



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

“Estudio del papel de los reguladores PhbF y Avin\_33510 en la expresión de las depolimerasas de PHB en *Azotobacter vinelandii*”

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:  
Thalía Barrientos Millán

TUTOR PRINCIPAL  
Dr. Daniel Genaro Segura González  
[Instituto de Biotecnología UNAM](#)

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR  
Dr. Víctor Humberto Bustamante Santillán  
[Instituto de Biotecnología UNAM](#)  
Dr. Miguel Castañeda Lucio  
[Instituto de Ciencias BUAP](#)

Ciudad de Cuernavaca. Octubre, 2020



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.

El presente trabajo experimental fue realizado en el Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México. El trabajo fue financiado por donativos del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología CONACyT, Proyecto 255158, y el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación de Innovación Tecnológica (PAPIIT-IT200415 e IG200219) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) de la UNAM

## AGRADECIMIENTOS

A CONACYT por el apoyo económico durante mi estancia, con el número de beca 855591.

Al Programa de Apoyo a los Estudiantes de Posgrado (PAEP) por el financiamiento para asistir a congresos nacionales donde se presentó este trabajo.

A la Unidad de síntesis y secuenciación por los oligonucleótidos necesarios para llevar a cabo este proyecto.

A mi familia, por el apoyo incondicional. A mi mamá, por tratar de siempre hacer lo mejor con lo que tienes, siempre vas a ser un ejemplo para mí, lo único que anhelo es que seas feliz. A mi hermana, por ser la voz de la razón cuando nadie más puede serlo, te convertiste en una persona admirable, estoy orgullosa de ti. A mi papá, por darnos lo que necesitamos y apoyarnos con lo que puedes, siempre estaré agradecida. Los quiero demasiado.

A mi asesor de tesis, el Dr. Daniel Segura, por la confianza y la libertad que me dio para realizar este proyecto, espero que se sienta al menos un poco retribuido, e ilusionado como yo con el trabajo que todavía tenemos por delante.

A los miembros de mi comité tutor: el Dr. Miguel Castañeda, que me sigue pareciendo un modelo a seguir, tanto en el ámbito profesional como en el personal; y el Dr. Víctor Bustamante, que siempre tiene comentarios acertados y su amplio conocimiento me sorprende e inspira.

A los miembros de mi jurado, por sus contribuciones a este trabajo a pesar de la difícil situación que vivimos actualmente.

A las doctoras Guadalupe Espín y Cinthia Núñez por sus sugerencias y comentarios, durante mis seminarios y en el laboratorio, que ayudaron a mejorar mucho la presentación de mi proyecto.

A Jose y Sol por su amable y paciente guía, y por sacarme de los apuros de los que yo no sabía salir sola, además, siempre con buena disposición y muy accesibles. Les estoy muy agradecida por todo.

A mis compañeritos de laboratorio que, en todo este tiempo, se convirtieron en otra familia, en especial a Andrea, Jess, Chanty, Mariana, Karen y Citlalli, por apoyarme siempre dentro y fuera del laboratorio, las quiero mucho. A Chanty, Gaby, Holjes y Leo por sus consejos y ayuda con mis experimentos, me salvaron más de una vez. A todos los miembros, actuales y pasados, del laboratorio vinelandii: son los mejores.

A mis compañeritos de maestría, por ser mi familia fuera del laboratorio: Ale, Brenda, Ivette, Steph, “Los Jorges” (originales y agregados, ustedes saben quiénes son) y, en especial, a Uriel, Marieli y Edgar, por ayudarme en el momento más difícil de todos, ustedes me salvaron. A Jaime: por ser tan bueno conmigo y por enseñarme a ver lo bueno, en mí y en otros, te quiero mucho. A Edgar: por siempre levantarme y hacerme sentir mejor, fuiste una maravillosa persona conmigo. A Marieli: por ser mi apoyo cuando no tenía a nadie, espero algún día poder ayudarte tanto como tú a mí. A Uri: no podría terminar de darte las gracias por todo lo que has hecho por mí, gracias por quererme mucho, yo te quiero más.

A mis amiguitas de siempre: Chivis y Maggie, por ayudarme a verme y a ver las cosas con otros ojos, me dieron valor y me hicieron más fuerte. Con ustedes aprendí que el amor de tu vida también viene en forma de amigas. Gracias por todo y por tanto. Las quiero.

A mis amigos de la licenciatura: Coral, Ceci, Emilio, Carlos y Bubu. Por seguir siendo mis amigos a pesar del tiempo y la distancia, porque aunque ya casi no nos veamos, siempre van a tener un lugar muy especial en la historia de mi vida. Los extraño.

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura general de un PHA.....	1
Figura 2. Gránulos de PHB en <i>R. eutropha</i> .....	6
Figura 3. Vías de biosíntesis de PHAs.....	7
Figura 4. Estado físico de PHA.....	8
Figura 5. Secuencia de eventos durante la formación del gránulo de PHA.....	14
Figura 6. <i>A. vinelandii</i> con gránulos de PHB.....	15
Figura 7. Metabolismo de PHB en <i>A. vinelandii</i> .....	16
Figura 8. Modelo de regulación que ejerce PhbR sobre el operón biosintético <i>phbBAC</i> .....	17
Figura 9. Modelo de la regulación de la síntesis de PHB en <i>A. vinelandii</i> .....	18
Figura 10. Operón biosintético de PHB y genes aledaños.....	19
Figura 11. Posibles sitios de unión al regulador transcripcional PhbF.....	21
Figura 12. Genes de PHB depolimerasa ( <i>Avin_33500</i> ) y de su posible regulador ( <i>Avin_33510</i> ).....	22
Figura 13. Visualización del gel SDS-PAGE con los extractos proteicos y lavados de la columna de níquel, se observa la mayor cantidad de la proteína en el carril E2.....	33
Figura 14. Genes ortólogos al gen <i>phbF</i> de <i>A. vinelandii</i> , donde se aprecia <i>phaR</i> de <i>R. eutropha</i> .....	37
Figura 15. Alineamiento de secuencias homólogas a PhaR.....	38
Figura 16. Crecimiento en placa de las cepas UW136 y UW136 <i>phbF</i> en medio BS, BG y PY a las 72 horas.....	39
Figura 17. Cinética de crecimiento de las cepas UW136 y UW136 <i>phbF</i> en medio líquido PY y BG.....	39

Figura 18. Producción específica de PHB en las cepas UW136 y UW136 <i>phbF</i> crecidas en medio líquido PY.....	40
Figura 19. Producción específica de PHB en las cepas UW136 y UW136 <i>phbF</i> crecidas en medio líquido BG.....	41
Figura 20. Cuantificación por qPCR de la expresión de los genes <i>phbP1</i> , <i>phbZ1</i> y <i>phbP2</i> en las cepas UW136 y UW136 <i>phbF</i> crecidas en medio BG a las 32 y a las 48 horas.....	43
Figura 21. Cinética de expresión de la fusión transcripcional <i>phbP2-gusA</i> .....	44
Figura 22. Cinética de expresión de la fusión transcripcional <i>phbZ1-gusA</i> .....	44
Figura 23. Sitios de unión a PhbF en el promotor del gen <i>phbP1</i> y en la región intergénica <i>phbZ1-phbP2</i> en <i>A. vinelandii</i> .....	45
Figura 24. Ensayo de retardo en la movilidad electroforética utilizando concentraciones crecientes de la proteína PhbF con la región reguladora del gen <i>phbP1</i> .....	46
Figura 25. Ensayo de retardo en la movilidad electroforética utilizando concentraciones crecientes de la proteína PhbF con la región reguladora que comparten los genes <i>phbZ1</i> y <i>phbP2</i> .....	46
Figura 26. Promotores encontrados con SoftBerry.....	47
Figura 27. Esquema de ortólogos del gen <i>Avin_33510</i> .....	48
Figura 28. Dominios conservados identificados en la proteína <i>Avin_33510</i> y en CopG, en la base de datos de NCBI.....	49
Figura 29. Alineamiento de secuencias homólogas a <i>Avin_33510</i> .....	49
Figura 30. Sitio de unión a CopG con las bases de contacto encerradas en rectángulos.....	50
Figura 31. Sitio encontrado en búsqueda manual de sitios CopG.....	50
Figura 32. Resultados de la búsqueda de sitios de unión a CopG.....	51
Figura 33. Representación del sitio de inserción del casete de resistencia a gentamicina en la cepa OP33510.....	51

Figura 34. Cinética de crecimiento y de acumulación de PHB en la cepa silvestre OP y la cepa OP33510.....	52
Figura 35. Expresión del gen <i>Avin_33500</i> en la cepa silvestre OP y en la mutante polar y no polar del gen <i>Avin_33510</i> .....	53
Figura 36. Esquema de la regulación ejercida por PhbF.....	57
Figura 37. Esquema de la regulación ejercida por <i>Avin_33510</i> .....	58

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Comparación de las propiedades de diferentes polímeros utilizados para fabricar plásticos.....	2
Tabla 2. Requerimientos energéticos y emisiones totales de dióxido de carbono en la producción de polímeros, de principio a fin.....	3
Tabla 3. Aplicaciones de los PHAs en diferentes campos.....	4
Tabla 4. Clasificación de las PHA depolimerasas y organismos en los que se encuentran.....	9
Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para realizar este trabajo.....	26
Tabla 6. Vectores utilizados en este trabajo.....	27
Tabla 7. Bacterias y cepas utilizadas en este trabajo.....	28
Tabla 8. Reguladores transcripcionales RHH caracterizados.....	54

## RESUMEN

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son poliésteres producidos por varias arqueas y bacterias como reserva de fuente de carbono, energía y poder reductor. Estos polímeros son acumulados intracelularmente bajo condiciones de exceso de fuente de carbono y limitación de nitrógeno, fósforo u oxígeno, y son movilizados (utilizados) cuando la fuente de carbono es escasa. *Azotobacter vinelandii* es una de las bacterias capaces de producir PHAs, sintetizando principalmente el homopolímero de hidroxibutirato denominado polihidroxibutirato (PHB) y la importancia de estos compuestos en la industria es que pueden ser utilizados para manufacturar plásticos biodegradables que reemplacen a los plásticos derivados del petróleo. La síntesis de PHB en *A. vinelandii* inicia a partir de dos moléculas de acetil Co-A, a través de tres pasos enzimáticos catalizados por la  $\beta$ -cetotiolasa, acetil Co-A reductasa y PHB sintasa, codificadas por los genes *phbA*, *phbB* y *phbC*, respectivamente; mientras que la degradación (movilización) de PHB se lleva a cabo por las enzimas PHB depolimerasas, hidroxibutirato deshidrogenasa, succinil Co-A transferasa y, de nuevo,  $\beta$ -cetotiolasa. Aunque estos dos procesos ocurren simultáneamente, dando lugar a un ciclo constante de síntesis/movilización, se necesitan algunos mecanismos para el control del balance de este ciclo, favoreciendo así la síntesis o la degradación dependiendo de las condiciones metabólicas de la bacteria. Ya se conocen numerosos reguladores de los genes biosintéticos de PHB en *A. vinelandii* pero no se sabe nada sobre el control de la degradación de PHB y es posible que ambos procesos sean controlados por los mismos sistemas de regulación.

En *A. vinelandii* se han encontrado siete genes que codifican para posibles PHB depolimerasas. Uno de ellos, denominado *phbZ1*, comparte su región reguladora con el gen *phbP2* (que codifica para una phasina posiblemente involucrada en biosíntesis). En este trabajo se demostró que PhbF, uno de los reguladores involucrados en el proceso de biosíntesis que reprime la expresión del gen *phbP1* (el cual codifica para una proteína asociada al gránulo de PHB necesaria para controlar el tamaño y número de gránulos durante la producción de PHB) también controla la transcripción de los genes *phbZ1* y *phbP2*, posiblemente a través de un sitio de unión a PhbF encontrado en la región intergénica *phbZ1-phbP2*. Además, se demostró la participación del regulador PhbF en el control del proceso de movilización a través del análisis de la expresión de los genes *phbZ1*, *phbP1* y *phbP2* en una cepa mutante UW136*phbF*, mediante RT-qPCR y fusiones transcripcionales, así como ensayos de retardo EMSA y análisis fenotípicos.

Otra de las PHB depolimerasas encontradas en *A. vinelandii* es Avin\_33500, que se encuentra río abajo de un posible regulador que pertenece a la familia CopG de reguladores transcripcionales. En el presente trabajo, se demostró que este regulador Avin\_33510 ejerce un efecto positivo en la expresión del gen de la PHB depolimerasa Avin\_33500, a través de análisis de expresión mediante RT-qPCR y análisis fenotípicos en la cepa silvestre OP y la mutante en Avin\_33510.

## ABSTRACT

Polyhydroxyalkanoates (PHAs) are polyesters produced by various archaea and bacteria as reserve of carbon, energy and reducing power. These polymers are intracellularly accumulated under conditions of carbon source excess and nitrogen, phosphorous or oxygen limitation, and are mobilized (utilized) when the carbon source is scarce. *Azotobacter vinelandii* is one of the bacteria capable of producing PHA, it synthesizes mainly the hydroxybutyrate homopolymer named polyhydroxybutyrate (PHB) and the importance of these compounds in industry is that they can be used to manufacture biodegradable plastics to replace petroleum-based plastics. PHB synthesis in *A. vinelandii* starts from two molecules of acetyl Co-A, through three enzymatic steps catalyzed by  $\beta$ -ketothiolase, acetyl Co-A reductase and PHB synthase, encoded by the *phbA*, *phbB* and *phbC* genes, respectively; while PHB degradation (mobilization) is carried out by the enzymes PHB depolymerases, hydroxybutyrate dehydrogenase, succinyl Co-A transferase and, again,  $\beta$ -ketothiolase. Although these two processes occur simultaneously, giving rise to a constant synthesis/mobilization cycle, some mechanism is needed to control the balance of this cycle, thus favoring synthesis or degradation depending on the metabolic conditions. Several regulators of the PHB biosynthetic genes are known in *A. vinelandii*, but nothing is known about the control of PHB degradation, though it is possible that both processes would be controlled by the same regulation systems.

In *A. vinelandii*, seven genes encoding possible PHB depolymerases have been found. One of them, called *phbZ1*, shares its regulatory region with *phbP2* gene (that encodes a phasin probably involved in biosynthesis process). In this study, it was shown that PhbF, one of the regulators involved in biosynthesis process and which represses the *phbP1* gene expression (that codes for a protein associated to PHB granules and necessary to control size and number of granules during PHB production) also regulates *phbZ1* and *phbP2* genes transcription, possibly through a PhbF binding site found in the intergenic region *phbZ1-phbP2*. Moreover, the participation of PhbF regulator in the control of mobilization process was demonstrated by the analysis of *phbZ1*, *phbP1* y *phbP2* genes expression in both UW136 and UW136*phbF* strains through qRT-PCR and transcriptional-fusions analysis, as well as EMSA and phenotypic analysis.

Another PHB depolymerase in *A. vinelandii* is Avin\_33500, which is found downstream of a possible regulator belonging to the CopG family of transcriptional regulators. In the present work, it was demonstrated that Avin\_33510 regulator has a positive effect on Avin\_33500 PHB depolymerase gene expression by RT-qPCR and phenotypic analysis in OP wild type strain and Avin\_33510 mutant strain.

# ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>II</b>
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>IV</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS.....</b>	<b>VII</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>VIII</b>
<b>ÍNDICE.....</b>	<b>X</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
1.1 GENERALIDADES DE LOS POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs).....	1
1.1.2 Aplicaciones como bioplásticos.....	2
1.1.3 Aplicaciones especiales.....	4
1.2 BACTERIAS PRODUCTORAS DE PHAs.....	5
1.2.1 Biosíntesis de PHAs.....	6
1.2.2 Movilización de PHAs.....	8
1.2.3 Proteínas asociadas a gránulos de PHAs.....	10
1.2.4 Factores que influyen en las propiedades de los PHAs.....	12
<b>2. ANTECEDENTES.....</b>	<b>13</b>
2.1 REGULACIÓN DE LA MOVILIZACIÓN Y PROTEÍNAS ASOCIADAS AL GRÁNULO DE PHA.....	13
2.2 GENERALIDADES DE <i>Azotobacter vinelandii</i> .....	15
2.3 BIOSÍNTESIS DE PHB EN <i>A. vinelandii</i> .....	16
2.3.1 Genes biosintéticos.....	17

2.3.2 Regulación de la biosíntesis.....	17
2.3.3 Regulación de las phasinas y formación del gránulo de PHB.....	19
2.4 MOVILIZACIÓN DE PHB EN <i>A. vinelandii</i> .....	20
2.4.1 Genes involucrados en movilización.....	20
2.4.2. Regulación de la movilización.....	21
<b>3. JUSTIFICACIÓN.....</b>	<b>23</b>
<b>4. HIPÓTESIS.....</b>	<b>24</b>
<b>5. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	25
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
<b>6. MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
6.1 OLIGONUCLEÓTIDOS, VECTORES y CEPAS.....	26
6.2 PREPARACIÓN DE IPTG 100 mM.....	28
6.3 MEDIOS DE CULTIVO PARA <i>A. vinelandii</i> .....	28
6.3.1 Burk-Sacarosa (BS).....	29
6.3.2 Burk-Glucosa (BG).....	29
6.3.3 Medio Peptona-Extracto de levadura-sacarosa 2% (PY).....	30
6.3 MEDIOS DE CULTIVO PARA <i>E. coli</i> .....	30
6.4.1 Medio Luria-Bertani (LB).....	30
6.5 CONSERVACIÓN DE CEPAS EN GLICEROL.....	30
6.6 TRANSFORMACIÓN.....	31

6.6.1 Transformación en <i>E. coli</i> .....	31
6.6.2 Transformación en <i>A. vinelandii</i> .....	31
6.7 PURIFICACIÓN Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	31
6.7.1 Extracción y purificación de DNA plasmídico en <i>E. coli</i> .....	31
6.7.2 Cuantificación de expresión por RT-qPCR en <i>A. vinelandii</i> .....	32
6.8 MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS.....	33
6.8.1 Purificación de PhbF expresada en <i>E. coli</i> .....	33
6.8.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS.....	34
6.9 ENSAYO DE RETARDO EMSA.....	35
6.10 TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN.....	36
6.10.1 Cuantificación de PHB.....	36
6.10.2 Determinación de actividad $\beta$ -glucoronidasa.....	36
6.10.3 Cuantificación de proteína por el método de Lowry.....	37
6.11 BÚSQUEDA DE SITIOS CONSERVADOS.....	37
<b>7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>38</b>
7.1 ANÁLISIS <i>in silico</i> DE LOS GENES <i>phbF</i> Y <i>phbP1</i> .....	38
7.2 ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LA CEPA MUTANTE UW136 <i>phbF</i> Y LA CEPA SILVESTRE UW136.....	39
7.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>phbZ1</i> , <i>phbP1</i> Y <i>phbP2</i> EN LA MUTANTE UW136 <i>phbF</i> .....	42
7.4 ENSAYOS DE INTERACCIÓN TIPO EMSA CON LA PROTEÍNA PhbF Y LA REGIÓN REGULADORA DE LOS GENES <i>phbZ1</i> , <i>phbP1</i> , <i>phbP2</i> y <i>phbF</i> .....	45

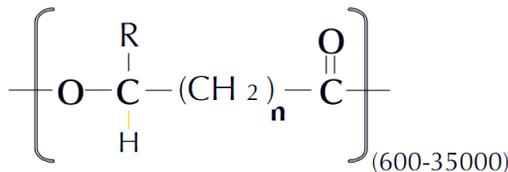
7.5 ANÁLISIS <i>in silico</i> DE LOS GENES <i>Avin_33500</i> Y <i>Avin_33510</i> .....	48
7.6 ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LA CEPA MUTANTE OP33510 Y LA SILVESTRE OP.....	52
7.7 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>Avin_33500</i> EN LA MUTANTE OP33510.....	53
<b>8. CONCLUSIONES.....</b>	<b>56</b>
<b>9. PERSPECTIVAS.....</b>	<b>57</b>
<b>10. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>58</b>

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 GENERALIDADES DE LOS POLIHIDROXIALCANOATOS (PHAs)

Los polihidroxicanoatos o ácidos polihidroxicanoicos (PHAs) son poliésteres producidos por diversas bacterias y arqueas que son sintetizados en condiciones de exceso de fuente de carbono con limitación de otro nutriente como nitrógeno, fósforo, oxígeno o después de cambios de pH. Estos polímeros se utilizan por los microorganismos como reserva de carbono, energía y poder reductor y son almacenados en forma de gránulos intracelulares (Kung *et al.*, 2007; Urtuvia *et al.*, 2014; Anjum *et al.*, 2016).

