHA pero no tienen fasinas. Las proteínas que se unen de manera inespecífica al gránulo no pueden realizar su función normal en el citoplasma, lo que tiene probablemente un efecto perjudicial para la célula.

El estudio de los gránulos de PHA y de sus proteínas asociadas ha sido impulsado por el interés biotecnológico de mejorar la producción de estos polímeros. El control de la expresión de las fasinas y de su concentración en la célula influye en el tamaño de los gránulos; en los gránulos más pequeños la razón superficie-volumen es mayor, haciendo posible una mayor tasa de síntesis de PHA, gracias a que hay más espacio para la unión de la sintasa. Por otro lado, las fasinas parecen tener interacciones directas con proteínas catalíticamente activas, dándoles sitios de anclaje y afectando su actividad de forma directa. Es por estas razones que la expresión correcta de los genes de las fasinas podría ser tan importante para la producción de PHA, como lo es la expresión de los genes de síntesis (Steinbuchel *et al.*, 1995).

En un estudio de *Pseudomonas putida* se analizaron dos mutantes que carecen de las proteínas asociadas al gránulo (GA1 y GA2), cuyos genes se encuentran adyacentes al operón de síntesis de PHB. Las mutantes acumularon entre un 30 y un 50% menos PHB que las silvestres, efecto similar al de la mutante en *phaP* de *R. eutropha*, sin embargo, a diferencia de ésta última, los gránulos no cambiaron de tamaño, efecto que no se discute en este trabajo (Valentín *et al.*, 1998). Por su función y homología con otras fasinas, éstas dos proteínas se clasificaron dentro de este grupo.

Stuart *et al.* construyeron dos cepas de *E. coli* que fueron transformadas con un plásmido que contenía los genes de síntesis de PHB de *R. eutropha*, pero una tenía además un plásmido con el gen *phaP* de la fasina GA24 de *R. eutropha*. La primera cepa tenía gránulos de PHB con una superficie desordenada, mientras que la doble transformante formó gránulos con una superficie parecida a la de los gránulos de *R. eutropha* silvestre, con una superficie ordenada y definida. El mismo efecto se observó cuando se deletó el gen de la fasina *phaP* de *P. putida*; formándose inclusiones desordenadas y sin una

estructura definida. Estos experimentos demostraron que efectivamente las fasinas son parte importante de la estructura del gránulo (Stuart *et al.*, 1998).

Se han propuesto diferentes modelos sobre el papel de las fasinas en la regulación de la síntesis de PHB; el modelo de Wieczorek propone que éstas promueven la síntesis de dos maneras; regulando la relación superficie-volumen de los gránulos (una mayor proporción superficie-volumen permite más sintasa en los gránulos y por lo tanto más síntesis), y además tienen una interacción con la sintasa que favorece su actividad. Adicionalmente se planteó que las fasinas promueven la síntesis de forma indirecta al prevenir que otras proteínas se unan al gránulo de manera inespecífica (Wieczorek *et al.*, 1995).

En estudios *in vitro* de la sintasa *phaEC* de *Chromatium vinosum*, Jossek *et al.* descubrieron que la producción de PHB se aumentaba de un 60% a un 90% en presencia de pequeñas cantidades de la GA24 de *R. eutropha* (Jossek *et al.*, 1998). Un efecto similar fue encontrado en un experimento *in vitro* con las sintasas tipo II PhaC1 y PhaC2 de *P. aeruginosa*, en el cual la adición de la fasina GA24 de *R. eutropha* provocó un aumento del 50% en la actividad de las sintasas (Qi *et al.*, 2000).

El grupo de Wieczorek produjo en 1995 cinco mutantes de *R. eutropha* para *phaP* con inserciones Tn5, y se reportó que eran deficientes en la producción de PHB. En el 2001, York y colaboradores encontraron con inmunotinción que estas mutantes seguían produciendo la proteína, aunque en bajas cantidades, por lo que construyeron una mutante con una delección que abatiera por completo la expresión (York *et al.*, 2001). Sin embargo los valores de las mediciones de PHB no cambiaron mucho entre las mutantes, lo que sugiere que PhaP debe acumularse en grandes cantidades para realizar su función correctamente. Ambos grupos reportaron la formación de un solo gránulo central en lugar de varios pequeños. En este experimento también se comparó el crecimiento y la producción de PHB entre la $\Delta phaP$ y la silvestre en distintos medios de cultivo, y se encontró que la mutante acumuló la mitad de lo que acumuló la silvestre en las distintas condiciones. Además se vio que la producción de PhaP coincide con la producción de PHB; cuando los niveles de polímero aumentan, los de PhaP aumentan también.

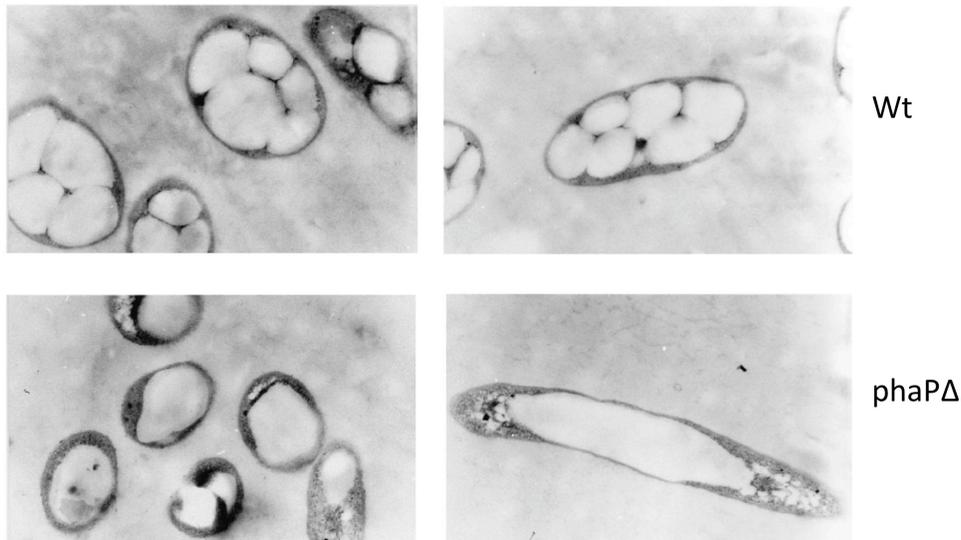


Figura 6. Estas son imágenes de microscopía electrónica en las que se muestran células de *R. eutropha*, la cepa silvestre (arriba) y la cepa mutante para *phaP*. En la cepa mutante se nota la formación de un gránulo central (Wieczoreck et al., 1995).

El crecimiento de la mutante en *phaP* no se vio afectado durante las primeras 8h, tiempo durante el cual la producción de PHB sí se afectó, por lo que se demostró que PhaP tiene un efecto sobre la producción que es independiente del efecto que tiene sobre el crecimiento. En el modelo que se propuso, PhaP no sólo regula la razón área-volumen del gránulo, sino que promueve la síntesis durante el periodo de producción mediante una interacción directa con la sintasa, probablemente provocando un cambio conformacional (York et al., 2001).

En *Paraccocus denitrificans* se identificó a PhaP como una proteína mayoritaria en los gránulos de PHA, su gen se clonó y expresó en *E. coli* junto con el gen de la sintasa (*phaC*), lo que provocó una reducción en el tamaño y un aumento en la cantidad de gránulos y el contenido de PHB, comparado con la *E. coli* que contaba solamente con *phaC* (Maehara et al., 1999). Además se encontró un gen río abajo de *phaP* al que llamaron *phaR*, cuya coexpresión en la *E. coli* productora causó una disminución en la acumulación de PhaP, por lo que fue designado como un posible regulador negativo de *phaP*.

A pesar de que existe normalmente una fasina mayoritaria en la superficie de los gránulos, se han encontrado en distintos organismos otras proteínas homólogas a la fasina principal. En *R. eutropha* se encontraron tres fasinas homólogas a PhaP1 (PhaP2,

PhaP3 y PhaP4) y se comprobó que sus genes se transcriben, sin embargo al estudiar las proteínas en un gel SDS-PAGE se nota que PhaP1 se encuentra en mucho mayor cantidad en los gránulos. Al comparar a la cepa silvestre con una mutante deficiente en PhaP1 se encontró que una de las fasinas (PhaP3) se encuentra aumentada en la mutante; sin embargo, el aumento no es suficiente para compensar la falta de la fasina principal, pues la mutante tiene un solo gránulo central y produce menos PHB que la silvestre. Hasta la fecha no es muy claro el papel que juegan las fasinas minoritarias en los organismos productores de PHA (Potter *et al.*, 2004).

Se han construido distintos modelos computacionales sobre la morfogénesis del gránulo, con el fin de comprender la dinámica del proceso y el papel que tienen los distintos elementos (Jurasek *et al.*, 2002).

En los últimos años ha existido un interés biotecnológico por las fasinas, gracias a sus características particulares. Uno de los ejemplos es su uso como herramienta para la purificación de otras proteínas: se han diseñado estrategias en las que una proteína de interés se fusiona a una fasina por medio de una inteína, en células que producen gránulos de PHB. Estas fusiones proteicas quedan unidas a la superficie de los gránulos, los cuales son purificados con una lisis celular y varias centrifugaciones. Por último se libera la proteína deseada mediante un corte de la inteína inducido por un cambio de pH, y después de otra ronda de centrifugación se obtiene la proteína pura. Este método ha probado ser altamente efectivo y podría comenzar a usarse más ampliamente.

Regulación de fasinas

Los trabajos sobre la fasina GA24 de *R. eutropha* habían revelado que ésta se expresaba exclusivamente en presencia de PHB, y que existía una estricta regulación en la que se producía sólo la cantidad suficiente para cubrir los gránulos (Wieczorek *et al.*, 1995), sin embargo no se sabía cómo estaba regulado el sistema, ni quién estaba involucrado.

En *Pseudomonas oleovorans* se encontró, río abajo del operón de síntesis de PHA (*phaC1,C2,Z,D*), una proteína parecida a una histona, llamada por los autores *phaF*, cuya interrupción causó un aumento en el nivel de transcripción de *phaC1* (una sintasa). Este resultado sugería que esta proteína funcionaba como un regulador negativo del operón de síntesis. Esta proteína tiene en el extremo C-terminal nueve copias de la unidad repetitiva AAKP, el motivo consenso característico de las proteínas tipo histona de bacterias (de

unión a DNA). La mutante en *phaF* no mostró diferencia en la acumulación de PHA en cultivos en matraz con limitación de nitrógeno, sin embargo en cultivos continuos con limitación de N, el contenido de PHA se redujo a una tercera parte. Los autores propusieron un modelo en el que PhaF reprime la transcripción de *phaC1*, la de *phal* (una fasina putativa) y la de sí mismo; cuando se produce PHA ésta proteína se une al gránulo, permitiendo así la transcripción, pero no se tenía evidencia de su unión al DNA. La unión de *phaF* con el gránulo se comprobó mediante un análisis proteómico de los gránulos purificados. (Prieto *et al.*, 1999).

En un experimento con *R. eutropha* se construyeron varias cepas en las que se reemplazó la sintasa *phaC* por sintasas con diferentes grados de actividad, y fueron transformadas con una fusión traduccional de *phaP-gfp*. Con esto se descubrió que la acumulación de PhbP depende de la actividad de las sintasas (York *et al.*, 2001).

En *E. coli* se vio que la expresión de la fasina *phaP* de *P. denitrificans* fue reprimida en buena manera con la coexpresión de *phaR*, lo que sugería que ésta proteína funcionaba como un represor de *phaP* (Maehara *et al.*, 1999). Se predijo que la proteína PhaR tenía un motivo hélice-giro-hélice, considerado como un dominio de unión al DNA. Además, se encontraron homólogos de *phaR* en varias bacterias productoras de PHA. La purificación de *phaR* por cromatografía de exclusión molecular mostró un peso de 93 kDa, lo que sugirió que la proteína forma tetrámeros. Se realizaron ensayos de movilidad en gel y se confirmó que *phaR* se une a regiones intergénicas río arriba de *phaP* y de *phaR*. Además, usando un sistema de transcripción *in vitro*, se comprobó que la expresión del gen *phaP* se reprime con la adición de la proteína PhaR purificada (Maehara *et al.*, 2001).

