



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Dinámica de los gránulos de polihidroxitirato durante
el ciclo celular de *Caulobacter crescentus*.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO
DE:**

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

Ana Laura Salinas Romero



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Sebastian Poggio Ghilarducci**

2013

1. Datos del alumno

Salinas

Romero

Ana Laura

55 30 27 87

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

101001601

2. Datos del Tutor

Dr

Sebastian

Poggio

Ghilarducci

3. Datos del sinodal 1

Dr

Heliodoro

Celis

Sandoval

4. Datos del sinodal 2

Dr

Luis

Servín

González

5. Datos del sinodal 3

Dr

Jesús

Ramírez

Santos

6. Datos de sinodal 4

Dra

Clelia

Domenzain

Reyna

7. Datos del trabajo escrito

Dinámica de los gránulos de polihidroxitirato durante el ciclo celular de *Caulobacter crescentus*.

57 p

2013

Agradecimientos

Especiales agradecimientos a la técnico del laboratorio, Aurora Ventura Osorio Franco por su apoyo en la realización de ésta investigación.

Al proyecto PAPIIT-UNAM IN02511 por su beca de apoyo a la finalización de estudios.

Para ti Mamá...

Dra. Rosa Laura Camarena Mejía gracias por darme la oportunidad de trabajar en el laboratorio y por tener siempre una linda sonrisa.

Dr. Sebastian Poggio Ghilarducci gracias por estar siempre dispuesto a ayudarme y llevarme por el camino de la investigación, por aceptarme, regañarme y enseñarme, pero sobre todo por creer en mí.

Auro, gracias por enseñarme tantas y tantas cosas, por revisarme las cuentas con tanta paciencia y sobre todo por ser el abrazo con tanto cariño que uno puede encontrar en esas cuatro paredes.

Mamá, tu siempre has estado a mi lado y eres parte de mí, ten por seguro que yo nunca te voy a dejar caer, así como tú lo hiciste tantos años, en los que día con día forjaste mi pensamiento y mis sentimientos; por ti es que hoy estoy logrando este sueño, por ti es que soy todo, tú me enseñaste a alcanzar las estrellas y a no tener miedo de llegar a ellas. Gracias mamá por ser el mayor ejemplo de mujer, de profesionalista y sobretodo el mayor ejemplo de vida.

Papá tú siempre me has dado la fortaleza para seguir adelante, para levantarme después de un gran tropiezo, me has dado la seguridad que me hace falta para enfrentar nuevos retos, gracias a ti he forjado el carácter y no me da miedo la vida que viene. Tú siempre serás el primer gran hombre de mi vida.

Paulina, ser mi única hermana no es lo principal, eres mi amiga, mi confidente, sin ti nada sería igual. Gracias por quererme tanto y por fastidiarme también, pero de eso se trata ser hermanas verdad? Quiero que sepas que crecer junto a ti fue una experiencia maravillosa, gracias por estar ahí siempre.

Alberto, en verdad estoy agradecida de que formes parte de la familia, a veces es difícil aceptar algo nuevo, pero el amor que le tienes a mi hermana es suficiente para mí. Gracias por todo.

Anet Rivera Osorio, tu guía académica es fascinante, pero tu amistad es incomparable.

Isaí Arista gracias por siempre alentarme y sacarme enormes sonrisas de esas que solo tú logras. Gracias por estar conmigo y sobre todo gracias por recordarme que los caballeros todavía existen.

A Salvador Fabela por tus sabios consejos y tus amenas compañías.

Clelia Domenzain gracias por siempre tener esa respuesta, gracias por tu amistad.

Compañeros del laboratorio: Caleb, Benjamín, Lili, Luis David, Andrés, Sandra, José Andrés, Diego, Paulina, José Cruz, Iván, Mauricio, Giovanni, Manuel y todos los demás que hicieron más placentero el tiempo del quehacer científico y no tan científico.

A mis padrinos, Liz, Silvia y Alejandro Cruz porque siempre han sido mi familia.

Antonio Ríos, tío gracias por siempre estar ahí, por apoyarme y quererme. Ten por seguro que siempre te estaré agradecida.

Mi tía Gabriela Cetto, que siempre me ha ofrecido todo su apoyo para cumplir mis más grandes sueños.

Erick García Trejo y Josué Orlando Ramírez Jarquín por siempre darme su apoyo y su amistad.

Índice

La célula bacteriana	1
El Polihidroxi butirato como macromolécula.....	2
Estructura del polihidroxi butirato	3
Síntesis del PHB	4
Inclusiones de PHB	5
Proteínas asociadas al gránulo de PHB	7
Formación y segregación de gránulos de PHB	10
<i>Caulobacter crescentus</i>	
Generalidades.....	13
Ciclo celular y regulación	15
<i>Caulobacter</i> y PHB	20
Hipótesis	21
Objetivo	21
Objetivos particulares	21
Materiales y Métodos	
Cepas bacterianas y Medios de Cultivo	22
Métodos de Genética Molecular	25
Resultados	31
Discusión	51
Conclusiones	53
Bibliografía	54

La célula Bacteriana

La célula bacteriana al igual que la célula eucarionte tiene una organización interna. La división tradicional de la célula bacteriana propone una estructura simple que consiste fundamentalmente de un citoplasma delimitado por la membrana citoplasmática y una pared celular. En el caso de las bacterias Gram-negativas existe además una segunda membrana a la que se le denomina membrana externa y un espacio entre la pared celular y la membrana externa al que se le denomina periplasma. Sin embargo las bacterias son capaces de distribuir de forma ordenada sus componentes intracelulares. Esta organización interna puede ser apreciada claramente cuando se analiza la dinámica de distintas macromoléculas durante el ciclo celular. La macromolécula más relevante es probablemente el cromosoma y la segregación de los cromosomas recién replicados hacia las dos futuras células hijas es un proceso ampliamente observado. Si bien en un primer momento se pensó que este proceso dependía de la exclusión de las dos moléculas de DNA, recientemente se ha observado que existen mecanismos que activamente segregan los cromosomas. Aun más, se ha reportado en diversas especies bacterianas que el cromosoma mantiene una orientación determinada durante el ciclo celular. Otra macromolécula menos obvia es la pared celular. En este caso se ha observado que la inserción de material nuevo para permitir el crecimiento celular, sigue un patrón determinado durante el ciclo celular y que no ocurre azarosamente.

Los mecanismos que permiten la segregación activa del cromosoma y el crecimiento ordenado de la pared celular dependen a su vez de la dinámica intracelular de distintas proteínas. Para que estas proteínas realicen su función requieren a su vez de estar en el sitio apropiado, sugiriendo que existe un orden intracelular más complejo del propuesto originalmente.

Los mecanismos mencionados anteriormente están relacionados con procesos fundamentales para la célula, como son su crecimiento, mantenimiento de la forma y regulación del ciclo celular. Pero además del cromosoma y la pared celular, las

bacterias pueden presentar otras estructuras macromoleculares. Los casos más extremos son quizá las células de algunos géneros que tienen compartimentos intracelulares definidos por membranas sencillas o en el caso de *Gemmata* una doble membrana que contiene al cromosoma en una estructura similar al núcleo eucarionte. Más frecuentemente las bacterias pueden presentar invaginaciones de la membrana interna, similares a las presentes en las mitocondrias y cloroplastos o estructuras protéicas como son las vesículas de gas, los carboxisomas o los magnetosomas.

A pesar de que se ha estudiado extensivamente la dinámica de las macromoléculas indispensables para la viabilidad celular, todavía se conoce poco sobre los mecanismos que permiten la segregación de otras estructuras o inclusive si dichos mecanismos existen.

El Polihidroxi butirato como macromolécula

Cuando las células procariotas se encuentran en un ambiente rico en fuentes de carbono pero limitado en otros nutrientes requeridos para el crecimiento, almacenan el exceso de energía de distintas maneras. Una de las formas más frecuentes es la producción de gránulos y otras inclusiones citoplasmáticas que actúan como reserva de energía o como depósitos de precursores para los componentes celulares. La acumulación de una fuente de reserva en forma de gránulo tiene la ventaja de no incrementar la presión osmótica intracelular ya que la presión osmótica está determinada por el número de moléculas en solución y no por el tamaño de éstas (**Brock, 2009**). Una de las maneras más comúnmente utilizadas para almacenar carbono es en la forma de un polímero de algún tipo de polyhidroxialcanoato (PHA), como se muestra en la figura 1, las bacterias pueden acumular un gran número de estas inclusiones intracitoplasmáticas.

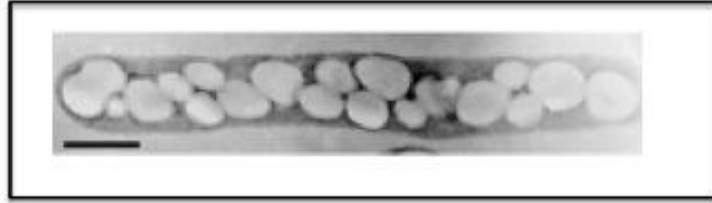


Fig.1 Micrografía electrónica de *Cupriavidus necator* donde se observa una célula llena de gránulos de PHA. La barra calibradora indica 500 nm. (Grage, et.al. 2009).

Estructura del Polihidroxibutirato

Los PHA son polímeros con una estructura lineal compuesta por monómeros de ácidos grasos como se muestra en la figura 2. Los monómeros son polimerizados mediante enlaces tipo éster los cuales se forman cuando del grupo carboxilo de un monómero reacciona con el grupo hidroxilo del siguiente monómero, formando así cadenas de distintas longitudes (**Madison, L. 1999**). Los PHA's se clasifican por el número de átomos de carbono en las unidades monoméricas: los de cadena corta (que van de 3 a 5 átomos de carbono) y los de cadena larga (que van de 6 a 14 átomos de carbono.).

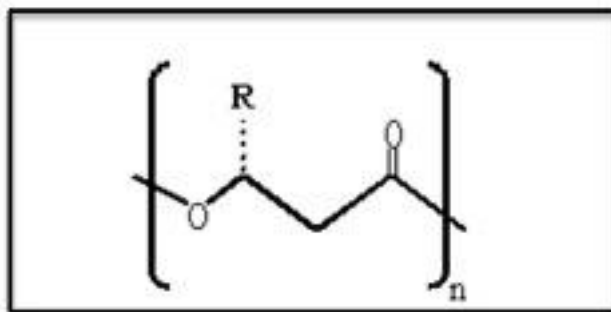


Fig 2. Estructura general de los polihidroxialcanoatos (PHA's).

La diversidad de esta familia de poliésteres proviene de las distintas cadenas laterales que pueden estar presentes en cada monómero. El PHA más frecuente es el polihidroxiбутirato (PHB) (**Sang, Y.L. 1996**), el cual como se muestra en la figura 3, presenta la cadena lateral más sencilla consistente de un grupo metilo.

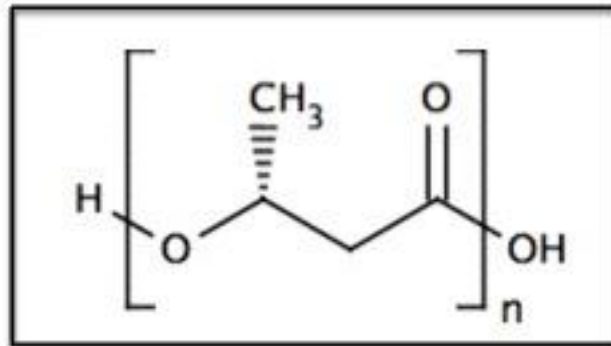


Fig.3 Estructura del polihidroxiбутirato (PHB).

Síntesis del PHB

Como se mencionó anteriormente, el PHB se acumula como respuesta a algún estrés fisiológico; particularmente en respuesta a un estrés nutricional que resulte en un exceso de la fuente de carbono disponible. Entre las especies bacterianas que generan inclusiones de PHB están *Ralstonia eutropha*, *Azotobacter vinelandii*, *Methylobacterium sp.*, *Pseudomonas sp.*, *Sphaerotilus sp.*, *Agrobacterium sp.*, *Rhodobacter sphaeroides* y *Caulobacter crescentus* entre otros. (**Madison, 1999**).

Como se observa en la figura 4, la biosíntesis del PHB comienza mediante la condensación de dos moléculas de acetil CoA mediada por una tiolasa, para formar acetoacetil CoA, el cual es reducido a 3-hidroxi-butiril CoA y la polimerización de este en PHB. Las primeras dos reacciones son llevadas a cabo por enzimas citoplásmicas (PhaA y PhaB respectivamente) codificadas por genes

relacionados con la síntesis de PHB. La reacción de polimerización es llevada a cabo por una PHA sintasa (PhaC).

El polímero puede ser hidrolizado a 3-hidroxibutirato por depolimerasas que pueden ser intra o extracelulares. (Uchino, et. al. 2007).

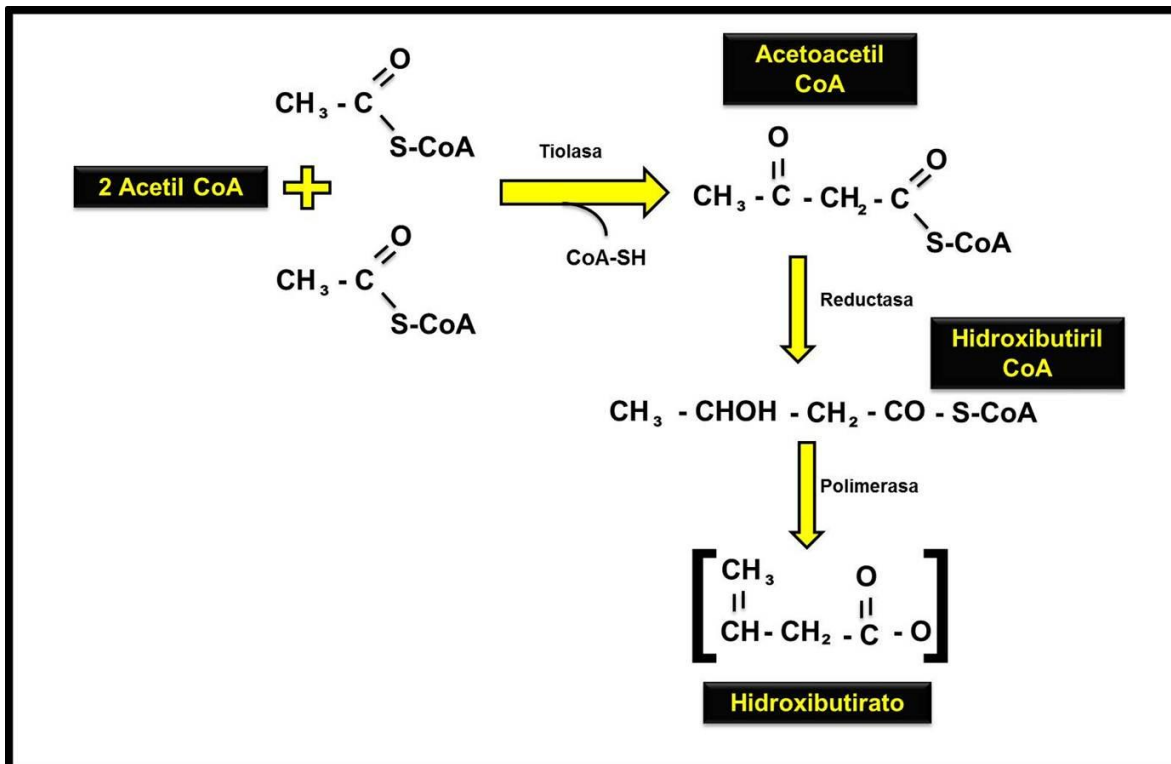


Fig. 4. Diagrama con la ruta de síntesis general del PHB.