Los PHAs están formados por monómeros de ácidos hidroxicanoicos (HA) de longitud entre 3 y 20 átomos de carbono y se clasifican de acuerdo a su tamaño en: PHAs de cadena corta, cuyos monómeros contienen de 3 a 5 átomos de carbono, y PHAs de cadena media, con monómeros de longitud de 6 a 14 carbonos o más (López *et al.*, 2015). La longitud del monómero incorporado determina el tamaño de la cadena lateral (Figura 1).



$n = 1$	R = hidrógeno	poli-(3-hidroxiopropionato)
	R = metilo	poli-(3-hidroxiobutirato)
	R = etilo	poli-(3-hidroxi valerato)
	R = propilo	poli-(3-hidroxi hexanoato)
	R = pentilo	poli-(3-hidroxi octanoato)
	R = nonilo	poli-(3-hidroxi dodecanoato)
$n = 2$	R = hidrógeno	poli-(4-hidroxi butirato)

**Figura 1.** Estructura general de un PHA (Lee, 1996; Khanna & Srivastava, 2005).

Algunos PHAs están formados por monómeros iguales (homopolímeros), pero también existen polímeros formados por dos ácidos hidroxicanoicos distintos, a los que se les llama copolímeros; estos pueden ser una mezcla de monómeros de cadena corta y/o de cadena media como, por ejemplo, el poli(hidroxi butirato-co-hidroxi valerato) (P(HB-co-HV)), poli(hidroxi hexanoato-co-hidroxi octanoato) (P(HHx-co-HO)) o poli(hidroxi butirato-co-hidroxi hexanoato) (P(HB-co-HHx)) (Możejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016).

Las propiedades y características de los diferentes PHAs como materiales plásticos pueden variar dependiendo de la longitud de los monómeros que los conforman y la proporción de éstos en el polímero. Los PHAs de cadena corta se caracterizan por producir plásticos más cristalinos, rígidos y frágiles; mientras que los PHAs de cadena

media dan materiales menos cristalinos, más flexibles y elásticos. Además, la incorporación de un HA secundario en un PHA (copolímeros) mejora sus propiedades en comparación con los PHAs de un mismo tipo de monómero; y, a su vez, los polímeros formados por más de un HA secundario (terpolímeros) son mejores que los copolímeros (Anjum *et al.*, 2016).

Debido a la diversidad en su composición y propiedades que poseen los polímeros y copolímeros de PHA, éstos pueden tener mucha similitud con los distintos plásticos derivados del petróleo y por esta razón se han empezado a utilizar para fabricar bioplásticos que sustituyan a los plásticos convencionales.

### 1.1.2 Aplicaciones como bioplásticos

Polímero	Punto de fusión (°C)	Módulo de Young (GPa)	Fuerza tensil (MPa)	Elongación de rotura (%)	Temperatura de transición vítrea (°C)
P(3HB)	179	3.5	40	5	4
P(3HB-co-3HV)					
3mol% 3HV	170	2.9	38	-	-
9mol% 3HV	162	1.9	37	-	-
14mol% 3HV	150	1.5	35	-	-
20mol% 3HV	145	1.2	32	-	-
25mol% 3HV	137	0.7	30	-	-
P(3HB-co-4HB)					
3mol% 4HB	166	-	28	45	-
10mol% 4HB	159	-	24	242	-
16mol% 4HB	-	-	26	444	-
64mol% 4HB	50	30	17	591	-
90mol% 4HB	50	100	65	1080	-
P(3HB-co-6%3HD)	130	-	17	680	-8
P(4HB)	53	149	104	1000	-
Homopolímeros mcl-PHA	80	-	20	300	-40
P(3HHx-co-3HO)	61	-	10	300	-
P(3HB-co-6mol% 3HA)	133	0.2	17	680	-8
P(3HB-co-67mol% HP)	44	-	-	-	-19
P(3HB-co-3HHx)	52	-	20	850	-4
Polipropileno	170	1.7	34.5	400	45
Polipropileno-terepalato	262	2.2	56	7300	3400
Poliestireno	110	3.1	50	-	21
LDPE	130	0.2	10	620	-30

**Tabla 1.** Comparación de las propiedades de diferentes polímeros utilizados para fabricar plásticos (Khanna & Srivastava, 2005; Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016).

Como se dijo anteriormente, las propiedades de los PHAs dependen del número de carbonos de los monómeros HA incorporados, lo que determina la longitud de la cadena lateral de los monómeros en el poliéster y esto hace que sus propiedades sean más o parecidas a los plásticos derivados del petróleo (Khanna & Srivastava, 2005; Mozejko-Ciesielska & Kiewisz, 2016). Por ejemplo, el copolímero P(3HB-co-3HV) tiene un punto de fusión similar al polipropileno, así como similares módulo de Young y fuerza

tensil, que tienen que ver con la elasticidad del polímero (Tabla 1); sin embargo, el P(3HB-co-3HV) tiene la ventaja de que es 100% biodegradable y compostable, y proviene de una fuente renovable.

Otras de las características que pueden afectar de forma importante las propiedades de los PHAs es su peso molecular. Se ha observado que entre mayor sea el peso molecular de algunos biopolímeros, aumenta también su fuerza y elasticidad, y puede mejorar además otras características como flexibilidad, fuerza tensil y elongación de rotura y algunos de los factores, propios de la bacteria, que modifican el peso molecular de un polímero son la ruta de biosíntesis así como la actividad de depolimerización (Adaya *et al.*, 2018).

Entre todos los PHAs, el polihidroxibutirato o PHB es el biopolímero más abundante y, por tanto, mejor estudiado. Como se ve en la tabla 1, las propiedades del PHB también son bastante similares a las del polipropileno; sin embargo, siguen siendo mejores las propiedades de los copolímeros.

A pesar de que las propiedades físicas de los biopolímeros son similares a las de los plásticos convencionales, se ha analizado el impacto ambiental de todo el ciclo de vida del PHB y, contrastándolo con el de algunas poliolefinas (termoplásticos) como polietileno y polipropileno, se encontró que los requerimientos energéticos para producir PHB, así como las emisiones de CO<sub>2</sub> son menores en comparación con las poliolefinas en general (Tabla 2); solo en el caso de la eutrofización y la acidificación, el polietileno obtuvo niveles más bajos que el PHB (Harding *et al.*, 2007).

Polímero		Emisiones de CO <sub>2</sub>	Requerimientos energéticos
		kg-CO <sub>2</sub> /kg-polímero	MJ/kg-polímero
PHA/PHB	PHA	0.26-2.4	50-59
	PHB	2.6	44.7-113.7
Poliolefinas	Polipropileno	3.4	85.9
	Polietileno de alta densidad	2.5	73.7
	Polietileno de baja densidad	3.0	81.8

**Tabla 2.** Requerimientos energéticos y emisiones totales de dióxido de carbono en la producción de polímeros, de principio a fin (Harding *et al.*, 2007).

Sin embargo, pese a las ventajas ambientales que presentan los PHAs como alternativa a los plásticos convencionales derivados del petróleo, el costo de producción de los biopolímeros sigue siendo muy elevado para su uso comercial en algunas aplicaciones, hasta 10 veces más que el polietileno o polipropileno, por lo que su uso se está encaminando hacia otras áreas más especializadas como medicina y farmacología (Chen, 2009).

### 1.1.3 Aplicaciones especiales

Además de su aplicación como bioplásticos comerciales biodegradables, los PHAs pueden ser utilizados en la fabricación de distintos tipos de bioplásticos aplicados en áreas de especialidad (Tabla 3), gracias a las características que poseen. Una de estas características más importantes, es que los PHAs son biocompatibles, es decir, que no causan rechazo como respuesta biológica en el cuerpo. Esto podría deberse a que, normalmente, en sangre humana se encuentran concentraciones pequeñas de los monómeros que forman algunos PHAs (Williams & Martin, 2001).

Algunas de las áreas más prometedoras en las que se aprovecha la biocompatibilidad de los PHAs con el cuerpo humano son en ingeniería de tejidos, como sistemas de suministro de medicamentos, usos terapéuticos y nutricionales (Chen, 2009; López *et al.*, 2015).

Aplicaciones	Ejemplos
Industria de empaquetamiento	Todos los materiales de empaque que son usados por un periodo corto de tiempo, incluyendo utensilios de comida, películas, consumibles diarios, accesorios electrónicos
Impresión e industria fotográfica	Los PHAs son poliésteres que pueden ser fácilmente teñidos
Otros químicos a granel	Adhesivos sensibles al calor, latex, geles inteligentes. Las matrices no tejidas de PHA se pueden usar para eliminar el aceite facial
Copolimerización en bloque	Los PHAs pueden ser convertidos en dioles de PHA para polimerizar en bloques con otros polímeros
Procesamiento de plástico	Los PHAs pueden ser usados como adyuvantes en el procesamiento de plástico
Industria textil	Como el nylon, los PHAs pueden ser procesados en fibras
Industria de químicos finos	Los monómeros de PHA son todos quirales con forma R, y pueden ser usados como materiales quirales iniciales para la síntesis de antibióticos y otros químicos finos
Biomateriales para implantes médicos	Los PHAs son biodegradables y biocompatibles, y pueden ser utilizados como material para implantes médicos. También pueden convertirse en matrices para liberación controlada de medicamentos
Médicas	Los monómeros de PHA, especialmente R3HB, tienen efectos terapéuticos sobre las enfermedades de Alzheimer y Parkinson, osteoporosis e incluso mejoramiento de la memoria
Aditivos alimentarios saludables	Los oligómeros de PHAs pueden ser usados como suplementos para la obtención de cuerpos cetónicos
Microbiología industrial	El operón biosintético de PHAs puede ser usado como regulador metabólico o potenciador de resistencia para mejorar el desempeño de cepas microbiológicas industriales
Biocombustibles o aditivos de combustible	Los PHAs pueden ser hidrolizados a la forma hidroxialcanoato-metil-éster que es combustible
Purificación de proteínas	Las proteínas phasinas de unión a gránulos de PHA o PhaP son usadas para purificar proteínas recombinantes
Suministro específico de medicamentos	La coexpresión de PhaP y ligandos específicos puede ayudar a lograr focalización específica de tejidos enfermos

**Tabla 3.** Aplicaciones de los PHAs en diferentes campos (Chen, 2009; López *et al.*, 2015).

En la ingeniería de tejidos, se ha visto que los PHAs presentan una serie de ventajas como sustitutos para implantes cardíacos y óseos, así como material de

andamiaje para crecimiento y regeneración celular de huesos, cartílagos y ligamentos, tanto *in vitro* como *in vivo* en cerdos, ovejas, conejos, ratas, y diversas líneas celulares. Entre las ventajas más importantes se encuentran la cantidad considerablemente menor de coágulos y respuesta inflamatoria que producen los implantes cardíacos y óseos que contienen PHAs, así como unas propiedades físicas muy similares a los tejidos originales, comparándolos con los implantes convencionales. Un ejemplo del uso de PHAs como material para implantes, es el implante del esófago artificial en un perro y, otro ejemplo muy reciente así como muy prometedor, es la regeneración de tejido neuronal utilizando microfibras de PHAs como andamiaje para las neuronas (Williams & Martin, 2001; Wu *et al.*, 2009; Lizarraga-Valderrama *et al.*, 2019). El uso de los PHAs como material para implantes y como andamiaje para crecimiento celular tiene numerosas aplicaciones potenciales y, a pesar de que todavía está en desarrollo, parece ser una opción muy viable que sustituirá gradualmente a los materiales convencionales.

También se han estudiado las propiedades de los PHAs para utilizarlos como materiales con los que se fabrican dispositivos para suministro de medicamentos por vía intradérmica, ya que tienen una vida media larga, un punto más bajo de fusión y menor grado de cristalinidad que los materiales convencionales, como el polietilenglicol (PEG). Además, los PHAs presentan mayor adhesión y permeabilidad para los medicamentos en comparación con los dispositivos intradérmicos hechos con materiales convencionales (Wu *et al.*, 2009).

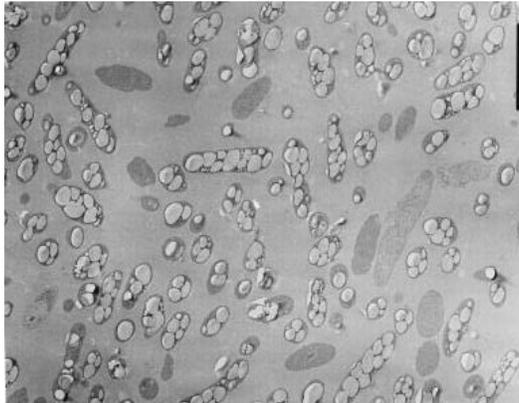
Por último, otra aplicación importante ha sido el uso de los PHAs en terapia nutricional. Diversos autores han evaluado al PHB y al P(3HB-co-3HV) como fuente de nutrición animal en ratas, pollos, ovejas, cerdos y vacas resultando en que los polímeros tratados con hidróxido de sodio son más digeribles y que la energía proporcionada es similar a la que se obtiene de los carbohidratos. También, se ha reportado que oligómeros de *R*-3-hidroxi-butarato (denominados oligólidos) pueden ser utilizados en tratamientos de enfermedades metabólicas, reducción del catabolismo de proteínas, supresión del apetito, control del daño a células cerebrales en enfermedades como Alzheimer, y en desórdenes neurodegenerativos y epilepsia (Williams & Martin, 2001).

## 1.2 BACTERIAS PRODUCTORAS DE PHAs

Como ya se comentó, los microorganismos productores de PHAs pueden ser bacterias o arqueas; sin embargo, los que se utilizan en la industria, por ser más económicos y de más fácil manipulación, son las bacterias.

Algunas bacterias utilizadas para la obtención de PHB son *Ralstonia eutropha*, *Azotobacter* sp., *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Burkholderia* sp., *Halomonas* sp., *Aeromonas* sp., *Methylobacterium* sp., *Thermus thermophilus*, *Hydrogenophaga pseudoflava*, *Saccharophagus degradans*, *Comamonas* sp., *Azohydromonas lata*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Zobellella denitrificans* y *Escherichia coli* recombinante. Estas

bacterias, acumulan el polímero en forma de gránulos intracelulares (Kim *et al.*, 1994; Chen & Page, 1994; Kusaka *et al.*, 1999; Tian *et al.*, 2005) (Figura 2).



**Figura 2.** Gránulos de PHB en *R. eutropha* (Tian *et al.*, 2005).

De todas las anteriores, la bacteria más utilizada en la industria y, por lo tanto, la más estudiada es la bacteria gram negativa *Ralstonia eutropha*. Esto se debe a que tiene la capacidad de acumular PHB en grandes cantidades (hasta 80% de su peso seco) cuando es crecida en medios de cultivo con fuentes de carbono simples como glucosa y fructosa, lo que hace su cultivo relativamente económico (Kim *et al.*, 1994).

Otra bacteria de gran interés, con gran producción de PHB, que además tiene un alto peso molecular, es *Azotobacter vinelandii* (Chen & Page, 1994), bacteria modelo de estudio en este trabajo, por lo que sus características se describen más adelante.

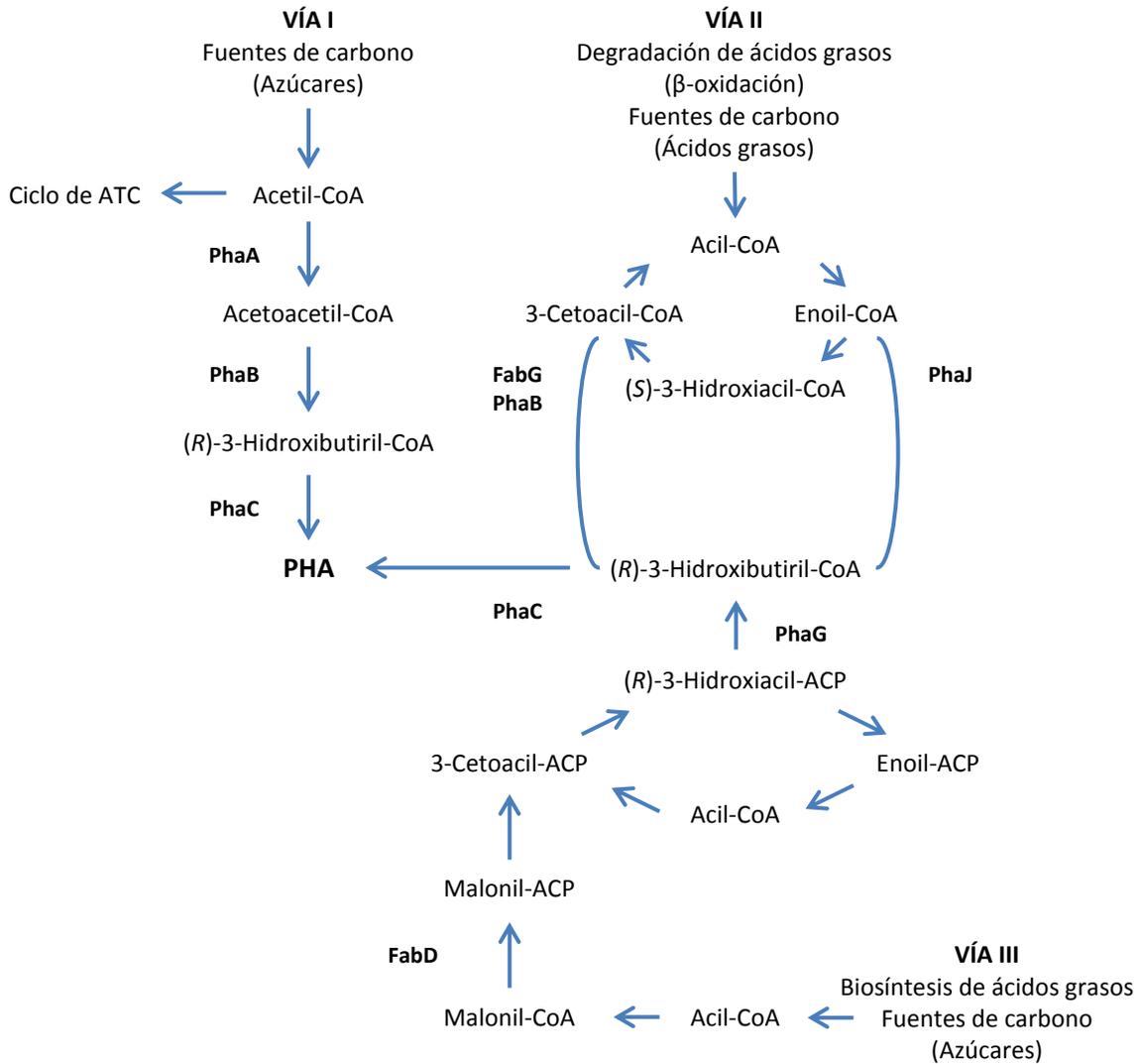
Por último, otro modelo de gran interés ha sido *E. coli* recombinante. Puesto que ya se han identificado los genes responsables de la síntesis de PHAs en muchas bacterias, desde hace tiempo se ha utilizado a la bacteria *E. coli* para alojar dichos genes y así producir diversos PHAs con el fin de estudiar diferentes modelos de producción (Kusaka *et al.*, 1999). De forma interesante, se ha visto que *E. coli* tiene una alta tasa de producción de PHAs, con las ventajas de que su tiempo de generación es más corto que el de otras bacterias y puede crecer en sustratos más económicos (Lee, 1996).

### 1.2.1 Biosíntesis de PHAs

En las bacterias productoras de PHAs, la síntesis del polímero se puede llevar a cabo a través de tres vías principales (Figura 3), sin embargo, el tipo de polímero resultante y la cantidad de PHA acumulado depende de factores como la vía de síntesis presente, el tipo de PHA sintasa que tenga la bacteria, la fuente de carbono que se utilice (Kessler & Witholt, 2001; Anjum *et al.*, 2016).

La vía I de síntesis es la más sencilla y la más conocida, y es utilizada por bacterias como *R. eutropha* y *A. vinelandii*. Ésta se lleva a cabo a través de tres pasos enzimáticos que inician con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA por la

enzima  $\beta$ -cetotiolasa (PhaA), lo que da lugar a una molécula de acetoacetyl-CoA, el cual es el sustrato para el segundo paso enzimático: su reducción a 3-hidroxibutiril-CoA por la enzima acetoacetyl-CoA reductasa dependiente de NADPH (PhaB); finalmente, el tercer paso es la polimerización de los monómeros de 3-hidroxibutiril-CoA por la enzima PHA sintasa (PhaC). Finalmente, se libera una molécula de CoA por cada monómero añadido y da como resultado el PHA (Anjum *et al.*, 2016).