Para determinar si PhaR de *R. eutropha* regulaba la acumulación de PhaP, York *et al.* construyeron la mutante con delección en *phaR*. Lo primero que encontraron, usando inmunotinción, es que la cepa $\Delta phaR$ expresa mucho más PhaP que la cepa silvestre, acorde con su papel de regulador negativo. Luego compararon a la mutante $\Delta phaR$ $\Delta phaC$ con la mutante $\Delta phaC$, ambas incapaces de producir PHB, y encontraron que, mientras que en la mutante $\Delta phaC$ no se detectaba nada de *phaP*, la doble mutante producía una gran cantidad de PhaP; esto demuestra que al no estar *phaR*, la acumulación de PhaP se desacopla de la producción de PHB. Con una fusión de PhaP-GFP, probaron que en la $\Delta phaC$ no expresa PhaP, mientras que la $\Delta phaR$ la sobreexpresa, consistente con la expresión dependiente de la producción de PHB. Con

estos resultados se deduce que *phaR* une directamente la acumulación de PHB con la producción de PhaP (York *et al.*, 2002). Este grupo evaluó la producción de PHB en las mutantes $\Delta phaR$ y $\Delta phaR \Delta phaP$, y se encontró que la $\Delta phaR$ acumuló un 70% de lo que acumula la cepa silvestre en un medio que favorece la acumulación. Los autores postularon que la sobreexpresión de PhaP puede tener un efecto negativo en la producción de PHB, tal vez por el uso excesivo de metabolitos o porque PhaP podría interferir con el inicio de la síntesis. Además, la mutante $\Delta phaR \Delta phaP$ acumuló aún menos PHB, lo que parece indicar que podría haber un mecanismo independiente de *phaP*, PhaR podría estar reprimiendo a otras proteínas que estarían interfiriendo con la producción o promoviendo la utilización del PHB, al ser expresadas a tiempos o niveles incorrectos (York *et al.*, 2002).

Para determinar los sitios de unión de PhaR en *P. denitrificans*, Maehara *et al.* hicieron experimentos de footprinting, y encontraron que los sitios de unión sobrelapan con los promotores putativos de *phaP* y *phaR*, y que ambas zonas cuentan con secuencias TGC repetidas. Con ensayos de movilidad en gel, probaron que el PHB causa la disociación del complejo PhaR-DNA. Además, con ayuda de un experimento de síntesis de proteínas *in vitro*, usando el DNA templado de *phaP*, se demostró primero que la adición de PhaR reprimió la expresión de *phaP*, pero al agregar PHB la expresión se restauró. Sin embargo, al seguir aumentando la cantidad de PHB se llegó a apagar la maquinaria de transcripción-traducción, lo que sugiere que la superficie del PHB, en ausencia de la fasina PhaP, podría estar interactuando de manera inespecífica con otras proteínas, causando deficiencias en sus funciones. Los autores crearon un modelo para la regulación de *phaP* y *phaR* (Maehara, 2002):

- Cuando no hay síntesis de PHA, PhaR se encuentra unido a los elementos río arriba de *phaP* y *phaR*, impidiendo su transcripción.
- Cuando hay síntesis de PHA y se comienza a acumular, PhaR se empieza a unir a los gránulos, permitiendo la expresión de *phaP*. Durante la elongación de las cadenas de PHA los gránulos aumentan de tamaño y se van cubriendo con PhaP, además de que la expresión de *phaR* sigue activa.

- La síntesis termina y comienza a degradarse el PHA, las moléculas de PhaR libres comienzan a unirse al DNA, reprimiendo la expresión de *phaP* y de *phaR*.

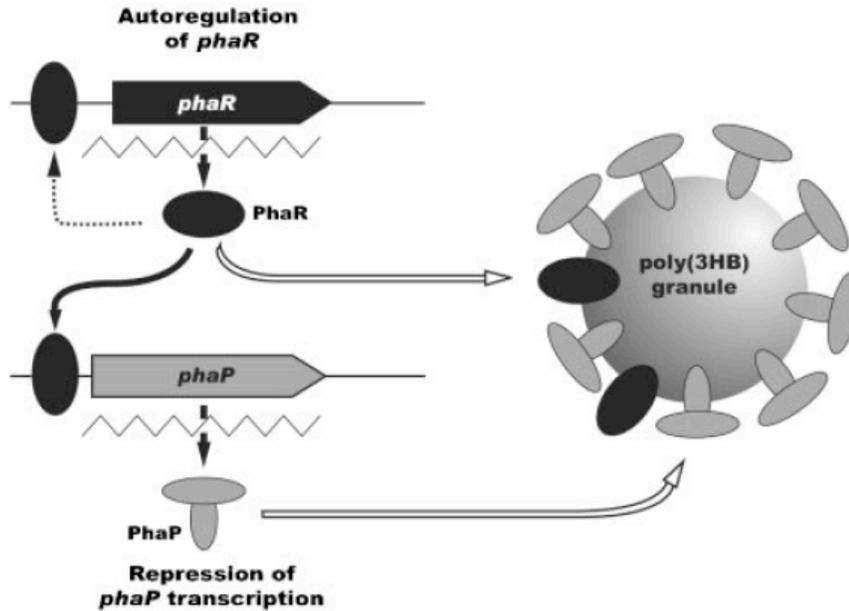


Figura 7. Modelo propuesto para la regulación que ejerce phaR sobre phaP y sobre sí mismo. PhaR reprime la transcripción de ambos genes, sin embargo cuando hay PHB en la célula, se une al gránulo, permitiendo su transcripción y la de phaP. Cuando el gránulo ha sido cubierto por completo, queda PhaR libre en el citoplasma, que regresa al DNA y reprime de nuevo la transcripción (Potter *et al.*, 2002).

Potter *et al.* evaluaron la mutante en *phaR* de *R. eutropha*, y encontraron que acumula hasta 48% (w/w) del peso seco, mientras que la acumulación de la cepa silvestre es de 76%. Con un análisis de movilidad en gel probaron que PhaR se une a las secuencias río arriba de *phaP* y *phaR*, además de que por footprinting encontraron los sitios de pegado de la proteína. Para probar la afinidad de *phaR* por los gránulos de PHA, se incubó la proteína purificada con gránulos artificiales de PHB, luego éstos fueron extraídos por centrifugación, lavados y resuspendidos; la suspensión se analizó por SDS-PAGE y se encontró a PhaR. Usando microscopía electrónica con inmunotinción para PhaR, se vio que en la cepa silvestre PhaR se localiza mayormente en la superficie de los gránulos, mientras que en la *phaR Ω km* (con más gránulos y más pequeños) no se detectó PhaR (figura 8). En la inmunotinción para PhaP, en la mutante *phaR Ω km* se detectó mucho más PhaP que en la cepa silvestre. Este grupo planteó un modelo consistente con el de

Maehara *et al.* en el que PhaR tiene una función como represor transcripcional, actuando sobre PhaP y sobre sí mismo, pero al haber PHA en la célula funciona como fasina, uniéndose al gránulo y permitiendo así la expresión de *phaP* y *phaR*. Los autores argumentan que la afinidad que PhaP tiene por el PHA es mayor, lo que explicaría por qué PhaR se une de nuevo al DNA en las últimas etapas de acumulación de PHA, cuando los gránulos han sido cubiertos en su totalidad por fasinas (Potter *et al.*, 2002).

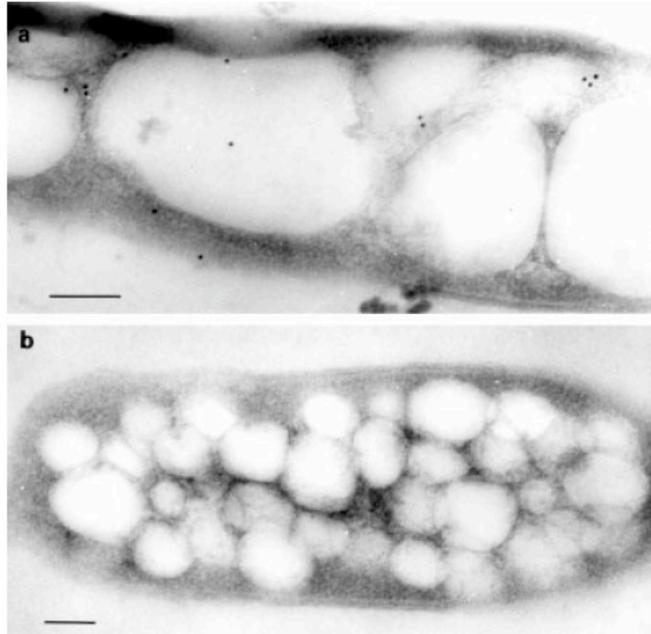


Figura 8. (a) Microscopía de la cepa silvestre de *Ralstonia eutropha*, los puntos negros indican la presencia de phaR. (b) Cepa mutante *phaRΩk*, (Potter *et al.*, 2002).

En otros experimentos se descubrió que PhaR se une también a una región río arriba de la fasina PhaP3 de *R. eutropha*. Se alinearon los sitios de pegado conocidos de PhaR (sobre secuencias de *phaP1*, *phaP3* y *phaR*) y se encontraron algunos nucleótidos conservados. Sin embargo en este trabajo se encontró también que no todas las fasinas son reguladas por este sistema; PhaP2 y PhaP4 se comportan de manera distinta, y podrían tener funciones diferentes (Potter *et al.*, 2005).

Antecedentes en A. vinelandii

En el 2009 se publicó la secuenciación del genoma de *Azotobacter vinelandii* (Setubal *et al.*, 2009), lo cual abrió camino a un amplio análisis informático de las secuencias. Entre

los genes descubiertos se reconocieron genes que posiblemente codifican para proteínas involucradas en el gránulo de PHB (Tabla 1).

Función	Ubicación	Gen
PHB sintasa	Avin23630	<i>phbC</i>
Acetoacetyl-CoA reductasa	Avin23650	<i>phbB</i>
β -Cetotiolasa	Avin23640	<i>phbA</i>
Activador Transcripcional	Avin23660	<i>phbR</i>
Regulador Transcripcional de la phasina	Avin23680	<i>phbF (phaR)</i>
Phasinas	Avin23670, Avin03930	<i>phbP, phbP2</i>
Posibles β -Cetotiolasas	Avin51590, Avin07370, Avin16380, Avin38200, Avin14450, Avin17360, Avin14260, Avin22240	<i>bktA</i>
Deshidrogenasas/reductasas similares a acetoacetyl-CoA reductasa	Avin14920, Avin13430, Avin46750, Avin31000, Avin20330, Avin09160, Avin22070, Avin21180, Avin17590, Avin41710, Avin11090, Avin06560, Avin11510, Avin34130	
Enoil-CoA hidratasa (D)-específica	Avin30160	<i>phaJ</i>
PHB depolimerasas	Avin03910, Avin34810, Avin34710, Avin33500, Avin44010, Avin46290, Avin27080	<i>phbZ₁₋₇</i>
Hidroxibutirato oligomero hidrolasas	Avin49180, Avin10140	
Hidroxibutirato deshidrogenasa	Avin117590	
Succinil-CoA transferasa Subunidades A y B	Avin117570, Avin117560	

Tabla 1. Genes relacionados con la producción, acumulación y depolimerización del PHB, al menos por su homología con proteínas previamente conocidas.

Además de las proteínas involucradas en la síntesis y degradación de PHB, se encontraron dos phasinas putativas (que se nombraron *phbP* y *phbP2*) y una proteína parecida al regulador *phaR* de *R. eutropha*, que se nombró *phbF*. Los genes de *phbP* y *phbF* se encuentran aledaños al operón de síntesis *phbBAC*, y se transcriben de manera convergente entre sí (figura 9).

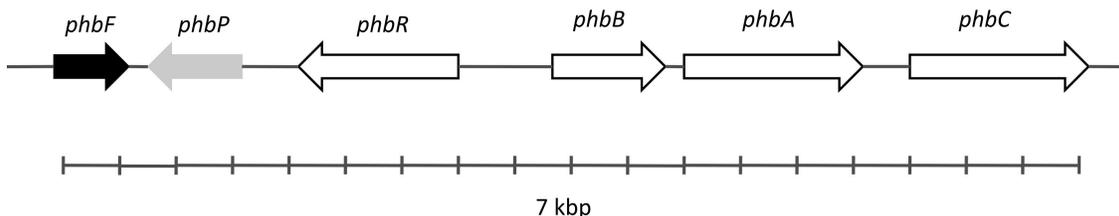


Figura 9. Del lado derecho se encuentran los genes del operón de síntesis, junto con su regulador *phbR*. Río debajo de éste último se encuentran *phbF* y *phbP*, dos genes que se transcriben de manera convergente entre sí.