Inclusiones de PHB

El PHB se acumula en el citoplasma de las células formando inclusiones esféricas, insolubles y de alto peso molecular. Aunque está claro que éstas inclusiones tienen una estructura más compleja que la simple agregación del polímero de PHB, la estructura de los gránulos no está todavía del todo clara. Se ha reportado que gránulos de PHB de *Ralstonia eutropha* aislados en su forma nativa están

constituidos aproximadamente de polímero en un 97.5%, proteínas 2% y 0.5% de fosfolípidos **(Uchino, et. al. 2007)**.

La estructura de los gránulos de PHB ha sido investigada por distintos grupos. En 1964 estudios en *Bacillus megaterium* indicaban la presencia de una monocapa lipídica **(Lundgren, D. et. al. 1964)**, este resultado fue corroborado por imágenes obtenidas por crio fractura en las que también se describió la presencia de una capa sólida entre la membrana y el interior suave del gránulo **(Dunlop, W. and Robards, A. 1973)**.

Años después, en 1995 se sugirió la presencia de una única capa de proteína envolviendo al gránulo, parecida a una capa S **(Steinbuchel, A. et. al. 1995 y Jurassek, L. and Marchessault R. M. 2002)**.

Sin embargo, en el año 2005 estudios de Microscopía de Fuerza Atómica y Microscopía electrónica en *R. eutropha* y *Comamonas acidovorans* registraron la presencia de una monocapa lipídica con grosor de 4 nm. **(Tian, J. et. al. 2005, Pötter, et. al. 2005)**.

En 2007 con Microscopía de Fuerza Atómica se encontró que los gránulos de PHB de *C. acidovorans* están formados por una membrana superficial lábil y que la fasina forma una matriz entre la membrana superficial y una capa cristalina interna confundida con la monocapa lipídica **(Jendrossek, D. et. al. 2006, Dennis, D. et. al. 2007)**. Con todos estos antecedentes, se propuso que el gránulo se encontraba rodeado por una monocapa lipídica y con un gran número de proteínas asociadas al metabolismo del PHB; éste modelo es el más aceptado. **(Jendrossek, D. 2009)**.

Sin embargo, en imágenes de células de *R. eutropha* obtenidas por microscopía electrónica de criotomografía, que es hasta el momento la técnica que presenta un menor número de artefactos técnicos, se observó un recubrimiento parcial de los gránulos que podría consistir de proteínas **(Beeby, M. et. al. 2012)**.

Proteínas asociadas al gránulo de PHB

Las proteínas asociadas a los gránulos de PHB, se dividen en 4 tipos debido a las funciones que realizan: sintasas, depolimerasas, proteínas regulatorias y proteínas estructurales (fig. 5).

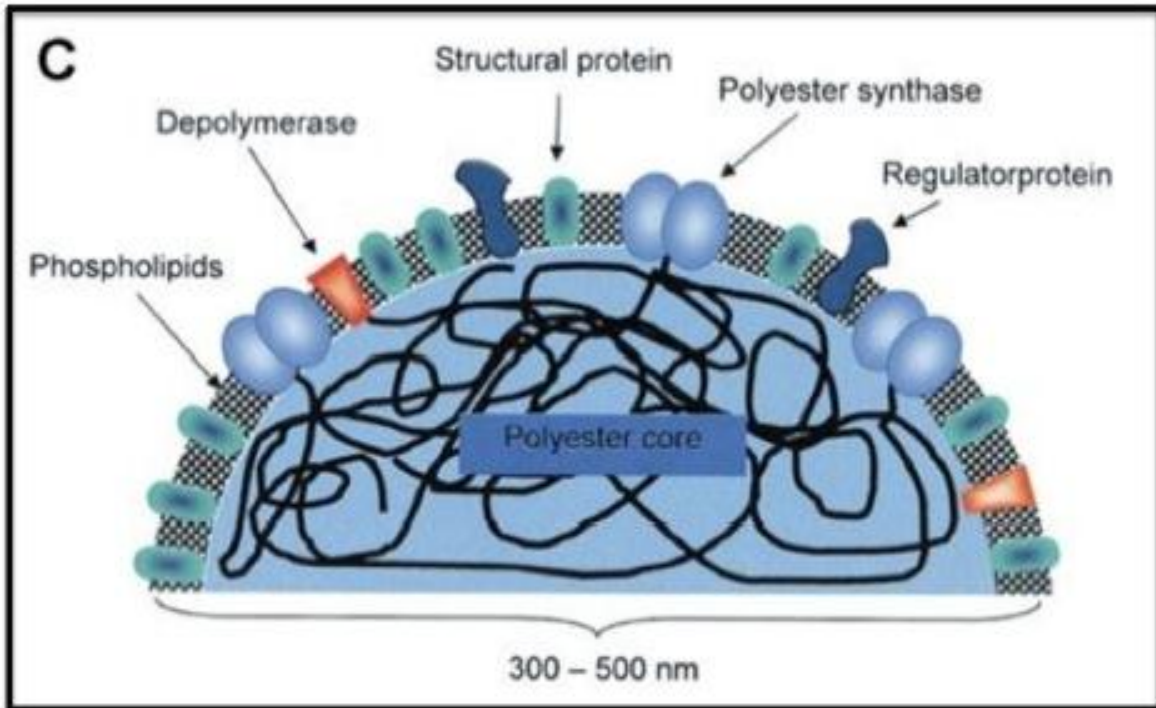


Fig. 5. Representación esquemática de un gránulo de PHA con sus proteínas asociadas. (Grage, et. al. 2009).

Las sintasas, son las únicas requeridas para la formación del gránulo y catalizan la polimerización de monómeros de hidroxibutiril CoA a hidroxibutirato (**Grage, et. al. 2009**). Existen tres familias de sintasas, clasificadas de acuerdo al sustrato que utilizan; la familia 1 está representada por la sintasa de *R. eutropha* la cual utiliza como sustrato (R)-hidroxiacil CoA de cadena corta, consistentes de 3 a 5 átomos de carbono. Los de la familia 2 están representados por la sintasa de *Pseudomonas aeruginosa* que utiliza (R)-hidroxiacil CoA de cadena media (de 6 a 14 átomos de carbono); y por último las de la familia 3 que son representadas por la sintasa de

Allochromatium vinosum, la cual utiliza (R)-hidroxiacil CoA de cadena corta pero que consisten de dos subunidades: PhaC y PhaE. (Qi, Q. and Rehm, B. 2001).

Las depolimerasas son enzimas que degradan el PHB, consisten de dos dominios: uno catalítico y uno de unión a la superficie del gránulo. Estas proteínas pueden ser intracelulares o extracelulares. Las intracelulares PhaZi son las encargadas de la degradación de los gránulos de PHB para utilizarlos como fuente energética; en cambio las extracelulares PhaZe son depolimerasas de bacterias u hongos que degradan gránulos de PHB cristalinos producto de lisis de bacterias formadoras de éstas inclusiones.

Las proteínas regulatorias están representadas por el represor transcripcional PhaR de *Ralstonia eutropha* el cual regula directamente la expresión de las proteínas estructurales (PhaP) y de si mismo, además de encontrarse asociado a la superficie de los gránulos de PHB (Pötter, et. al. 2005).

Finalmente las proteínas estructurales conocidas como fasinas son sintetizadas solo en estados de acumulación de PHB (Jurasek, et. al. 2002). Estas son las más abundantes en la superficie del gránulo; estudios en *Bacillus megaterium* indican que los porcentajes de fasinas representan el 1.87% (del 2% total de proteínas) de la masa total del gránulo, mientras que los fosfolípidos representan apenas el 0.46% (Jurassek, L. and Marchessault R. M. 2002). Las fasinas son proteínas no catalíticas que consisten de dos dominios: uno hidrofóbico el cual está asociado a la superficie del gránulo (N-terminal) y uno hidrofílico el cual está expuesto al citoplasma de la célula (C-terminal); cabe decir que esta estructura general puede variar conforme a la especie.



Fig. 6. Representación esquemática de la estructura general de la fasina.

Diversos estudios en otras bacterias revelan que las fasinas tienen una alta afinidad para unirse a gránulos de los distintos tipos de PHA, sin embargo no son proteínas exclusivas de estos gránulos ya que se han encontrado en inclusiones lipídicas; estudios recientes en *R. eutropha* indican que una fasina de 14kDa tiene cerca del dominio C-terminal segmentos hidrofóbicos, la remoción de los cuales por ingeniería genética produce la pérdida de la capacidad de la fasina de unirse a los gránulos de PHA. (Jurasek, et. al. 2002).

Las fasinas tienen una gran importancia dentro de todas las proteínas implicadas en el metabolismo del PHB ya que otorgan estabilidad estructural al gránulo gracias a su carácter anfifílico, además de controlar el tamaño y número de gránulos en la célula; cuando se incrementa la cantidad de fasina hay un mayor número de gránulos de tamaño pequeño y cuando se disminuye la concentración de fasina hay un menor número de gránulos pero estos son de un tamaño más grande. En mutantes del gen *phaP* de *R. eutropha* que codifica para la fasina de este microorganismo, se observa la formación de un solo gránulo de PHA en la célula (fig. 7).

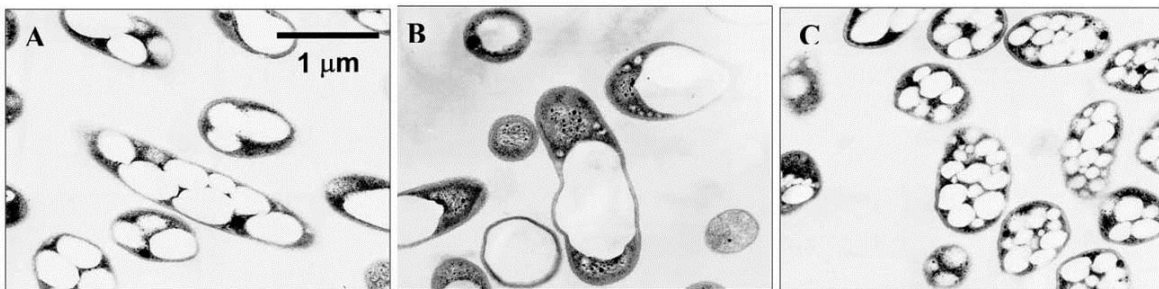


Fig. 7. Microscopía electrónica donde se observa acumulación de gránulos de PHB en *R. eutropha*. A wild type, B mutante de PhaP, C sobreexpresión de PhaP (Stubbe, J. and Tian, J. 2003).

Además de su papel estructural, las fasinas impiden la unión no específica al gránulo de otras proteínas no relacionadas al metabolismo del PHB para evitar la interferencia con funciones vitales. **(Jurasek, et. al. 2002)**. Asimismo existe una relación entre la actividad de las fasinas con las sintasas; aumentando la actividad de las sintasas de un 60 a 90% en presencia de las fasinas con lo cual se intuye que la presencia de las fasinas incrementa la actividad de las sintasas en condiciones donde se acumula el PHB.

En distintos organismos puede variar el número de genes que codifiquen para distintas fasinas en el genoma; en *R. eutropha* hay hasta ahora 7 fasinas descritas **(Pfeiffer, D. and Jendrossek, D. 2012)**.

Formación y segregación de gránulos de PHB

Cuando se analizó la composición lipídica de los gránulos de PHB se encontró que ésta es similar a la de la membrana interna. Este resultado sugería que los gránulos se formaban a partir de esta membrana o que podría existir un intercambio de lípidos. El seguimiento por microscopía electrónica de células activamente formando gránulos de PHB permitió sugerir que inicialmente las proteínas involucradas en la formación de los gránulos se encuentran asociadas a la membrana interna. Al iniciar la formación del gránulo las proteínas involucradas se movilizan por su afinidad al polímero hasta que ocurre la separación del gránulo **(Jendrossek, D. et. al. 2006)**.

Existen tres modelos sugeridos para la formación de los gránulos de PHB **(Beeby, M. et. al. 2012)**; el primer modelo planteado, como se mencionó anteriormente, es el llamado “Naciente de membrana” en el cual cadenas hidrofóbicas de PHB son sintetizadas dentro de la membrana citoplasmática y subsecuentemente los gránulos ya formados brotan desde la membrana hacia el citoplasma celular. El segundo modelo es con un supuesto elemento mediador que actúa como andamio en el cual se localizan las sintasas y fasinas que al acumularse el PHB, envuelven

al gránulo en la etapa joven de su formación. Y por último el tercer modelo es el llamado de micela, en el cual las cadenas de PHB se agregan en el citoplasma celular uniéndose covalentemente con las proteínas sintasas en la superficie, dejando así que ejerzan su acción sobre la formación del gránulo (fig 8).

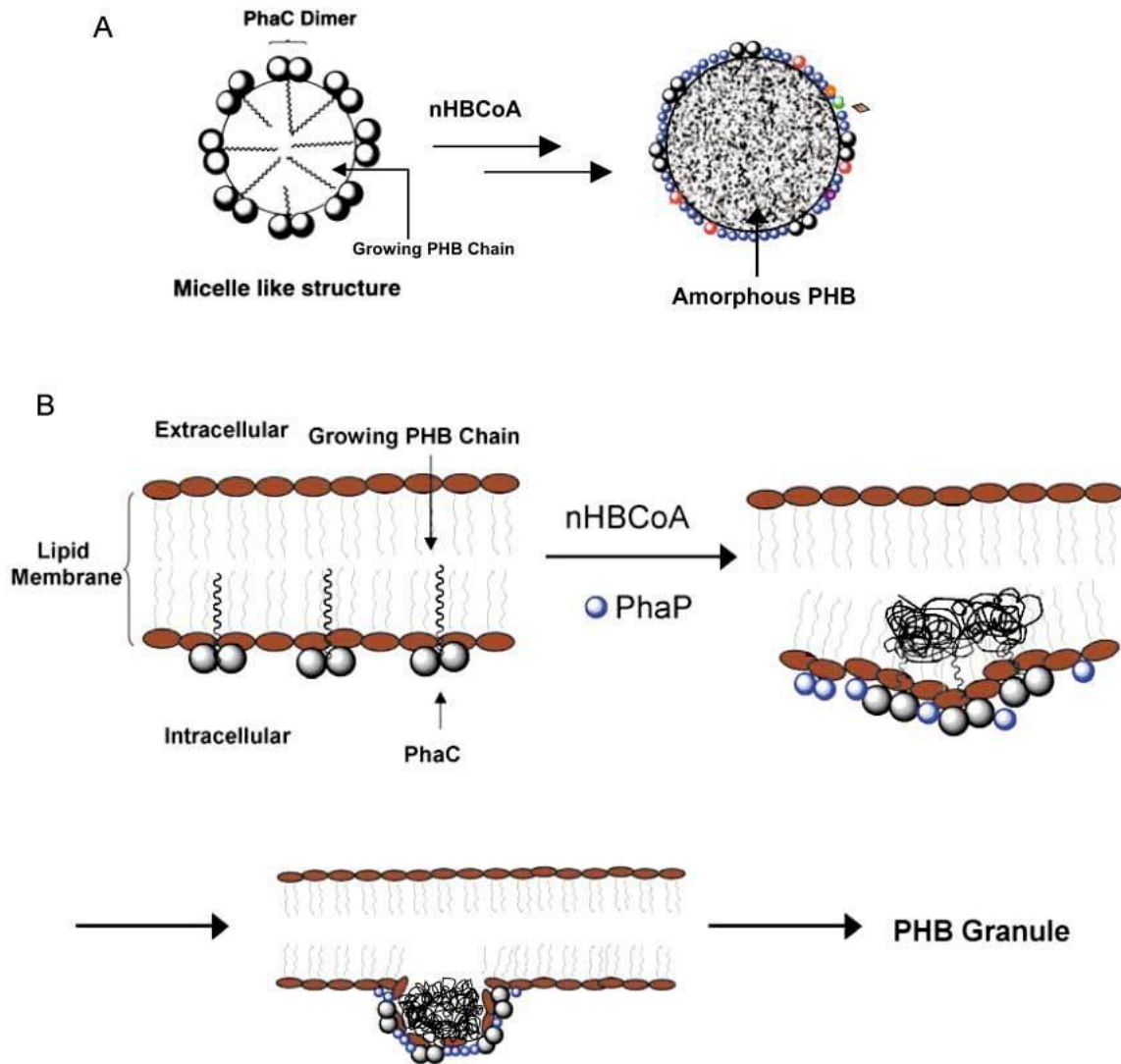


Fig. 8. Representación esquemática de dos modelos de formación de gránulos de PHB. A representa el modelo de micela y B el modelo naciente de membrana. (Stubbe, J. and Tian, J. 2003).