**Figura 3.** Vías de biosíntesis de PHAs (Anjum *et al.*, 2016).

Las otras dos vías de síntesis de PHAs involucran el metabolismo de ácidos grasos. Generalmente, dan como resultado copolímeros dependiendo de la fuente de carbono que se administre. En estas vías participan enzimas como la enoil-CoA hidratasa (PhaJ), 3-oxoacil-ACP reductasa (FabG), (R)-3-hidroxidecanoil-ACP CoA transacilasa (PhaG) y ACP S-maloniltransferasa (FabD).

La vía II es utilizada por bacterias como *P. aeruginosa* y *A. caviae*, y genera los monómeros precursores de los PHAs a partir de intermediarios de la ruta de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos. Requiere fuentes de carbono que sean catabolizadas mediante esta ruta e inicia a partir del acil-CoA que se genera de la asimilación de la fuente de carbono. El acilo activado después se convierte en enoil-CoA y dependiendo del microorganismo, puede ser transformado en (S)-3-hidroxiacil-CoA o (R)-3-hidroxibutiril-CoA, ambos pueden convertirse en 3-cetoacetil-CoA para después regresar a tiolizarse a acetil-CoA y acil-CoA o el (R)-3-hidroxibutiril-CoA puede ser polimerizado en PHA. La vía III utiliza intermediarios de la ruta de síntesis de *novoo* de ácidos grasos para generar los monómeros precursores del PHA, y es de gran interés porque permite utilizar fuentes de carbono más económicas y sencillas que la vía II, como los carbohidratos.

### 1.2.2 Movilización de PHAs

Los microorganismos que producen PHAs, lo hacen bajo ciertas condiciones de abundancia de fuente de carbono, para consumirlo en otras (limitación); sin embargo, hay algunos organismos que son capaces de degradar PHAs sin la necesidad de ser productores, y a este proceso se le conoce como degradación extracelular. El término “movilización” hace referencia al proceso de degradación del polímero que ocurre dentro de la célula productora, es decir, es el proceso de degradar y utilizar el PHA que la célula acumuló previamente.

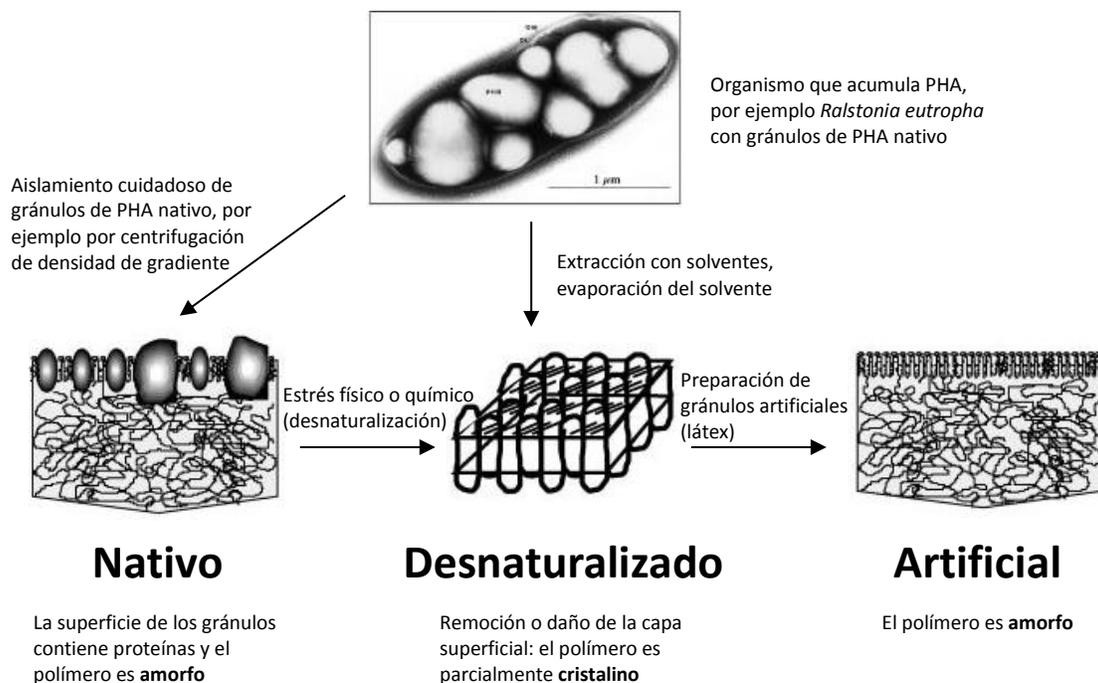


Figura 4. Estado físico del PHA (Jendrossek & Handrick, 2002).

La movilización y la degradación extracelular, además de ser procesos que ocurren en diferente espacio celular, son procesos que actúan sobre PHAs con distinto estado físico. El PHA intracelular, está contenido en gránulos y se encuentra en estado amorfo, con mayor libertad de movimiento; cuando hay lisis celular, los gránulos de PHA se liberan al medio extracelular y el polímero adopta una conformación helicoidal ordenada cristalina, es por eso que al polímero intracelular se le conoce como PHA amorfo y al extracelular se le conoce como PHA cristalino (Jendrossek & Handrick, 2002) (Figura 4).

Las enzimas que participan en el proceso de movilización, es decir, las encargadas de llevar a cabo la hidrólisis de PHA amorfo, se conocen como PHA depolimerasas intracelulares y son distintas a las PHA depolimerasas que degradan el PHA extracelular, ya que éstas últimas solo actúan sobre PHA cristalino. De hecho, hay muy pocas excepciones a este fenómeno, hasta ahora solo se ha reportado una depolimerasa extracelular, PhaZ7 en *Paucimonas lemoignei*, que es capaz de utilizar como sustrato PHB amorfo, pero que no participa en el proceso intracelular de movilización; otra es una depolimerasa intracelular de *Bacillus megaterium* que actúa sobre los dos tipos de PHA (Handrick *et al.*, 2001; Jendrossek & Handrick, 2002; Chen *et al.*, 2009).

Familia	Organismo
nPHA (granulos de PHA nativos) S <sub>CL</sub> depolimerasas intracelulares (sin caja lipasa)	<i>Ralstonia eutropha</i> H16 <i>Bacillus thuringiensis</i> serovar israelensis ATCC 35646
nPHAS <sub>CL</sub> depolimerasas intracelulares (con caja lipasa)	<i>Pseudomonas oleovorans</i>
nPHAM <sub>CL</sub> depolimerasas intracelulares	<i>Pseudomonas putida</i> <i>Rhodospirillum rubrum</i>
PHA depolimerasas periplásmicas	<i>Ralstonia picketti</i>
dPHA'S <sub>CL</sub> depolimerasas extracelulares (dominio catalítico tipo 1)	<i>Alcaligenes faecalis</i> <i>Bacillus megaterium</i> <i>Paucimonas lemoignei</i> <i>Pseudomonas stutzeri</i>
dPHA'S <sub>CL</sub> depolimerasas extracelulares (dominio catalítico tipo 2)	<i>Acidovorax</i> sp. TP4 <i>Caldimonas manganoxidans</i> <i>Comamonas</i> sp. <i>Delftia acidovorans</i> <i>Schlegelella</i> sp. KB1a <i>Streptomyces exfoliatus</i> <i>Penicillium funiculosum</i>
nPHA'S <sub>CL</sub> depolimerasas extracelulares	<i>Paucimonas lemoignei</i>
dPHAM <sub>CL</sub> depolimerasas extracelulares	<i>Pseudomonas alcaligenes</i> <i>Pseudomonas fluorescens</i>

**Tabla 4.** Clasificación de las PHA depolimerasas y organismos en los que se encuentran (Modificado de Knoll *et al.*, 2009).

Con algunas excepciones, las PHA depolimerasas poseen en su estructura la secuencia GxSxG como sitio catalítico, conocido como caja lipasa, misma que se encuentra en diversas éster hidrolasas y también poseen una histidina no catalítica conservada cerca del agujero de oxianión. Las PHA depolimerasas extracelulares tienen una estructura general común: un péptido-señal, un dominio catalítico, un dominio de enlace y un dominio de unión al sustrato, el dominio catalítico puede ser de tipo 1 si el agujero de oxianión está más cerca del N-terminal y del tipo 2 si el agujero de oxianión está más cerca del C-terminal. Además, las PHA depolimerasas también se pueden dividir dependiendo de la longitud del PHA que utilizan como sustrato, pueden ser PHAs de cadena corta (SCL) o de cadena media (MCL). Las características anteriores dividen a las PHA depolimerasas en 8 familias (Tabla 4) que se encuentran reunidas en la base de datos de ingeniería de depolimerasas o DED (Knoll *et al.*, 2009).

### 1.2.3 Proteínas asociadas a los gránulos de PHA

Simultáneo al proceso de biosíntesis de PHAs, existe otro proceso que se lleva a cabo dentro de la célula, y es la formación de los gránulos que contienen el polímero que se está acumulando. En la superficie de estos gránulos hay proteínas con afinidad a los PHAs que cubren y dan estructura a los gránulos dentro de la célula. Estas proteínas pueden tener diversas funciones y algunas de ellas participan en los procesos de biosíntesis y/o de movilización. Existen 4 tipos de proteínas que pueden encontrarse asociadas a gránulos de PHAs: sintasas de PHA, PHA depolimerasas, phasinas y reguladores (Pötter & Steinbüchel, 2005).

**Sintasas de PHA.** Son las enzimas encargadas de polimerizar los PHAs y se dividen en cuatro clases, dependiendo del sustrato sobre el que actúan y la homología de secuencia. La clase I sintetiza PHAs de longitud de cadena corta. La clase II utiliza hidroxialcanoatos de longitud de cadena media y, generalmente, se encuentran dentro del género *Pseudomonadaceae*. La clase III es similar a la clase I pero esta enzima está formada por dos subunidades diferentes en lugar de una. Y por último, la clase IV que está presente en el género *Bacillus*, es similar a las sintasas de clase III en cuanto a composición, pues ambas tienen dos subunidades, pero requiere de un activador para realizar su actividad (Pötter & Steinbüchel, 2005).

**Phasinas.** Son las proteínas más abundantes en los gránulos de PHA cuya función primordial es conferirles estabilidad y separar el gránulo del citoplasma, ya que presentan un dominio hidrofóbico de gran afinidad al polímero. Sin embargo, se sabe que algunas de estas phasinas poseen la capacidad de aumentar la actividad catalítica de las sintasas o de las depolimerasas de PHA. También pueden participar en la segregación de los gránulos durante la división celular y además, se ha visto que la cantidad de phasinas expresadas también se relaciona con la cantidad de gránulos de PHA que se forman en la célula (Sudesh *et al.*, 2000; Pötter & Steinbüchel, 2005).

Las phasinas también intervienen en el proceso de síntesis de PHA, en un sistema heterólogo en *Escherichia coli* que contiene las enzimas biosintéticas para PHB de *R. eutropha* dispuestas en un operón *phaCAB*, se ha observado que al sobreexpresar la phasina PhaP1 se presenta una disminución en la producción de PHB al iniciar el proceso de biosíntesis (York *et al.*, 2002).

**PHA depolimerasas.** Son enzimas que se encargan de catalizar la hidrólisis de PHAs en monómeros u oligómeros para su catabolismo, sin embargo, se hace distinción entre las PHA depolimerasas que se encargan de movilizar el PHA de gránulos nativos (nPHA depolimerasas) en los organismos que son productores de estos polímeros que son intracelulares, y las PHA depolimerasas que hidrolizan PHA cristalino (dPHA depolimerasas) que son extracelulares y son producidas por organismos que no necesariamente son productores de PHA pero que pueden utilizar estos poliésteres como fuente de carbono. Solo las PHA depolimerasas intracelulares son las que pueden encontrarse asociadas a los gránulos de PHA aunque también existen PHA depolimerasas periplásmicas que, como su nombre lo indica, se encuentran localizadas en el periplasma y son de función desconocida (Pötter & Steinbüchel, 2005; Knoll *et al.*, 2009).

**Reguladores.** Hasta ahora, la proteína más conocida como regulador asociado a gránulos, es la proteína PhaR (también conocida como PhaF, PhbF o AniA), que está presente en muchas bacterias productoras de PHAs de cadena corta y actúa como un represor. PhaR es capaz de unirse a su propio promotor y al promotor de la phasina PhaP, sin embargo, se ha reportado que en la cepa SmR1 de *Herbaspirillum seropedicae*, PhaR puede unirse a 11 genes incluidos los genes biosintéticos (Velázquez *et al.*, 2020). *R. eutropha* es la bacteria modelo en la que se ha estudiado este regulador y, en ese organismo, PhaR se une al promotor de la phasina PhaP1 así como a su propio promotor para reprimir la transcripción de ambos genes. Esta represión evita que PhaP1 interfiera en el proceso hasta una fase más tardía o al evitar que los metabolitos se desvíen hacia la sobreexpresión de esta phasina, el mecanismo de regulación PhaR/PhaP1 se describe con detalle más adelante (York *et al.*, 2002).

En especies de *Pseudomonas* productoras de PHAs de cadena media existe otro regulador denominado PhaF, pero no relacionado con PhaR (PhaF), y también asociado a gránulos de PHA, que regula a una phasina, Phal, y a la sintasa PhaC1. A pesar de que el modelo de regulación es similar al de PhaR-PhaP de muchas bacterias, ni PhaF ni Phal de *Pseudomonas* son similares a esas dos proteínas. Además, se ha observado que PhaF también participa en el proceso de segregación de gránulos de PHA durante la división celular (Velázquez *et al.*, 2020).

#### 1.2.4 Factores que influyen en las propiedades de los PHAs

Entre los factores que pueden influir en las propiedades físicas de los PHAs son su composición monomérica y el peso molecular (tamaño del polímero o número de monómeros). A su vez, la composición y el peso molecular del polímero se pueden ver afectadas por la vía de síntesis y el tipo de PHA sintasa presentes en el microorganismo; sin embargo, la actividad de las PHA depolimerasas sobre el PHA almacenado en los gránulos, también es de vital importancia para la modificación directa de los PHAs, pues puede afectar su peso molecular (Aoyagi *et al.*, 2003).

En *R. eutropha*, se ha observado que las PHB depolimerasas PhaZ3 y PhaZ5 no tienen un papel fundamental en el proceso de movilización, pero están involucradas en la determinación de la estructura del gránulo y en el porcentaje de cristalinidad del PHB acumulado. Se propone que PhaZ3 y PhaZ5 modifican la longitud de las cadenas del PHB y esto tiene repercusión en las propiedades físicas del polímero (Brigham *et al.*, 2012).

Recientemente, en *A. vinelandii*, se reportó que la PHB depolimerasa PhbZ1 está involucrada en la hidrólisis del PHB en oligómeros más pequeños, lo que modifica el peso molecular del PHB acumulado, cambiando sus propiedades físicas. La inactivación de PhbZ1 permite obtener polímeros de alto peso molecular y con distribución de tamaños uniforme (Adaya *et al.*, 2018).

## 2. ANTECEDENTES

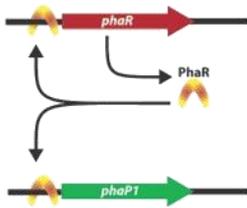
### 2.1 REGULACIÓN DE MOVILIZACIÓN Y PROTEÍNAS ASOCIADAS AL GRÁNULO DE PHA

Como se ha descrito, las PHA depolimerasas son uno de los factores más importantes que actúan directamente sobre los PHAs. Estas enzimas son capaces de modificar las propiedades físicas y la cantidad de PHA acumulado, por lo que conocer y controlar su actividad podría ser de gran ayuda para obtener una mayor producción de este polímero con propiedades físicas deseadas.

Hasta ahora no se conoce mucho sobre los mecanismos de regulación a los que están sometidas las PHA depolimerasas y que modulan su actividad (en especial las intracelulares que participan en la movilización); sin embargo, se sabe que varias de ellas se encuentran asociadas a los gránulos de PHA de la misma forma que las enzimas biosintéticas y los reguladores PhaR y PhaF, que controlan la expresión de genes involucrados en el proceso de síntesis de PHAs y/o de formación del gránulo.

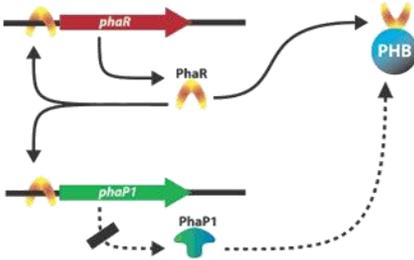
Como *R. eutropha* es el organismo modelo de estudio de producción de PHB, el proceso de formación de gránulo ya se encuentra caracterizado. Inicia con la célula en un estado de no producción de PHB (Figura 5. Situación A), en este estado, el regulador PhaR se encuentra unido a su propio promotor y al promotor del gen *phaP1* reprimiendo su transcripción. Cuando la célula inicia la síntesis de PHB (Figura 5. Situación B), se forman pequeñas agrupaciones de PHB cerca de la sintasa PhaC y se empiezan a recubrir de PhaR, proteína con afinidad por el polímero, titulando a este regulador. Después de un tiempo de que la célula esté produciendo PHB, empiezan a crecer los gránulos y una cantidad de PhaR cada vez mayor se une a su superficie (Figura 5. Situación C), esto provoca que la represión sobre los promotores *phaP1* y *phaR* disminuya y estos genes inicien su transcripción. Así, la phasina PhaP1 se produce en mayor cantidad y el gránulo de PHB empieza a recubrirse con esta phasina. Cuando los gránulos de PHB alcanzan su tamaño máximo (Figura 5. Situación D), la phasina PhaP1 se sigue sintetizando hasta recubrir toda la superficie posible del gránulo; la phasina llega a ser tan abundante que empieza a desplazar al regulador PhaR de la superficie del gránulo (Figura 5. Situación E) y la concentración de éste en el citoplasma aumenta, lo que provoca que el regulador se una nuevamente al promotor de *phaP1* y de *phaR*, reprimiendo su expresión. Este sistema de regulación permite que la phasina PhaP1 se exprese solamente cuando es necesario recubrir al gránulo de PHB y no en otro momento (Pötter & Steinbüchel, 2005).

El regulador PhaR (también llamado AniA, PhbF y PhaF) se encuentra conservado en muchas bacterias como *Paracoccus denitrificans*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Bradyrhizobium diazoefficiens* y *Sinorhizobium meliloti* y parece ser que en algunas está involucrado en el proceso de biosíntesis del PHA. Particularmente, en bacterias como



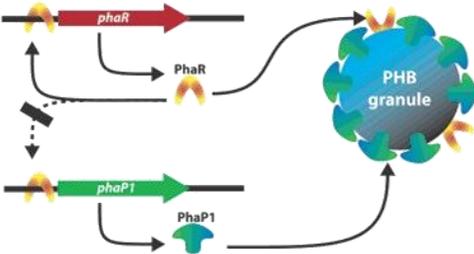
**Situación A**

Las células crecen bajo condiciones no permisivas para la síntesis de PHA



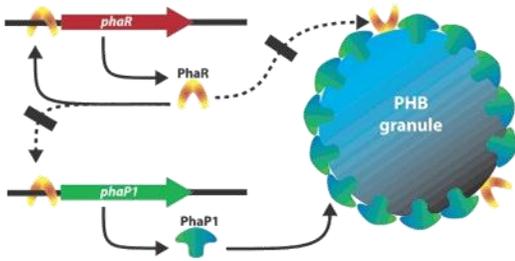
**Situación B**

Las células son cultivadas bajo condiciones permisivas para la síntesis de PHA (fase temprana de acumulación de PHA)



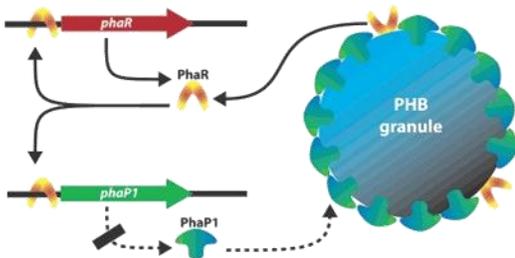
**Situación C**

Las células son cultivadas bajo condiciones permisivas para la síntesis de PHA (fase media de acumulación de PHA)



**Situación D**

Las células son cultivadas bajo condiciones permisivas para la síntesis de PHA (fase tardía de acumulación de PHA)



**Situación E**

Las células detienen la síntesis de PHA

**Figura 5.** Secuencia de eventos durante la formación del gránulo de PHA (Tomado de Pötter & Steinbüchel, 2005).

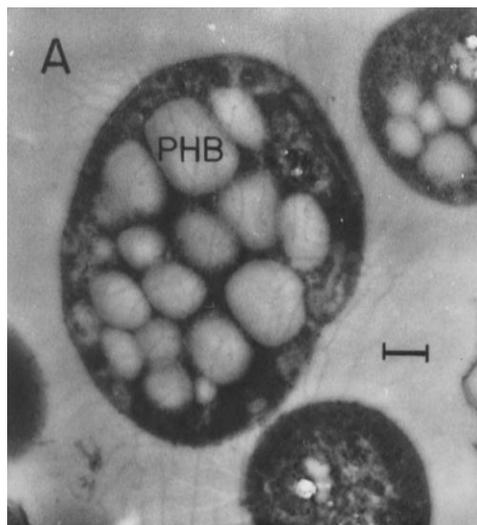
*Rhizobium etli* y *Herbaspirillum seropedicae*, se ha visto que la cantidad de PHB se ve reducida en una mutante en *phaR* (Velázquez *et al.*, 2020)

Debido a que algunas PHA depolimerasas están asociadas a gránulos de PHA, podría ser que el regulador PhaR esté involucrado en la regulación de estas enzimas. Se conoce que en algunas bacterias productoras de PHA como *P. lemoignei*, PhaR también puede regular negativamente la expresión de la PHA depolimerasa PhaZ2 al unirse al promotor de su gen e impedir su transcripción (Jendrosseck & Handrick, 2002), así como PhaR controla la phasina PhaP1 en *R. eutropha*.