El gen *phbP* mide 561 pb y tiene un dominio conservado en la superfamilia de las fasinas, que se encuentran normalmente en bacterias productoras de PHA. Esta pequeña proteína, de 20 kDa, se ha localizado en los gránulos de PHB de *A. vinelandii* mediante análisis de proteómica, por lo que se ha asumido que tiene un papel importante en la estructura y funcionamiento de los mismos. En el proteoma del gránulo se ha demostrado que la proteína PhbP se encuentra en grandes cantidades, en comparación con otras de las proteínas involucradas, lo que sugiere que es ésta la fasina mayoritaria del gránulo.

phbF es un gen de 525 pb que se encuentra cercano a *phbP*, sin embargo se transcribe en dirección contraria. La proteína codificada tiene dos dominios conservados: en el extremo N-terminal tiene un dominio de unión al DNA que se encuentra en reguladores de la síntesis de PHA, para los cuales se ha demostrado de manera experimental que se unen directamente al DNA. En el lado C-terminal encontramos dos dominios que en otras proteínas participan en la unión con los gránulos de PHA. Sin embargo la proteína aún no se ha estudiado, y su presencia en el gránulo no ha sido comprobada.

El gen de *phbF* tiene un alto grado de homología con genes que se encuentran en otras bacterias que acumulan PHA. En la tabla 2 se muestran algunos de los genes con los cuales tiene un mayor porcentaje de identidad.

	Score	E-value	Identidad (%)
<i>Azotobacter vinelandii</i> (<i>phbF</i>)	948	0	100
<i>Pseudomonas stutzeri</i> (<i>phaR</i>)	347	5e-92	78
<i>Ralstonia eutropha</i> (<i>phaR</i>)	134	6e-28	70

<i>Bordetella petrii</i> (<i>phbF</i>)	123	1e-24	72
<i>Pseudomonas putida</i> (<i>phaR</i>)	78	4e-11	67

Tabla 2. Alineamiento del gen *phbF* usando el algoritmo BLAST, en la tabla se muestran sólo algunos de los genes con mayor porcentaje de identidad.

HIPÓTESIS

- La proteína PhbP tiene un papel fundamental en la adecuada formación de los gránulos de PHB, determinando el número y tamaño de los mismos. Además se necesita para una óptima acumulación de PHB.
- El producto de *phbF* es un regulador negativo de la transcripción del gen *phbP*.

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es comenzar a entender el papel que estos dos genes tienen en el proceso de síntesis y acumulación de PHB en *A. vinelandii*. Para esto nos propusimos una serie de objetivos particulares:

- Construir cepas mutantes para los genes *phbP* y *phbF*.
- Caracterizar los fenotipos de las mutantes *phbP* Δ y *phbF* Δ por medio de distintos métodos:
 - a) Microscopía electrónica
 - b) Mediciones de PHB
 - c) Proteoma del gránulo
- Medir los mensajeros de *phbF* y *phbP* (RT-PCR) en las cepas mutantes.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Construcción de cepas de *A. vinelandii* con mutaciones en los genes *phbP* y *phbF*.

Para generar las mutantes en los genes *phbP* y *phbF* se construyeron fragmentos que contienen al gen interrumpido con un cassette de resistencia a un antibiótico, incluyendo su región promotora. Estos fragmentos se clonaron en un plásmido, el cual fue luego transformado en la cepa UW136 de *A. vinelandii*. Este método aprovecha el sistema de recombinación homóloga que provoca un intercambio de material entre secuencias con homología.

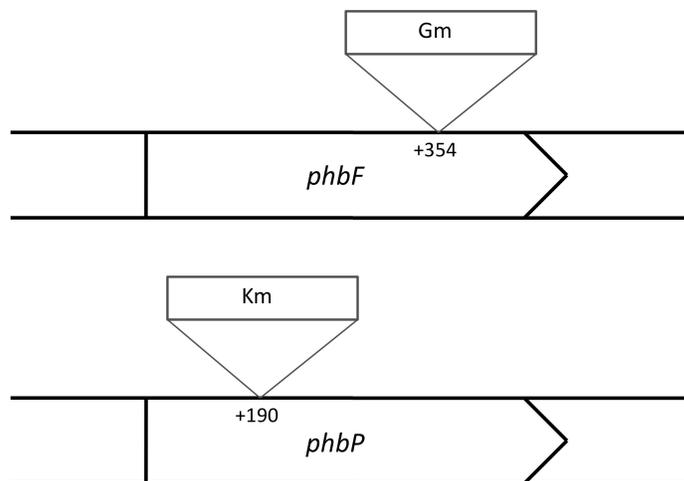


Figura 10. En esta imagen se muestra un esquema de las construcciones usadas para transformar la cepa UW136. Ambas incluyen una región de unos 100 pares de bases de cada lado, para facilitar la recombinación homóloga. El gen *phbF* fue interrumpido con un cassette de resistencia a gentamicina (Gm), mientras que *phbP* se interrumpió con un cassette de resistencia a kanamicina (km).

La cepa silvestre que se usó en los experimentos es la UW136, que acumula altos niveles de PHB, y es deficiente en su producción de alginato, lo cual es conveniente pues facilita su manejo. Para la generación de la cepa *phbP* Δ se hizo una construcción con un cassette de resistencia a kanamicina en la posición +190 del gen *phbP* (también se generó una cepa con un cassette de gentamicina, sin embargo se usó la primera cepa para los experimentos posteriores), con la cual se transformó la cepa UW136, y se

aprovechó el sistema de recombinación homóloga que existe en *A. vinelandii* para reemplazar el gen silvestre. Para la generar la cepa *phbF* Δ se partió de la misma cepa UW, pero se transformó con un plásmido que lleva una construcción con un cassette de resistencia a Gentamicina en el +354 del gen *phbF*. Ambas construcciones cuentan con secuencias que flanquean al gen por ambos lados, para facilitar el proceso de recombinación homóloga (Figura 11).

Dado que hay múltiples copias del cromosoma en cada célula, la transformación normalmente produce poblaciones de células que tienen copias del gen silvestre y otras del gen inactivado. En estos casos se necesita resembrar la cepa varias veces en medio con el antibiótico de selección, partiendo de una colonia, para ejercer una presión selectiva que favorece la pérdida de las copias del gen silvestre. Finalmente se comprobó que las cepas no tuvieran copias del gen silvestre mediante PCR de colonia.

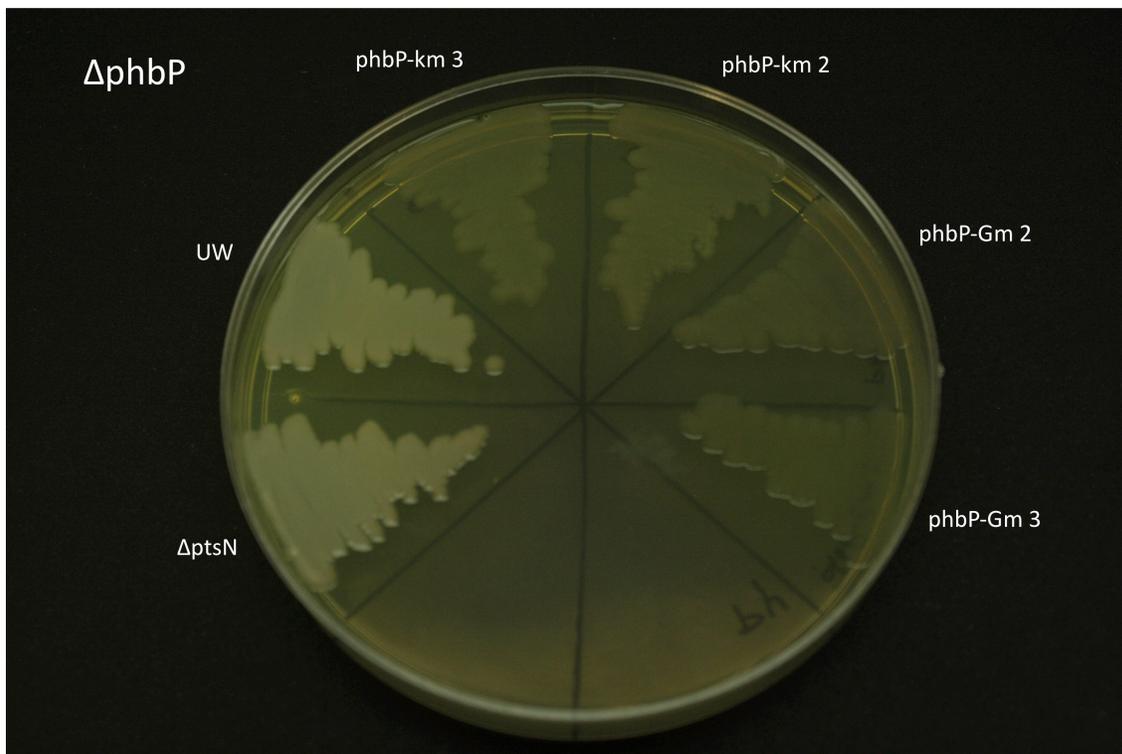


Figura 11. En esta imagen se muestra el fenotipo de la cepa silvestre UW136, junto con la mutante $\Delta ptsN$, que sobreproduce PHB, ambas tienen un aspecto opaco y blancuzco, característico de la acumulación del polímero. También se observan distintas cepas mutantes para el gen *phbP*, generadas después de la transformación, de las cuales se eligió una. El fenotipo translúcido que presentan las cepas mutantes es característico de una baja producción de PHB.

2. Fenotipo de producción de PHB de las cepas *phbP* Δ y *phbF* Δ en medio sólido.

El primer paso fue estudiar el fenotipo de las mutantes, con relación a su producción y acumulación de PHB. Para esto se cultivaron en un medio PY sólido (un medio que favorece la producción de PHB), y se cultivaron por 48h. La cepa UW silvestre tiene una alta producción de PHB, por lo que al cultivarse en este medio sólido, muestra un fenotipo blanco-opaco, que se debe al PHB acumulado dentro de la célula.

La cepa *phbP* Δ mostró un fenotipo translúcido y no muy blanco, lo que muestra que es deficiente en la producción de PHB, por lo menos en estas condiciones. En la figura se muestran cuatro mutantes para *phbP*, junto con la cepa silvestre UW y la Δ *ptsN*, una cepa mutante que sobreproduce PHB. La cepa *phbF* Δ presentó un fenotipo parecido, translúcido y no muy opaco, sugiriendo que también es deficiente en la producción de PHB en estas condiciones, como se muestra en la figura 12, junto con la cepa silvestre y la Δ *ptsN*.

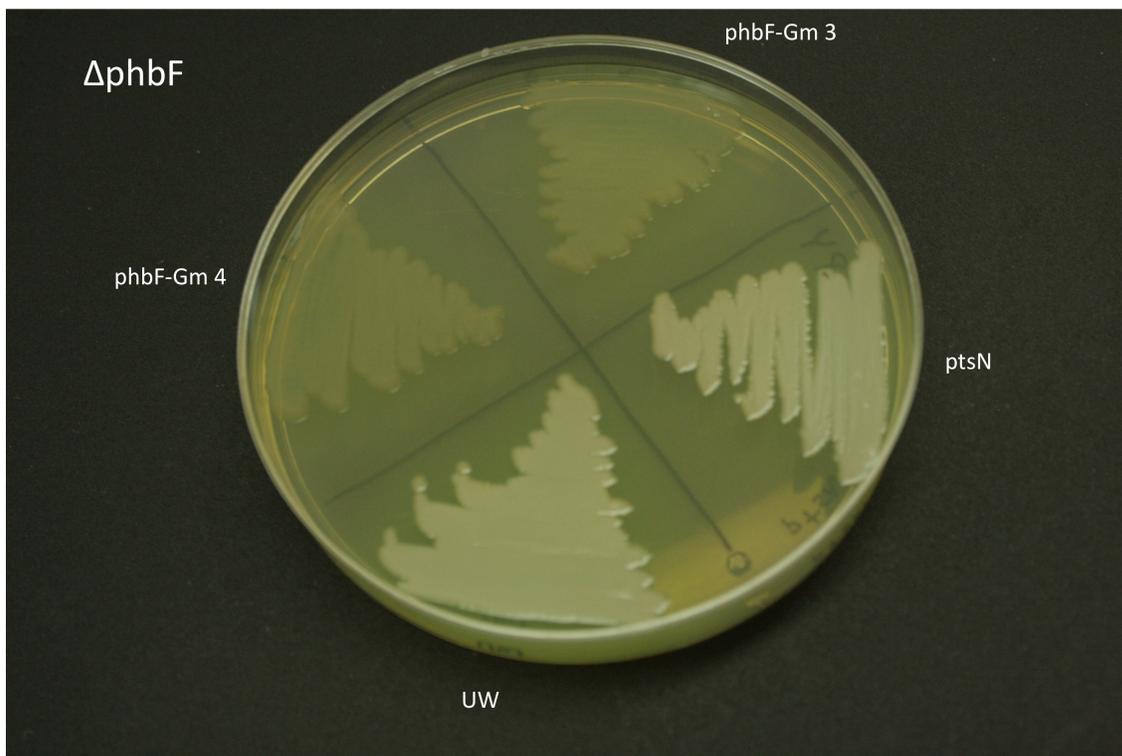


Figura 12. En esta imagen se observan dos cepas mutantes para *phbF*, las cuales, a diferencia de la UW136 y la Δ *ptsN*, presentan un fenotipo translúcido, mostrando una menor acumulación de PHB.