Este modelo está apoyado por un estudio de criotomografía electrónica, en el cual en células de *R. eutropha* se observan estructuras alargadas formadas por cadenas de PHB en las cuales se encuentran asociadas las proteínas sintasas, las cuales agregan y forman la estructura granular. Esto da pie a concluir que en esta especie bacteriana, la formación de los gránulos de PHB es por el modelo de micela, ya que la localización de éstos es hacia la región central de la célula **(Beeby, M. et. al. 2012)**.

En *R. eutropha* la localización de los gránulos de PHB es hacia la región central de la célula, lo que sugiere una dinámica definida y controlada. **(Beeby, M. et. al. 2012)**. En *Escherichia coli* la localización polar de los gránulos parece estar mediada por exclusión debida al nucleoide, como ocurre con los agregados de proteínas **(Peters, V. and Rehm, B. 2005)**.

Debido a que el PHB es un compuesto de reserva resulta lógico suponer que la segregación dirigida de los gránulos podría resultar ventajoso para las células. En *Pseudomonas putida* y *Ralstonia eutropha* se ha descrito que las proteínas presentes en la superficie del gránulo tienen afinidad por el DNA; PhaF de *Pseudomonas putida* y PhaM de *Ralstonia eutropha* tienen dos dominios, el N-terminal que es el dominio de unión a las proteínas de la superficie del gránulo de PHB, y el C-terminal que es el dominio de unión a DNA **(Galan, B. et. al. 2011, Pfeiffer, D. et. al. 2011)**.

PhaF tiene regiones ricas en residuos de lisina-alanina-prolina que tienen una alta carga positiva; probablemente formando una hélice AKP. Estas repeticiones en tandem presentes en el extremo carboxilo terminal de ésta proteína, sugiere las características de la familia de histonas H1 en eucariontes, la cual se encarga de la condensación de la cromatina y del bloqueo en el acceso del nucleosoma **(Galan, B. et. al. 2011)**. En cambio PhaM es rica solo en residuos de lisina **(Pfeiffer, D. et. al. 2011)**.

En ambos casos la afinidad por el DNA parece ser independiente de una secuencia de nucleótido particular; lo que sugiere que existe una interacción

inespecífica con el cromosoma que resulta en la segregación de los gránulos junto con la segregación cromosómica. Esto se ve reflejado en experimentos con mutantes de estas proteínas, en las cuales la segregación de los gránulos al momento de la división celular es desordenada, ya que presuntamente no hay interacción con el nucleóide. Este mecanismo podría ser similar al recientemente propuesto para la segregación de los complejos quimiotácticos citoplásmicos de *Rhodobacter sphaeroides*, donde un homólogo de ParA (PpfA) interactúa con el cromosoma para la segregación de estos complejos quimiotácticos. **(Roberts, M. et. al. 2012).**

En *R. eutropha* está demostrado que PhaM es capaz de unirse al DNA *in vitro* y a la región del nucleóide *in vivo*, así se puede concluir que la segregación de los gránulos de PHB está determinada por su habilidad de unirse al nucleóide; aunque cabe mencionar que no todas las fasinas tienen estas propiedades. **(Pfeiffer, D. et. al. 2011).**

Caulobacter crescentus

Generalidades

Caulobacter crescentus es una bacteria acuática Gram negativa perteneciente al grupo de las alfa-proteobacterias. Este microorganismo ha sido ampliamente estudiado debido a que se divide asimétricamente.

En la figura 9 se observa el ciclo celular de *C. crescentus*, en el cual se produce una célula flagelada mótil y una célula prostecada sésil en cada ciclo. Estos dos tipos celulares tienen distintas características morfológicas y fisiológicas. **(Laub, et. al. 2007).**

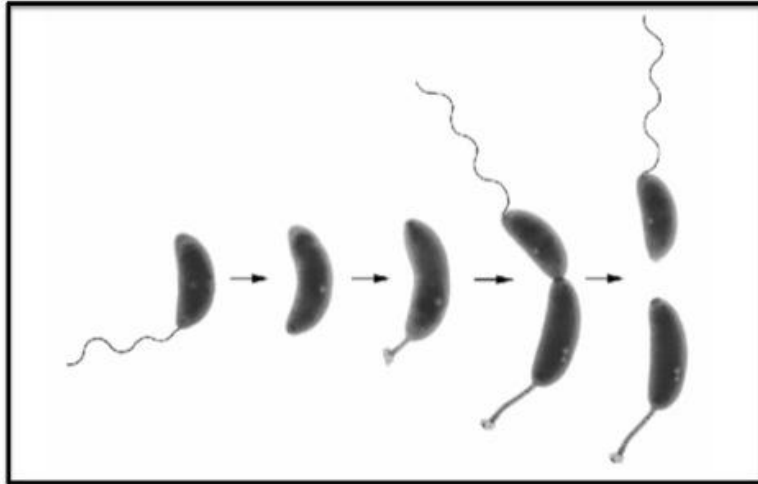


Fig. 9. Representación esquemática del ciclo celular de *C. crescentus*

La célula sésil se caracteriza morfológicamente por la presencia de una prosteca. Esta estructura consiste de una elongación de las tres envolturas celulares (membrana citoplasmática, pared y membrana externa) pero carece de citoplasma. Al final de la prosteca se forma el asidero (holdfast) que consiste de una serie de sustancias que le permiten a la célula prostecada adherirse a distintos tipos de sustratos o por los extremos de las prostecas entre ellas, formando lo que se conoce como rosetas **(Poindexter, 1981)**. La prosteca presenta bandas o engrosamientos visibles en el microscopio electrónico, las cuales están aparentemente relacionadas con algún evento del ciclo celular ya que con cada división se forma una nueva banda. Fisiológicamente la característica fundamental de la célula prostecada reside en que es capaz de iniciar la replicación del cromosoma inmediatamente después de la división celular. **(Jenal, U. and Stephens, C. 2002)**.

La célula flagelada presenta un único flagelo polar. Este flagelo es sintetizado en el polo opuesto al prostecado durante la división celular y antes de que los citoplasmas de las células hijas se separen. Durante esta etapa el flagelo no se mueve. Una vez que la citocinesis ha terminado pero antes de que finalice la

división, el flagelo empieza a rotar. La célula mótil resultante permanece en este estado por un tiempo variable que depende de las condiciones de cultivo. La duración de esta etapa es controlada al menos de forma parcial por el segundo mensajero ppGpp. Cuando la célula flagelada esta lista para diferenciarse en una célula prostecada, expulsa el flagelo por medio de la proteólisis específica de la proteína flagelar FliF. La prosteca crecerá a partir del mismo polo donde se encontraba el flagelo.

Ciclo celular y Regulación

Como ya se mencionó, la característica de *C. crescentus* que ha llamado más la atención es su ciclo celular asimétrico, el cual implica un evento de diferenciación celular cuyos mecanismos podrían ser generales en sistemas biológicos más complejos.

Adicionalmente *Caulobacter* tiene algunas características que la hacen un excelente sistema de estudio; tales características son:

1. Cada célula replica su cromosoma una vez por cada división.
2. Las etapas del ciclo celular están asociadas a diferentes morfologías.
3. Los cultivos son fácilmente sincronizables.
4. Es fácilmente modificable genéticamente

La generación de dos células morfológica y fisiológicamente distintas en cada ciclo de división es un proceso basado en la generación de programas transcripcionales distintos en las células hijas. Estos programas transcripcionales se generan a partir de asas de retroalimentación muy complejas que involucran la interacción de la estructura celular que resulta en la localización diferencial de proteínas y factores de regulación en los diferentes estadios del ciclo celular y la expresión génica. **(Jensen, R. et. al. 2002).**

Las células móviles se encuentran en la fase G1 del ciclo celular (fig. 10) (las células crecen pero son incapaces de iniciar la replicación del DNA); en la transición nadadora-prostecada (de fase G1 a S) la célula gana la habilidad de replicar el material genético y simultáneamente el flagelo se pierde y se comienzan a elongar la envoltura celular para dar lugar a la prosteca (en el mismo lugar en que el flagelo se perdió). El cuerpo celular crece conforme progresa la replicación del DNA y el cromosoma nuevo es segregado al lado opuesto de la célula. En este momento el flagelo se comienza a formar en el lado opuesto a la prosteca en lo que correspondería a la fase G2. Finalmente la división celular da origen a dos células diferenciadas: una nadadora con flagelo y una sésil con prosteca que comienza una nueva ronda de replicación y división celular. (Bowers, et. al. 2008).

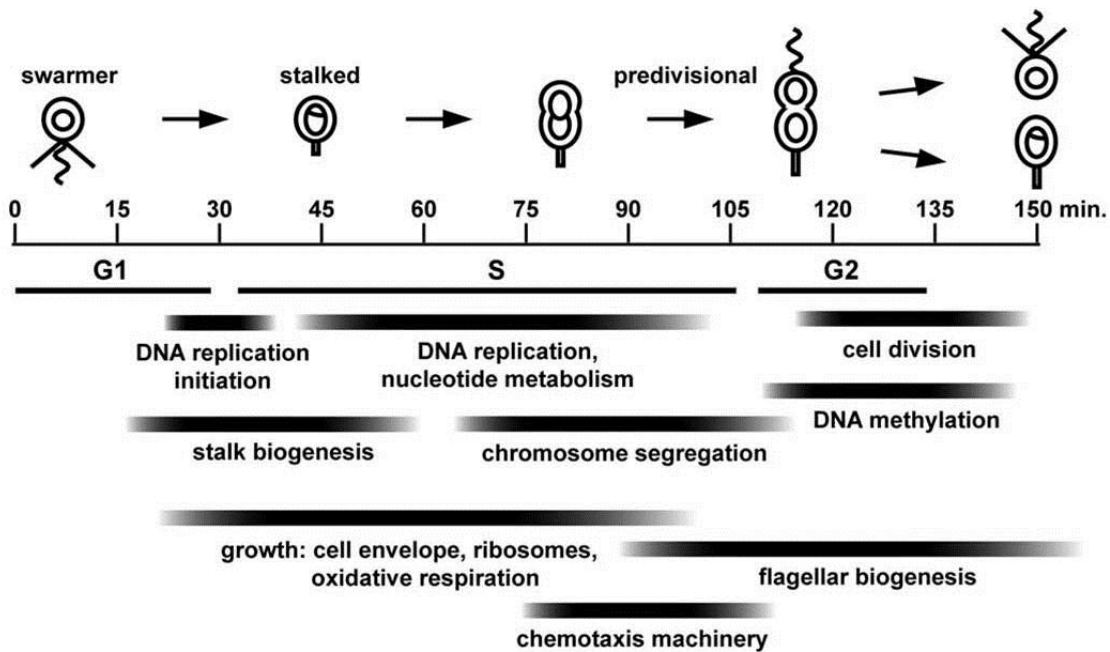


Fig. 10. Esquema del ciclo general de *Caulobacter crescentus* donde se indican las fases del ciclo celular con tiempo aproximado y los acontecimientos fisiológicos y morfológicos que las caracterizan.

Análisis de microarreglos de *C. crescentus* indican que al menos 553 genes, los cuales representan el 19% total del genoma, son diferencialmente transcritos durante el ciclo celular. **(Laub, M. et. al. 2000)**. Y estudios donde se analiza la abundancia relativa de los genes transcritos durante el ciclo, indican que existe un control de la regulación por la abundancia de estas proteínas en distintos tiempos del ciclo celular. **(Grunenfelder, B. et. al. 2001)**.

La regulación de este ciclo esta dada por tres reguladores maestros principalmente: CtrA, DnaA y GcrA. **(Bowers, et. al. 2008)**.

CtrA controla 25% de los genes involucrados en la regulación del ciclo celular **(Jensen, R. et. al. 2002)**. Esta proteína es un miembro de la superfamilia de reguladores de respuesta, proteínas que actúan como factores de transcripción en un sistema de señalización de dos componentes. Estos sistemas están compuestos por una histidin-cinasa, que al recibir una señal de entrada, se autofosforila en el residuo conservado de histidina y transfiere su fosfato a un residuo de aspartato en el regulador de respuesta, lo que le permite al regulador de respuesta activar o reprimir la transcripción de otros genes. Entonces CtrA actúa directamente en los promotores regulados por el ciclo celular. **(Quon, K. et. al. 1996)**.

El gen *ctrA* es esencial y es el regulador global del ciclo celular de *Caulobacter*, su proteína (CtrA) actúa directamente en cis sobre secuencias conservadas de DNA esenciales en distintos eventos del ciclo celular

Esta proteína tiene un dominio de unión a DNA; su forma fosforilada actúa como factor de transcripción que directamente regula genes involucrados en el ciclo celular, metilación del DNA, biogénesis del flagelo y pili, además de reprimir el inicio de la replicación al unirse en 5 sitios en el *oriC* (sitio de inicio de la replicación) **(Laub, M. et. al. 2002)**.

La actividad de CtrA como regulador transcripcional depende tanto de su estado de fosforilación como de la proteína SciP, la cual permite la unión de CtrA-P al

DNA pero inhibe la interacción de esta con la RNA polimerasa. Adicionalmente la actividad de CtrA está regulada por el nivel de degradación de proteínas en los estadios del ciclo celular en los que no se requiere. La degradación de CtrA está regulada por el regulador CpdR. Esta proteína consiste únicamente de un dominio de regulador de respuesta y compite por los fosfatos con CtrA. Cuando CpdR se encuentra en su forma fosforilada la degradación de CtrA por el complejo protéico ClpXP es inhibida, de forma que CpdR funciona como un sensor del nivel de actividad de la cinasa de CtrA **(Goley, et. al. 2007)**.

El punto más claro que determina la transición de G1 a S esta dado por el inicio de la replicación. Para que esto ocurra se requiere que los niveles de CtrA en su forma fosforilada (CtrA-P) disminuyan, ya que esta proteína se une al origen de replicación bloqueando el acceso de DnaA. Los niveles de CtrA-P disminuyen rápidamente por la desfosforilación de esta proteína y mediante su proteólisis por el complejo ClpXP. El inicio de la replicación esta controlado por la proteína DnaA la cual se une a sitios proximales del origen de replicación y facilita la apertura de las hebras de DNA en el origen de replicación del cromosoma. **(Goley, et. al. 2007)**. Además de ser un regulador del inicio de la replicación, DnaA también es un regulador transcripcional, activando la transcripción de *gcrA*, la subunidad de la polimerasa III, la subunidad de ribonucleótido reductasa, DNA helicasa y las proteínas de la división celular. **(Bowers, et. al. 2008)**.

Al igual que CtrA los niveles de DnaA varían conforme el ciclo celular avanza, siendo su nivel más alto durante la transición G1-S. La regulación de *dnaA* esta dada fundamentalmente a nivel transcripcional por cambios en la metilación de su promotor, el cual es activado en su estado metilado y se inactiva después de la replicación cuando esta hemimetilado. El estado de metilación también afecta el nivel transcripcional de *ctrA* pero en sentido inverso. El promotor P1 de *ctrA* es más activo en el estado hemimetilado y se inactiva cuando está completamente metilado **(Bowers, et. al. 2008)**.