*A. vinelandii* es una bacteria que posee homólogos al sistema PhaR/PhaP y es una de las bacterias modelo en la producción de PHB, por lo que la hipótesis de que PhaR (PhbF en *A. vinelandii*) pudiera estar involucrada en la regulación de las PHB depolimerasas, se retomará más tarde en este trabajo.

## 2.2 GENERALIDADES DE *Azotobacter vinelandii*

*A. vinelandii* es una bacteria gram negativa que pertenece a las  $\gamma$ -Proteobacterias y a la familia *Pseudomonadaceae* que habita en suelo y agua. Es una bacteria poliploide, es decir, que presenta varias copias de su propio cromosoma dependiendo del medio en el que sea crecida y la fase de crecimiento en la que se encuentre. Se ha reportado que *A. vinelandii* puede presentar desde 4 hasta más de 100 copias de su cromosoma (Punita *et al.*, 1989; Maldonado *et al.*, 1994). *A. vinelandii* también tiene la capacidad, bajo condiciones adversas, de diferenciarse morfológicamente en quistes (Figura 6) que pueden resistir a la desecación por más de 10 años (Sadoff, 1975; Vela, 1974). Además, una característica muy peculiar de *A. vinelandii* es que puede fijar nitrógeno en presencia de oxígeno por lo que posee una tasa respiratoria muy alta a comparación de otras bacterias (Poole & Hill, 1997).



**Figura 6.** *A. vinelandii* con gránulos de PHB. La barra equivale a 0.4  $\mu\text{m}$  (Castañeda *et al.*, 2000).

*A. vinelandii* posee un metabolismo secundario bastante versátil, esta bacteria tiene la capacidad de producir: polihidroxitirato (PHB) y alginatos, que son polímeros de interés industrial y que se utilizan para producir plásticos biodegradables y agentes viscosantes y gelificantes en la industria farmacéutica y alimentaria, respectivamente (Cho *et al.*, 2001; Sabra *et al.*, 2001).

### 2.3 BIOSÍNTESIS DE PHAs EN *Azotobacter vinelandii*

Como se mencionó anteriormente, *A. vinelandii* es una bacteria capaz de producir PHAs. Principalmente, sintetiza el homopolímero polihidroxitirato o PHB, aunque también puede producir el copolímero poli(hidroxitirato-co-hidroxitirato) o P(HB-co-HV) (Page *et al.*, 1992). Es capaz de crecer en una amplia variedad de sustratos y almacenar una gran cantidad de PHB (de 80 a 85% de su peso seco) de un alto peso molecular; sin embargo, esto puede ser influenciado por la composición del medio en el que se cultive, dándole al polímero características particulares y permitiendo su mejoramiento (Chen & Page, 1994; Peña *et al.*, 2014).

Tal como en la vía I, en *A. vinelandii*, la síntesis de PHB se inicia a partir de acetil-CoA y se lleva a cabo a través de tres pasos enzimáticos (Figura 7). El primer paso es la condensación de dos moléculas de acetil-CoA por la enzima  $\beta$ -cetotilasa, lo que da lugar a una molécula de acetoacetyl-CoA; posteriormente, le sigue la reducción de este compuesto a 3-hidroxitiril-CoA por una enzima acetoacetyl-CoA reductasa dependiente de NADPH; y finalmente, el paso final es la polimerización de los monómeros de 3-hidroxitiril-CoA gracias a la enzima PHA sintasa, liberando CoA y dando como resultado el PHB (Peña *et al.*, 2014).

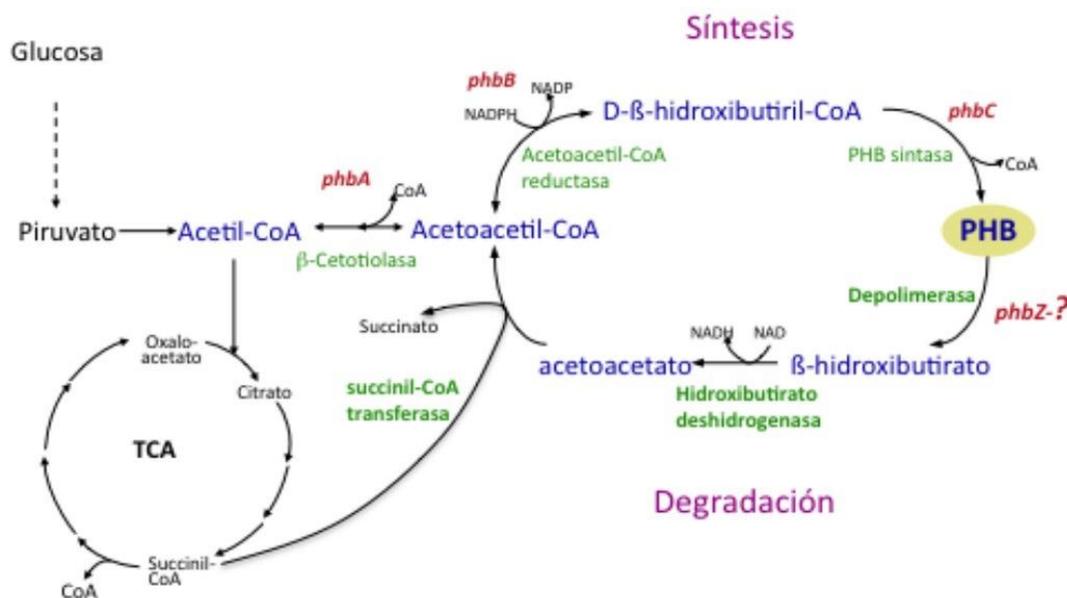
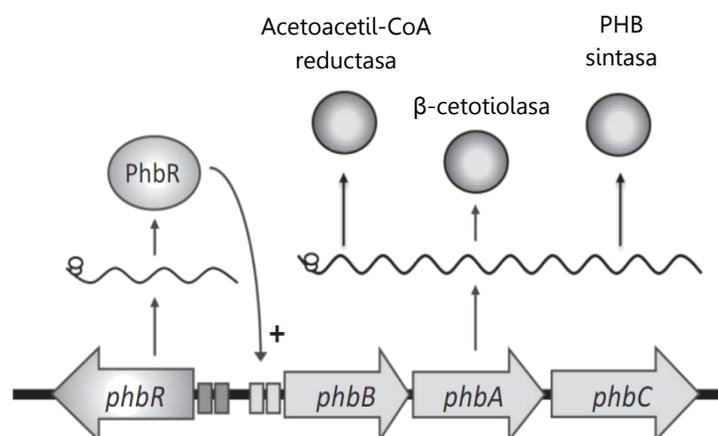


Figura 7. Metabolismo de PHB en *A. vinelandii* señalando los genes participantes (rojo).

### 2.3.1 Genes biosintéticos

En el grupo de trabajo se ha identificado la ruta biosintética de PHB en *A. vinelandii*. En esta bacteria, los tres genes involucrados con la síntesis de PHB localizados dentro del operón *phbBAC* (Figura 8). El gen *phbA* codifica para la enzima  $\beta$ -cetotiolasa, el gen *phbB* codifica para la acetil-CoA reductasa y el gen *phbC* para la PHB sintasa (Segura *et al.*, 2000; Pettinari *et al.*, 2001). Divergente al operón, se encuentra el gen *phbR* que codifica para un activador transcripcional (miembro de la familia AraC) que regula la expresión de sí mismo y del operón (Peralta-Gil *et al.*, 2002).



**Figura 8.** Modelo de regulación que ejerce PhbR sobre el operón biosintético *phbBAC* (Modificado de Peña *et al.*, 2014).

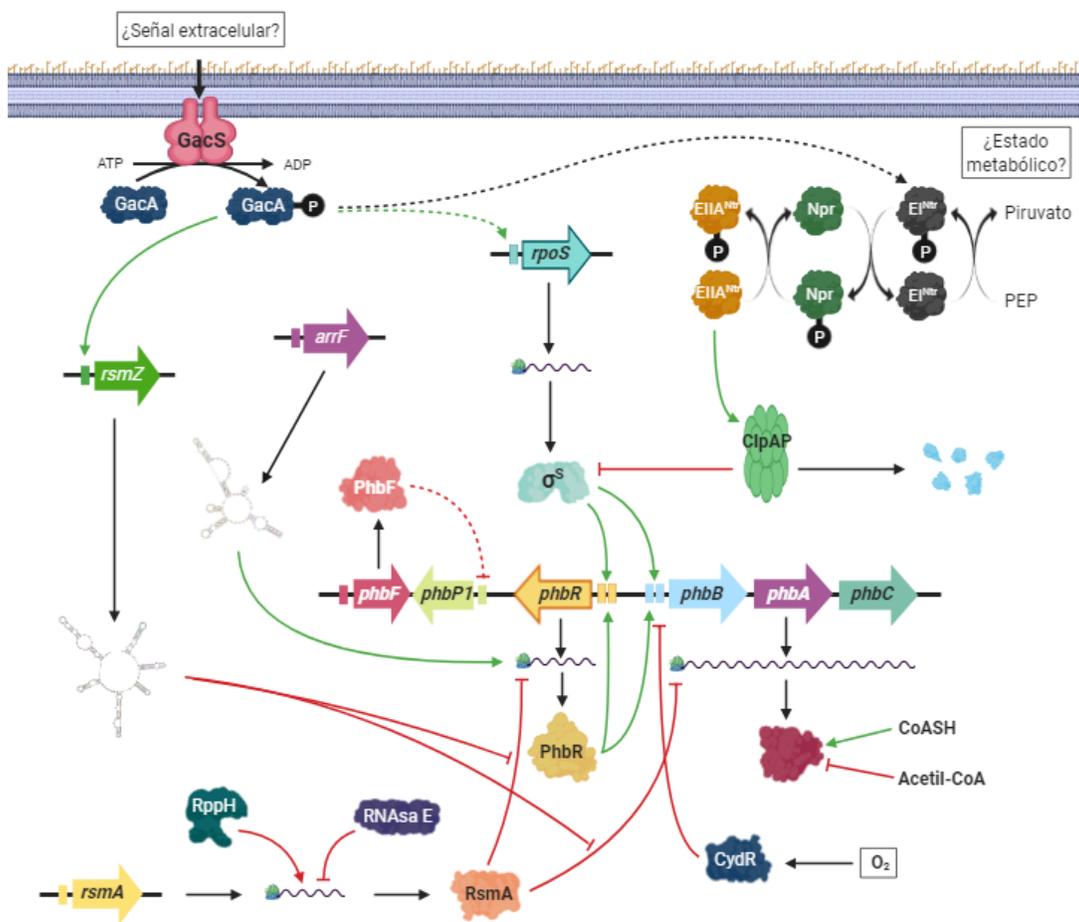
### 2.3.2 Regulación de la biosíntesis en *A. vinelandii*

Además del regulador PhbR, existen otros elementos que regulan, ya sea de manera positiva o negativa, la síntesis de PHB a través de la expresión del operón biosintético *phbBAC* y que involucran tanto señales extracelulares como el estado metabólico de la bacteria y niveles de oxígeno (Figura 9).

Entre los mecanismos de regulación positiva de genes biosintéticos se encuentra el sistema de doble componente GacS/GacA (Castañeda *et al.*, 2000) que puede actuar de dos formas: una a través de RpoS y la otra a través del sistema Rsm. En el primer caso, GacA activa la expresión del gen *rpoS* que codifica para un factor sigma  $\sigma^S$ , éste a su vez actúa sobre uno de los promotores del gen *phbR* y del operón *phbBAC*, activando su expresión (Hernández-Eligio *et al.*, 2011). En el segundo caso, el sistema GacS/GacA actúa a través del sistema de regulación postranscripcional Rsm que comprende la proteína RsmA (represora de la traducción por unión al RNA mensajero de los genes biosintéticos) y los pequeños ARNs reguladores que actúan uniéndose a la proteína RsmA, contrarrestando su actividad represora (Hernández-Eligio *et al.*, 2012).

Otra condición que regula de manera positiva la síntesis de PHB es la limitación de hierro, ya que esta condición aumenta la expresión del operón biosintético *phbBAC* a nivel transcripcional y la expresión del gen *phbR* a nivel postranscripcional; además de que se ha visto que el pequeño RNA ArrF, que responde a bajas concentraciones de hierro, actúa como regulador positivo de la traducción de *phbR* (Muriel-Millán *et al.*, 2014).

Además de los mecanismos anteriores, existe una proteína que regula positivamente, pero de manera indirecta, la expresión del operón biosintético *phbBAC*. RppH es una pirofosfohidrolasa que elimina fosfatos del extremo 5' en los transcritos de RNA tri/difosfatados del regulador negativo RsmA, promoviendo su degradación por acción de la RNasa E, logrando con esto eliminar la represión que ejerce RsmA sobre la traducción del operón *phbBAC* (Bedoya *et al.*, 2018).



**Figura 9.** Modelo de la regulación de la síntesis de PHB en *A. vinelandii*. La regulación positiva se indica con flechas verdes y la negativa con líneas rojas.

Por otra parte, el sistema fosfotransferasa de azúcares o PTS también está involucrado en la regulación de la síntesis de PHB. Este sistema comprende una serie de proteínas (Enzima I<sup>Ntr</sup>, NPr y Enzima IIA<sup>Ntr</sup>) que participan en una cadena de transferencia de fosfato, en la cual, el aceptor final es la proteína EIIA<sup>Ntr</sup>. Se sabe que la mutación en el

gen *ptsP* que codifica para la Enzima I<sup>Ntr</sup>, la producción de PHB en *A. vinelandii* se abate (Segura & Espín, 1998). De igual manera, la mutación en el gen *ptsO* disminuye drásticamente la producción de PHB. El efecto negativo sobre la producción de PHB en las cepas mutantes, se debe al efecto negativo sobre la transcripción del operón *phbBAC* y del gen *phbR*. Por otro lado, una mutación puntual en el gen *ptsN*, en el sitio de fosforilación de IIA<sup>Ntr</sup>, revierte el efecto negativo en la acumulación de PHB, esto debido a que la forma no fosforilada de IIA<sup>Ntr</sup> induce la degradación de RpoS a través del complejo proteolítico ClpAP (Noguez *et al.*, 2008; Muriel *et al.*, 2017).

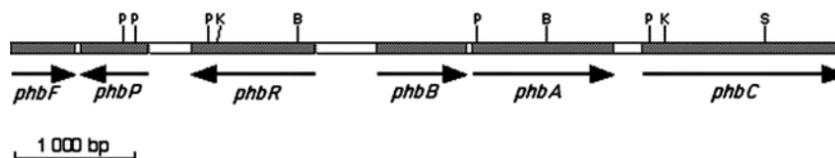
Otro de los elementos que controlan de manera negativa la síntesis de PHB, es el regulador transcripcional CydR (involucrado en la expresión del citocromo *bd*) que responde a la concentración de oxígeno y reprime la transcripción del operón *phbBAC* (Wu *et al.*, 2001).

Por último, se ha visto que el regulador PhbF también participa en la regulación de genes relacionados con el metabolismo de PHB, inhibiendo la expresión del gen *phbP1* que codifica para una phasina (Canales, 2013), proteína involucrada en la estabilidad de los gránulos de PHB. El mecanismo de regulación será descrito con detalle más adelante.

### 2.3.3 Regulación de las phasinas y formación del gránulo de PHB en *A. vinelandii*

Como se dijo anteriormente, en diversas bacterias productoras de PHA, existen proteínas asociadas a gránulos, como son las phasinas, proteínas reguladoras, sintasas de PHB y depolimerasas de PHB. Entre las proteínas anteriores, destaca el regulador PhaR que controla negativamente la expresión de una phasina principal denominada PhaP (Pötter & Steinbüchel, 2005).

En *A. vinelandii* se han descrito homólogos de los genes *phaR* y *phaP1* que se encuentran contiguos al gen *phbR*, el cual codifica para el activador del operón biosintético *phbBAC*. En *A. vinelandii*, se le llamó *phbF* al homólogo del regulador *phaR*, y *phbP1* al homólogo del gen *phaP1* (Figura 10; Segura *et al.*, 2003).



**Figura 10.** Operón biosintético de PHB y genes aledaños (Segura *et al.*, 2003).

En un estudio previo del sistema de regulación *phbF-phbP*, se propuso un modelo similar al descrito en *R. eutropha*, en el que PhbF reprime la transcripción del gen *phbP1* en ausencia de PHB, mientras que en presencia de PHB, PhbF libera la represión. Se propone que PhbF regula al unirse a un sitio consenso identificado sobre el promotor al

cual reprime (Canales, 2013), aunque no se encuentra altamente conservado, el sitio de unión a PhbF generalmente se caracteriza por una secuencia palíndroma que contiene las bases CTGC o GCAG flanqueadas por una región rica en Ts y As (Chou & Yang). De manera interesante, el mismo posible sitio de unión se encontró en la región intergénica que comparten la phasina Avin\_03930 (*phbP2*), y la PHB depolimerasa, *phbZ1*.

## 2.4 MOVILIZACIÓN DE PHB en *A. vinelandii*

En *A. vinelandii*, la utilización del PHB acumulado (Figura 7) inicia con la movilización o degradación del polímero por la actividad PHB depolimerasa, dando lugar a monómeros de hidroxibutirato que luego son oxidados por una hidroxibutirato deshidrogenasa, lo que resulta en la generación de poder reductor (NADH). Posteriormente, una succinil-CoA transferasa activa al acetato resultante, utilizando la CoA del succinil-CoA y, por último, el acetoacetil-CoA formado sufre tiólisis a partir de una molécula de CoA libre mediante la  $\beta$ -cetotiolasa, la misma enzima que cataliza el primer paso de la biosíntesis de PHB (en dirección reversa), formando así dos moléculas de acetil-CoA que pueden cumplir funciones biosintéticas o de obtención de energía en el ciclo de Krebs (Manchak & Page, 1994).

### 2.4.1 Genes involucrados en movilización en *A. vinelandii*

Se han identificado algunos genes relacionados con el proceso de degradación del PHB en *A. vinelandii*, tales como el gen de la hidroxibutirato deshidrogenasa y los genes que codifican para las dos subunidades de la succinil-CoA transferasa que, como se mencionó anteriormente, participan en la degradación de PHB; sin embargo, con respecto a los genes que codifican para las depolimerasas de PHB, la situación es más compleja debido a que existen varios genes de posibles PHB depolimerasas.

Hasta ahora, en el genoma de *A. vinelandii*, se han encontrado siete genes que codifican para posibles depolimerasas de PHB y algunas de ellas muestran homología significativa con PhaZa1, la depolimerasa más importante de *R. eutropha* (Saegusa *et al.*, 2001). Los genes de PHB depolimerasas que mejor se han estudiado en *A. vinelandii* son Avin\_03910, Avin\_34710 y Avin\_33500, que se designaron como *phbZ1*, *phbZ2* y *phbZ3* respectivamente, los demás genes que también están identificados como posibles PHB depolimerasas son Avin\_44010, Avin\_46290, Avin\_34810 y Avin\_27080.

PhbZ1 es una depolimerasa intracelular asociada a gránulos de PHB (Adaya *et al.*, 2018) y en el genoma de *A. vinelandii* existen dos parálogos (genes duplicados en el genoma): Avin\_44010, con 45% de identidad, y Avin\_27080, con 25% de identidad. Otros genes de depolimerasas son Avin\_34810 (*phbZ2*) y Avin\_33500 (*phbZ3*), éste último, un posible parálogo al anterior. También se han identificado posibles phasinas (proteínas asociadas al gránulo) como PhbP1 y PhbP2 (Avin\_23670, Avin\_03930).