3. Cinética de acumulación de PHB de las mutantes *phbF* Δ y *phbP* Δ en medio líquido.

Para saber en qué medida afectan estas mutaciones a la producción de PHB, se realizaron mediciones de PHB en cultivos en medio PY líquido. Se realizaron cultivos en 50 ml de medio PY líquido, y se incubaron con agitación a 30°C durante 72h. Se tomó 1 ml de muestra cada 8h para medir la acumulación de PHB. Los resultados muestran que, en medio líquido, las mutantes *phbP* Δ y *phbF* Δ tienen una menor producción de PHB por mililitro de cultivo a partir de las 40h (figura 13). Este patrón se observa durante casi toda la cinética, después de las 40h. La mutante en *phbP* es la que tiene la menor producción de PHB. En la cinética se observa como, entre las 60 y las 70 horas, la cantidad de PHB de las tres cepas comienza a disminuir, debido a la degradación del polímero por el agotamiento de los nutrientes del medio.

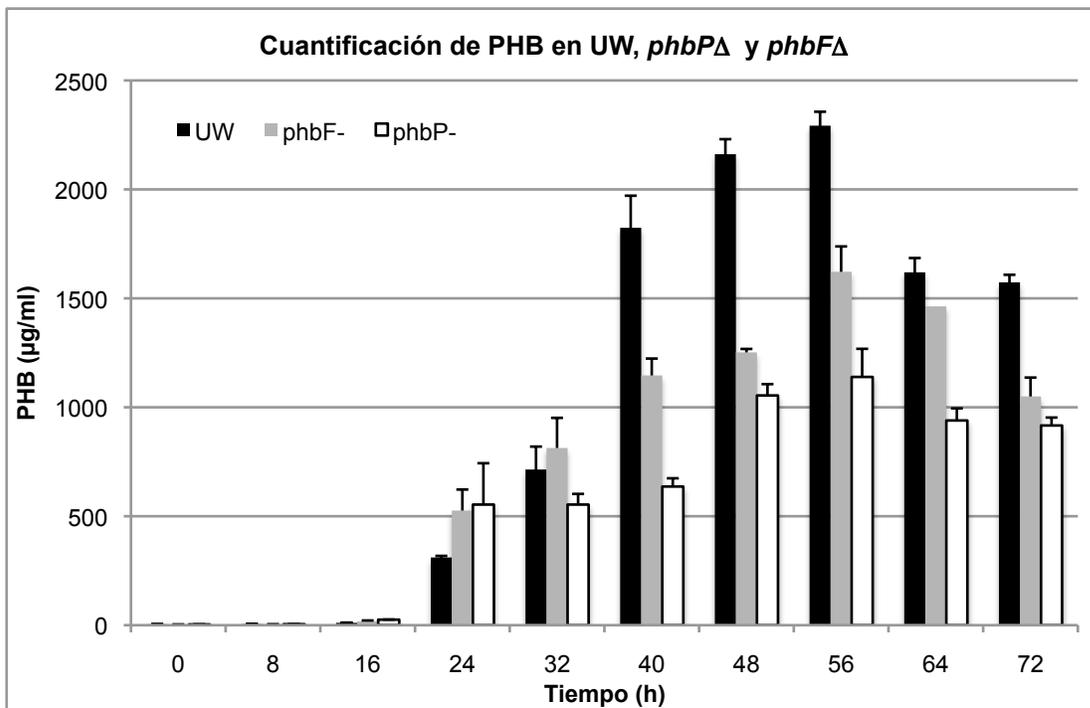


Figura 13. En esta cinética se observan los niveles de acumulación de PHB de las tres cepas (UW136, *phbP* Δ y *phbF* Δ) a lo largo de 72h de cultivo. Esta gráfica muestra la concentración absoluta del PHB en el cultivo.

La disminución en la acumulación de PHB en la cepa *phbP* Δ puede tener varias explicaciones. Por un lado, la falta de una fasina importante provoca que el PHB se acumule en gránulos más grandes y en menor número, con lo que se disminuye la superficie de los gránulos, disminuyendo consecuentemente el espacio para que las sintasas funcionen (previamente postulado en el modelo de Wieczorek *et al.*, 1995). Otra de las explicaciones es que las fasinas tengan un efecto positivo sobre las sintasas por medio de una interacción directa (fenómeno que ha sido observado en experimentos *in vitro* en otros modelos; Jossek *et al.*, 1998 y Qi *et al.*, 2000), y al faltar una fasina importante en el gránulo, la actividad de las sintasas se ve disminuida. Una última explicación puede tener que ver con que al faltar la fasina el PHB se encuentra más expuesto en el citoplasma, por lo que otras proteínas que normalmente no están involucradas en estos procesos se unen de manera inespecífica al gránulo, por tener dominios hidrofóbicos, lo que puede causar un efecto negativo generalizado en diversas vías metabólicas, que de manera indirecta podrían afectar a la producción y acumulación del polímero.

La cepa *phbF* Δ también acumula PHB a niveles más bajos que la silvestre, efecto que podría ser explicado suponiendo que *phbF* participa en la regulación de depolimerasas del de PHB, de manera que su ausencia permitiría una sobreexpresión de las mismas y, por lo tanto, niveles más bajos de PHB en la célula. En el laboratorio se tienen evidencias preliminares de que *phbF* regula la transcripción de al menos una depolimerasa del gránulo.

Una de las razones por las que existen disminuciones en las cantidades de PHB podría ser que el crecimiento de las cepas mutantes se viera afectado. Para averiguar si este era el caso, durante las cinéticas se midió en cada punto el crecimiento de las cepas, calculando la cantidad de proteína presente en el cultivo (figura 14).

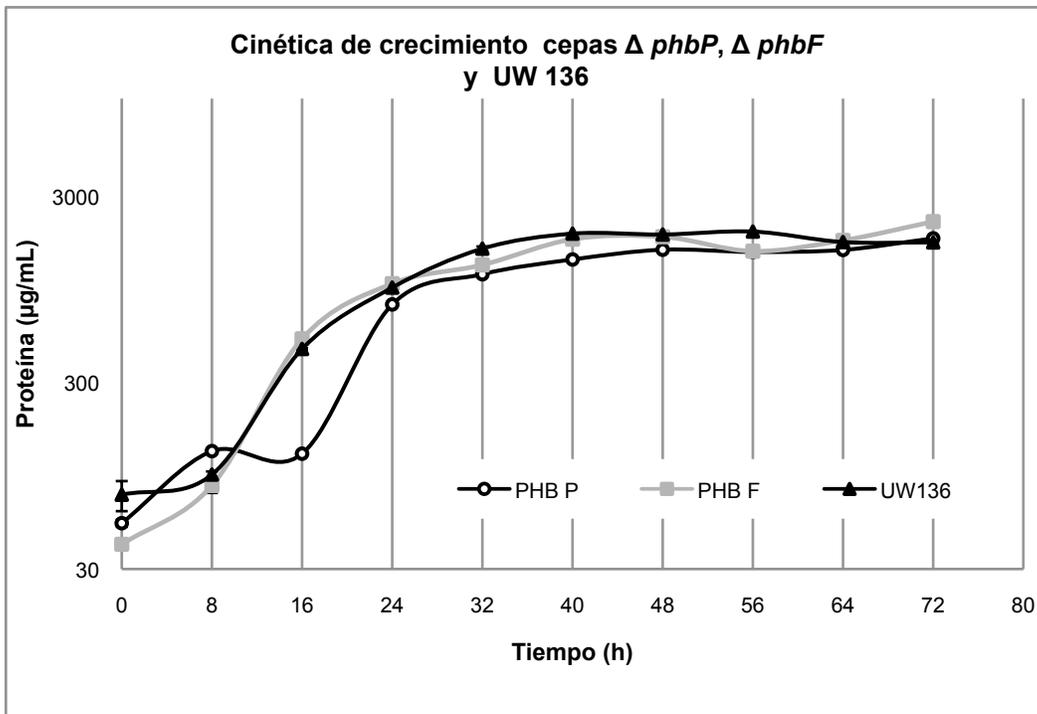


Figura 14. Cinética de crecimiento de las cepas UW136, *phbF* Δ y *phbP* Δ . Se muestra la cantidad de proteína medida cada 8h. Este es un experimento realizado por triplicado. La síntesis de PHB se inicia alrededor de las 24h.

Este experimento (figura 14) nos permitió observar que la cepa *phbF* Δ no tiene problemas de crecimiento, ya que durante toda la cinética la cantidad de proteína producida es comparable con la de la cepa silvestre. Por otro lado, la cepa *phbP* Δ parece tener una cierta deficiencia en las primeras horas del cultivo, sin embargo, a partir de que se inicia la acumulación de PHB su crecimiento es comparable al de la silvestre, por lo que no parece que el crecimiento tenga que ver con las deficiencias en la acumulación del polímero. Con estas mediciones se estimó la cantidad de PHB específica de cada cepa, es decir, la cantidad de PHB ajustada a la concentración de proteína del cultivo (μg de PHB/ μg de proteína), que se muestra en la figura 15.

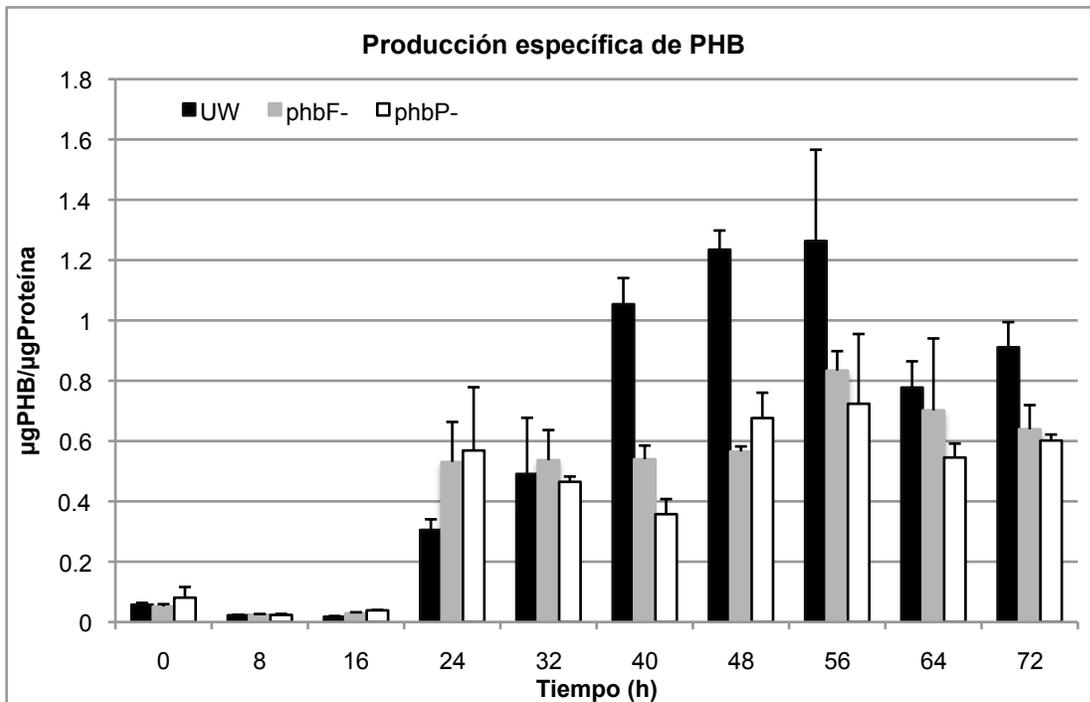


Figura 15. En esta gráfica se muestra una cinética de la cuantificación específica de PHB, lo que se refiere a la cantidad de PHB producida sobre la cantidad de proteína en el cultivo.