El último regulador maestro en ser descrito fue GcrA, esta proteína regula la transcripción de 49 genes reguladores del ciclo celular incluyendo a *ctrA*. La transcripción de *gcrA* es activada por DnaA, por lo que GcrA se acumula durante la fase S y permite la acumulación de CtrA después de que el promotor P1 de este gen se encuentra en su estado hemimetilado. La transcripción de *gcrA* es finalmente reprimida por CtrA. **(Bowers, et. al. 2008).**

Un factor esencial en el proceso de división es la coordinación entre la maquinaria de división celular y la segregación cromosómica, lo que garantiza que las células resultantes de la división tendrán una copia completa del genoma.

En *Caulobacter*, como en otras especies bacterianas, el cromosoma está organizado espacialmente. Las células tienen su origen de replicación localizado en el polo viejo de la célula y el sitio de término en el polo opuesto o polo nuevo. Esta localización está dada fundamentalmente por las proteínas ParB y PopZ. ParB esta involucrada junto con ParA en la segregación cromosómica y reconoce la región centromérica *parC*. PopZ es una proteína pequeña que es capaz de formar agregados que reconocen la curvatura de los polos celulares.

En las bacterias, la determinación del sitio de división está dado por FtsZ en una estructura llamada anillo Z, el cual se posiciona en el sitio adecuado gracias a factores que inhiben la polimerización de FtsZ en otros sitios. Este anillo actúa como un andamio para que la maquinaria de división o divisoma (Un complejo multiprotéico que incluye a FtsZ, A, Q, K, I, N entre otras) se forme y genere fuerzas constrictivas requeridas para la división de la célula.

Caulobacter integra la información espacial de los dos polos celulares y del cromosoma gracias a una proteína llamada MipZ. Esta proteína es una ATPasa de la superfamilia de ParA que inhibe la polimerización de FtsZ. MipZ forma dos gradientes de concentración que van de los polos hacia la mitad de la célula, permitiendo la formación del anillo Z únicamente en la mitad de la célula. La formación del gradiente de MipZ depende de la interacción de ParB con PopZ, lo

que ocurre solo cuando la segregación de los cromosomas ha ocurrido (Ebersbach, G. et. al. 2008, Thanbichler, M. and Shapiro, L. 2006).

***Caulobacter* y el PHB**

Como se mencionó anteriormente, *Caulobacter crescentus* es una bacteria que forma inclusiones o gránulos de PHB en su estado natural. Es una bacteria oligotrófica que frecuentemente crece en ambientes con bajo contenido de carbono. Por este motivo la segregación del PHB debería de ser de particular importancia. En la figura 11, se observan células de *C. crescentus* en distintos momentos del ciclo celular, las cuales presentan gránulos de PHB en distintos estados. Lo que sugiere esta microfotografía, es que la dinámica de los gránulos de PHB es controlada por la célula durante el ciclo celular.

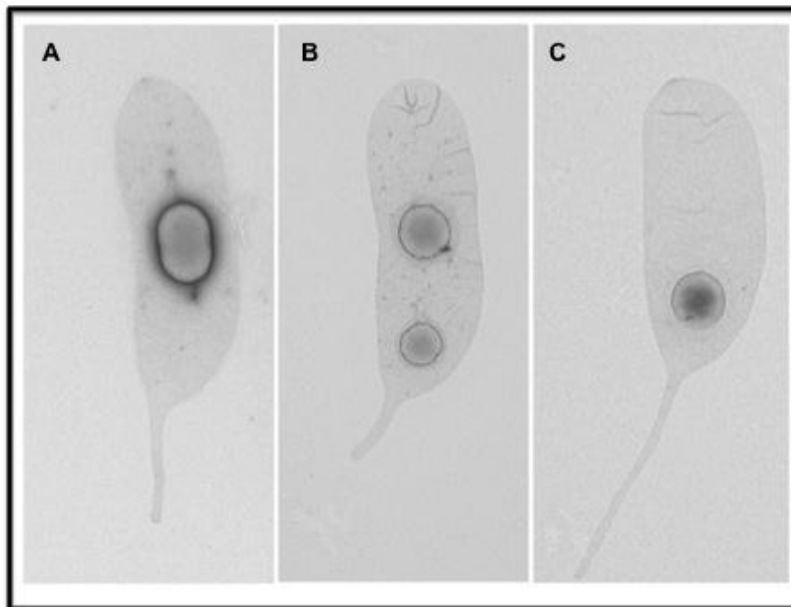


Fig 11. Micrografía electrónica en la que se observan células de *C. crescentus* con gránulos de PHB. En A se observa una célula en proceso de división celular en la que el gránulo de PHB se alarga justo en el septo; en la imagen B se observan dos gránulos y en C se observa una célula joven con un solo gránulo.

Hipótesis

Dado que existe evidencia para comprobar que la dinámica de los gránulos de PHB se controla activamente y no es azarosa, en *C. crescentus* existe la posibilidad de que la segregación de éstas inclusiones tenga una dinámica definida durante el ciclo celular y controlada activamente como sucede en *R. eutropha*.

Objetivo

Caracterizar el crecimiento y la distribución de los gránulos de PHB para conocer su dinámica durante el ciclo celular de *C. crescentus*.

Objetivos particulares

- Identificar las proteínas implicadas en la síntesis de PHB en *C. crescentus*.

- Realizar fusiones de proteínas fluorescentes con las proteínas implicadas en la síntesis de PHB.

- Seguir la dinámica de los gránulos de PHB durante el ciclo celular de *C. crescentus*.

Materiales y Métodos

Cepas Bacterianas y Medios de Cultivo

Tabla 1. Plásmidos y cepas utilizadas en este trabajo.

Nombre	Resistencia	Descripción/Genotipo	Referencia
CB15N		Cepa silvestre de <i>C. crescentus</i>	
Top10		Cepa de <i>E.coli</i> para clonaciones generales con la capacidad de selección de colonias blancas y azules sin utilizar IPTG.	Invitrogen
pCR 2.1 TOPO	Kanamicina/ Ampicilina	Vector de clonación de 3931 pb, diseñado para clonar productos de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	Invitrogen
pXCFFN-4	Gentamicina	Plásmido integrativo para fusiones en el extremo amino terminal y un promotor inducible por xilosa (X) y la proteína fluorescente CFP.	Thanbichler et. al. , 2007.
pNPTS138	Kanamicina	Plásmido suicida de 5361 pb, contiene un polilinker con selección , por α -complementación, origen para conjugación y selección negativa por sacarosa.	Dickon Alley sin publicar
pXCFFphaS-4	Gentamicina	Plásmido en <i>C. crescentus</i> que contiene la fusión traduccional	Este trabajo

		CFP-phaS bajo el control de un promotor inducible por xilosa.	
pCFPphaS-4	Gentamicina	Construcción sin promotor inducible por xilosa.	Este trabajo
pUpphaSCFPphaS		Construcción para el suicidio.	Este trabajo
pNPTS-UpphaSCFPphaS		Construcción suicida.	Este trabajo
AL1		CB15N <i>xyIR::pXCFP-4</i>	Este trabajo
AL2		CB15N <i>xyIR::pXCFPphaS-4</i>	Este trabajo
AL3		CB15N Δ <i>phaS::CFPphaS</i>	Este trabajo

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Nombre	Secuencia
phaSupR1 NdeI	CACATATGGAGTCTCCTGGGGAGGAAAGG
phaSupF1 HindIII	CAAAGCTTCATCACGATCTGATCGGTGAGCTTC
phaSf1 SacI	CAGAGCTCCTCTAGGTTATGGTGCGCTG
phaSr1 EcoRI	CAGAATTCGCCTTCAAGTTCTGATGTCACAGACG

Escherichia coli

E. coli Top10 fue crecida en medio LB (1L: 10g bactotripton, 5g extracto de levadura y 10g NaCl). Para cultivos en medio sólido se agregó 15g/L de Bacto Agar. Se añadieron antibióticos en casos necesarios, Ampicilina 2.5% 6µl/mL, Kanamicina 0.5% 10µl/mL y Gentamicina 0.3% 5µl/mL. Esta cepa se creció a 37°C en agitación.

Caulobacter crescentus

La cepa silvestre de *C. crescentus* CB15N fue crecida en distintos medios de cultivo dependiendo del protocolo a seguir; los medios fueron los siguientes: PYE (1L: 2g Bactopeptona, 1g extracto de levadura, 1mL MgSO₄ 1M, 0.5mL CaCl₂ 1M), M2G (1L: 25mL sales M2 40X, 500µl MgSO₄ 1M, 500µl CaCl₂ 1M, 1mL FeSO₄ 10mM EDTA, 10mL glucosa 20%), M2L (1L: 25mL sales M2 40X, 500µl MgSO₄ 1M, 500µl CaCl₂ 1M, 1mL FeSO₄ 10mM EDTA, 10mL lactosa 10%), M5GG 0.05% (1L: 1mL NaCl 1M, 1mL KCl 1M, 6.25 mL NH₄Cl₂ 0.05%, 850µl Glutamato de Sodio, 500µl MgSO₄ 1M, 10mL Glucosa 20%, 1mL FeSO₄ 10mM EDTA, 500µl CaCl₂, 20mL Tris-HCl pH 7.0 1M, 250µl sales M2 1X). En caso necesario, se añadió glucosa 0.2% o lactosa 0.1% final para ensayos de crecimiento específicos. Se adicionaron antibióticos en caso necesario, Gentamicina 0.3% 5µl/mL y Kanamicina 0.5% 10µl/mL. Esta cepa se creció a 30°C en agitación.

Conservación de las cepas en Glicerol

Para preservar las cepas bacterianas de interés, a un vial con glicerol al 65% (Buffer MgSO₄ 0.1M y Tris Base 0.025 M pH 8.0) estéril se le añaden 750µl de cultivo en fase estacionaria; se agita muy bien por inversión y se congela en hielo seco. Se almacena a -70°C.

Métodos de Genética Molecular

- **Diseño de oligonucleótidos**

Los oligonucleótidos deseados se construyeron en el programa DNAMAN, en el cual se revisó que la temperatura de desnaturalización (T_m) fuera similar en cada par de oligonucleótidos y que no existieran posibles estructuras secundarias.

- **Reacción en Cadena de la Polimerasa**

Método para tener copias de un fragmento específico; la reacción llevó 17 μ l H_2O , 25 μ l Buffer 2X, 5 μ l dNTPs 2mM, 1.5 μ l de cada oligonucleótido, 1 μ l DNA cromosomal CB15N 100ng/ μ l, 0.5 μ l DNA Pol PRIME STAR (Takara). El programa fue: 95°C por 2 min, 30 ciclos consistentes de 94° por 35 seg, 58° por 15 seg, 72° por 1 min, y un último paso de 72° por 10 min.

- **Purificación de plásmidos con el Kit QIAprep Spin Miniprep (columnas QIAGEN)**

Método para extracción de plásmido a partir de cultivos de toda la noche. Los cultivos crecidos (10mL) se centrifugan 6 minutos a 4500 rpm. Al paquete celular se le añaden 900 μ l de Buffer P1 y 30 μ l de RNAsa 10mg/ml, lo cual se somete a una agitación vigorosa en vórtex y se traslada a tres tubos eppendorf en partes iguales. Se agrega a los tubos 300 μ l de Buffer P2 y se agita cuidadosamente dejando reposar 5 minutos. Posteriormente se agregan 350 μ l de Buffer N3 y se procede a centrifugar 20 minutos a 1400 rpm a 4°C; en este paso se recupera el sobrenadante y se desecha el paquete celular. El sobrenadante se vacía a una columna QIAGEN, centrifugando 1 min a temperatura ambiente; se añaden 500 μ l de Buffer PB volviendo a centrifugar y posteriormente 750 μ l de Buffer PE, en esta ocasión se centrifuga dos veces por un minuto para quitar los excesos de etanol en la muestra. La columna se pone en un tubo eppendorf y se le

agregan 50µl de H₂O dejando reposar por 1 minuto, por último se centrifuga 1 minuto.

- **Purificación de plásmidos mediante minipreparaciones hervidas.**

Se inoculan las células de interés en 3mL de medio de cultivo selectivo y se incuba toda la noche. Se centrifuga 1.5mL de este medio y al paquete celular (pellet) se le agregan 300µl de solución STET (8% de sacarosa, 50 mM de EDTA pH 8.0, 5% tritón, 50mM Tris-HCl pH 8.0) y 30µl de lisozima 10 mg/ml. Esta mezcla se agita en vórtex durante 5 seg. y se hierve por 45 seg. Posteriormente se centrifuga 15 min a 13000 rpm a temperatura ambiente y el sobrenadante es transferido a un tubo eppendorf nuevo, al cual se le agregan 300µl de isopropanol, se agita en vórtex y se deja reposar 10 min en hielo. Después se centrifuga en frío (4°C) durante 20 min a 14000 rpm. Se decanta y el pellet se lava con etanol al 70% y se deja secar a 42°C durante 1 hr. Finalmente se resuspende en 40µl de H₂O, se incuba 5 min a 70°C y se centrifuga 1 min a 13000 rpm.

- **Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa. QIAquick gel extraction**

Este protocolo se utiliza para purificar y extraer DNA a partir de geles de agarosa. Primero se prepara un gel de agarosa al 1% y se separan las muestras de DNA, se tiñe con bromuro de etidio y se corta la banda deseada con ayuda de una lámpara de luz U.V. de longitud de onda larga. El gel se pesa dentro de un tubo eppendorf, sacando el peso neto del gel. Se añaden 3 volúmenes de Buffer QG y se incuba 10 min a 65°C para disolver el gel, se procede a añadir 5µl de Acetato de Sodio 5M pH 5 y un volumen de isopropanol. Esta mezcla se decanta en una columna QIAquick y se centrifuga a 13000 rpm durante 1 min, se descarta el sobrenadante y se agregan 500µl de Buffer QG y se centrifuga. Posteriormente se hace un lavado agregando 750µl de Buffer PE y se centrifuga dos veces por un

minuto a 13000 rpm. La columna se pasa a un tubo eppendorf nuevo y se añaden 30µl de H₂O, se centrifuga para extraer de la columna el DNA.

- **Transformación por electroporación**

Para transformar se necesitan células competentes previamente preparadas; se pone a enfriar una celda de electroporación de 0.1 cm en hielo, se agrega al tubo de las células competentes el DNA y se resuspende cuidadosamente; esta mezcla se vacía en la celda, cuidando que las células queden en el fondo para que la transformación sea eficiente. Se coloca la celda en un aparato de electroporación y se da un pulso de 1.6 kV. Inmediatamente después se agrega 1mL de medio de cultivo nuevo a la celda para recolectar las células transformadas y se coloca en un tubo eppendorf, el cual se incuba durante 1 hora a la temperatura deseada (dependiendo del organismo) en agitación. Este procedimiento se realiza en esterilidad estricta.

- **Ensayo de Western-Blot**

Para este ensayo se necesitan preparar extractos, alícuotas de inóculos de la cepa de interés en densidad óptica 0.3 resuspendidas en solución de Magic Mix 2X (para 10 mL: 1mL Tris 1M pH 6.8, 2mL glicerol 100%, 2mL SDS 10%, 80µl EDTA 0.5M, H₂O, azul de bromofanol y 200µl β-mercaptoetanol); se sonicán las muestras. Las proteínas de los extractos se separan por electroforesis en un gel de acrilamida (Gel 12%: 2mL Acrilamida Bisacrilamida, 1.875mL Tris 1M pH 8.8, 50µl SDS 10%, 40µl Persulfato de amonio 10%, 1mL H₂O, 3µl solución TEMED; Gel 4%: 0.335mL Acrilamida Bisacrilamida, 0.3125mL Tris 1M pH 6.8, 25µl SDS 10%, 25µl Persulfato de amonio 10%, 1.8mL H₂O, 1,5µl solución TEMED) a 25 mA con Buffer de proteínas (para 1L: 14.4g Glicina, 3g Tris Base, 10mL SDS 100%).