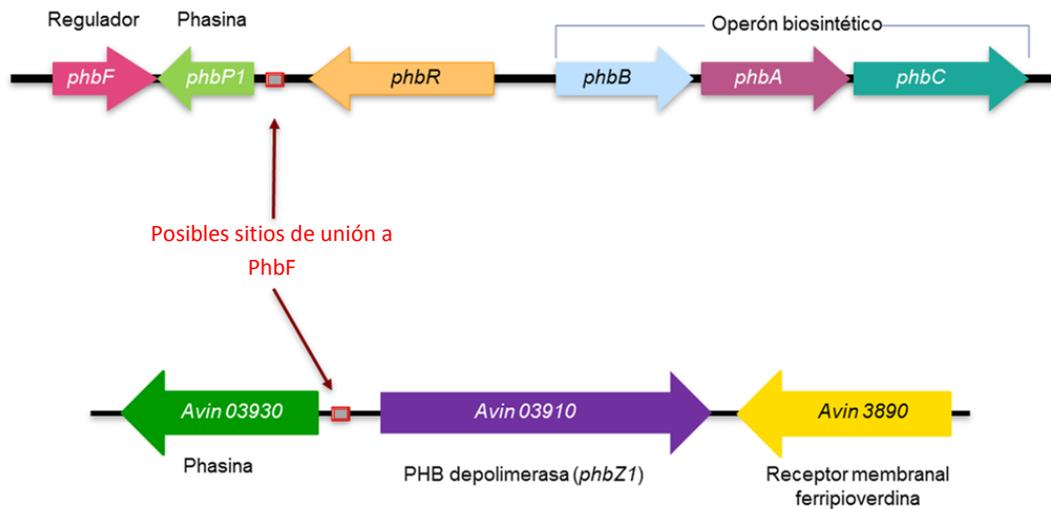
## 2.4.2 Regulación de la movilización en *A. vinelandii*

En general, la regulación de la movilización de PHAs es un tema que aún no se encuentra bien estudiado, sin embargo, se conocen algunos elementos que participan en este proceso. Por ejemplo, en varias especies de *Pseudomonas*, el regulador PhaD activa simultáneamente la expresión de varias PHA sintasas y la PHA depolimerasa PhaZ1 (Velázquez *et al.*, 2020). Se conoce también que la phasina ApdA, presente en *Rodhospirillum rubrum*, se une a una PHA depolimerasa aumentando su actividad de degradación (Handrick *et al.*, 2004)

Otros elementos que controlan indirectamente la movilización de PHAs son algunos reguladores de biosíntesis; en *R. eutropha* y *P. putida*, por ejemplo, se ha visto que una mutación en *rpoS* da como resultado un aumento en la movilización de PHA durante la fase estacionaria, y en *R. eutropha*, una mutación en la Enzima I y HPr del sistema PTS, llevan a un aumento en la degradación de PHB (Velázquez *et al.*, 2020).

En *A. vinelandii* no se sabe qué reguladores participan en el proceso de movilización de PHB, sin embargo, se han identificado dos reguladores que podrían estar involucrados en este proceso: PhbF y Avin\_33510.

En *A. vinelandii*, así como en otras bacterias, PhbF es un regulador negativo que controla la expresión de la phasina PhbP1 (Canales, 2013). Los genes que codifican para ambas proteínas se encuentran junto al gen del regulador PhbR y al operón biosintético *phbBAC*; además, dentro del promotor de *phbP1* se encuentra el posible sitio de unión a PhbF (Figura 11; Segura *et al.*, 2003).



**Figura 11.** Posibles sitios de unión al regulador transcripcional PhbF.

Como se mencionó anteriormente, en *A. vinelandii*, el gen de la PHB depolimerasa *phbZ1* y el gen de la phasina Avin\_03930 (*phbP2*), comparten su región reguladora y en ésta, hay un posible sitio de unión al regulador PhbF (Figura 11), que en otras bacterias

participa controlando negativamente la expresión de la phasina PhbP1 (Maehara *et al.*, 2001; Pötter *et al.*, 2005).

En estudios previos en el laboratorio, se ha observado que la inactivación del gen *phbF* en *A. vinelandii*, tiene un efecto positivo sobre la actividad del promotor de *phbZ1*, así como la de *phbP2*, por lo que se propone que PhbF es un regulador negativo de la depolimerasa y que podría estar actuando a través de la unión a la secuencia propuesta en la región intergénica.

Por otra parte, mediante un análisis de contexto genómico, se identificó al segundo regulador, *Avin\_33510*. Este gen codifica para un regulador que está anotado como miembro de la familia CopG y se encuentra río arriba de la PHB depolimerasa *Avin\_33500* (Moyao, 2018). Se propone que el producto del gen *Avin\_33510* podría estar involucrado en la regulación de la expresión de esa depolimerasa (Figura 12).



**Figura 12.** Genes de PHB depolimerasa (*Avin\_33500*) y de su posible regulador (*Avin\_33510*).

Los reguladores de la familia CopG son reguladores negativos, poseen un dominio conservado RHH (Ribbon-Helix-Helix) que ayuda a estos factores transcripcionales a dimerizarse para poder unirse al promotor de su gen blanco y reprimir su transcripción, esto ocurre porque el lugar preciso al que se unen en el DNA se encuentra justo sobre el sitio -35 del promotor (Del Solar *et al.*, 2002).

Todos los reguladores de la familia CopG reportados, participan en el control de la replicación de plásmidos en diferentes bacterias, regulando el número de copias de plásmidos a través de la represión de la expresión del gen *repB* (proteína de iniciación de la replicación del plásmido) que se encuentra río abajo del gen del regulador (Del Solar *et al.*, 2002). Sin embargo, *A. vinelandii* no tiene plásmidos, por lo que es posible que este regulador controle genes diferentes a los ya reportados. La ubicación contigua al gen de una PHB depolimerasa sugiere que podría estar controlando su expresión.

### 3. JUSTIFICACIÓN

La contaminación por plásticos derivados del petróleo ha llegado a niveles alarmantes en todo el mundo, por lo que los plásticos biodegradables que se fabrican con PHAs (polihidroxialcanoatos) que provienen de fuentes renovables, como azúcares o aceites utilizados por las bacterias como fuente de carbono, han empezado a cobrar mayor importancia a través de estos últimos años. *Azotobacter vinelandii* es una bacteria con la capacidad de acumular hasta el 85% de su peso seco en PHB, un tipo de PHA; y posee diversos sistemas de regulación que ayudan a mantener el balance de síntesis/movilización. Estudiar dichos sistemas de regulación es de gran importancia para poder entender el proceso de acumulación de PHB y así poder incrementar la tasa de producción del polímero.

## 4. HIPÓTESIS

Las proteínas PhbF y Avin\_33510 de *Azotobacter vinelandii* participan en el control de la degradación de PHB regulando la expresión de los genes que codifican las PHB depolimerasas *phbZ1* y *Avin\_33500*, y PhbF participa regulando los genes de phasinas *phbP1* y *phbP2*. Esto mediante la unión de ambos reguladores a las regiones reguladoras correspondientes a sus genes blanco.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 OBJETIVO GENERAL

- Determinar de qué manera los reguladores PhbF y Avin\_33510 controlan la expresión de genes de PHB depolimerasas (*phbZ1*, *Avin\_33500*) y phasinas (*phbP1*, *phbP2*) en *A. vinelandii*.

### 5.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar el efecto de la inactivación del gen *phbF* sobre el fenotipo de producción de PHB.
2. Determinar la participación de la proteína PhbF en el control de la expresión de los genes *phbZ1*, *phbP1* y *phbP2* (relacionados con movilización de PHB) a través del análisis de la expresión de estos genes en la cepa *phbF* mutante.
3. Identificar a qué nivel de regulación controla PhbF sus genes blanco (*phbZ1*, *phbP1* y *phbP2*).
4. Analizar el efecto de la inactivación del gen *Avin\_33510* sobre el fenotipo de producción de PHB.
5. Determinar si la proteína Avin\_33510 controla la expresión del gen *Avin\_33500*, mediante la cuantificación de su expresión en el fondo genético de la cepa mutante en *Avin\_33510*.

## 6. MATERIAL Y MÉTODOS

### 6.1 OLIGONUCLEÓTIDOS, VECTORES Y CEPAS

Para los diversos experimentos que se llevaron a cabo en este trabajo se utilizaron los oligonucleótidos que se enlistan a continuación (Tabla 5).

Nombre	Gen	Secuencia	Uso
03910(phbZ1)_Fw	<i>phbZ1</i>	5'- GCA GGA ATT CTT CTC CGA CA -3'	qPCR
03910(phbZ1)_Rv	<i>phbZ1</i>	5'- AAC CAG CCG TAG AGC GTA TG -3'	qPCR
qphbP1_Fw	<i>phbP1</i>	5'- CTT TCT TCA AGC CCA ACG AG -3'	qPCR
qphbP1_Rv	<i>phbP1</i>	5'- CTG AGT GCC GAT TTC GAT T -3'	qPCR
PL3930	<i>phbP2</i>	5'- GAC AGG CCC AGG AAG TGG -3'	qPCR
PD3930	<i>phbP2</i>	5'- GAC CAT GCC GTG CAT CTG -3'	qPCR
33500(phbZ3)_Fw	<i>phbZ3</i>	5'- ACG CCA GAC GAC GAG TGT AG -3'	qPCR
33500(phbZ3)_Rv	<i>phbZ3</i>	5'- TTG CCG GGA TGA ACA GTC GT -3'	qPCR
Ftrnscip. FW39	<i>phbZ1</i>	5'- CGT ATC TAG AGT CTC AAT CTC CCA AAG GCA AC -3'	Fusión transcripcional
Ftrnscip. RV39	<i>phbZ1</i>	5'- TCA GGA ATT CGA TCA CCC TCT TCG TGC TGG -3'	Fusión transcripcional
Ftrnscip. FWP2	<i>phbP2</i>	5'- TGC ATC TAG AGA TCA CCC TCT TCG TGC TGG -3'	Fusión transcripcional
Ftrnscip. RVP2	<i>phbP2</i>	5'- TCA GGA ATT CGT CTC AAT CTC CCA AAG GCA AC -3'	Fusión transcripcional
PhbFexpFW	<i>phbF</i>	5'- ATG CGG ATC CTC AGC CAA TGG CCG AAA -3'	Expresión PhbF
PhbFexpRv	<i>phbF</i>	5'- CTG AGT CGA CGC TTT GGC CTT CAT CGC -3'	Expresión PhbF
FWPhbP1-R	<i>phbP1</i>	5'- GAC CGT ATC TCC TGC ATA GTG -3'	EMSA
RVPhbP1-R	<i>phbP1</i>	5'- TCG GCC CGT AGG AAA AAG CGC -3'	EMSA
FWZ1-P2	<i>phbZ1-P2</i>	5'- GTC TCA ATC TCC CAA AGG CAA CG -3'	EMSA
RVZ1-P2	<i>phbZ1-P2</i>	5'- GAT CAC CCT CTT CGT TGC TGG AGT AAG -3'	EMSA
RRphbF_Fw	<i>phbZ1</i>	5'- AAG TGA TAC GAC GAG CCT GC -3'	EMSA
RRphbF_Rv	<i>phbZ1</i>	5'- CGA ACA TCG TTT CGG CCA TT -3'	EMSA

En rojo: Sitio de restricción *Bam*HI

En azul: Sitio de restricción *Xba*I

En verde: Sitio de restricción *Sal*I

En naranja: Sitio de restricción *Eco*RI

Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados para realizar este trabajo.

Para realizar la RT-qPCR se diseñaron oligonucleótidos que aparean en la región estructural de los genes *phbZ1*, *phbP1*, *phbP2* y *Avin\_33500* (*phbZ3*) amplificando entre 100 y 120 pb. Para comprobar su especificidad, los oligonucleótidos se utilizaron en una simulación de PCR con el programa SnapGene, utilizando el genoma completo de *A. vinelandii* como templado y además, se realizó un alineamiento mediante el algoritmo BLASTN contra el genoma de *A. vinelandii*.

Para el ensayo de unión DNA-proteína (EMSA), por un lado, se utilizaron oligonucleótidos para clonar y expresar la proteína PhbF, y por otro, se diseñaron oligonucleótidos para amplificar las regiones de regulación de los genes descritos anteriormente. Los oligonucleótidos con los que se amplificó el gen *phbF* poseen un sitio *Bam*HI (delantero) y un sitio *Sal*I (reverso), para poder clonarlo en el vector de expresión

pET21a+ (Tabla 6). Este vector posee una secuencia de nucleótidos que codifica para una etiqueta de histidinas que, al clonar la región estructural del gen *phbF* en fase, queda en la región carboxilo terminal de la proteína. La etiqueta de histidinas sirve para purificar la proteína al hacerla pasar por una columna de Níquel. Los oligonucleótidos que se usaron para amplificar las regiones reguladoras de los genes *phbP1*, *phbZ1-P2* y *phbF* no poseen sitios de restricción. Los fragmentos amplificados de las regiones reguladoras, se clonaron en el vector pJET1.2blunt (Tabla 6).

Para las fusiones transcripcionales, se diseñaron oligonucleótidos que flanquearan las regiones reguladoras de los genes *phbZ1* y *phbP2*, los oligonucleótidos delanteros poseen un sitio de restricción *XbaI* y los reversos poseen un sitio *EcoRI* para dirigir la clonación en el vector pUMATcgusAT (Tabla 6) en el sentido del gen *gusA* para que así, el gen reportero se encuentre bajo el control del promotor de *phbZ1* o *phbP2*, según sea el caso.

Nombre	Características	Referencias
pJET1.2blunt	Vector de clonación, Amp <sup>R</sup>	Thermo Fisher Scientific
pJET1.2 <i>phbF</i>	Derivado del vector pJET1.2blunt, contiene la región estructural del gen <i>phbF</i>	Este trabajo
pJET1.2RR <i>phbZ1-P2</i>	Derivado del vector pJET1.2blunt, contiene la región reguladora que comparten los genes <i>phbZ1</i> y <i>phbP2</i>	Este trabajo
pJET1.2RR <i>phbP1</i>	Derivado del vector pJET1.2blunt, contiene la región reguladora del gen <i>phbP1</i>	Este trabajo
pJET1.2RR <i>phbF</i>	Derivado del vector pJET1.2blunt, contiene la región estructural del gen <i>phbF</i>	Este trabajo
pET21a+	Vector de expresión con marcador selectivo Amp y etiqueta de histidinas C-terminal, se induce con IPTG	
pET21a+ <i>phbF</i>	Derivado del pET21a+, porta la región estructural del gen <i>phbF</i> (525 pb)	Este trabajo
pUMATcgusAT	Derivado del vector pUC19, contiene un casete de resistencia a Tetraciclina en contrasentido al gen reportero <i>gusA</i> , ambos flanqueados por secuencias para recombinar en el gen <i>melA</i> de <i>A. vinelandii</i>	Este trabajo
pUMATc <i>phbZ1gusAT</i>	Derivado del pUMATcgusAT, contiene la región reguladora de <i>phbZ1</i> controlando la expresión de <i>gusA</i>	Este trabajo
pUMATc <i>phbP2gusAT</i>	Derivado del pUMATcgusAT, contiene la región reguladora de <i>phbP2</i> controlando la expresión de <i>gusA</i>	Este trabajo

**Tabla 6.** Vectores utilizados en este trabajo.

Para mantener el vector pJET1.2blunt y todos sus derivados con inserciones, se utilizó la cepa de *E. coli* Top 10 (Tabla 7), mientras que para expresar la proteína PhbF desde el vector pET21a+::*phbF* se utilizó la cepa de expresión BL21DE3, también de *E. coli*.

Los vectores se mantienen en *E. coli* en lugar de *A. vinelandii* porque ésta última no puede mantener plásmidos. Debido a este hecho, las fusiones transcripcionales se incorporan al cromosoma en el locus *melA* que codifica para una  $\alpha$ -galactosidasa que solo se expresa cuando la bacteria es crecida en melibiosa, por lo que este locus es neutro.

Se utilizaron las cepas de *A. vinelandii*: UW136 y su variante UW136*phbF* para trabajar con el regulador PhbF, y OP, OP33510P y OP33510NP para trabajar con el regulador *Avin\_33510* (Tabla7).

Bacteria	Cepa	Características	Referencia	Cultivo
<i>E. coli</i>	Top 10	F- <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr</i> - <i>hsdRMS</i> - <i>mcrBC</i> ) $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74 nupG recA1</i> <i>araD139</i> $\Delta$ ( <i>ara-leu</i> )7697 <i>galE15</i> <i>galK16 rpsL</i> (Str <sup>R</sup> ) <i>endA1</i> $\lambda$ -	Invitrogen	Luria Bertani, 37°C
	BL21DE3	F- <i>omp T hsdSB</i> ( <i>rB-mB</i> -) <i>gal dcm</i> <i>me 121</i> (DE3)	Invitrogen	Luria Bertani, 37°C
<i>A. vinelandii</i>	UW136	Cepa no mucoide ( <i>algU</i> -), Rif <sup>R</sup> , mutante espontánea derivada de la cepa silvestre DJ	Bishop & Brill, 1977	Burk-Sacarosa, 30°C
	UW136 <i>phbF</i>	Mutante derivada de la cepa UW136 con un casete de resistencia a Gentamicina insertado en la posición +354 del gen <i>phbF</i>	Canales, 2013	Burk-Sacarosa, 30°C
	OP	Cepa derivada de la UW136, Ac.nal <sup>R</sup>	Moyao, 2018	Burk-Sacarosa, 30°C
	OP33510P	Mutante derivada de la OP con un casete de resistencia a Gentamicina insertado en la posición +70 y en el mismo sentido del gen <i>Avin_33510</i>	Este trabajo	Burk-Sacarosa, 30°C
	OP33510NP	Mutante derivada de la OP con un casete de resistencia a Gentamicina insertado en la posición +70 y en sentido contrario al gen <i>Avin_33510</i>	Este trabajo	Burk-Sacarosa, 30°C

Tabla 7. Bacterias y cepas utilizadas en este trabajo.

## 6.2 PREPARACIÓN DE IPTG (ISOPROPIL-B-D- TIOTALACTOPIRANÓSIDO) 100 mM

El IPTG se utilizó a una concentración stock de 24 mg/ml para inducir la expresión del gen *phbF* contenido en el vector pET21a+, agregando 1 $\mu$ l por cada ml de medio de cultivo.

## 6.3 MEDIOS DE CULTIVO PARA *A. vinelandii*

*A. vinelandii* es una bacteria que posee múltiples copias de su cromosoma, lo que depende en gran medida del medio en el que se cultive. Para los análisis de expresión y

para su manipulación genética, se crece en los medios mínimos BS y BG, ya que presenta una mínima cantidad de copias de su cromosoma. Para observar con más detalle el fenotipo de acumulación de PHB, se creció en medio rico PYS.

### 6.3.1 Burk-Sacarosa (BS)

	Solución Stock		Concentración final
MgCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	0.79 M	160 g/L	0.79 mM
NaMO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	0.00083 M	0.2 g/L	0.83 μM
FeSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.018 M	5 g/L	0.018 mM
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	0.05 M	7.3 g/L	0.5 mM
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.13 M	18.3 g/L	1.3mM
Buffer fosfatos pH 7			
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.046 M	8 g/L	4.6mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.015 M	2 g/L	1.5 mM
Sacarosa		200 g/L	

Si el medio va a ser sólido se agrega agar al 1.5% y se esteriliza junto con el agua a utilizar.

### 6.3.2 Burk-Glucosa (BG)

	Solución Stock		Concentración final
MgSO <sub>4</sub> . 7H <sub>2</sub> O	0.79 M	20 g/L	0.8 mM
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.05 M	5 g/L	8.7 μM
FeSO <sub>4</sub>	0.13 M	18.3 g/L	0.05 mM
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	0.05 M	7.3 g/L	0.34 mM
NaCl	0.00083 M	20 g/L	3.4 mM
Buffer fosfatos pH7			
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.037 M	6.4 g/L	3.7 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.0012 M	1.6 g/L	1.2 mM
Glucosa		100 g/L	

Si el medio va a ser sólido se agrega agar al 1.5% y se esteriliza junto con el agua a utilizar.

PARA PREPARAR 1L DE MEDIO:

	BS	CM*
H <sub>2</sub> O	800 ml	800 ml
Buffer PO <sub>4</sub>	100 ml	100 ml
Sacarosa 20%	100 ml	100 ml
CaCl <sub>2</sub>	10 ml	10 ml
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	10 ml	10 ml
MgCl <sub>2</sub>	1 ml	1 ml
FeSO <sub>4</sub>	1 ml	0 ml
NaMoO <sub>4</sub>	1 ml	0 ml

\*Medio de competencia para *A. vinelandii*

### 6.3.3 Medio Peptona-Extracto de levadura-sacarosa 2% (PY)

Peptona	5 g/L
Levadura	3 g/L
Sacarosa	20 g/L
H <sub>2</sub> O destilada cbp	1 L

Si el medio va a ser sólido añadir 1.5% de agar.