En esta gráfica podemos observar que el patrón de acumulación específica de PHB no cambia de manera significativa con respecto a la cuantificación absoluta, las dos mutantes tienen una menor acumulación después de las 32h en casi todos los puntos. Este resultado nos sugiere que la disminución en la acumulación de PHB es independiente de algún efecto en el crecimiento de las cepas mutantes.

4. Microscopía electrónica de las cepas *phbP*Δ y *phbF*Δ.

Para observar con detalle el fenotipo de las mutantes se tomaron imágenes de microscopía electrónica, luego de una incubación de 72h en medio PY líquido, que se muestran en las figuras 16-18. Los cuerpos blancos que se observan dentro de las células son los gránulos de PHB. Como observamos en la cinética, a las 72 h ya se ha llegado a un punto máximo en la acumulación de PHB (figuras 13 y 15).

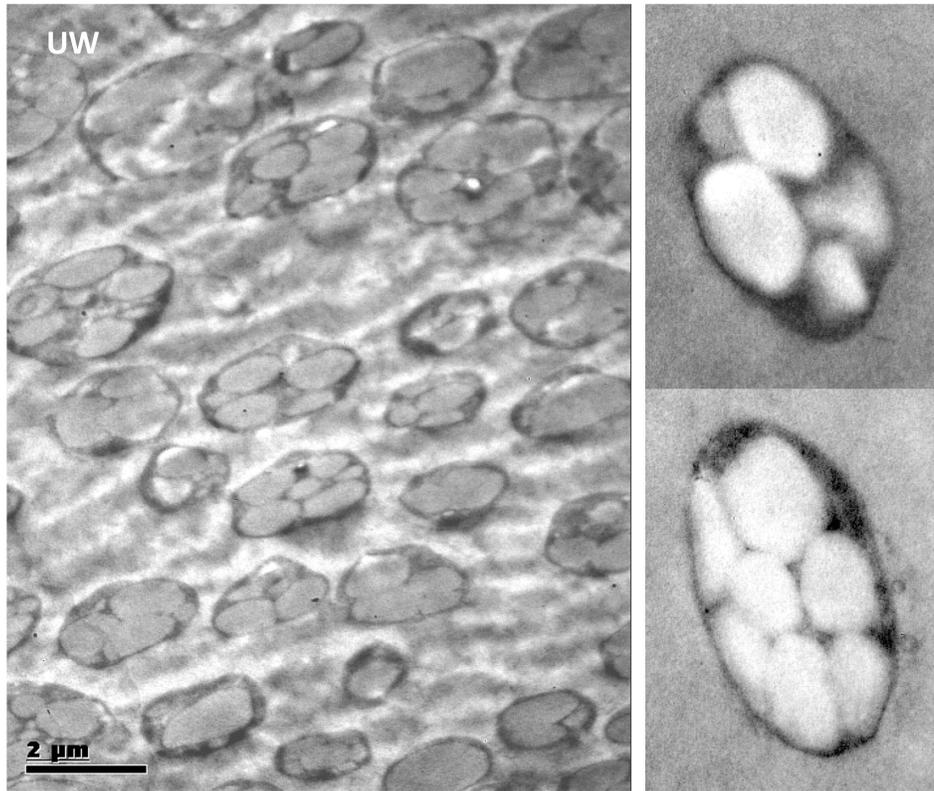


Figura 16. Fenotipo de la cepa silvestre UW136, observado con microscopía electrónica de barrido. Del lado izquierdo se observa un campo abierto, mientras que en la derecha se observan acercamientos de células aisladas.

En la figura 16 se muestra la cepa silvestre UW, lo primero que notamos es el gran tamaño de los gránulos, que ocupan una gran parte del citoplasma, esto se debe a que las células llevan ya mucho tiempo acumulando PHB, y a que esta cepa en particular acumula una gran cantidad de PHB. Se puede observar que en la mayoría de las células se forman entre 4 y 6 gránulos de gran tamaño, que ocupan casi todo el espacio celular, además de que todas las células presentan gránulos, los cuales tienen un tamaño más o menos regular. Esto nos habla de que el proceso está altamente regulado.

En la figura 17 se muestran células de la cepa *phbF* Δ : En este caso se observan diferencias inmediatas con respecto a la cepa silvestre: el tamaño de los gránulos es mucho menor al de los gránulos de las células silvestres, y éstos se encuentran en mucha mayor cantidad. Este fenotipo coincide con el escenario en el que existe un exceso de fasinas en la célula, lo que provocaría un aumento en la relación superficie-volumen de los gránulos, produciendo así una mayor cantidad de gránulos de menor tamaño. El

tamaño de las células no parece haber cambiado, y casi todas han acumulado una gran cantidad de PHB, el cual sigue ocupando la mayor parte del espacio celular.

El fenotipo de esta cepa nos hizo notar que posiblemente la proteína PhbF tiene un papel en la regulación de una o varias fasinas, ejerciendo un efecto negativo, de manera directa o indirecta.

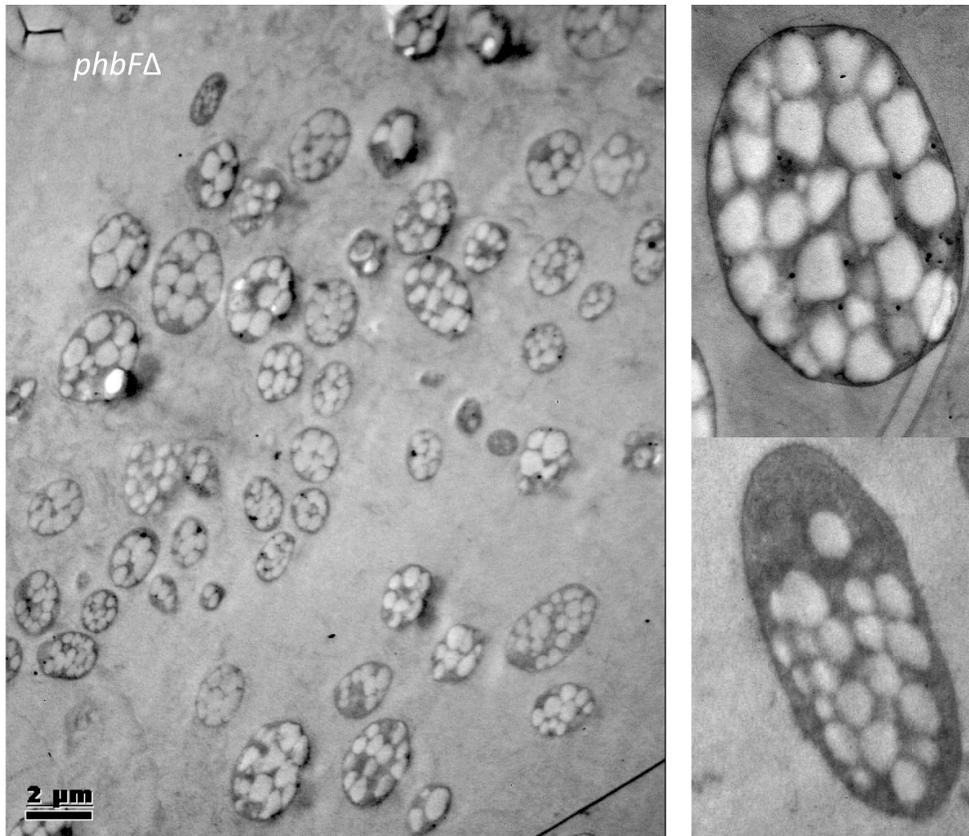


Figura 17. Imágenes de microscopía electrónica de células de la cepa *phbFΔ*. En la mayoría de las células se observa un gran número de gránulos, que además son más pequeños que en la cepa silvestre.

El fenotipo de la cepa *phbPΔ* también es muy distintivo, sobre todo respecto a la morfología de los gránulos, como se muestra en la figura 18. La mayoría de las células cuentan con un menor número de gránulos, los cuales son de gran tamaño, llegando en algunos casos a tener un sólo gránulo central, que ocupa casi todo el espacio citoplasmático. Hay células que tienen un gránulo muy grande y varios pequeños. Este fenotipo se explica posiblemente por que al no estar PhbP en la superficie del gránulo,

todo el PHB colapsa en un gránulo central. En general la estructura de los gránulos parece ser más irregular que en la cepa silvestre. También observamos que hay algunas células que no presentan gránulos PHB en su citoplasma.

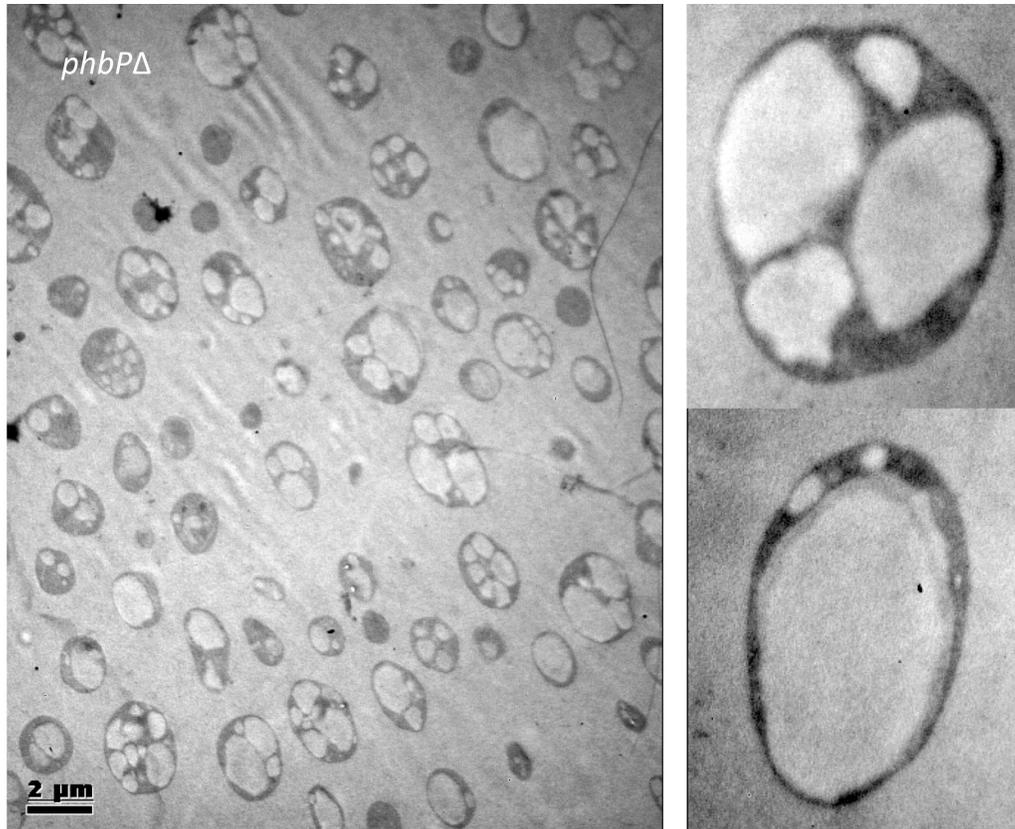


Figura 18. Microscopía electrónica de la cepa *phbPΔ*. En muchos de los casos podemos observar células que tienen un gránulo central muy grande, y otros más pequeños, o en casos extremos un sólo gránulo que ocupa gran parte del espacio intracelular. Además se observan muchas células que parecen no contener gránulos.

El fenotipo de la cepa *phbPΔ* demuestra que la fasina PhbP es, aunque probablemente no la única, una proteína esencial para la estructura del gránulo, su ausencia tiene efectos claros en la arquitectura de los mismos. Sabemos que existe al menos otro gen que codifica para una fasina en el genoma de *A. vinelandii* (*phbP2*, figura 8), sin embargo no se sabe en qué condiciones se expresa, o si tiene otras funciones específicas en los gránulos de PHB.

Otra observación interesante es que algunas de las células de la cepa *phbPΔ* parecen carecer de gránulos de PHB, alrededor de un 10% de las células parecen no tenerlos,

mientras que en la cepa silvestre casi no observamos este fenómeno. Una de las posibles explicaciones es que al no formarse varios gránulos dentro de la célula, el PHB no se puede distribuir de manera correcta al momento de la división celular, por lo que una de las células hijas se queda con un gránulo muy grande con todo el PHB, mientras que la otra se queda sin gránulos. Esta mala distribución de los gránulos entre las células hijas podría ser otro de los factores que contribuyen a la deficiente acumulación de PHB, ya que algunas células se quedarían sin gránulos y dejarían de sintetizar PHB. Aunque no tenemos muchas imágenes de microscopía para hacer un estudio estadístico sobre este fenómeno, será interesante continuar con esta hipótesis en trabajos futuros.