El gel con las proteínas separadas se transfiere a una membrana de nitrocelulosa (Buffer de Transferencia 1L: 0.32g Carbonato de sodio, 0.84g Bicarbonato de sodio, 200mL Metanol y aforar con agua fría); esta transferencia se realiza superponiendo la membrana al gel y añadiéndole carga durante una hora a 250mA, teniendo la cámara sobre un agitador. Posteriormente la membrana se bloquea con una solución de TBS Tween 1x-Leche 1% durante 1 hora en agitación (TBS Tween 1x 500mL: 50mL TBS 10x en 450mL de agua, añadir 500 mL de Tween).

Se hacen 3 lavados cada 15 minutos con TBS Tween y posteriormente se procede a someter a la membrana al anticuerpo primario y secundario. El anticuerpo primario anti-GFP (1:20 000) se dejó en agitación durante 1 hora, después se lavó 5 veces y se colocó el anticuerpo secundario (1:10 000) en las mismas condiciones. Inmediatamente después, se hace una solución 900µl tropix-100µl tropix nitroblock y la membrana se sumerge durante 5 minutos. Como último paso, la membrana se revela en placas R-X, con exposición de 5, 10, 15 minutos, dependiendo de la banda que se desee observar.

- **Sincronización de células Cb15N**

Para obtener células ce Cb15N en la misma etapa del ciclo celular, se realizaron ensayos de sincronización donde se obtienen muestras de células flageladas que al incubarse, se obtienen células en cada etapa del ciclo celular.

Se inoculan 3mL de medio de cultivo selectivo con la cepa de interés y se incuba toda la noche, posteriormente se reinocula en 30mL de medio de cultivo nuevo para obtener un cultivo en fase exponencial (densidad óptica de 0.3). Se ponen a enfriar en hielo: tubos de ensayo Corex de 15mL, fosfatos M2 1X y el medio de cultivo en fase exponencial y a partir de este momento todos los procedimientos se harán en frío. Se prepara en uno de los tubos corex una solución de 6mL Ludox pH 7 y 450µl HCl 1M, la cual se

mezcla por inversión. En dos tubos distintos se añaden 3mL de la solución Ludox-HCl y 12mL del medio de cultivo en fase exponencial, se mezclan por inversión.

Los tubos se centrifugan durante 30 minutos a 9000 rpm a 4°C. En esta fase se forman dos bandas tenues de células, una en el fondo del tubo y otra cerca de la superficie, la banda de abajo corresponde a las células nadadoras y la de arriba a las células prostecadas.

Se aspira con vacío el sobrenadante, y la banda deseada se toma con micropipeta, colocando la suspensión celular en otro tubo corex limpio al cual se le añaden 10mL de fosfatos M2 1X (mezcla por inversión) y se centrifuga 5 minutos con las especificaciones antes mencionadas. En este momento se comienza a formar un paquete celular en el fondo del tubo, se aspira el sobrenadante y se añaden 10mL del medio nuevo previamente enfriado y se repite el proceso de centrifugación.

Se aspira el sobrenadante y el pellet resuspendido se transfiere a un tubo eppendorf nuevo, lo cual se centrifuga 1 min a 10 000 rpm a 4°C; el pellet resultante se inocula a 3mL de medio nuevo precalentado e inmediatamente se toma una muestra para el análisis al microscopio

Fijación con HCOOH y tinción de gránulos de PHB con colorante Azul del Nilo A

El Azul del Nilo A es un colorante específico de gránulos de PHB; el primer paso es fijar las células por métodos químicos, en este caso se utilizó paraformaldehído al 30%. Las células se ponen a cultivar toda la noche y se fijan en fase exponencial (densidad óptica 0.3 nm). Se dejan 20 minutos a temperatura ambiente y se almacenan a 4°C. Se agregan 10µl de Azul del Nilo A en solución acuosa al 1% y se incuba por 1 min a 55°C. Después se centrifuga a 1300 rpm por 2 min y se lava el pellet dos veces con medio de

cultivo nuevo, posteriormente se hace un lavado con ácido acético al 8% y se resuspende en 50µl de medio de cultivo nuevo.

- **Microscopía Óptica de Fluorescencia**

Para el ensayo de microscopía de fluorescencia se hicieron camitas de agarosa sobre portaobjetos, este procedimiento se realiza con una solución de 5mL de sales M2 1X y 0.075 g de agarosa, se realizó en un tubo de ensayo para calentarlo directo a la flama; cuando la agarosa este completamente disuelta, se colocan de 600 a 700µl sobre un portaobjetos limpio, el cual en los extremos tiene 3 cubreobjetos apilados; inmediatamente después de colocar la solución de agarosa, se cubre con otro portaobjetos hasta que polimerice. Cuando este polimerizado, se desliza suavemente el portaobjetos de arriba y queda expuesta la camita de agarosa. Se colocan enseguida 2µl de la muestra a observar y se coloca el cubreobjetos.

La muestra se observa en campo claro y en fluorescencia con objetivo de 100x utilizando aceite de inmersión.

Resultados

Identificación de las proteínas involucradas con el PHB en *C. crescentus*

Para identificar los genes que pudieran estar involucrados en la síntesis de PHB en *C. crescentus* se utilizó fundamentalmente la base de datos Pfam (Nucleic Acids Research (2010) Database Issue 38:D211-222). Esta base de datos consiste de dominios conservados de proteínas que fueron determinados por matrices generadas utilizando modelos escondidos de Markov.

Cuando es posible, la base de datos también tiene una descripción sobre la posible función de dichos dominios. De esta forma es posible buscar la presencia de dominios en secuencias de proteínas de interés o identificar dominios involucrados en una determinada actividad mediante la búsqueda de palabras clave presentes en las descripciones.

En nuestro caso se utilizaron proteínas involucradas en la síntesis del PHB en *R. eutropha* para determinar que dominios contenían y luego se buscaron las proteínas presentes en el genoma de *C. crescentus* que contenían estos dominios. También se realizó una búsqueda por palabra clave de dominios involucrados en la síntesis de PHB.

A partir de esta búsqueda se identificaron posibles genes involucrados en el metabolismo del PHB, como es el caso del gen cc_2160 *phaS* el cual corresponde a la posible fasina y el cc_1380 *phaC* que corresponde a la sintasa (Gene ID: 940861). Cabe mencionar que el gen CC_1380 ya había sido caracterizado con anterioridad y su actividad como sintasa demostrada (Qi, Q. and Rehm, B. 2001).

Fusión de la posible fasina de *C. crescentus* con la proteína fluorescente CFP.

Ya que la fasina es la proteína más abundante en los gránulos, se prosiguió a hacer una fusión fluorescente de esta proteína para poder determinar la dinámica de los gránulos durante el ciclo celular. La primera construcción realizada fue la fusión en el extremo 5' (N-terminal) del gen de *phaS* con el gen que codifica para la proteína fluorescente CFP bajo el control de un promotor inducible por xilosa, como se muestra en el diagrama de la figura 12; la fusión generada es de aproximadamente 1300 pb pero el plásmido completo es de 6000 pb.

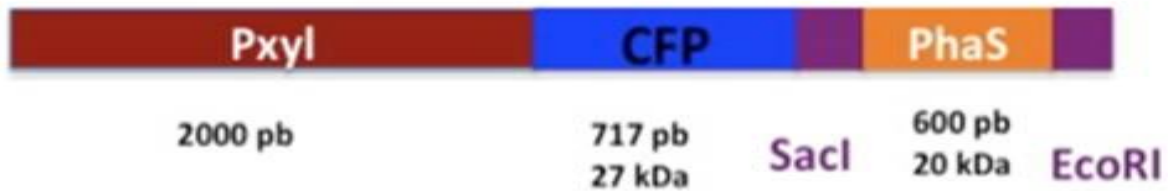


Fig. 12. Representación esquemática del plásmido pXCFPphaS-4.

Para esto, se realizó una reacción de PCR con los oligonucleótidos *phaSf1Sacl* y *phaSr1EcoRI*, el cual fue purificado con el método QIAquick gel extraction antes descrito; el tamaño del producto de la reacción se esperaba en 600 pb y después de la purificación quedó a una concentración de 56.1ng/μl. El producto obtenido se verificó con un gel de agarosa al 1%, como se observa en la figura 13.

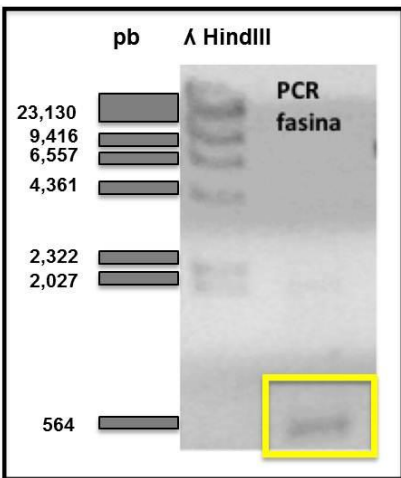


Fig.13. Producto obtenido por PCR con los oligonucleótidos phaSf1Sacl y phaSr1EcoRI, el cual fue purificado quedando con un tamaño de aproximadamente 600 pb y con una concentración de 56.1ng/ μ l.

Por otro lado, se purificó el plásmido pXCFPN-4 con el método QIAGEN, el cual quedó a una concentración de 65.4ng/ μ l (Fig. 14).

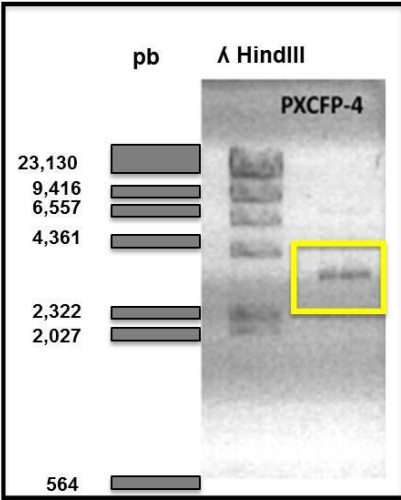


Fig.14. Plásmido pXCFPN-4 purificado.

Tanto el producto puro de PCR como el fragmento puro pXCFPN-4 se digirieron con las enzimas de restricción EcoRI y Sacl, dichos sitios se incorporaron en el

diseño de los oligonucleótidos. La reacción de digestión consistió de: 1.5µl EcoRI, 1.5µl SacI, 26µl H₂O, 4µl Buffer 2 y 5µl DNA; se incubó durante 1hr a 37°C. Teniendo las digestiones listas, se inactivaron a 65°C durante 10 minutos y se procedió a poner una reacción de ligación, con la enzima T4 DNA Ligasa (1.5µl ATP, 0.5µl T4DNA ligasa, 1.0µl pXCFPN-4, 4µl PCR, 1µl Buffer 2, 2µl H₂O) la cual se incubó durante 1 hora y se inactivó de la misma forma que las digestiones. Posteriormente se transformó por electroporación a la cepa TOP10 de *E. coli*, lo cual se plateó en cajas de LB Gm15 (Luria con gentamicina).

De las colonias obtenidas en las cajas de LB Gm15, se crecieron algunas en medio solido (replicación), para después crecerlas en medio de cultivo líquido y poder hacer una purificación a pequeña escala del plásmido presente en las clonas obtenidas.

La purificación se realizó mediante el protocolo de minipreparacione y se corroboró con un gel de agarosa al 1% como se muestra en la figura 11.

Después se realizó una digestión doble con las enzimas EcoRI y SstI (mezcla de 6µl Buffer 2, 44µl H₂O, 1µl EcoRI, 1µl SstI lo cual fue dividido en 4 tubos para 4 digestiones con 15µl de la mezcla y 3µl del DNA correspondiente a los minipreps 1, 3, 9,12), se inactivó a 65°C por 10 minutos y se verificó en un gel de agarosa al 1% como se muestra en la figura 16.

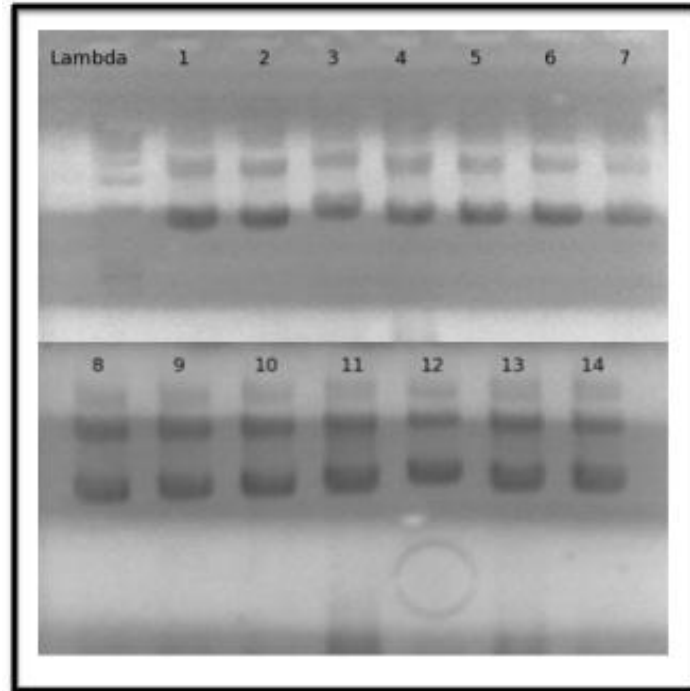


Fig. 15. Plásmidos obtenidos de las clonas de la ligación producto PCR fasina-pXCFP-4.

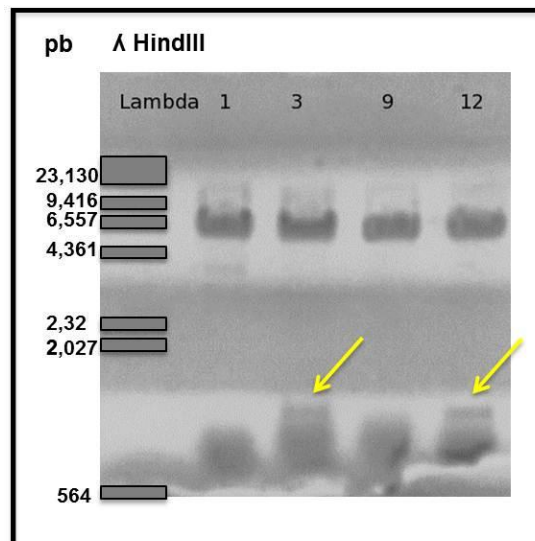


Fig. 16. Digestión de las minipreparaciones con las enzimas de restricción SstI-EcoRI.

Con la digestión de las minipreparaciones (fig.16.) se corroboró la presencia en las clonas 3 y 9 de un inserto de un tamaño aproximado al esperado. Se purificó el plásmido de una de estas clonas con el kit de miniprep de QIAGEN, obteniendo la construcción pXCFPphaS-4 con una concentración de 378.3 ng/μl . La identidad del fragmento se corroboró por secuenciación con el oligo phaSR1.

Obtención de la cepa AL2 y ensayo de microscopía de fluorescencia.