### 6.4 MEDIOS DE CULTIVO PARA *E. coli*

*E. coli* es una bacteria muy fácil de manipular y en el laboratorio se crece en medio rico LB, cuya preparación se llevó a cabo como sigue:

#### 6.4.1 Luria-Bertani (LB)

Bacto triptona	10 g/L
Extracto de Levadura	5 g/L
Cloruro de Sodio	10 g/L
Agua destilada cbp	1 L

### 6.5 CONSERVACIÓN DE CEPAS EN GLICEROL

Las cepas con las que se trabajó se preservaron a partir de cultivos frescos. En el caso de *A. vinelandii*, se inocularon 5 ml de BS líquido con la cepa y se incubó a 30°C/ 48 h. Para el caso de *E. coli*, se inocularon 3 ml de LB líquido con la cepa y se incubaron a 37°C/ 12 h. Posteriormente, para ambas bacterias, antes de guardarlas en congelación a -

70°C, se cambió el medio de cultivo por una solución 1:1 de medio BS o LB líquido (dependiendo de la bacteria) y glicerol al 80%.

## **6.6 TRANSFORMACIÓN**

### **6.6.1 Transformación en *E. coli***

*E. coli* es una bacteria que no es competente natural, por lo que las células se deben preparar para llevar a cabo el proceso de transformación. Para esto se tomó una colonia de una placa fresca de *E. coli* crecida de 16 a 20 horas a 37°C, para inocular 5 ml de medio LB e incubar 18 horas a 37°C, de este cultivo se tomó 1 ml para inocular 100 ml de LB hasta llegar a una D. O. de 0.5 a 650 nm. Se incubaron por 10 minutos en hielo y el paquete celular se transfirió a 30 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M para una posterior incubación en hielo por 15 minutos. Se volvió a resuspender el paquete celular en 2 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1M, 14% de Glicerol, por cada 50ml de cultivo original.

Para transformar las células competentes de *E. coli* con DNA plasmídico, se mezcló 1 µl de DNA (10-100 ng) con 200 µl de células competentes, la mezcla se incubó 30 minutos en hielo y después se le dio un choque de calor a 42°C por dos minutos. Se le agregó 1 ml de LB y, después de incubar por una hora a 37°C en agitación, se platearon 100 µl en placas de selección con el antibiótico que corresponda al casete de resistencia que contenga el vector.

### **6.6.2 Transformación en *A. vinelandii***

*A. vinelandii* es una bacteria competente natural por lo que para prepararla para recibir DNA externo basta con resembrarla en medio CM dos veces. En la última, se recogen todas las células en 200 µl de MgSO<sub>4</sub> 100 mM y se ponen a interactuar con 10-100 ng de DNA para después platear en placas de selección con el antibiótico que corresponda al casete de resistencia que contenga el vector.

## **6.7 PURIFICACIÓN Y MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS**

### **6.7.1 Extracción y purificación de DNA plasmídico de *E. coli***

La extracción de DNA plasmídico de los vectores contenidos en las cepas de *E. coli* se realizó por medio del método de perclorato. Para realizarlo se utilizó el paquete celular de 2 ml de cultivo de *E. coli* en LB al que se le agregaron 175 µl de buffer TES (50mM TRIS pH 8.5, 50mM EDTA pH 8.0 y 15% Sacarosa), 25 µl de lisozima (10mg/ml, 20 minutos en hielo) para romper la pared celular y 400 µl de agua helada para dar un

choque térmico al incubar 15 minutos a 73 °C. Se recuperó la fase acuosa y se añadió 60 µl de NaClO<sub>4</sub> 5M y 600 µl de isopropanol para precipitar y recuperar el DNA menos pesado al centrifugar a 13000 rpm por 15 minutos. Se lavó el pellet con 1 ml de etanol al 70% dos veces para eliminar las sales y se resuspendió en 30 µl de RNasa 20 µg/ml después de secarlo.

### 6.7.2 Cuantificación de expresión por RT-qPCR en *A. vinelandii*

Para realizar la cuantificación de transcritos por RT-qPCR primero se purificó en RNA total de *A. vinelandii* a partir de un cultivo de 48 horas en medio BS o BG líquido. Al paquete celular resuspendido en 60 µl de H<sub>2</sub>O tratada con DEPC 0.1% V/V se le agregaron 5 µl de H<sub>2</sub>O DEPC 0.5 % V/V y 200 µl de acetona helada, se mezcló manualmente y centrifugó a 10000 rpm por 2 minutos. Luego de desechar el sobrenadante se resuspendió la pastilla en 50 µl de H<sub>2</sub>O DEPC 0.1 %, se agregaron 10 µl de Lisozima (10 mg/ml, preparada con DEPC 0.5%) y se incubó a 37°C durante 10 minutos. Se agregó 1 µl de Proteinasa K (100 µl/ml) y, después de incubar en hielo 10 minutos, se adicionaron 3.5 µl de H<sub>2</sub>O DEPC 0.5%, 200 µl de Fenol (precalentado a 70°C) y 150 µl de cloroformo. Se agregaron 120 µl de H<sub>2</sub>O DEPC 0.1% y se centrifugó a 12000 rpm por 5 minutos para recuperar la fase acuosa. Ya en un tubo nuevo, se adicionó 1 ml de etanol absoluto y se precipitó a -70°C toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a 12000 rpm por 15 minutos y se resuspendió en 50 µl de DEPC 0.1 %.

(**DEPC:** Di-Etil Pirocarbono. La solución se prepara adicionando la cantidad adecuada (V/V) de este reactivo en agua tetradestilada. Se incuba en agitación a temperatura ambiente toda la noche para inactivar las RNAasas. Al día siguiente se esteriliza por autoclave lo que también resulta en la inactivación del DEPC.)

Una vez obtenido el RNA total, se procedió a tratarlo con DNAsa para eliminar el DNA de la muestra. Para esto, se hizo una mezcla con 2 µl de Buffer 10x y 3 µl de DNAsa I para tratar 2 µg de RNA, al final aforar con agua destilada hasta llegar a los 20 µl de volumen final. Esta mezcla se incubó a 37°C durante un hora y después se inactiva agregándole 1 µl de EDTA e incubando durante 10 minutos a 65°C. Para saber si quedaba DNA en la muestra, se realizó una PCR punto final y posteriormente una electroforesis en gel de agarosa. Como no se observó ningún amplificado, se siguió con la obtención del DNA complementario.

Para realizar síntesis de DNA complementario a partir de RNA, se cuantificó el RNA obtenido anteriormente, se le agregaron 20 pmol de oligonucleótido reverso por cada 1 µg de RNA total y se aforó a 12 µl. Se incubó a 70°C durante 5 minutos, luego en hielo durante 2 minutos y se añadió 1 µl de inhibidor de RNAasas, 4 µl de buffer de reacción (5X) y 2 µl de una mezcla de dNTP's 10 mM. Se incubó a 37°C durante 5 minutos y al final se adicionó 1 µl de transcriptasa reversa (200 U/µl). Se incubó una hora a a 42°C y se detuvo la reacción con un choque de calor a 70°C durante 10 minutos.

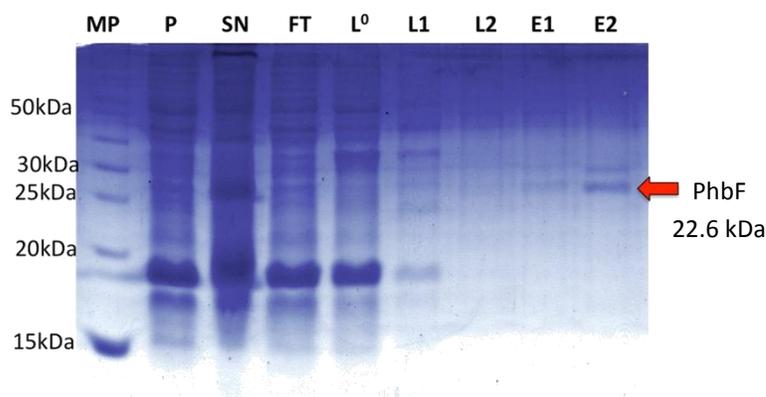
Para cuantificar la expresión de los genes blanco y los controles internos por medio de qPCR (1 ciclo de 95°C por 10 minutos, 40 ciclos de: 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto) a partir de DNA complementario, se lleva a cabo la siguiente mezcla por triplicado para cada cepa:

SYBRGRREN Applied Biosystem	10 µl
DNA complementario (5 µg)	1 µl
Oligonucleótido Fw (2.5 pmol/µl)	1 µl
Oligonucleótido Rv (2.5 pmol/µl)	1 µl
Agua estéril	7 µl
<b>Volumen final</b>	<b>20 µl</b>

## 6.8 MANIPULACIÓN DE PROTEÍNAS

### 6.8.1 Purificación de PhbF expresada en *E. coli*

Para la purificación de la proteína, se inició con 75 ml de un cultivo en LB líquido de *E. coli* BL21DE3 que contiene el plásmido pET21a+*phbF*, con éste se inocularon 750 ml de LB líquido al alcanzar una D. O. de 0.1. Los 750 ml inoculados, se incubaron a 37°C hasta alcanzar una D. O. de 0.5 y se le adicionaron 400 µl de IPTG 1M, se incubó por tres horas más y después se recuperaron y pesaron las células, añadiéndoles 1 ml de buffer de lisis (HCl 200 mM, DTT 1 mM, EDTA 1 mM, NaCl 50 mM) por cada 1 g de células. Las células se congelaron y descongelaron 3 veces, después se sometieron a sonicación durante 8 minutos dando pulsos de duración de 10 segundos con 10 segundos de reposo entre cada pulso y se centrifugaron por 10 minutos a 13,000 rpm a 4°C para recuperar la fracción soluble donde se encontraba la proteína.



**Figura 13.** Visualización del gel SDS-PAGE con los extractos proteicos y lavados de la columna de níquel, se observa la mayor cantidad de la proteína en el carril E2. MP: Marcador de peso, P: Pellet, SN: Sobrenadante, FT: Fracción total, L: Lavado, E: Elución.

En una columna se colocó un filtro con una mezcla de níquel-agarosa (resina), se lavó con agua y se equilibró con buffer de lisis. Después, se colocaron 4mL de la fracción soluble del extracto proteico y se agitó en frío, los lavados de la columna consistieron en usar un gradiente de imidazol de 10, 30, 70, 100, 250 y 500mM, todas con buffer (fosfatos 100mM y NaCl 50mM pH8). La proteína se encontró a mayor concentración en el lavado E2 (Figura 13).

La concentración de proteína se cuantificó con el software Image Studio analizando un gel SDS-PAGE, obteniendo una concentración final de 50 ng/ml.

### 6.8.2 Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS

Para visualizar las proteínas purificadas en un gel, se prepararon tanto buffers de carga y de corrida como soluciones para teñir y desteñir los geles. Además, las soluciones para preparar los geles de empaquetamiento y de resolución fueron tomadas de Harlow & Lane, 1988.

#### Buffer de corrida (5x)

Tris base	15.1 g
Glicina	94 g
SDS 10% (P/V)	50 ml
H <sub>2</sub> O	Aforar a 1 L

#### Solución para teñir el gel (100 ml)

Azul de Coomasie R-250	0.25 g
Metanol-agua 1:1	90 ml
Ácido acético	10 ml
Filtrar en Whatman no. 1	

#### Buffer de carga

Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	2.5 ml
SDS	0.4 g
Glicerol	2 ml
β-mercaptoetanol	0.4 ml
Coomasie G-250	0.02 gr

#### Solución para desteñir el gel

Metanol	50 ml
Ácido acético	50 ml
H <sub>2</sub> O	400 ml

#### Acrilamida al 30%:

29 g de acrilamida

1 g de Bis acrilamida

Aforar a 100 ml con agua

### Componentes gel de resolución

<b>Geles al 6%</b>	<b>1gel (5 ml)</b>	<b>2 geles (10 ml)</b>	<b>3 geles (15 ml)</b>
H <sub>2</sub> O	2.6	5.3	7.9
30% mezcla de acrilamida	1.0	2.0	3.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8
10% SDS	0.05	0.1	0.15
10% persulfato de amonio	0.05	0.1	0.15
TEMED	0.004	0.008	0.012

<b>Geles al 12%</b>	<b>1 gel (5 ml)</b>	<b>2 geles (10 ml)</b>	<b>3 geles (15 ml)</b>
H <sub>2</sub> O	1.6	3.3	4.9
30% mezcla de acrilamida	2.0	4.0	6.0
1.5 M Tris (pH 8.8)	1.3	2.5	3.8
10% SDS	0.05	0.1	0.15
10% persulfato de amonio	0.05	0.1	0.15
TEMED	0.002	0.004	0.006

<b>Componentes gel de empaquetamiento</b>	<b>1 gel (1 ml)</b>	<b>2 geles (2 ml)</b>	<b>3 geles (3 ml)</b>
H <sub>2</sub> O	0.68	1.4	2.1
30% mezcla de acrilamida	0.17	0.33	0.5
1.5 M Tris (pH 8.8)	0.13	0.25	0.38
10% SDS	0.01	0.02	0.03
10% persulfato de amonio	0.01	0.02	0.03
TEMED	0.001	0.002	0.003

Para preparar los geles, primero se montaron los vidrios, se preparó la solución del gel de resolución y se vertió la mezcla al interior de los vidrios. Una vez polimerizado, se preparó la solución para el gel de empaquetamiento, la cual se vertió sobre el gel de resolución y se colocó el peine. El gel polimerizado, se desmontó, se cargó y se cometió a una electroforesis.

### 6.9 ENSAYO DE RETARDO DE MOVILIDAD ELECTROFORÉTICA EN GEL (EMSA)

Los geles para llevar a cabo los EMSA se prepararon como un único gel de resolución al 6%. Por otro lado, la mezcla de unión se preparó como sigue: en 10 tubos de 200 µl o de 1 ml se colocó una mezcla de Tris-HCl 10 mM, KCl 1 M, DTT 20 mM, EDTA 10 mM Glicerol 50%, BSA 200 µg/ml, 100 ng de DNA problema y 50 ng de DNA control negativo (amplificado con los oligos 33500(phbZ3)\_Fw y 33500(phbZ3)\_Rv). Adicionalmente, se añadió una concentración creciente de proteína del tubo 2 al 9 desde 50 ng hasta 1000 ng. Finalmente, la mezcla se aforó con agua para llegar a un volumen final de 20 µl y se le agregó 1 µl de buffer de carga. Se dejó incubar media hora a temperatura ambiente y luego se cargaron las mezclas de reacción en los geles nativos de poli-acrilamida preparados con anterioridad.

El gel se sometió a una electroforesis a 80 V por 70 minutos. Al finalizar, el gel se tiñó 10 minutos con Bromuro de Etidio 5 mg/ml diluido a 1  $\mu$ l por ml de agua y después se enjuagó en agua corriente por 30 minutos. Se visualizó con luz UV a 360 nm y la imagen se capturó mediante el equipo de fotodocumentación BioRad Gel Doc XR+.

## 6.10 TÉCNICAS DE CUANTIFICACIÓN

### 6.10.1 Cuantificación de PHB

Para cuantificar PHB se utilizó el método espectrofotométrico de Law y Splecky (1961) cuyo fundamento es la conversión del polímero en ácido crotónico. Se partió de un cultivo de 48 horas del cual se tomó una muestra de 1 ml, se resuspendió el paquete celular, previamente centrifugado, en 1 ml de hipoclorito de sodio al 30% y se incubó a 30°C durante una hora. La muestra se centrifugó y se resuspendió el paquete celular ahora en 1 ml de agua, se volvió a centrifugar y se resuspendió el paquete celular en 1 ml de acetona, se centrifugó y se eliminó el sobrenadante. Finalmente, dejó secar toda la noche.

Al día siguiente se resuspendió el PHB seco en 1 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, se incubó a 95°C durante 10 minutos y se leyó la absorbancia a 235 nm, utilizando celdas de cuarzo y usando ácido sulfúrico concentrado como blanco. Para calcular la concentración de PHB en mg/ml se utilizó la fórmula donde A es la absorbancia obtenida y  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar, que es 15,600 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> para el caso del H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. Lo único que hay que hacer con  $\epsilon$  es convertir las unidades de M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup> a L/g con el peso molecular del ácido crotónico 86.09 g/mol.

### 6.10.2 Determinación de actividad $\beta$ -glucoronidasa

Se determinó la actividad de la enzima  $\beta$ -glucoronidasa, codificada por el gen reportero *gusA* contenido en las fusiones transcripcionales con las que se trabajó, basándose en el trabajo de Wilson *et al.*, 1995. Para iniciar con la cuantificación se tomó una muestra de 1 ml de un cultivo de 48 horas y se centrifugó. La pastilla se lavó y se resuspendió en 1 ml de MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O (10 mM), se tomaron 20  $\mu$ l y se les agregó 710  $\mu$ l de Buffer Z (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 30 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, EDTA 1 mM, DTT 5 mM), al mismo tiempo se puso un tubo Blanco con 730  $\mu$ l de Buffer Z. A todos los tubos se les agregaron 10  $\mu$ l de lisozima 10 mg/ml y se incubaron por 5 minutos a 37°C, se les agregaron 10  $\mu$ l de Tritón 10%, después se les añadieron 100  $\mu$ l de PNPG (*p*- nitrofenil -  $\beta$  - D- glucurónido 12.5 mM), se incubaron a 28°C y se cronometró el tiempo de reacción hasta que se volvieron de color amarillento, al llegar a ese color se detuvo la reacción agregando 150  $\mu$ l de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.2 M. Se leyó la absorbancia a 405 nm y para calcular las unidades de actividad se utilizaron las siguientes fórmulas:

$$U \beta\text{-Gluc} = DO_{405} (1000) / [(0,018) (t \text{ Rx minutos}) (\text{Vol Rx } \mu\text{l}) (\text{proteína } \mu\text{g /ml})]$$

1 U = nmoles de PNP producidos /minutos / $\mu\text{g}$  proteína

### 6.10.3 Cuantificación de proteína por el método de Lowry

Para realizar las curvas de crecimiento, cuantificar la producción específica de PHB y medir la actividad específica  $\beta$ -glucoronidasa, se necesita cuantificar proteína total por el método de Lowry. La proteína se determinó partiendo de una muestra de 1 ml de un cultivo de 48 horas. El paquete celular se lavó con 1 ml de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  (10 mM) y se resuspendió nuevamente en 1 ml de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ . Se tomaron 20  $\mu\text{l}$  de la suspensión celular en un tubo nuevo y se llevó a 200  $\mu\text{l}$  con  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ . Al mismo tiempo se corrió una curva de calibración usando Albúmina Sérica Bovina Sigma (1 mg/ml) en concentraciones crecientes, en 7 tubos se agregaron 1  $\mu\text{l}$ , 2  $\mu\text{l}$ , 4  $\mu\text{l}$ , 8  $\mu\text{l}$ , 16  $\mu\text{l}$ , 32  $\mu\text{l}$  y 64  $\mu\text{l}$  y se llevaron todos hasta 200  $\mu\text{l}$  con  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ , además se puso un tubo Blanco en el que solo se agregaron 200  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ .

A todos los tubos se les añadió 1ml de la solución reactiva (1% de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% en NaOH 0.1 N, 1% de Tartrato de Na y K al 2 %, y 98% de  $\text{CuSO}_4$  al 1 %) y se dejaron reposar 10 minutos a temperatura ambiente, después se les agregó 0.1 ml de reactivo Folin 1:1 con agua y se dejaron reposar 30 minutos a temperatura ambiente para posteriormente leer absorbancia a 625 nm.

## 6.11 BÚSQUEDA DE SITIOS CONSERVADOS

El algoritmo MEME (Bailey & Elkan, 1994) fue utilizado para la predicción de posibles sitios de unión. Se usaron a partir de las regiones 5' de todos los ortólogos al regulador Avin\_33510 de *Azotobacter vinelandii*, se ejecuta un ciclo que contiene un algoritmo EM (maximización de la esperanza) que es ejecutado repetidamente con diferentes posiciones de inicio. Los puntos de inicio son derivados de las subsecuencias las cuales ocurren dentro de las secuencias de entrada. Cada corrida de EM produce un modelo probabilístico de un posible motivo compartido. El punto de inicio con la mayor verosimilitud es elegido y EM se ejecuta hasta su convergencia a partir de este punto inicial. Finalmente, el modelo del motivo compartido es desplegado.

# 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

## 7.1 ANÁLISIS *in silico* DE LOS GENES *phbF* y *phbP1*

Para analizar el papel del posible regulador PhbF en el control de la depolimerización de PHB, primero se realizó una búsqueda de ortólogos del gen *phbF* a través de la página web <http://operons.ibt.unam.mx/gctNG/index.jsp>, de las bacterias que tienen un ortólogo de *phbF* (también denominado *phaR* o *aniA*, Figura 14) se eligieron aquellas que también contienen el ortólogo del gen *phbP1*. Esto para saber si dichos genes se encuentran conservados y si esto pudiera sugerir si el modelo de regulación descrito en *R. eutropha* también estaría conservado y pudiera ocurrir en *A. vinelandii*.