5. Efecto de la mutación en *phbF* sobre la expresión de *phbP* y sobre sí mismo.

Para averiguar si en la cepa *phbF* Δ se afecta la transcripción de *phbP* y/o de *phbF*, se cuantificó el mRNA de estos genes mediante rtPCR cuantitativo. Para esto se tomaron muestras de cultivos de 12 y 30 horas, y se midió la expresión relativa de ambos transcritos para cada tiempo. Elegimos estos dos tiempos para tener un tiempo en el que no hubiera producción de PHB (12h) y otro en el que ya se hubiera encendido la maquinaria de síntesis (30h). Los cultivos se realizaron en medio mínimo BS-sacarosa, ya que hubo problemas técnicos cuando se realizó el experimento en medio rico PY.

En la figura 19 se muestra la expresión relativa del transcrito de *phbP* en la cepa *phbF* Δ , con respecto a la expresión del mismo gen en la cepa silvestre. En el caso de la muestra de 12h observamos que el nivel del transcrito de *phbP* es mucho mayor en *phbF* Δ que en la silvestre; hay un aumento de alrededor de 80 veces. Por otro lado, a las 30h también existe un aumento con respecto a la silvestre, sin embargo no es tan drástico. Este resultado nos deja ver que efectivamente, en ausencia de PhbF, hay un aumento en los niveles del transcrito de *phbP*, por lo que es evidente tiene un efecto negativo a nivel transcripcional.

Suponemos que a las 12h el gen de *phbP* tiene un nivel de expresión muy bajo en la cepa silvestre, ya que al no haber producción de PHB, este gen debería de estar fuertemente regulado de manera negativa. Esto explicaría por qué encontramos una diferencia tan grande en la cantidad de transcrito de *phbP* entre la cepa silvestre y la *phbF* Δ a las 12h, ya que en la *phbF* Δ hay una expresión descontrolada de *phbP*.

Por otro lado, a las 30h ya se ha echado a andar la maquinaria de síntesis de PHB, por lo que en el caso de la cepa silvestre ya debe haber un nivel de expresión considerable del gen *phbP*, haciendo que la diferencia con la expresión en la mutante *phbFΔ* no sea tan grande.

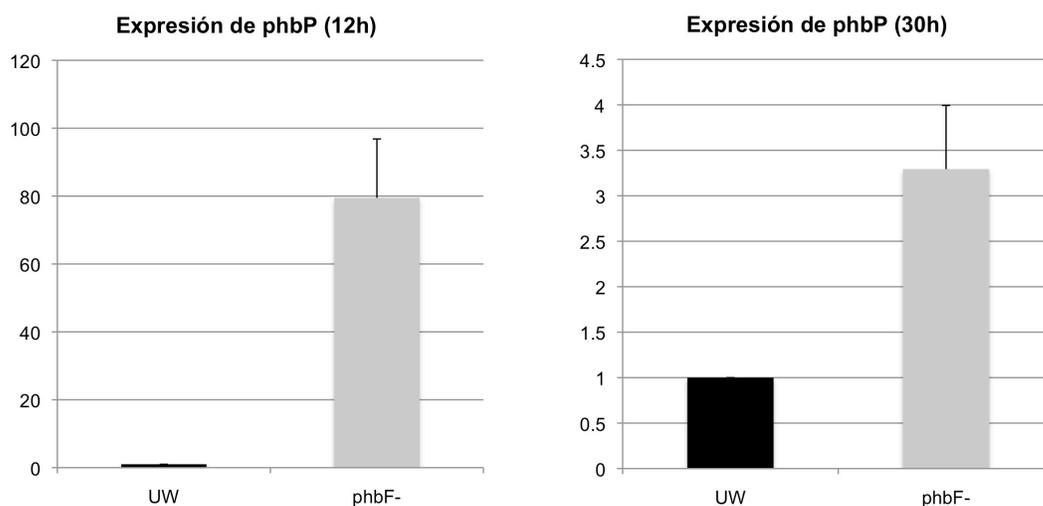


Figura 19. En estas gráficas se observa la expresión relativa del transcrito de *phbP* en la cepa *phbFΔ*, comparada con su expresión en la cepa silvestre. Del lado izquierdo observamos el nivel del transcrito de *phbP* a las 12h, y del lado derecho se observa el de las 30h.

Cuando analizamos la expresión del transcrito de *phbF* no se detectó al mensajero de *phbF* en la cepa *phbFΔ*, a pesar de que en la silvestre sí se detectó. Este resultado sugiere que *phbF* podría estar involucrado en su propia regulación, ejerciendo un efecto positivo sobre su transcripción. Este resultado debe ser tomado con reserva, ya que éste experimento es la única evidencia de que exista esta función para PhbF. La otra explicación es que el mensajero podría estar degradándose rápidamente gracias a la inserción del cassette de resistencia. Hacen falta más experimentos para tener datos concluyentes respecto a este caso.

6. Proteoma de los gránulos de PHB de las cepas *phbPΔ* y *phbFΔ*.

Con el experimento anterior se comprobó que PhbF está implicado en la transcripción de *phbP*, pero para averiguar si esto tiene un efecto a nivel de proteína, se realizó un estudio de proteómica del gránulo en la cepa *phbFΔ*. Para esto se purificaron gránulos de cultivos de 30h, y se corrieron las proteínas en un gel SDS-PAGE. En la figura 20 se pueden

observar, de izquierda a derecha, los proteomas de los gránulos de la cepa silvestre UW, la *phbF* Δ y la *phbP* Δ , se cargó la misma cantidad de proteína en cada carril del gel para poder comprar el patrón proteico entre las tres cepas.

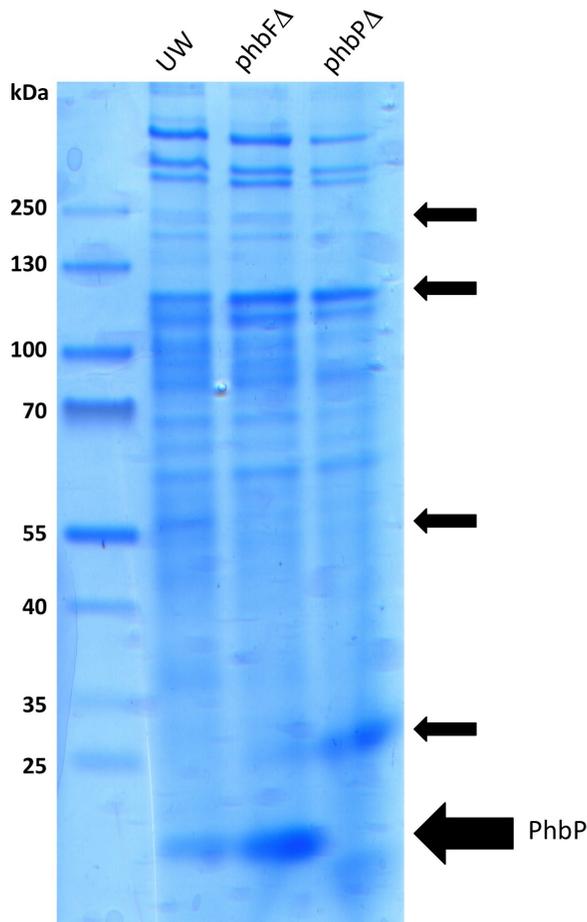


Figura 20. En esta imagen se muestra un gel SDS-PAGE en el que se compara el perfil proteico de los gránulos de las cepas UW136, *phbF* Δ , y *phbP* Δ .

En cada carril se cargó la misma cantidad de proteína total purificada junto con los gránulos de PHB.

Las flechas indican cambios en la expresión de algunas proteínas que aún no han sido identificadas. La flecha grande indica a la fasina PhbP.

Lo primero que se observa es la gran cantidad de proteínas distintas que están presentes en la superficie de los gránulos, algunas de las cuales se han identificado previamente mediante secuenciación, y que podemos reconocer por su tamaño. Algunos de los ejemplos son PhbB (acetoacetil-CoA reductasa), la depolimerasa 03910, y una PHB sintasa. Seguramente hay más participantes involucrados que los que vemos, ya que hay proteínas presentes en concentraciones muy bajas, haciendo que las bandas sean demasiado tenues para reconocerse a simple vista.

Al analizar el patrón de la cepa *phbF* Δ , observamos que en más de una caso se nota un cambio en la cantidad de cierta proteína, sin embargo, el caso más claro es el de la fasina

PhbP, cuya banda de 20 kDa es mucho más gruesa que en la silvestre. Este experimento no es cuantitativo, sin embargo, indica que efectivamente hay un aumento en la cantidad de la proteína PhbP cuando *phbF* no está presente, lo cual es consistente con el fenotipo y con el aumento en el transcrito. Hay al menos otra proteína no identificada que se ve aumentada, lo cual sugiere que podría ser blanco de la misma regulación por *phbF*, además de otra que se ve disminuida, por lo que en el futuro valdrá la pena hacer estudios de secuenciación para averiguar la identidad de estas proteínas.

En el caso de la cepa *phbP* Δ , observamos que también existen cambios en el patrón proteico. Lo primero que se observa es que efectivamente no hay PhbP en los gránulos, lo cual confirma que las mutantes no tienen copias silvestres del gen. Hay una proteína no identificada que parece estar muy aumentada, por encima de la marca de los 25 kDa. Podemos observar otros cambios en la expresión de algunas proteínas, cuya identidad aún desconocemos. Al faltar PhbP del gránulo suponemos que se genera un desorden en la superficie del mismo; al exponerse el PHB directamente al citoplasma, es posible que otras proteínas se unan de manera inespecífica, las cuales no podemos observar probablemente por estar en muy bajas concentraciones. Es importante considerar que en estos geles se cargó la misma cantidad de proteína en cada carril, por lo que un aparente aumento en una proteína no quiere decir necesariamente que haya aumentado con respecto a otra cepa, sino que el aumento es con respecto al resto de las proteínas presentes en la muestra.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

La fasina phbP

Este trabajo demuestra que *phbP* es un elemento fundamental en la acumulación de PHB y en la arquitectura del gránulo. La disminución en la acumulación de PHB en ausencia de PhbP, tanto en cultivo sólido como en líquido, demuestran que la síntesis y acumulación del polímero no pueden llevarse a cabo en condiciones óptimas si PhbP no está presente. Por un lado, es claro que la falta de esta fasina provoca la formación de pocos gránulos de gran tamaño en la célula, por lo que hay menos superficie disponible para las sintasas. Además, es posible que, al quedar expuesto el PHB en el citoplasma, otras proteínas se unan de manera inespecífica al gránulo, gracias a dominios hidrofóbicos, quedando atrapadas en este sitio, lo cual podría tener un efecto negativo sobre diversos procesos celulares.

Tampoco descartamos la posibilidad de que PhbP tenga interacciones directas con algunas de las proteínas del gránulo, como por ejemplo las sintasas, necesarias para llevar a cabo sus funciones de manera óptima, lo cual también explicaría la deficiente acumulación de PHB. Los resultados concuerdan con el papel observado para las fasinias en otros organismos, recubriendo al gránulo de PHB, determinando el tamaño y número de los mismos.

Aunque la producción de PHB es un proceso que se realiza principalmente cuando las células ya no se dividen, aún existe división celular durante este proceso, por lo que deben existir mecanismos mediante los cuales se controle la distribución de los gránulos, para que cada célula hija conserve una cantidad parecida. Aunque no sabemos cómo funcione este mecanismo en *A. vinelandii*, es posible que *phbP* tenga una participación importante, pues en la cepa *phbP* Δ encontramos muchas células que parecen no tener gránulos de PHB en su interior. Este efecto podría deberse a que, al formarse un solo gránulo central, la célula al dividirse no sea capaz de romperlo en dos partes, quedándose una célula hija con el único gránulo, dejando a la otra sin gránulos.

Sin duda PhbP es importante en el gránulo, además de que es probablemente la fasina mayoritaria del gránulo, ya que su falta es suficiente para provocar cambios drásticos en el fenotipo de las células, además de que se encuentra en grandes cantidades en el gránulo. Sin embargo probablemente no sea la única, se ha identificado al menos otro gen

que podría codificar para una fasina adicional, que probablemente cumpla un papel importante.