La construcción resultante (pXCFPphaS-4) se transformó por electroporación en la cepa CB15N de *Caulobacter crescentus*, se seleccionaron las células que integraron el plásmido al cromosoma plateando en cajas de PYE Gm, dando como resultado la cepa AL2. Como se puede observar en la figura 8, el plásmido pXCFPphaS-4 lleva además de la fusión CFP-phaS, un fragmento de 2Kpb correspondiente a la región río arriba del gen *xyIA*. Este fragmento direcciona la integración del plásmido en el locus de *xyIR* por lo que la cepa AL2 tiene el alelo silvestre de *phaS* y el alelo CFP-*phaS* como segunda copia bajo el control del promotor inducible por xilosa *p_{xyIA}*.

Para determinar si la proteína de fusión CFP-PhaS podía expresarse y de ser así su patrón de localización, se creció la cepa AL2 (CB15N::pXCFP-phaS) en el medio de cultivo rico PYE y en el medio definido M2G.

Cuando los cultivos llegaron a una densidad óptica de 0.3, se indujeron con xilosa 0.1% final durante 3 horas. Se obtuvieron imágenes de estas células en el microscopio óptico de fluorescencia en las cuales se observó que en medio definido M2G o M2G adicionado con glucosa al 0.2% hay una mayor cantidad de gránulos que en células crecidas en medio rico (PYE) o PYE adicionado con glucosa (figura 17).

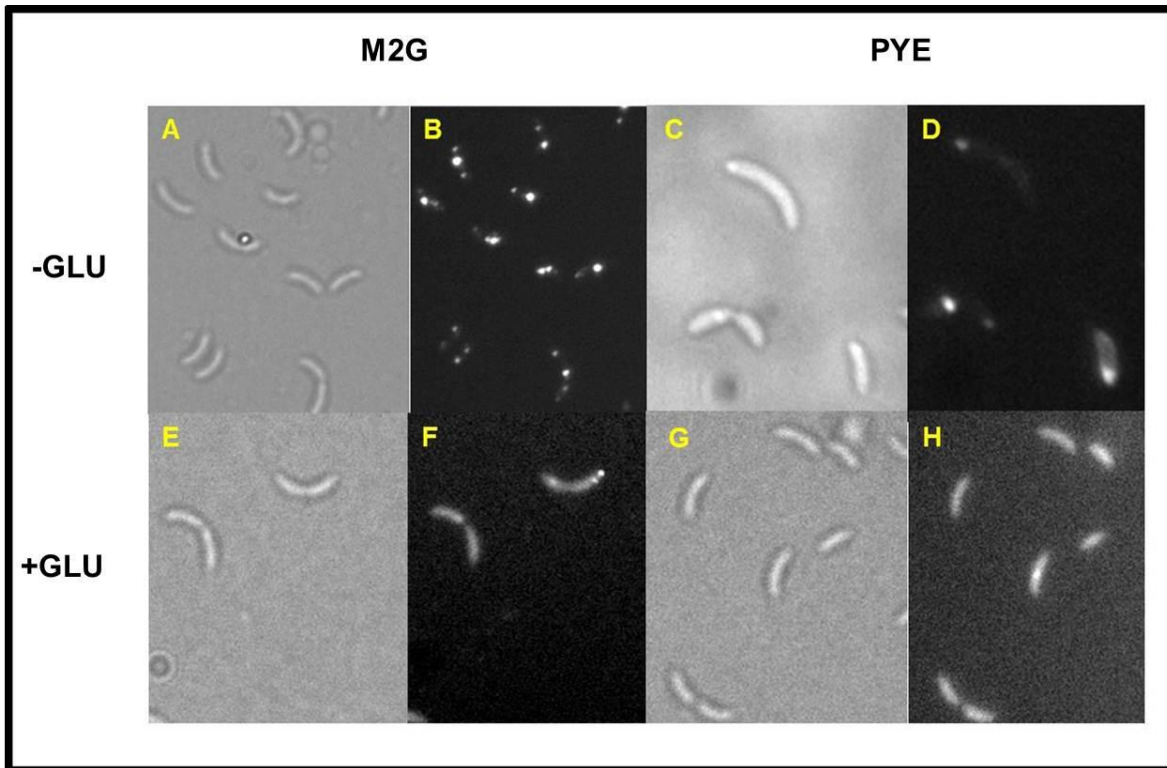


Fig. 17. Microscopia de fluorescencia de la cepa AL2 donde se observa la fluorescencia de la proteína de fusión CFP-phaS. Células crecidas en M2G (A,B), PYE (C,D), M2G adicionado con glucosa al 0.2% (E,F) y PYE adicionado con glucosa al 0.2% (G,H). En todos los casos las células fueron inducidas con xilosa al 0.1% final durante 3 horas.

Ensayo de Western Blot anti-GFP

Para corroborar que los focos de fluorescencia observados se deben a la presencia de la proteína CFP-PhaS y para evaluar la estabilidad de ésta, se realizó un ensayo de Western blot utilizando el anticuerpo anti-GFP, en el que se observa claramente una banda de 47kDa (fig. 18) que corresponde con el tamaño esperado de la proteína de fusión (CFP 27kDa y phaS 20kDa).

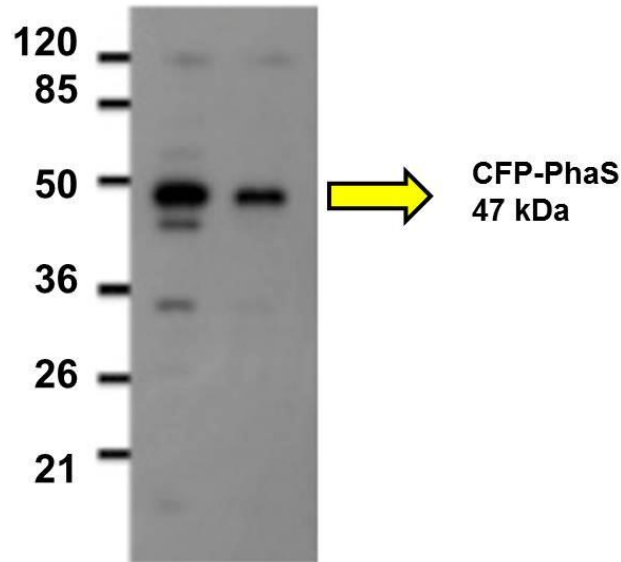


Fig. 18. Western blot de proteínas de la cepa pXCFPphaS-4. Se observa la banda de 47 kDa esperada de la fusión CFP-phaS. Las proteínas fueron detectadas con un anticuerpo monoclonal anti-GFP.

Sustitución de *phaS* por *CFP-phaS*

Habiendo comprobado que la fusión de PhaS con la CFP produce una proteína estable se decidió poner el gen que codifica para esta proteína bajo el control del promotor nativo del gen *phaS*.

Esto nos permitiría determinar la cantidad de proteína bajo su promotor nativo, quitando la posible sobre expresión causada por el promotor inducible.

Para poder sustituir el gen nativo por el alelo de fusión primero se sustituyó el promotor inducible de xilosa del plásmido pXCFPphaS-4 por la región río arriba de *phaS* que probablemente contiene el promotor nativo de este gen (Fig. 19).

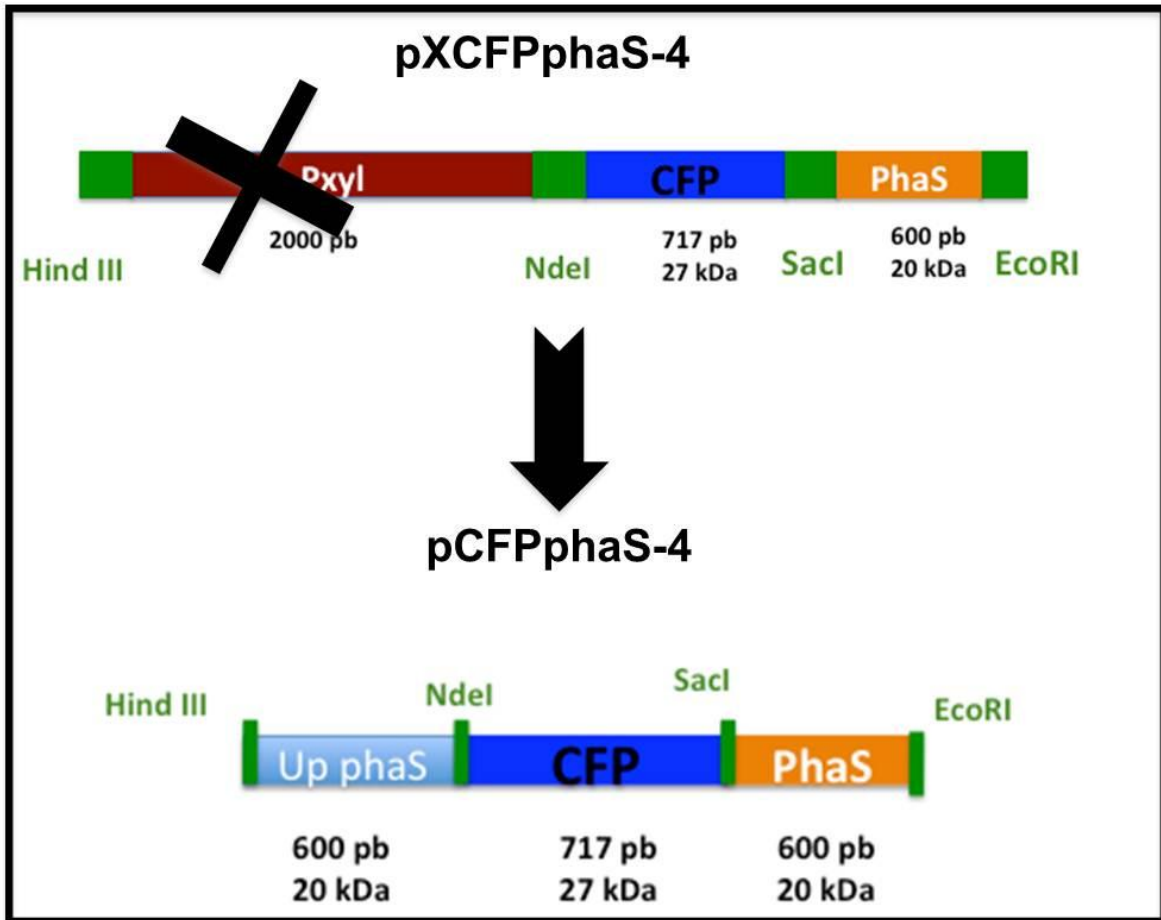


Fig. 19. Representación esquemática del plásmido pXCFPphaS-4 en el cual se suprime el promotor de xilosa para quedar bajo el promotor nativo del gen *phaS*, quedando la segunda construcción pCFPphaS-4.

La región río arriba de *phaS* se obtuvo mediante una reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos PhaSupF1HindIII y PhaSupR1NdeI, esperando una banda de aproximadamente 600pb como se observa en la figura 20.

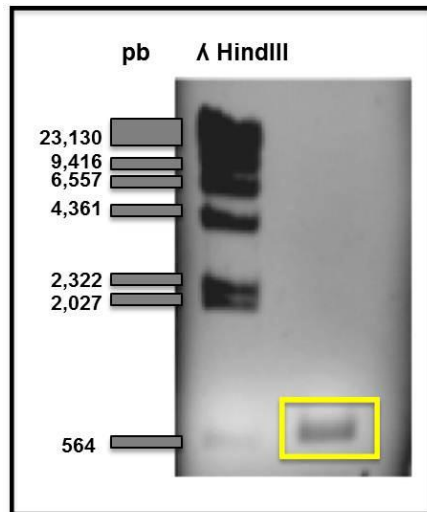


Fig. 20. Producto de PCR Up phaS con los oligonucleótidos PhaS Up F1 HindIII y PhaS Up R1 NdeI, el cual fue purificado quedando el tamaño en aproximadamente 600 pb y con una concentración de 16.1ng/μl .

Se purificó el producto de PCR “Up phaS” con el método de QIAGEN quedando con una concentración final de 16.1ng/μl.

Posteriormente se realizaron digestiones con las enzimas de restricción NdeI y HindIII al producto de PCR Up phaS (12μl H₂O, 3μl Buffer 2, 15μl DNA, 0.75μl NdeI, 0.75μl HindIII) y del plásmido pXCFPphaS-4 (44μl H₂O, 6μl Buffer 2, 10μl DNA, 1.5μl NdeI, 1.5μl HindIII). La digestión se inactivó a 65°C por 10 minutos.

De la digestión del plásmido se esperan dos fragmentos, uno de 2 Kpb que corresponde al promotor inducible por xilosa y uno de 4 Kpb conteniendo el resto del plásmido (Fig. 21). Se purificó la banda de 4000 pb con el método “QIAquick gel extraction” eliminando el promotor de xilosa para poder realizar la ligación del PCR Up phaS y el pCFPphaS-4. El fragmento obtenido quedó a una concentración de 73.3ng/μl.

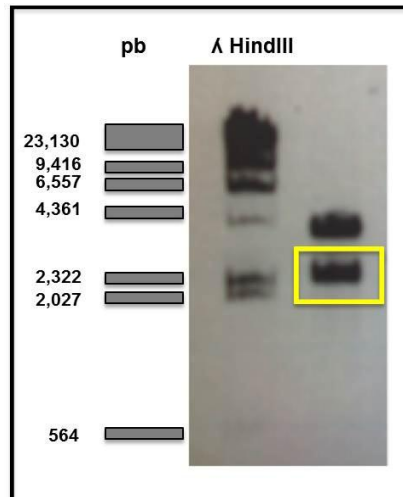


Fig. 21. Separación de los fragmentos del plásmido pXCFPphaS-4; promotor *p_{xyI}* (2000 pb) y el resto del plásmido (4000 pb) con las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII*, en un gel de agarosa al 1%.

Posteriormente se realizó una reacción de ligación con el producto de PCR Up phaS y el fragmento del plásmido pXCFPphaS-4 (1µl pXCFPphaS-4, 1µl Buffer 2, 6µl PCR Up phaS, 1µl ligasa, 1.5µl ATP) la cual se quedó toda la noche a temperatura ambiente. Posteriormente se inactivó la ligasa a 65°C por 10 minutos y se transformó por electroporación en células de *E. coli TOP10*, las cuales se platearon en cajas de LB-Gm. Se procedió a realizar las Minipreparaciones de las colonias recuperadas de la transformación para la extracción del plásmido y su respectiva digestión con *HindIII-EcoRI*.

Con la digestión, fue posible identificar las colonias que contenían la construcción esperada y se purificó el plásmido de una de estas con el método de columna de QIAGEN, obteniendo pUpphaSCFPphaS con una concentración final de 19.1ng/µl.

Clonación de pUpphaSCFPphaS en el plásmido suicida

Para poder sustituir al gen nativo por el alelo de fusión y quitar la posible sobre expresión de la proteína, se clonó el fragmento HindIII/EcoRI del plásmido pUpphaSCFPphaS en el vector suicida pNPTS 138 obteniendo la construcción pNPTS-UpphaSCFPphaS, como se muestra en la figura 22.