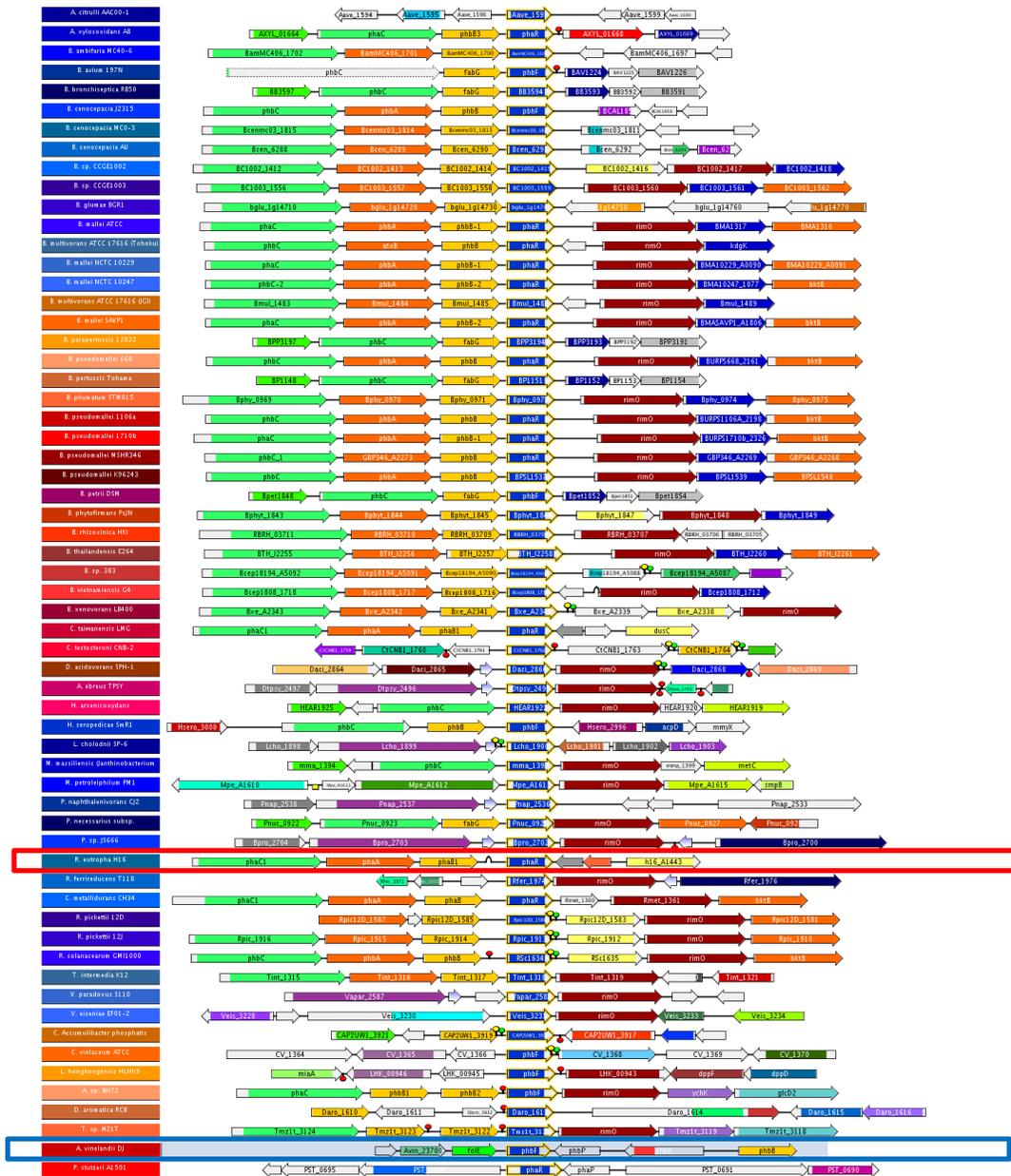
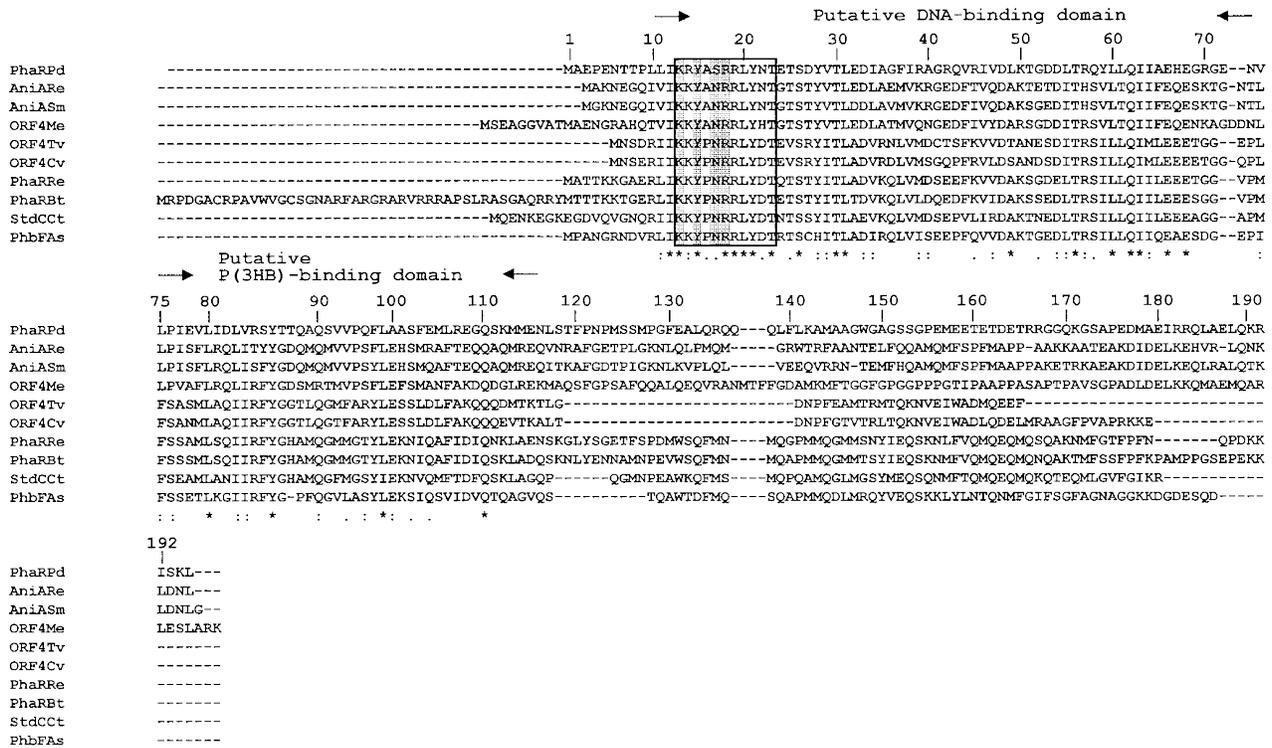


Figura 14. Genes ortólogos al gen *phbF* de *A. vinelandii* (azul), donde se aprecia *phaR* de *R. eutropha* (rojo).

Entre los resultados se puede encontrar a *R. eutropha*, así como otras bacterias en las cuales está presente el modelo de regulación PhbF-PhbP antes descrito y cuyos reguladores PhaR reportan mayor similitud tanto en el dominio de unión a DNA como en el dominio de unión a PHB (Figura 15).

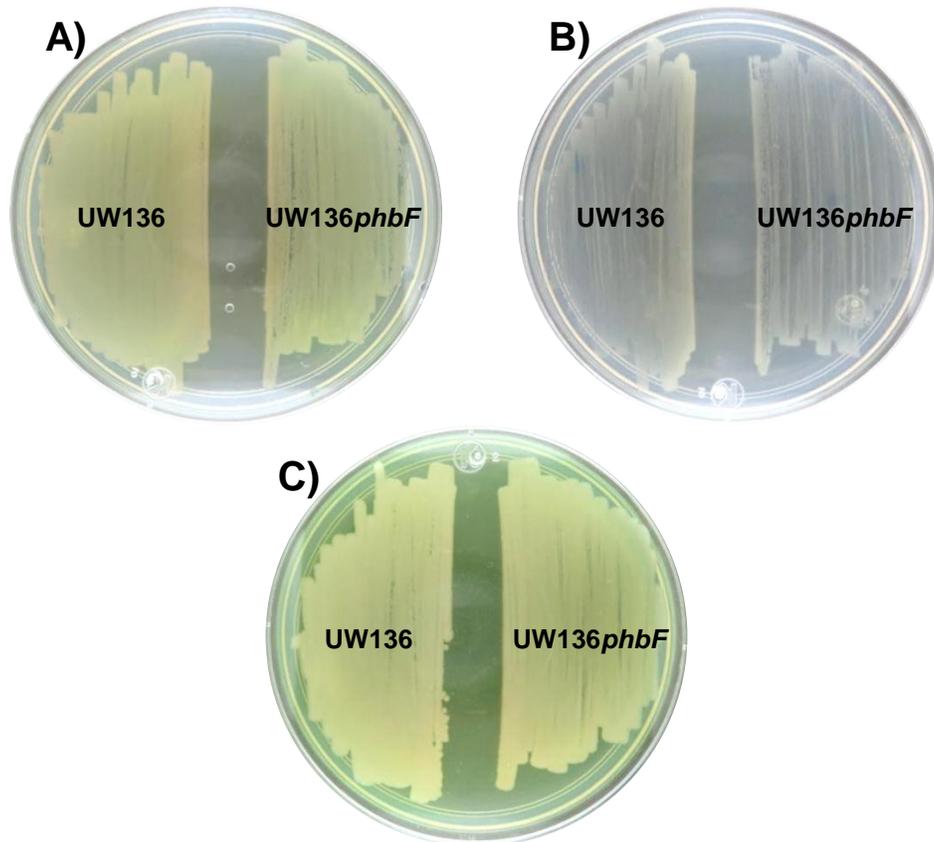


**Figura 15.** Alineamiento de secuencias homólogas a PhaR. PhaRPd, PhaR de *P. denitrificans*; AniARe, AniA de *R. etli*; AniASm, AniA de *S. meliloti*; ORF4Me, ORF4 de *Methylobacterium extorquens* AM1; ORF4Tv, ORF4 de *Thiocystis violacea*; ORF4Cv, ORF4 de *Chromatium vinosum*; PhaRRe, PhaR de *R. eutropha*; PhaRbt, PhaR de *Burkholderia thailandensis* E264; StdCct, StdC de *Comamonas testosteroni*; PhbFAs, PhbF de *Azotobacter* sp. FA8. (Yamada *et al.*, 2007)

Este resultado nos alienta a pensar que el sistema de regulación se lleva a cabo de manera similar a los reportados y a continuar con los análisis fenotípicos.

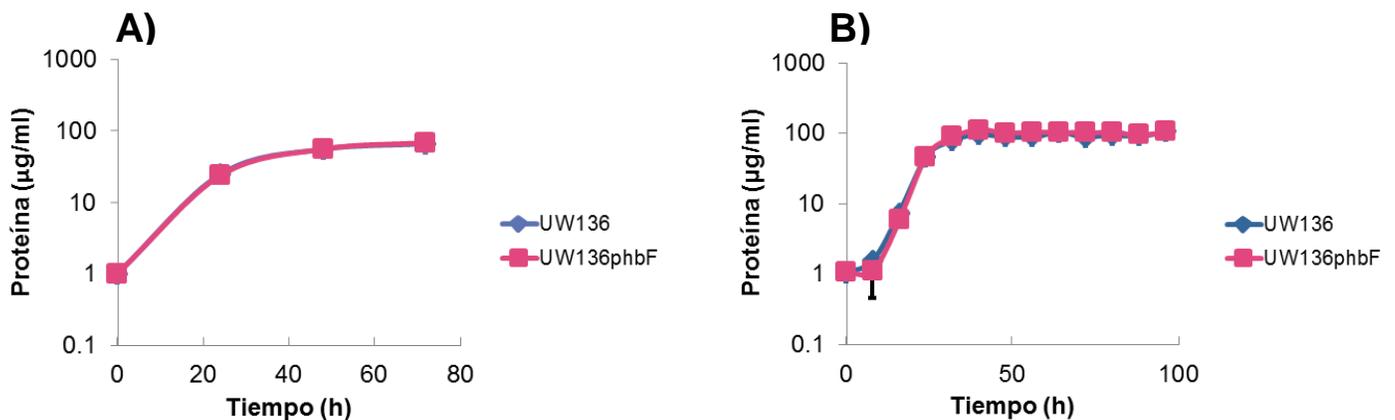
## 7.2 ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LA CEPA MUTANTE UW136PhbF Y LA SILVESTRE UW136

Para evaluar la participación del regulador PhbF en la síntesis de PHB, se analizó el fenotipo de la cepa mutante UW136phbF, en tres medios sólidos diferentes. El primero es medio mínimo Burk-Sacarosa (BS), donde se crece a *A. vinelandii* regularmente (Figura 16A). El segundo es medio rico Peptona-Extracto de levadura-Sacarosa (PYS), el cual se utiliza para observar la acumulación de PHB (Figura 16B), y por último se creció en medio mínimo Burk-Glucosa (BG), donde se observa de forma más evidente la degradación de PHB por tener una menor concentración de fuente de carbono (Figura 16C).



**Figura 16.** Fenotipo de producción de PHB en medio sólido de las cepas UW136 y UW136*phbF*. A) Medio BS, B) medio BG y C) medio PYS a las 72 horas de incubación.

Se analizó el fenotipo de acumulación de PHB en las placas desde las 24 hasta las 120 horas; sin embargo, en placa y a simple vista no se apreciaron cambios en el fenotipo de opacidad (acumulación del polímero) por lo que no se realizó la extracción y cuantificación de PHB de esos cultivos. Debido a que no se observaron cambios en la producción de PHB en ambas cepas en medio sólido, se procedió a cuantificar PHB de ambas cepas en medio líquido PYS y BS.



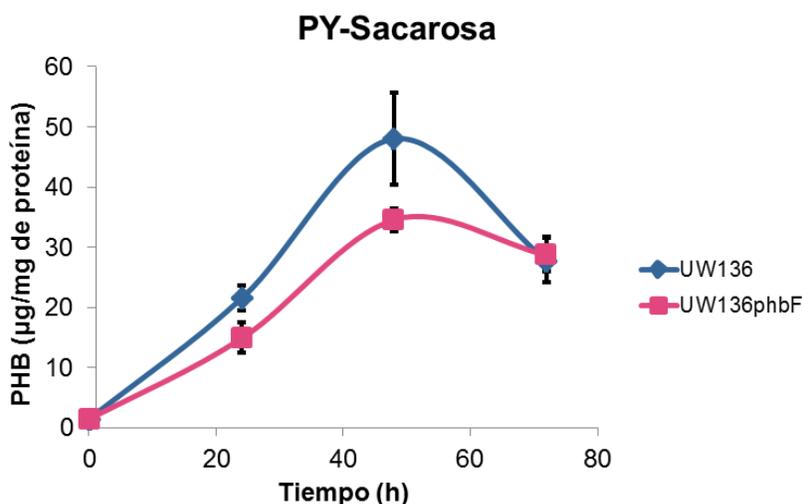
**Figura 17.** Cinética de crecimiento de las cepas UW136 y UW136*phbF* en medio líquido A) PYS y B) BG.

Por un lado, se crecieron las cepas UW136 y UW136*phbF* en medio PYS para cuantificar el PHB acumulado, y por otro, se crecieron en medio BG para estudiar el proceso de degradación de PHB. Antes de cuantificar la producción de PHB, se procedió a realizar cinética de crecimiento en la cepa mutante y silvestre para determinar si la mutación en el regulador tiene algún efecto sobre el crecimiento (Figura 17).

En el cultivo crecido en medio PY, se tomaron muestras cada 24 horas (Figura 17A) mientras que en el cultivo en BG se tomaron cada 8 horas, esto debido a que *A. vinelandii* crece más lento en este último, y si la mutación en el gen *phbF* tiene algún efecto sobre el crecimiento se podrían apreciar mejor las diferencias entre la cepa mutante UW136*phbF* con respecto a la silvestre UW136 (Figura 17B). Al observar las gráficas se puede apreciar que en ambos medios y en ambas cepas existe un patrón de crecimiento similar entre la cepa silvestre y la cepa mutante, lo que sugiere que la mutación en el gen *phbF* no tiene efecto en el crecimiento en *A. vinelandii*.

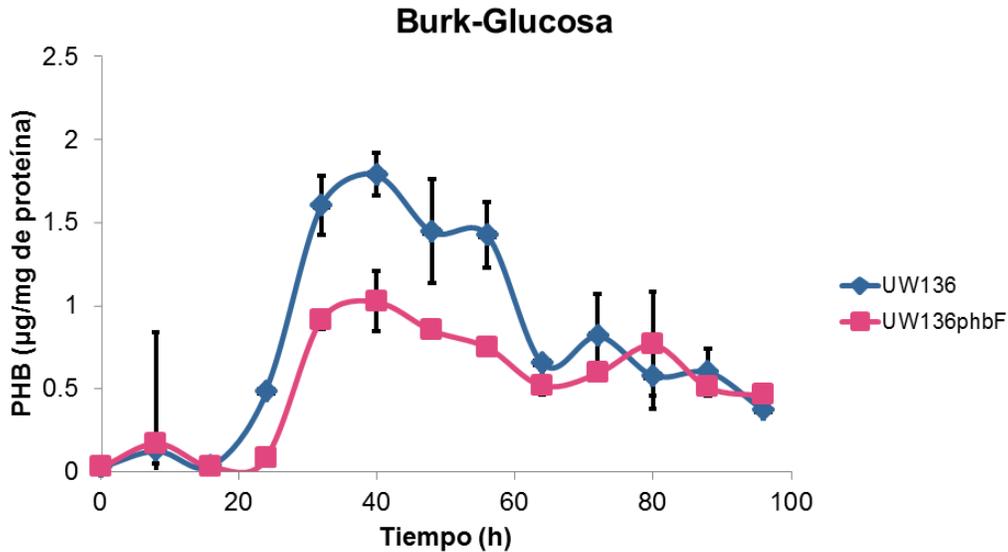
Una vez analizado el patrón de crecimiento y habiendo determinado que no hay diferencias entre ambas cepas, se procedió a determinar si existen cambios en la acumulación de PHB en ambas cepas, usando dos diferentes medios de cultivo. Las muestras fueron tomadas en los mismos intervalos de tiempo que para la cinética de crecimiento, cada 24 horas en los cultivos con medio PYS (Figura 18) y cada 8 horas en los cultivos con medio BG (Figura 19), esto para poder comparar la cantidad de PHB acumulado con respecto a la cantidad de proteína y realizar una curva de producción específica de PHB.

A pesar de que las cepas crecidas en el medio BG (Figura 19) acumularon menos PHB que las crecidas en el medio PYS (Figura 18), en ambas gráficas se observó que la cepa UW136*phbF* acumuló menos PHB que la cepa silvestre UW136, lo cual sugiere que la mutación en el regulador PhbF podría estar afectando el balance entre síntesis y movilización de PHB.



**Figura 18.** Producción específica de PHB en las cepas UW136 y UW136*phbF* crecidas en medio líquido PYS.

Se puede observar que la diferencia en la acumulación de PHB de la cepa mutante con respecto a la silvestre es mayor si se crecen las cepas en medio BG que si se crecen en el medio PYS, además de que en el medio BG se observa con mayor claridad el momento en el que ambas cepas dejan de acumular el polímero (Figura 19).



**Figura 19.** Producción específica de PHB en las cepas UW136 y UW136*phbF* crecidas en medio líquido BG.

La diferencia en la acumulación de PHB entre ambas cepas podría resultar de dos escenarios: el primero es que se sintetice una menor cantidad de PHB en la cepa con la mutación en *phbF* y el segundo es que hay mayor movilización de PHB en esa cepa, ambos darían como resultado una menor acumulación de PHB en la cepa UW136*phbF*. Sin embargo, debido a los antecedentes de que el regulador PhbF puede estar involucrado en la movilización de PHB y tiene un posible sitio de unión en la región reguladora de los genes *phbP1*, *phbP2* y *phbZ1*, se decidió examinar el segundo escenario a través del análisis de la expresión de esos genes.