El regulador PhbF

El fenotipo de la cepa *phbF* Δ es congruente con la hipótesis de que *phbF* regula de manera negativa a uno o varios genes involucrados en la superficie del gránulo, especialmente a genes de fasinas. Cuando hay más fasinas en la célula se debe aumentar la relación superficie-volumen de los gránulos, de manera que se forman gránulos en mayor número y de menor tamaño. Acorde con los resultados vistos anteriormente, este aumento en la relación superficie-volumen debería permitir que más sintasas se unieran a los gránulos, permitiendo así una mayor producción de PHB; sin embargo lo que vemos es el caso contrario, una disminución en la acumulación del polímero. Este efecto podría estar explicado por otras razones, una podría ser que *phbF* funcione como regulador negativo de una o varias depolimerasas de PHB, que al estar sobreexpresadas en ausencia de *phbF*, causarían una mayor tasa de depolimerización de PHB, y por lo tanto niveles de acumulación más bajos. Otros experimentos del laboratorio indican que efectivamente PhbF tiene un efecto negativo sobre la transcripción de al menos una depolimerasa.

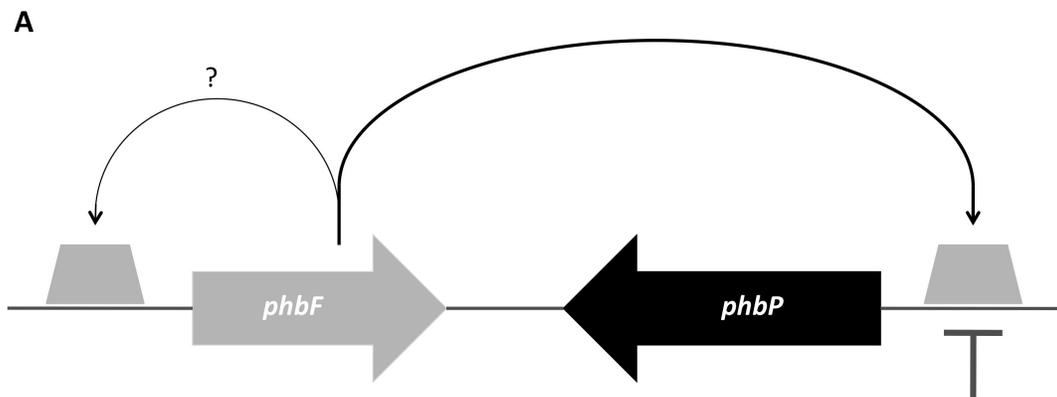
Hemos demostrado que los niveles de transcrito de *phbP* aumentan cuando *phbF* está ausente, lo que nos habla de que existe una regulación negativa de este gen a nivel transcripcional, sin embargo, aunque creemos que PhbF se une directamente al DNA para impedir la transcripción de este gen, esto tendrá que ser comprobado en el futuro con otro tipo de experimentos.

En el caso de la autorregulación de *phbF* deberá resolverse en el futuro con experimentos adicionales, ya que con los datos que tenemos no podemos sacar conclusiones sobre el mecanismo de este proceso. Existe la posibilidad de que efectivamente haya una regulación positiva sobre sí mismo, lo que representaría una función distinta al observado en otras bacterias.

También comprobamos que, en ausencia de *phbF*, el aumento en los transcritos de *phbP* se ven reflejados en los niveles de proteína, ya que observamos un aumento en la cantidad de PhbP en el proteoma de los gránulos. Esto nos deja ver que, aunque podría existir regulación a otros niveles, éste es un sitio de control fundamental para regular la

cantidad de fasinina necesaria para la correcta formación de los gránulos, y probablemente de otras proteínas involucradas en el proceso. El proteoma del gránulo nos muestra que hay cambios en los niveles de otras proteínas, que aún no hemos identificado, y que representan blancos, directos o indirectos, de la regulación mediada por *phbF*.

Los resultados obtenidos en este trabajo nos permiten proponer un modelo, que mediante experimentos adicionales tendrá que ser mejor definido, que representa el funcionamiento del sistema. Como se puede observar en la figura 21, *phbF* impide la transcripción del gen *phbP*, mientras que la síntesis de PHB no se ha iniciado. Cuando comienza a acumularse PHB en la célula, PhbF se une al polímero por tener una gran afinidad hacia el PHB, dejando libre la transcripción de *phbP*, hasta que los gránulos han sido completamente cubiertos. Cuando comienza a quedar PhbF libre en el citoplasma, éste se une de vuelta al DNA, impidiendo de nuevo la transcripción de *phbP*.



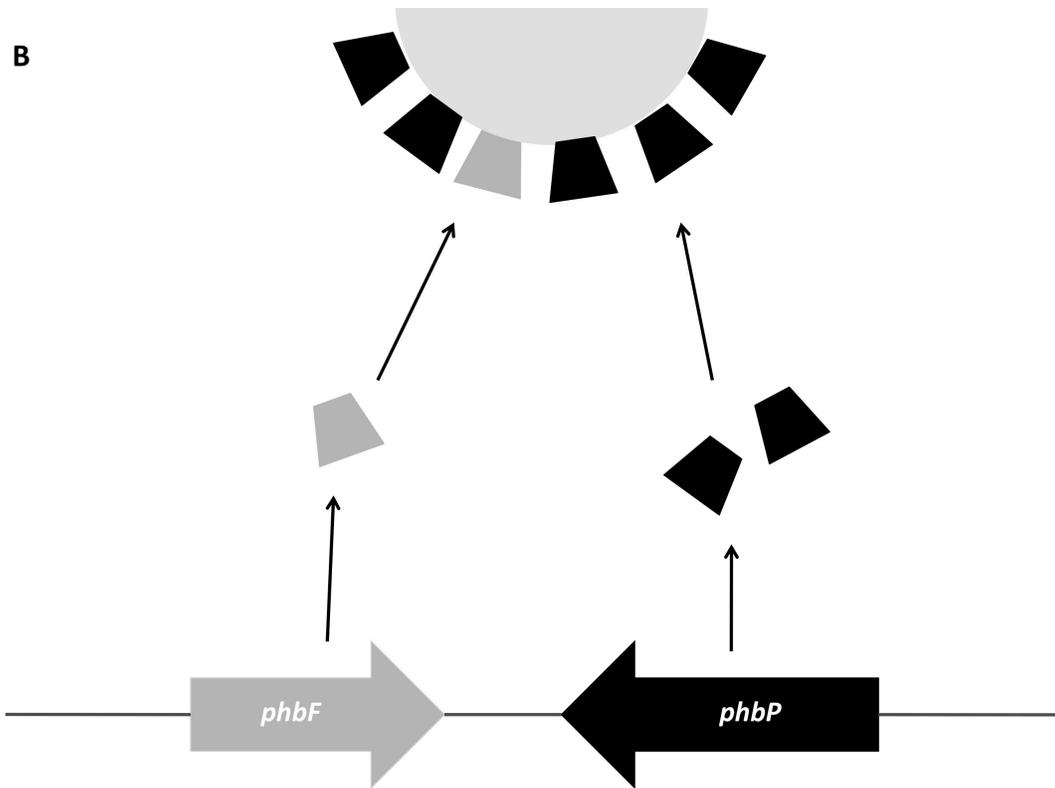


Figura 21. El modelo de regulación propuesto para estas proteínas: Cuando no hay PHB, PhbF ejerce una regulación negativa sobre *phbP* (A). Cuando se está acumulando PHB, PhbF se une a la superficie del gránulo, permitiendo la transcripción de *phbP* (B). PhbF podría tener una función de autorregulación.

Sabemos, por experimentos adicionales del laboratorio, que hay por lo menos otros dos blancos de *phbF*, que son regulados de manera negativa por esta proteína; una fasina hipotética (*phbP2*) y una depolimerasa, y pensamos que se encontrarán blancos adicionales de este sistema de regulación. Mediante la secuenciación de las proteínas cuyos niveles se han visto modificados en el proteoma, lograremos definir qué otros genes son sujetos a esta regulación. Otro paso inmediato será comprobar que PhbF se pega efectivamente al DNA y en qué sitios lo hace, para lo cual se podría purificar la proteína y realizar ensayos de movilidad. En este sentido, una búsqueda bioinformática en las secuencias cercanas a los promotores de los genes *phbP*, *phbP2* y una depolimerasa, se han encontrado unos sitios palindrómicos, que se asemejan a los sitios a los que se une el regulador PhaR de *P. denitrificans*, por lo que parecen ser buenos candidatos para

ser los sitios de pegado de *phbF*; Sin embargo, esto tendrá que ser comprobado de manera experimental. Estos sitios son buenos candidatos para ser el lugar en donde PhbF se une al DNA, ya que se encuentran cerca de los promotores de genes cuya transcripción se ve aumentada en ausencia de PhbF.

MÉTODOS

Procedimientos microbiológicos

Las cepas, plásmidos y oligonucleótidos usados se encuentran listados en la tabla 1. Los cultivos de *Azotobacter vinelandii* se realizaron a 30°C en medio con peptona de levadura (PY) o en medio Burke's (Kennedy et al., 1986) suplementado con sacarosa al 2% (BS). *E. coli* se cultivó a 37°C en medio Luria-Bertani. Las concentraciones de antibiótico para *A. vinelandii* (en $\mu\text{g ml}^{-1}$) fueron las siguientes: kanamicina 0.5, gentamicina 0.25, ácido nalidíxico 10, rifampicina 2.5. Las concentraciones de antibiótico para *E. coli* (en $\mu\text{g ml}^{-1}$) fueron: ampicilina 100, kanamicina 30, gentamicina 10.

La preparación de células competentes se realizó de la siguiente manera: las células fueron subcultivadas dos veces en medio de competencia (CM) por 48h a 30°C. Luego fueron recolectadas e inoculadas en 50 ml de medio CM líquido y fueron incubadas a 30°C por 48h, con agitación. Las células se recuperaron por centrifugación y fueron lavadas con MgSO_4 10mM. Finalmente fueron resuspendidas en 2 ml de medio CM con MgSO_4 16 mM.

La transformación de *A. vinelandii* se llevó a cabo como fue descrito por Page & von Tigerstorm (1978): se tomaron 100 μl de células competentes y se agregaron 5 μl del plásmido linearizado. La mezcla se colocó sobre medio CM sólido, extendiéndola sobre toda la superficie, y se incubó por 48h a 30°C. El tapete celular fue recolectado con 1ml de MgSO_4 10mM, y éste fue plateado en medio de selección e incubado a 30°C por 72h.

La cuantificación de proteína se realizó con el método de Lowry (Lowry et al. 1951). Se tomó una cantidad adecuada de muestra y se resuspendió en 200 μl de MgSO_4 . Se añadió 1ml de solución reactiva (Na_2CO_3 2%, NaOH 0.1N, $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.01%, CuSO_4 0.005 %) y se reposó 10min. Se añadieron 100 μl de reactivo de Folin diluido con un volumen de H_2O , y se reposó 30min. La absorbancia se leyó a 625nm. Se realizó una curva de calibración usando concentraciones crecientes de albúmina.

<i>Cepa/Plásmido/Oligo</i>	<i>Descripción</i>	<i>Referencia</i>
Cepas de <i>A. vinelandii</i>		
UW136	Silvestre	Colección del laboratorio
<i>gacA</i> -	UW con mutación <i>gacA::Gm</i>	Colección del laboratorio

<i>phbP</i> Δ	UW con mutación <i>phbP</i> ::Km	En este trabajo
<i>phbF</i> Δ	UW con mutación <i>phbF</i> ::Gm	En este trabajo
Cepas de <i>E. coli</i>		
DH5α	<i>supE44 ΔlacU169 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Hanahan (1983)
Plásmidos		
pJET1.2	Vector de clonación	Fermentas
Oligonucleótidos		
<i>gyrA</i> Fw	CCAGCAAGGGCAAGGTCTA	Noguez <i>et al.</i> (2008)
<i>gyrA</i> Rev	TCGTCCAGCGGCAACAGGT	Noguez <i>et al.</i> (2008)
<i>phbR</i> Fw	CCACATGCGTTTGGTTTCTTG	Noguez <i>et al.</i> (2008)
<i>phbR</i> Rev	TCTGCCCTAAGCGTCTCCTC	Noguez <i>et al.</i> (2008)
<i>phbB</i> Fw	TCCGCAATCCAAACGCAAAG	Noguez <i>et al.</i> (2008)
<i>phbB</i> Rev	GTGCTCTCCAATCGGTTAC	Noguez <i>et al.</i> (2008)
<i>qphbP</i> Fw	CTTTCTTCAAGCCCAACGAG	Muriel, datos no publicados
<i>qphbP</i> Rv	CTGAGTGCCGATTTTCGAT TT	Muriel, datos no publicados
<i>phbF</i> -RT1	CTTCGCTGACCACCAACTG	En este trabajo
<i>phbF</i> -RT2	CCGAAACGATGTTTCGTCTG	En este trabajo
<i>phbF</i> -1	CCCTGGTCACTTCGGTAATG	En este trabajo
<i>phbF</i> -2	CGCCATGGTTTTACCTTCC	En este trabajo
<i>phbP</i> -F	GGCAATACCGGGCTCATAG	En este trabajo
<i>phbP</i> -Re	CAAAACAGGCGGAAAGAAAG	En este trabajo

Construcción de las mutantes *phbP1*Δ y *phbF*Δ

Los oligos *phbF*-1 y *phbF*-2 se usaron para amplificar un fragmento de 0.8 kb que contiene al gen *phbF*, usando como templado el DNA cromosomal de *A. vinelandii* UW136. De igual manera, se usaron los oligos *phbP*-F y *phbP*-Re para amplificar un fragmento de 1.1 kb que contiene al gen *phbP*. Los fragmentos se clonaron en el plásmido pJET1.2, y luego fueron digeridos con *Bgl*III (ambos genes tienen un sitio de restricción único para *Bgl*III). El plásmido pJET-*phbP* fue usado para clonar un fragmento que contiene un cassette de resistencia a kanamicina, mientras que en el plásmido pJET-*phbF* fue clonado un cassette de resistencia a gentamicina. Los plásmidos fueron digeridos con la enzima *Pvu*I (con un sitio único en el vector) para ser linearizados, y fueron transformados en *A. vinelandii* UW136.