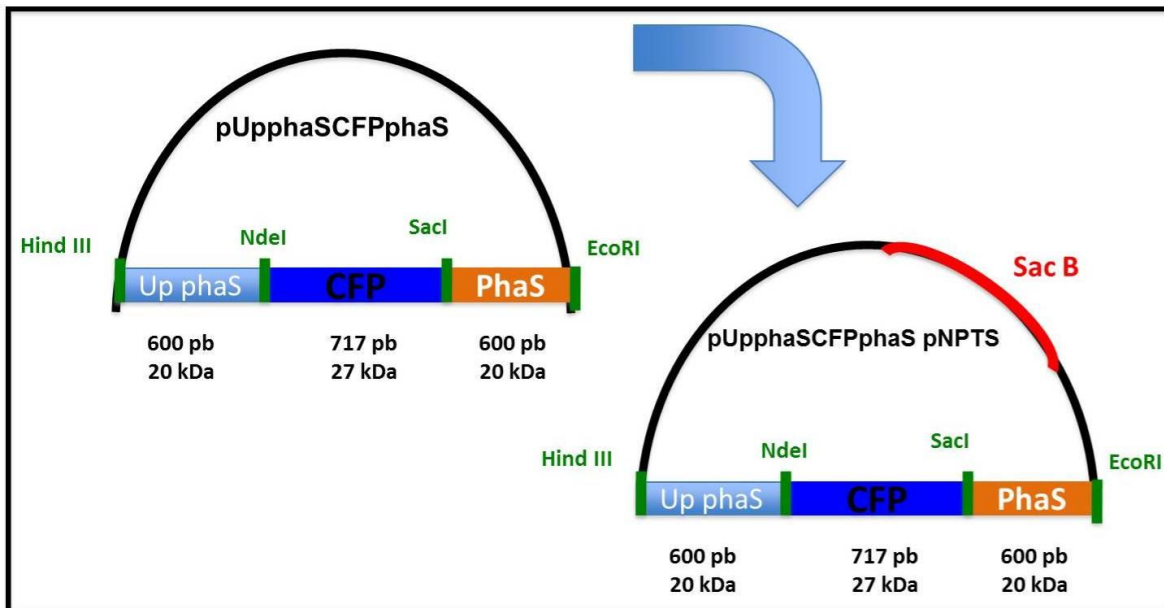


Fig. 22. Representación esquemática de la construcción suicida del plásmido pNPTS-pUpphaSCFPphaS.

El plásmido pNPTS tiene al gen *sacB* el cual permite seleccionar negativamente la presencia del plásmido cuando después de transformar en la cepa de interés se siembra en cajas con sacarosa ya que las colonias que crecen en presencia de sacarosa y que todavía tienen integrado el plásmido pNPTS que lleva el gen *sacB* son seleccionadas en contra. El pNPTS fue purificado y digerido con HindIII-EcoRI quedando a una concentración de 18.9ng/μl. Se realizó una reacción de ligación con el pNPTS digerido y el plásmido pUpphaSCFPphaS (2μl pUpphaSCFPphaS, 1μl pNPTS, 1.5μl ATP, 1μl Buffer 2, 1μl DNA ligasa, 1μl H₂O) la cual se incubó toda la noche a temperatura ambiente y se inactivó a 75°C por 10 minutos.

Posteriormente se transformó por electroporación en células de *E.coli* TOP10 y tras la recuperación celular se inoculó en cajas de LB Kanamicina con X-Gal para la selección de colonias blancas y azules. Se replicaron colonias blancas y azul claro y una sola colonia azul fuerte para como control negativo.

Se cultivaron colonias blancas, azul claro, y azul fuerte en LB-Kan para realizar las minipreparaciones (figura 23) y la digestión con EcoRI-HindIII (6 μ l DNA, 4.5 μ l Buffer 2, 0.75 μ l EcoRI, 0.75 μ l HindIII, 36 μ l H₂O) la cual estuvo 1 hora a 37°C e inactivada a 65°C durante 10 minutos (figura 24).

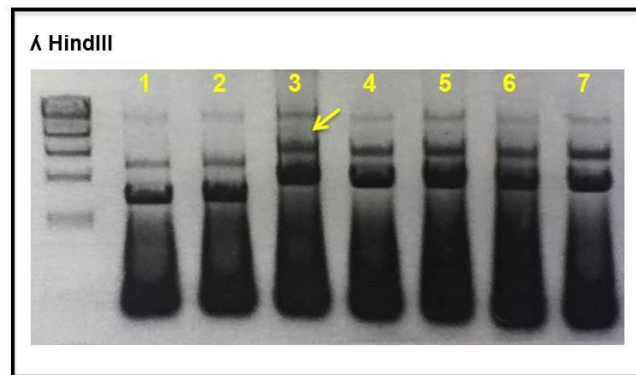


Fig. 23. Plásmidos obtenidos de las clonas de ligación con el plásmido suicida. El número 1 corresponde a una colonia azul fuerte, el 2 a colonia azul claro y 3-7 colonias blancas.

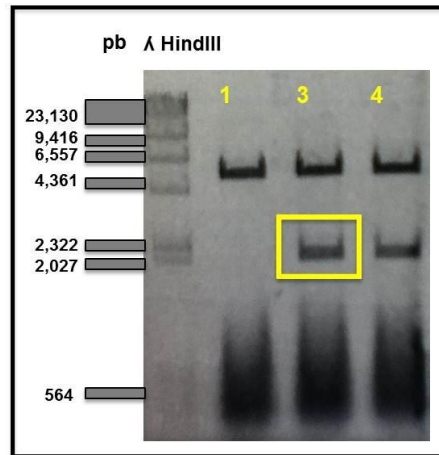


Fig. 24. Digestión de las minipreparaciones 1, 3 y 4 con las enzimas de restricción EcoRI-HindIII.

Posteriormente se puso un cultivo en LB-Kan de la muestra 3 que fue una colonia blanca que como muestra la figura 20, tiene el fragmento deseado. Se purificó el plásmido pNPTS-UpphaSCFPphaS quedando con una concentración de 195.ng/μl.

Generación de la cepa AL3

Las células de ésta construcción (pNPTS-UpphaSCFPphaS) se transformaron en Cb15N por electroporación y se sembraron en cajas de PYE-Kan para seleccionar las colonias que tuvieran el plásmido insertado en el cromosoma. Dos de estas colonias se crecieron hasta fase estacionaria en medio líquido PYE y se inocularon en cajas de PYE adicionado con sacarosa. Colonias independientes fueron sembradas por replicado en cajas de PYE y PYE-Kan. Las colonias sensibles a kanamicina han perdido la región correspondiente al pNPTS por medio de una segunda recombinación, resultando en la restauración del alelo silvestre o en la sustitución de este por el de la fusión. Para confirmar que la segunda recombinación resulto en la sustitución del alelo silvestre por la fusión con la proteína fluorescente, los parches sensibles a kanamicina obtenidas se cultivaron para su análisis al microscopio en medio definido líquido M2G adicionado con

glucosa al 0.2%. Una de las colonias que presentaron fluorescencia fue seleccionada y nombrada AL3, esta cepa presumiblemente presenta el genotipo CB15N $\Delta phaS::CFPphaS$.

Análisis al Microscopio de Fluorescencia de la cepa AL3

Las células se crecieron para su análisis al microscopio óptico de fluorescencia en camas de agarosa. La figura 25 muestra las imágenes obtenidas de este experimento, en las cuales se observa en (campo claro) que los gránulos de PHB se ven sin necesidad de fluorescencia y en el campo B se observan focos de fluorescencia en los gránulos. Sin embargo el nivel de fluorescencia es bajo, indicando una cantidad limitada de esta proteína.

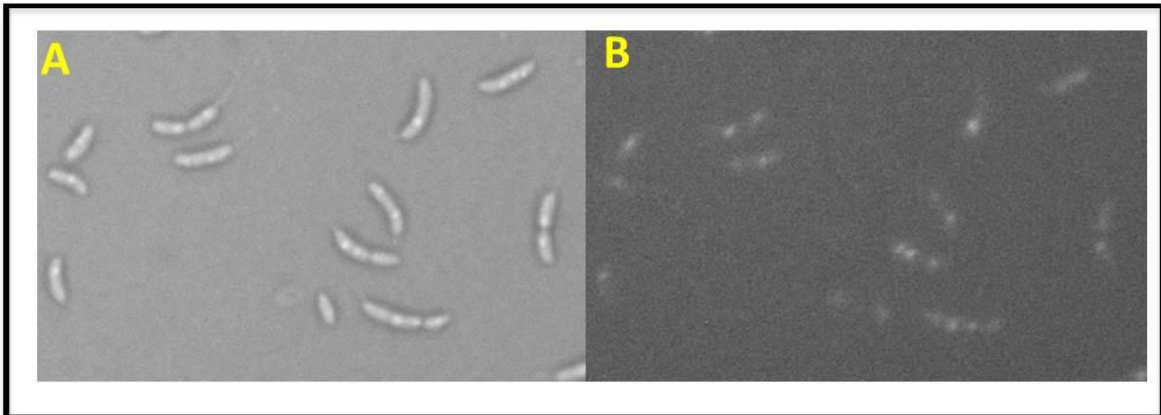


Fig. 25. Microscopia de fluorescencia de la cepa AL3 campo claro (A) y fluorescencia (B) crecida en medio M2G adicionado con glucosa al 0.2%.

A lo largo de los análisis al microscopio de esta cepa, se observó que es muy inestable, ya que pierde con facilidad la fluorescencia de los gránulos.

Tinción de gránulos de PHB de células de *C. crescentus* crecidas en distintas concentraciones de fosfato

Ya que la fluorescencia de las células que expresan la fusión CFP-*phaS* es muy baja, para tener un control se puso a punto la tinción de gránulos de PHB con el colorante fluorescente Azul de Nilo-A, para esto procedimos a probar la cepa CB15N en medio M5GG con distintas concentraciones de fosfato: 0.01mM, 0.05mM y 10mM (figura 26). Esto con el objetivo de aumentar la producción de PHB.

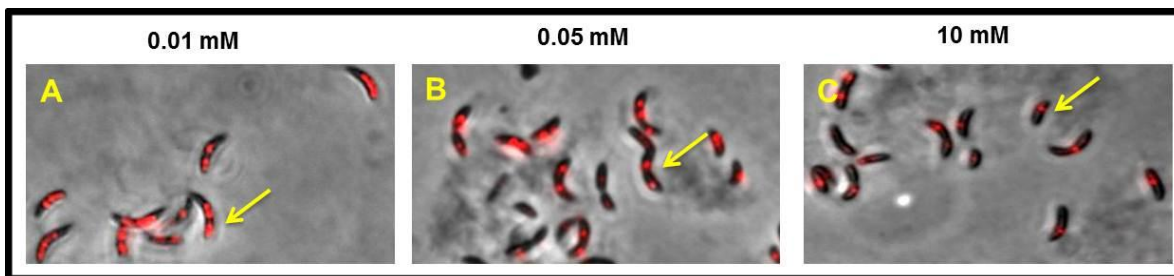


Fig. 26. Microscopía de fluorescencia en la que se observan imágenes superpuestas del campo claro y fluorescente de la cepa CB15N en medio de cultivo bajo en fosfatos (M5GG) con distintas concentraciones de PO_4 ; A corresponde a una concentración de 0.01mM, B 0.05mM y C 10mM.

Como se espera, las células crecidas en medio bajo en fosfato (0.01mM) tienen una mayor producción de gránulos de PHB (4-6); en cambio las células crecidas en alto fosfato tienen entre 1 y 2 gránulos por célula.

Sincronización de células CB15N

Para determinar la dinámica de los gránulos de PHB durante el ciclo celular, se realizó un Ensayo de Sincronización de las células silvestres CB15N crecidas en medio M5GG con una concentración de fosfatos de 0.05mM y 10mM. Debido a que inclusive una baja concentración del colorante Azul del Nilo-A resulta tóxica para *C. crescentus*, no es posible seguir los gránulos de PHB en células individuales. Por este motivo se tomaron alícuotas del cultivo sincronizado para su tinción y observación en el microscopio.

M5GG 0.05 mM

Las alícuotas de las células sincronizadas en medio M5GG 0.05mM se tomaron cada 20 minutos para la tinción y análisis al microscopio óptico de fluorescencia. Las imágenes obtenidas en este ensayo son mostradas en la figura 27, en el tiempo 0, se observa que todas las células tienen un gránulo, al paso del tiempo entre el minuto 20 y 40, logran sintetizar otro gránulo, quedando dos gránulos por célula. Las células predivisionales tienen dos gránulos (uno a cada lado del cuerpo celular); a los 140 minutos (donde ya ocurrió la división celular) se nota que todas las células nuevas tienen un gránulo y las predivisionales dos gránulos. Esto indica que las células de *C. crescentus* no sintetizan los gránulos de PHB después de la división, en cambio, la célula predivisional sintetiza varios gránulos, los cuales se acomodan para que al momento de la división celular cada célula hija se quede con uno o dos gránulos.

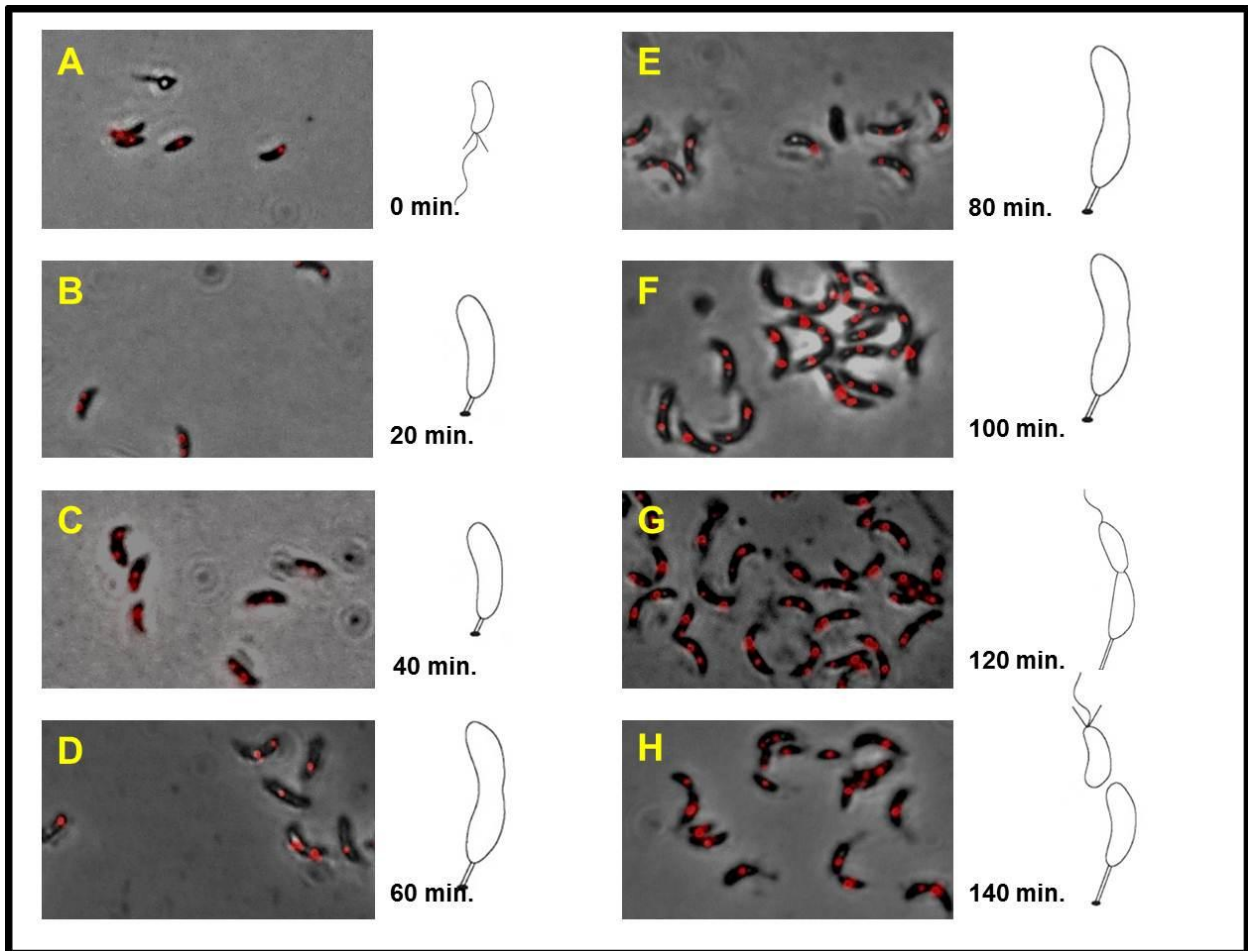


Fig. 27. Microscopía de fluorescencia de células de la cepa CB15N en medio M5GG 0.05mM sincronizadas, teñidas con Azul del Nilo A y analizadas cada 20 minutos al microscopio óptico de fluorescencia con una exposición de 300 mseg y un valor 0 de ganancia.