Medición de PHB

Para la extracción de PHB, los cultivos fueron crecidos en medio PY con sacarosa al 2%. El PHB fue extraído de las células mediante una incubación con hipoclorito de sodio al 30%, a 37°C durante 1h. El PHB fue separado de las células por centrifugación y lavado con agua, acetona y etanol. El PHB fue incubado por 10 min a 95°C con ácido sulfúrico concentrado (el PHB reacciona con el ácido para formar ácido propiónico, que da un color morado), y luego se midió la absorbancia de las muestras a 235λ.

Microscopía electrónica

Los cultivos fueron incubados en medio PY por 72h, luego las células fueron lavadas con una solución de sulfato de magnesio. Las células fueron fijadas toda la noche con glutaraldehído a 2.5% a 4°C. Después fueron lavadas y deshidratadas con etanol a varias concentraciones. Finalmente fueron incluidas en resina de Epon que fue polimerizada a 65°C por 24h. Se hicieron cortes ultrafinos que fueron incubados con acetato de uranilo, lavados con agua destilada y tratados con citrato de uranilo.

RT-PCR cuantitativo

Para purificar el RNA total se hicieron cultivos en medio PY por 12, 30 y 72 h, en duplicados. Las células se lavaron con sulfato de magnesio y con acetona, y se les agregó DEPC (dietilpirocarbonato) al 0.5%. Se agregó lisozima y se incubó a 37°C por 10 min. Se agregó proteinasa K y se incubó en hielo 10 min. Se agregó fenol caliente y luego cloroformo, para generar una fase acuosa con el RNA y separarlo por centrifugación. Se agregó etanol puro y se guardó a -20°C toda la noche para precipitar el RNA. El RNA fue tratado con DNAsa (Fermentas) durante 1h a 37°C, y se realizó un PCR como control para verificar la ausencia de DNA en las muestras. Se incubaron las muestras con Transcriptasa reversa y los respectivos oligos reversos a 65°C por 5 min, para generar el cDNA. El qPCR fue realizado en el Light Cycler 480 (Roche). Los oligos que se usaron para el qPCR fueron los siguientes: qphbPFw/qphbPRv para *phbP*, phbF-RT1/phbF-RT2 para *phbF*, phbBFw/phbBRev para *phbB*, phbRFw/phbRRev para *phbR* y gyrAFw/gyrARev para *gyrA*, el cual se usó como control interno para normalizar los resultados. Todos los ensayos se realizaron por duplicado. Los datos se presentan como cambio relativo de los niveles de RNA de las mutantes con respecto a la cepa silvestre.

Análisis proteómico del gránulo

Para purificar los gránulos de PHB, las células fueron cultivadas en medio PY durante 30h. Las células fueron lavadas con sulfato de magnesio, y resuspendidas en Buffer Tris-HCl. Se usó la prensa francesa para romper las células sin comprometer la integridad de los gránulos. Los gránulos fueron separados del resto del extracto celular con dos gradientes de glicerol que fueron centrifugados a 20000 rpm por 45 min. Los gránulos fueron colectados del gradiente con una pipeta y posteriormente dializados a 4°C toda la noche, para quitarles el glicerol. Los gránulos se corrieron en un gel SDS-PAGE, Tris-tricina 10%.

BIBLIOGRAFÍA

1. Espin, G. Biología de *Azotobacter vinelandii* en *Microbios en Línea*. Martínez Romero, E. y Martínez Romero, J. Editores. Universidad Nacional Autónoma de México. México, 2002.
2. Fuller, Clinton (1999). Microbial inclusions with special referente to PHA inclusions and intracellular Boundary envelopes. *International Journal of Biological Macromolecules*. 25: 21-29.
3. Griebel R, Smith Z, Merrick JM. (1968). Metabolism of poly-beta-hydroxybutyrate, Purification, composition, and properties of native poly-beta-hydroxybutyrate granules from *Bacillus megaterium*. *Biochemistry*. Oct; 7(10): 3676-81.
4. Guo-Qiang Chen. *Plastics from Bacteria: Natural Functions and Applications*. Springer-Verlag. Berlin, 2010.
5. Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*. 5;166(4):557-80.
6. Jossek, R., Reichelt, R., Steinbuchel, A. (1998). In vitro biosynthesis of poly(3-hydroxybutyric acid) synthase of *Chromatium vinosum*. *Applied Microbiological Biotechnology*. 49: 258-266.
7. Jurasek, L., and Marchessault, R. (2002). The role of phasins in the morphogenesis of poly(3-hydroxybutyrate) granules. *Biomacromolecules*. 3: 256-261.
8. Jurasek, L., Marchessault, R. (2004). Polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* cells: a computer simulation. *Applied Microbiological Biotechnology*. 64: 611-617.
9. Kennedy, C., Gamal, R., Hummprey, R., Ramos, J., Dean, D. (1986). The *nifH*, *nifM*, and *nifN* genes of *Azotobacter vinelandii*: characterization by Tn5 mutagenesis and isolation from pLARF1 gene Banks. *Molecular Genetics and Genomics*. 205, 318-325.
10. Keshvarz, T. and Roy, I. (2010). Polyhydroxyalcanoates: bioplastics with a green agenda. *Current Opinion in Microbiology*. 13: 321-326.
11. Lenz, R. and Marchessault, R. (2005). Bacterial polyesters: Biosynthesis, biodegradable plastics and biotechnology. *Biomacromolecules*. 6: Number 1.
12. Lowry, O., Rosebrough, N., Farr, L., Randall, R. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.
13. Maehara, A., Ueda, S., Nakano, H., Yamane, T. (1999). Analyses of a polyhydroxyalcanoic acid granule-associated 16-kilodalton protein and its putative regulador in the *pha* locus of *Paracoccus denitrificans*. *Journal of Bacteriology*. 181: 2914-2921.
14. Maehara, A., Doi, Y., Nishiyama, T., Takagi, Y., Ueda, S., Nakano, H., Yamane, T. (2001). PhaR, a proteina of unknown function conserved among short-chain-length polyhydroxyalkanoic acids producing bacteria, is a DNA-binding protein and represses *Paracoccus denitrificans phaP* expression in vitro. *FEMS Microbiolgy Letters*. 200: 9-15.

15. Maehara, A., Taguchi, S., Nishiyama, T., Yamane, T., Doi, Y. (2002). A repressor protein, PhaR, regulates polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis via its direct interaction with PHA. *Journal of Bacteriology*. 184: 3992-4002.
16. Murphy, D. J. (1993) Structure, function and biogenesis of storage lipid bodies and oleosins in plants. *Progress in Lipid Research*. 32:247-280.
17. Noguez, R., Segura, D., Moreno, S., Hernandez, A., Juarez, K., Espin, G. (2008). Enzyme I^{Ntr}, NPr and IIA^{Ntr} are involved in regulation of the Poly-β-hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. 15: 244-254.
18. Page, W., von Tigerstorm, M. (1978). Induction of transformation competence in *Azotobacter vinelandii* iron-limited cultures. *Canadian Journal of Microbiology*. 24: 1590-1594.
19. Pieper-Furst, U., Hussein, M., Mayer, F., Steinbuchel, A. (1994). Purification and characterization of a 14-kilodalton protein that is bound to the surface of polyhydroxyalkanoic acid granules in *Rhodococcus ruber*. *Journal of Bacteriology*. 176: 4328-4337.
20. Pieper-Furst, U., Madkour, H., Mayer, F., Steinbuchel, A. (1995). Identification of the region of a 14-Kilodalton protein of *Rhodococcus ruber* that is responsible for the binding of this phasin to polyhydroxyalkanoic acid granules. *Journal of Bacteriology*. 177: 2513-2523.
21. Potter, M., Madkour, M., Mayer, F., Steinbuchel, A. (2002). Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology*. 148: 2413-2426.
22. Potter, M., Muller, H., Reinecke, F., Wieczorek, R., Fricke, F., Bowien, B., Friedrich, B., Steinbuchel, A. (2004). The complex structure of polyhydroxybutyrate (PHB) granules: four orthologous and paralogous phasins occur in *Ralstonia eutropha*. *Microbiology*. 150: 2301-2311.
23. Potter, M., Muller, H., Steinbuchel, A. (2005). Influence of homologous phasins (PhaP) on PHA accumulation and regulation of their expression by the transcriptional repressor PhaR in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology*. 151: 825-833.
24. Prieto, M., Buhler, B., Jung, K., Withholt, B., Kessler, B. (1999) PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of *Pseudomonas oleovorans* GPo1 involved in the regulatory expression system for pha genes. *Journal of Bacteriology*. 181: 858-868.
25. Qi, Q., Steinbuchel, A., Rehm, B. (2000). In vitro synthesis of poly(3-hydroxidecanoate): purification and enzymatic characterization of type II polyhydroxyalkanoate synthases PhaC1 and PhaC2 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Microbiological Biotechnology*. 54: 27-43.

26. Setubal, J., dos Santos, P., et al. (2009). Genome sequence of *Azotobacter vinelandii*, an obligate aerobe specialized to support diverse anaerobic metabolic processes. *Journal of Bacteriology*. 191: 4534-4545.
27. Steinbuchel, A., Aerts, K., Babel, W., Follner, C., Liebergesell, M., Madkour, M., Mayer, F., Pieper-Furst, U., Pries, A., Valentin, H., Wieczorek, R. (1995) Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. *Canadian Journal of Microbiology*. 41: 94-105.
28. Steinbuchel, A.; Wieczorek, R.; Alvarez, H.; Jossek, R. En: *Proceedings, International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates*; Eggink G. et al., Eds. 1996; p 36.
29. Stuart, E., Tehrani, A., Valentin, H., Dennis, D., Lenz, R., Fuller, C. (1998). Protein organization on the PHA inclusion cytoplasmic boundary. *Journal of Biotechnology*. 64: 137-144.
30. Valentín, H., Stuart, E., Fuller, C., Lenz, R., Dennis, D. (1998). Investigation of the function of proteins associated to polyhydroxyalkanoate inclusions in *Pseudomonas putida* BMO1. *Journal of Biotechnology*. 64: 145-157.
31. Wieczorek, R., Pries, A., Steinbuchel, A., Mayer, F. (1995). Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *Journal of Bacteriology*. 177: 2425-2435.
32. York, G., Stubbe, J., Sinskey, A. (2001). New insight into the role of the PhaP phasin of *Ralstonia eutropha* in promoting synthesis of polyhydroxybutyrate. *Journal of Bacteriology*. 183: 2394-2397.
33. York, G., Junker, B., Stubbe, J., Sinskey, A. (2001). Accumulation of the PhaP phasin of *Ralstonia eutropha* is dependent on production of polyhydroxybutyrate in cells. *Journal of Bacteriology*. 183: 4217-4226.
34. York, G., Stubbe, J., Sinskey, A. (2002). The *Ralstonia eutropha* PhaR protein couples synthesis of the PhaP phasin to the presence of polyhydroxybutyrate in cells and promotes polyhydroxybutyrate production. *Journal of Bacteriology*. 184: 59-66.