M5GG 10mM

Las alícuotas de células sincronizadas en medio M5GG 10mM fueron fijadas cada 10 minutos y teñidas para su posterior análisis. En la figura 28 se observan las células de la cepa CB15N de este ensayo.

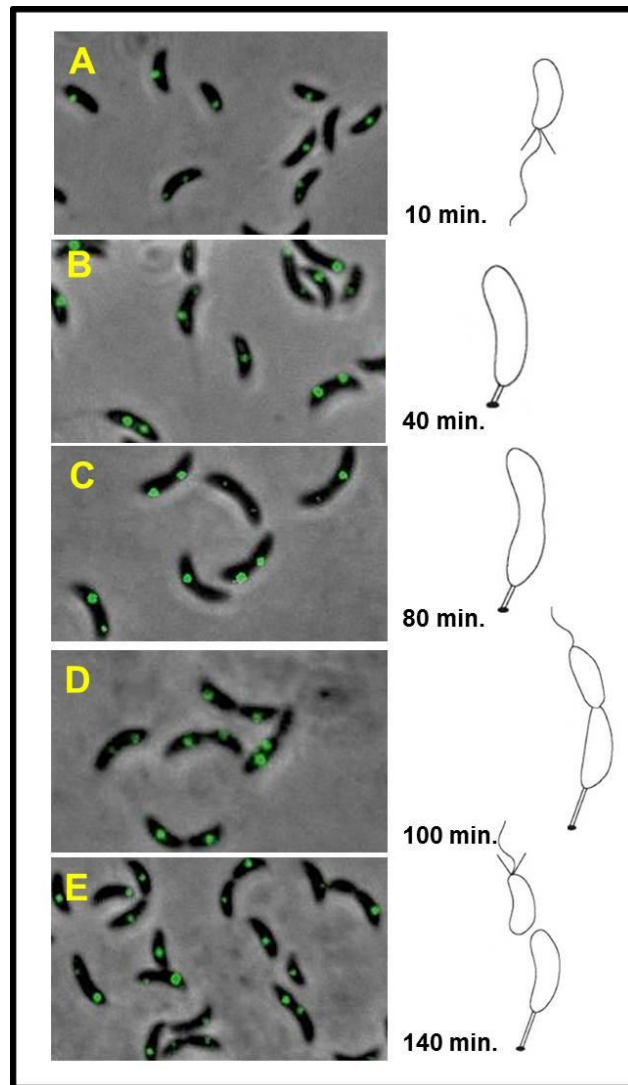


Fig. 28. Microscopía de fluorescencia de células de la cepa CB15N en medio M5GG 10mM, sincronizadas, fijadas con HCOOH cada 10 minutos y teñidas con Azul del Nilo A.

Como se observa en los dos ensayos de sincronización, las células flageladas tienen un solo gránulo; conforme avanza el ciclo, la célula sintetiza uno o dos, haciendo que al momento de la división, el arreglo de éstos en la célula sea a cada lado del sitio de división, dejando así a cada célula con un gránulo como se puede observar en la figura 29, la cual representa la dinámica de los gránulos de PHB en *C. crescentus* conforme avanza el ciclo celular.

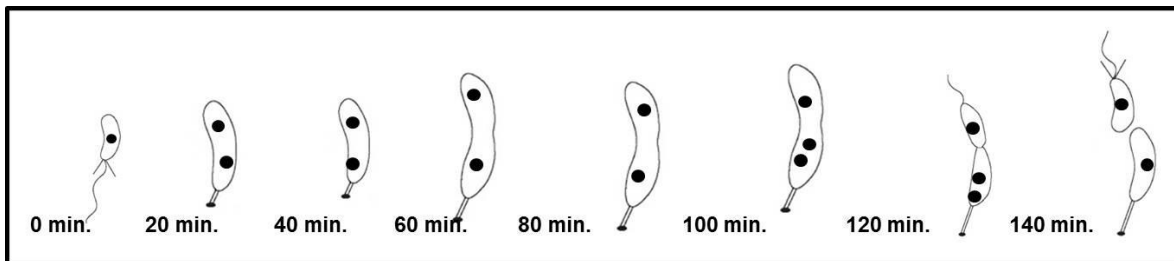


Fig. 28. Representación esquemática de la dinámica de los gránulos de PHB durante el ciclo celular en *Caulobacter crescentus*.

Discusión

Los resultados obtenidos muestran que *C. crescentus* es capaz de sintetizar gránulos de PHB en medio rico, medio mínimo y medio mínimo bajo y alto en fosfatos. Analizando la dinámica durante el ciclo, se observa que aparentemente los gránulos son heredados al momento de la división celular.

La dinámica de los gránulos de PHB se ha investigado por varios grupos en distintas especies bacterianas; Pfeifer *et. al.* determinaron que en *R. eutropha* la segregación y localización normal de los gránulos depende de la fasina PhaM y probablemente de la capacidad de esta de unirse al DNA. Resultados similares fueron obtenidos por Galan *et al.* en *P. putida* al mutagenizar la fasina *phaF*.

El ensayo de sincronización en *C. crescentus* mostró que las células flageladas presentan un gránulo en el polo o bien en el centro de la célula. Conforme avanzó el ciclo celular, se formaron de dos a tres gránulos, los cuales se localizaron a lo largo del cuerpo celular.

La localización puede ser congruente con la evidencia existente de que el cromosoma de *C. crescentus* se encuentra distribuido a lo largo del cuerpo celular; si alguna de las proteínas asociadas a éstos gránulos tienen dominios de unión a DNA (como se ha mostrado en otras especies bacterianas) la distribución de los gránulos sería a lo largo de la célula, no como sucede en células de *E. coli* expresando heterológamente los genes de biosíntesis de PHB de *R. eutropha*, las cuales acumularon los gránulos de PHB en los polos celulares (**Jendrossek D. 2005**).

El resultado obtenido de la sincronía indica que en esta especie bacteriana, el gránulo presente en las células nadadoras es heredado durante la división, descartando la idea de que la célula nueva sintetiza su propio gránulo.

Aunque estos resultados indican que la dinámica de los gránulos de PHB durante el ciclo celular es regulada por la bacteria, todavía es necesario determinar si la dinámica de los gránulos esta asociada a algún otro proceso celular. En particular

la segregación conjunta del cromosoma y de los gránulos, ya que se ha visto que en otros organismos como *R. eutropha* ocurre simultáneamente debido a la propiedad de unión al DNA de las proteínas estructurales (fasinas) presentes en el gránulo **(Wahl, A. et. al. 2012)**.

Como se puede ver en la tinción de las células sincronizadas, la aparición de dos gránulos entre los minutos 20 y 40 coincide aproximadamente con el inicio de la replicación e inicio de la segregación del cromosoma. Este resultado sugiere que en *C. crescentus* la segregación de los gránulos podría estar también ligada a la segregación del cromosoma.

Finalmente la poca fluorescencia observada en la cepa AL3 sugiere que la fasina identificada no es la única proteína con esta función en *C. crescentus*, ya que la fasina constituye la mayoría de la proteína en la superficie del gránulo y la cantidad de fluorescencia observada es muy baja. Se sabe que en otras especies bacterianas hay diferentes fasinas, por ejemplo *R. eutropha* tiene 7 hasta ahora descritas. **(Pfeiffer, D. and Jendrossek, D. 2012)**. Por otro lado la inestabilidad de la cepa podría ser la causa de la baja fluorescencia observada. El motivo de la inestabilidad es desconocido ya que en principio el gen silvestre fue sustituido por la copia del gen fusionado con la proteína fluorescente. Sin embargo en este trabajo no se obtuvo evidencia directa de que la sustitución ocurrió de forma apropiada.

Conclusiones

En este trabajo se muestra que:

- En *C. crescentus* la síntesis de gránulos de PHB se ve favorecida por la utilización de un medio de cultivo bajo en fosfatos adicionado con una fuente de carbono, que en este caso fue la glucosa.
- Los gránulos de PHB no se sintetizan en la célula nadadora, sino que al ocurrir la división celular, la célula madura otorga el gránulo a la célula nueva.
- La fusión CFP-phaS permite concluir que PhaS no es la proteína mayoritaria en *C. crescentus*, ya que pueden existir otras fasinias en esta especie bacteriana.

Bibliografía

Beeby, M. et. al. 2012. Growth and Localization of Polyhydroxybutyrate Granules in *Ralstonia eutropha*. *Journal of Bacteriology*. 5, 194:1092-1099.

Bowers, L. et. al. 2008. Who's in charge here? Regulating cell cycle regulators. *Current Opinion in Microbiology*. 11: 547-552.

Dennis, D. et. al. 2007. PhaP is involved in the formation of a Network on the surface of Polyhydroxyalkanoate inclusions in *Cupriavidus necator H16*. *Journal of Bacteriology*. 2, 190:555-563.

Dunlop, W. and Robards, A. 1973. Ultrastructural Study of Poly- β -Hydroxybutyrate Granules from *Bacillus cereus*. *Journal of Bacteriology*. 3,114:1271-1280.

Ebersbach, G. et. al. 2008. A self-associating protein critical for chromosome attachment, division, and polar organization in *Caulobacter*. *Cell*. 134, 6:956-968.

Galan, B. et. al. 2011. Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* KT2442. *Molecular Microbiology*. 2, 79: 402-418.

Goley, E., Iniesta, A., Shapiro, L. 2007. Cell cycle regulation in *Caulobacter*: location, location, location. *Journal of cell science*. 120: 3501-3507.

Grage, K. et. al. 2009. Bacterial Polyhydroxyalkanoate Granules: Biogenesis, Structure, and Potential Use as Nano-/Micro-Beads in Biotechnological and Biomedical Applications. *Biomacromolecules*. 10: 660-669.

Grunenfelder, B. et. al. 2001. Proteomic analysis of the bacterial cell cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 98:4681-4686.

Handrick, R. et. al. 2000. Mobilization of Poly(3-hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha*. *Journal of Bacteriology*. 20, 182: 5916-5918.

- Herman, S., Jendrossek, D. 2007.** Microscopical investigation of Poly(3-hydroxybutyrate) granule formation in *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiology Letters*. 266: 60-64.
- Jenal, U. and Stephens, C. 2002.** The *Caulobacter* cell cycle: timing, spatial organization and checkpoints. *Current Opinion in Microbiology*. 5:558-563.
- Jendrossek, D. 2005.** Fluorescence Microscopical Investigation of Poly(3-hydroxybutyrate) Granule Formation in Bacteria. *Biomacromolecules*. 6: 598-603.
- Jendrossek, D. et.al. 2006.** Poly(3-Hydroxybutyrate) granules at the early stages of formation are localized close to the cytoplasmic membrane in *Caryophanon Batum*. *Applied and Environmental Microbiology*. 2, 73: 586-593.
- Jendrossek, D. 2009.** Polyhydroxyalkanoate Granules are Complex Subcellular Organelles (Carbonosomes). *Journal of Bacteriology*. 10, 191:3195-3202.
- Jensen, R. et. al. 2002.** Dynamic localization of proteins and DNA during a bacterial cell cycle. *Nature Reviews*. 3:167-176.
- Jurassek, L. and Marchessault R. M. 2002.** The role of Phasins in the morphogenesis of Poly(3-hydroxybutyrate) granules. *Biomacromolecules*. 3: 256-261.
- Laub, M. et. al. 2000.** Global analysis of the genetic network controlling a bacterial cell cycle. *Science*. 290:2144-2148.
- Laub, M. et. al. 2002.** Genes directly controlled by CtrA, a master regulator of the *Caulobacter* cell cycle. *PNAS*. 7, 99:4632-4637.
- Laub, M. Shapiro, L. and McAdams, H. 2007.** Systems biology of *Caulobacter*. *Annu. Rev. Genet.* 41: 429-441.
- Lundgren, D. et. al. 1964.** Structure of Poly- β -hydroxybutyric Acid Granules. *J. Gen. Microbiol.* 34:441-446.

Madison, L. and Huisman, G. W. 1999. Metabolic engineering of Poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 1, 63: 21-53.

Mott, M. and Berger, J. 2007. DNA replication initiation: mechanisms and regulation in bacteria. *Nature Reviews.* 5:343-354.

Ostle, A. and Holt, J. 1982. Nile Blue A as a fluorescent stain for Poly- β -Hydroxybutyrate. *Applied and Environmental Microbiology.* 1, 44: 238-241.

Peters, V. and Rehm, B. 2005. In vivo monitoring of PHA granule formation using GFP-labeled PHA synthases. *FEMS Microbiology Letters.* 248:93-100.

Pfeiffer, D. et. al. 2011. Identification of a multifunctional protein, PhaM, that determines number, surface to volume ratio, subcellular localization and distribution to daughter cells of Poly(3-hydroxybutyrate), PHB, granules in *Ralstonia eutropha* H16. *Molecular Microbiology.* 1-16.

Pfeiffer, D. and Jendrossek, D. 2012. Localization of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) granule-associated proteins during PHB granule formation and identification of two new phasins, PhaP6 and PhaP7, in *Ralstonia eutropha* H16. *Journal of Bacteriology.* 21, 194:5909-5921.

Pötter, M. and Steinbüchel, A. 2005. Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: impacts on Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. *Biomacromolecules.* 6: 552-560.

Qi, Q. and Rehm, B. 2001. Polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Caulobacter crescentus*: molecular characterization of the polyhydroxybutyrate synthase. *Microbiology.* 147: 3353-3358.

Quon, K. et. al. 1996. Cell cycle control by an essential bacterial two-component signal transduction protein. *Cell.* 84:83-93.

Roberts, M. et. al. 2012. ParA-like protein uses non-specific chromosomal DNA binding to partition protein complexes. *PNAS.* 17, 109: 6698-6703.

- Sang Yup, L. 1996.** Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering*. 46: 1-14.
- Steinbuchel, A. et. al. 1995.** Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. *Can. J. Microbiol.* 41(Suppl. 1):94–105.
- Stubbe, J. and Tian, J. 2003.** Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of PHA synthase. *Nat. Prod. Rep.* 20,5:445-457.
- Tian, J. et. al. 2005.** Kinetic Studies of Polyhydroxybutyrate Granule Formation in *Wautersia eutropha* H16 by Transmission Electron Microscopy. *Journal of Bacteriology*. 11, 187:3814-3824.
- Tian, J. et. al. 2005.** Analysis of Transient Polyhydroxybutyrate Production in *Wautersia eutropha* H16 by Quantitative Western Analysis and Transmission Electron Microscopy. *Journal of Bacteriology*. 11,187:3825-3832.
- Thanbichler, M. and Shapiro, L. 2006.** MipZ, a spatial regulator coordinating chromosome segregation with cell division in *Caulobacter*. *Cell*. 126, 1:147-162.
- Thanbichler, M. et. al. 2007.** A comprehensive set of plasmids for vanillate- and xylose-inducible gene expression in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acid Research*. 20, 35: e137.
- Uchino, K. et.al. 2007.** Isolated Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) granules are complex bacterial organelles catalyzing formation of PHB from Acetyl Coenzyme A (CoA) and degradation of PHB to Acetyl-CoA. *Journal of Bacteriology*. 22, 189: 8250-8256.
- Wahl, A. et. al. 2012.** PBH granules are attached to the nucleoid via PhaM in *Ralstonia eutropha*. *BMC Microbiol.* 12:262