### 7.3 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *phbZ1*, *phbP1* Y *phbP2* EN LA MUTANTE UW136*phbF*

Para determinar si el fenotipo de disminución en la acumulación de PHB de la cepa UW136*phbF* se debe a que PhbF regula la expresión de la depolimerasa PhbZ1 y las proteínas phasinas PhbP1 y PhbP2, se realizaron las cuantificaciones por qRT-PCR de los transcritos correspondientes. En la figura 17 hay un pico de acumulación del PHB en ambas cepas a las 40 horas y posteriormente la acumulación empieza a decaer. Tomando esto en cuenta, para determinar si existen cambios en el perfil de expresión en el momento en que la acumulación va en aumento y cuando empieza a disminuir, se realizó una cuantificación de la expresión de los genes *phbZ1*, *phbP1* y *phbP2* mediante RT-qPCR tomando muestras 8 horas antes y 8 horas después del pico de acumulación de

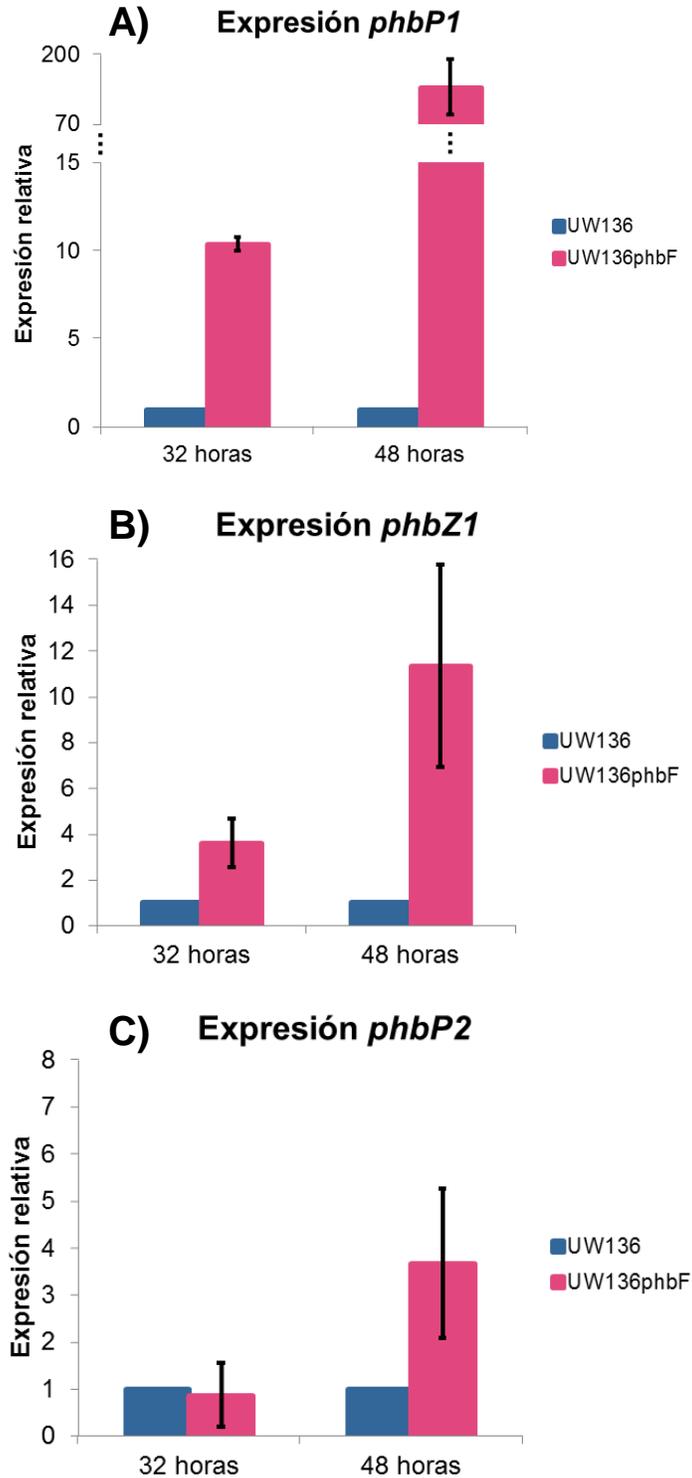
PHB (32 y 48 horas) para determinar si existe algún cambio en el perfil de expresión en el momento en que la acumulación va en aumento y cuando empieza a disminuir.

En experimentos anteriores en el laboratorio, se ha visto que cuando *A. vinelandii* se crece en el medio rico PY, las cuantificaciones de expresión de genes mediante RT-qPCR presentan desviaciones estándar muy grandes comparadas con mediciones en las que la bacteria es crecida en medio mínimo. Debido a este fenómeno, se decidió realizar el experimento creciendo ambas cepas, UW136 y UW136*phbF*, únicamente en el medio mínimo BG, mismo que se utilizó para observar acumulación de PHB en el punto anterior.

El análisis de la expresión de los genes mencionados con anterioridad arrojó que, en ausencia del regulador PhbF, la expresión del gen *phbP1* aumentó 10 veces a las 32 horas mientras que a las 48 horas aumentó hasta casi 140 veces (Figura 20A). Esto concuerda con el modelo de regulación determinado en otras bacterias, en el que PhaR, homólogo a PhbF, regula de manera negativa la expresión de la phasina PhaP durante la síntesis y formación del gránulo de PHB.

Con respecto a la expresión del gen *phbZ1*, se observó que también aumentó en la cepa mutante UW136*phbF* con respecto a la cepa silvestre UW136. A las 32 horas aumentó 4 veces mientras que a las 48 horas, más de 10 veces (Figura 20B). Este resultado nos indica que la expresión del gen *phbZ1* es más activa después del pico de acumulación de PHB en la célula, lo cual es lógico porque este gen codifica para una PHB depolimerasa que degrada el polímero y eso explicaría la disminución en la acumulación de PHB después de las 40 horas. También, al igual que con el gen *phbP1*, parece ser que la expresión de la PHB depolimerasa PhbZ1 está regulada por PhbF pero queda aclarar si dicha regulación se lleva a cabo de manera directa, a través del posible sitio de unión que se ha identificado, o de manera indirecta.

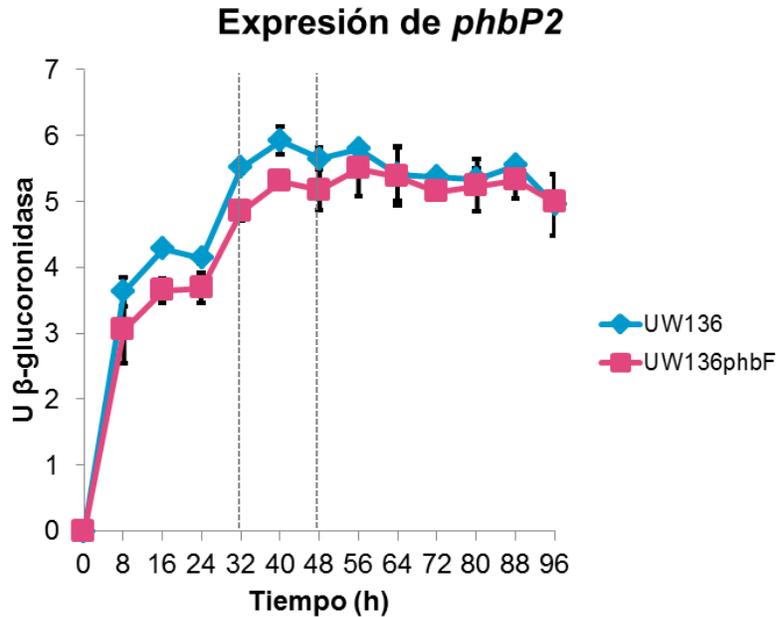
Por otra parte, también se cuantificó la expresión del gen *phbP2* debido a que comparte la región reguladora en contrasentido con el gen de la PHB depolimerasa *phbZ1*. Como se puede apreciar en la figura 20C, a las 32 horas no hubo diferencia en la expresión de *phbP2* entre la cepa mutante UW136*phbF* y la cepa silvestre UW136, sin embargo la expresión se vio incrementada a las 48 horas mostrando una regulación negativa por parte de PhbF, lo que podría indicar que quizás la expresión de *phbP2* está sujeta a regulación adicional que interfiere con el efecto de PhbF a las 32 horas. Para corroborar este resultado se determinó la expresión de *phbP2* midiendo la actividad enzimática  $\beta$ -glucoronidasa en ambas cepas con la fusión transcripcional *phbP2-gusA* en la cual, el promotor del gen *phbP2* y su región reguladora se encuentran fusionados a la región codificante del gen reportero *gusA* que codifica para la  $\beta$ -glucoronidasa. Se realizó una cinética para determinar el patrón de expresión de *phbP2*.



**Figura 20.** Cuantificación por qPCR de la expresión de los genes (A) *phbP1*, (B) *phbZ1* y (C) *phbP2* en las cepas UW136 y UW136*phbF* crecidas en medio BG a las 32 y a las 48 horas.

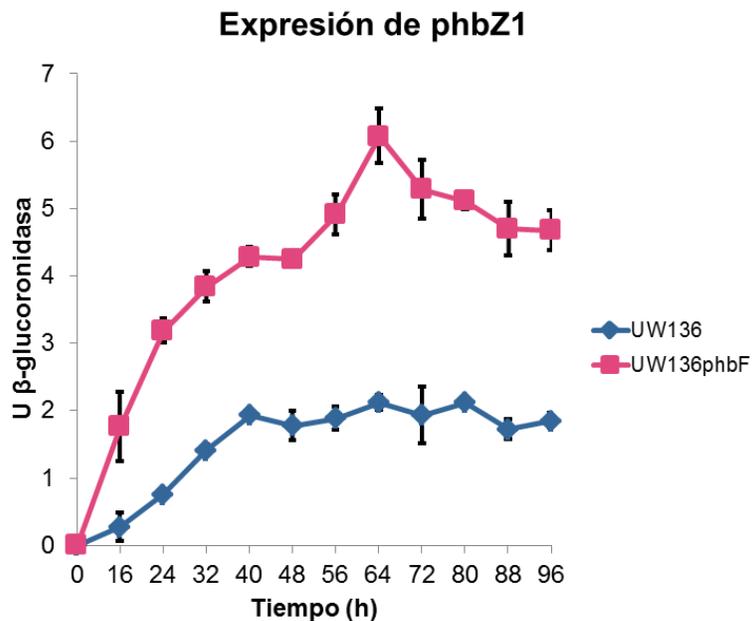
A diferencia de lo observado en el experimento de RT-qPCR, en las cuantificaciones de actividad enzimática  $\beta$ -glucoronidasa de la fusión *phbP2-gusA* se obtuvo una menor actividad de las fusiones que se encuentran en la cepa UW136*phbF*

con respecto a la actividad de las fusiones en la cepa UW136, desde el inicio de la cinética hasta llegar a las 40 horas y a partir de las 48 horas no se detectó diferencia alguna entre la actividad de las fusiones de ambas cepas (Figura 21).



**Figura 21.** Cinética de expresión de la fusión transcripcional *phbP2-gusA*.

Para tener un comparativo, se realizó una cinética con la fusión *phbZ1-gusA* (Figura 22), que utiliza el mismo fragmento de DNA en el que se encuentran los promotores de ambos genes.



**Figura 22.** Cinética de expresión de la fusión transcripcional *phbZ1-gusA*.

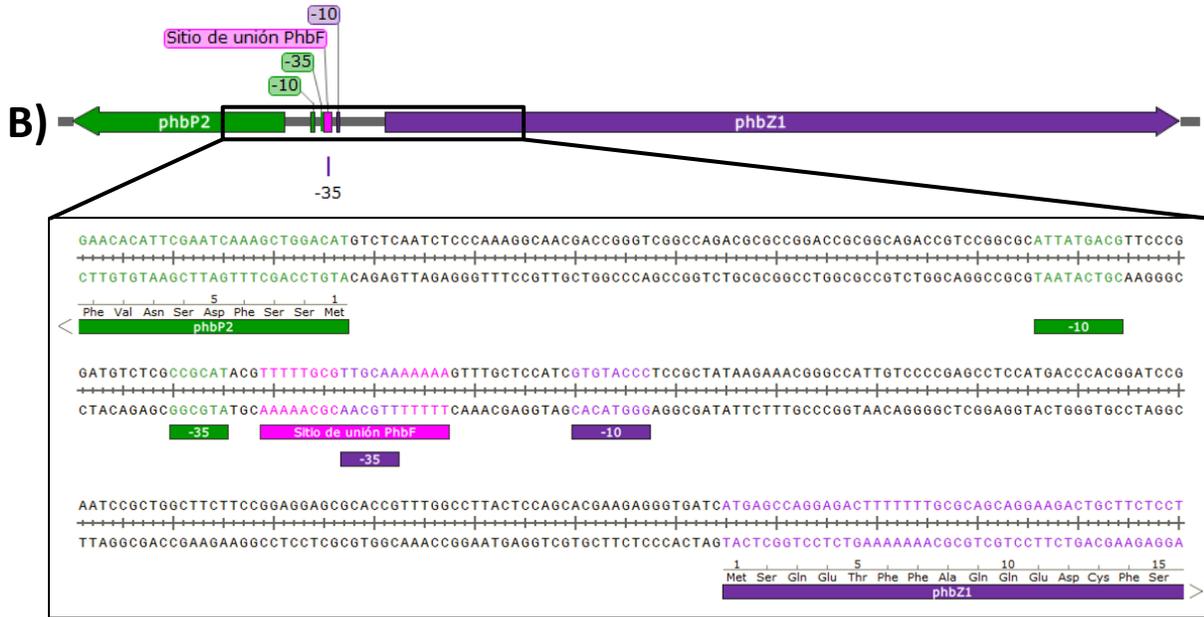
Se puede observar que el patrón de actividad de la fusión *phbZ1-gusA* es similar al patrón de expresión de *phbZ1* obtenido mediante RT-qPCR, en cuanto a que se ve aumentada la expresión de *phbZ1* en la cepa UW136*phbF* con respecto a la cepa silvestre UW136. Algo interesante, es que hay un pico en la actividad a las 64 horas que coincide con el de la figura 19, en donde se ve que la acumulación de PHB disminuye drásticamente.

Los resultados anteriores no permiten concluir si PhbF por sí solo tiene un rol regulador sobre el gen de la phasina PhbP2, podría suceder que existan otros mecanismos de regulación diferentes a PhbF y que actúen a distintos niveles. Sin embargo, los datos mostrados sugieren que PhbF tiene un efecto regulador negativo sobre los genes *phbP1* y *phbZ1*, ya que su expresión se vio afectada positivamente en la mutante UW136*phbF*, por lo que se procedió a establecer si la regulación es directa o no.

#### 7.4 ENSAYOS DE INTERACCIÓN TIPO EMSA CON LA PROTEÍNA PhbF Y LA REGIÓN REGULADORA DE LOS GENES *phbZ1*, *phbP1*, *phbP2* y *phbF*

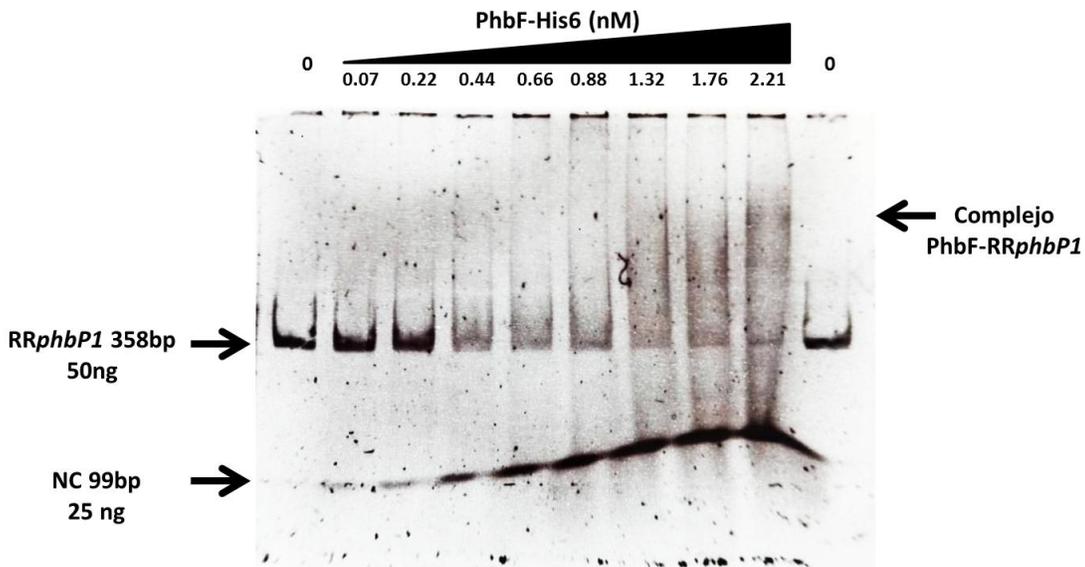
Como se mencionó anteriormente, se han identificado posibles sitios de unión del regulador PhbF en la región reguladora del gen *phbP1* y en la región intergénica de los genes *phbZ1* y *phbP2* (Figura 23). Esto, sumado al resultado de la RT-qPCR hace pensar que la regulación podría ser directa.





**Figura 23.** Posibles sitios de unión a PhbF en el promotor del gen *phbP1* (A) y en la región intergénica *phbZ1-phbP2* (B) en *A. vinelandii*.

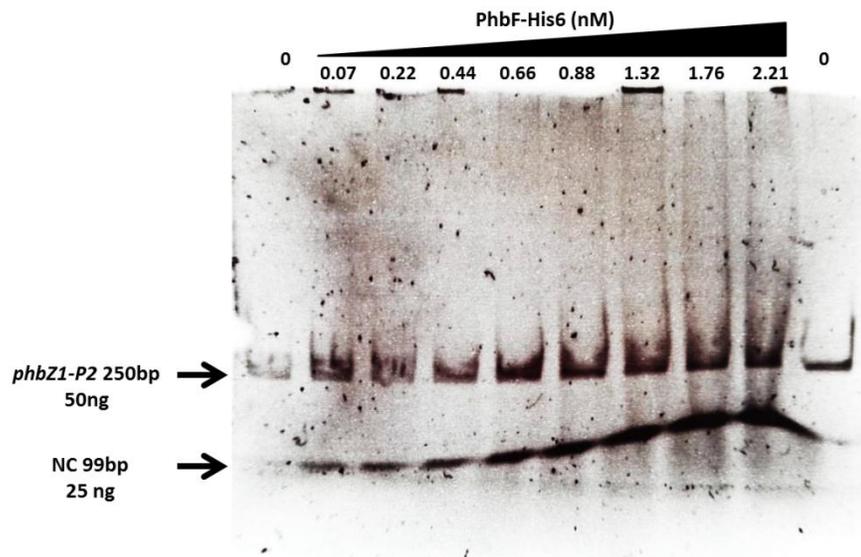
Con el fin de corroborar la idea anterior, se decidió realizar ensayos de movilidad electroforética EMSA (geles de retardo), utilizando la región reguladora de los genes *phbZ1-phbP2*, y *phbP1*, y la proteína PhbF purificada. Para esto, se clonó la región estructural de la proteína PhbF en el vector de expresión pET21a+ que le agrega una cola de Histidinas a la región C-terminal de la proteína (el sitio de unión a DNA de PhbF se encuentra más cerca de la región N-terminal) para purificarla en una columna de Níquel; también se clonaron las regiones reguladoras antes mencionadas, en el vector pJET1.2.



**Figura 24.** Ensayo de retardo en la movilidad electroforética utilizando concentraciones crecientes de la proteína PhbF con la región reguladora del gen *phbP1*.

En el ensayo EMSA de la figura 24 se nota que, a partir del cuarto carril, hay un barrido conforme aumenta la concentración de proteína y se forma una mancha que correspondería al retardo en el corrimiento del fragmento de DNA por la unión de PhbF con la región reguladora del gen *phbP1*. Esto comprueba que, en *A. vinelandii*, la proteína PhbF regula de manera directa la expresión del gen *phbP1* al unirse a su región reguladora y reprimir su transcripción.

Para el segundo ensayo EMSA, se pusieron a interaccionar la proteína PhbF con la región intergénica *phbZ1-phbP2* que contiene las regiones reguladoras de ambos genes. En la figura 25 se observa que el fragmento de DNA correspondiente con la región reguladora *phbZ1-phbP2* no presenta un corrimiento ni disminución en la cantidad de DNA con respecto al control sin PhbF, sin embargo, quedaría pendiente repetir el experimento con una concentración un poco mayor de proteína para precisar si en verdad se lleva a cabo el retardo y existe interacción de la proteína PhbF y la región de regulación de *phbz1-phbP2*.



**Figura 25.** Ensayo de retardo en la movilidad electroforética utilizando concentraciones crecientes de la proteína PhbF con la región reguladora que comparten los genes *phbZ1* y *phbP2*.

## 7.5 ANÁLISIS *In silico* DE LOS GENES *Avin\_33500* Y *Avin\_33510*



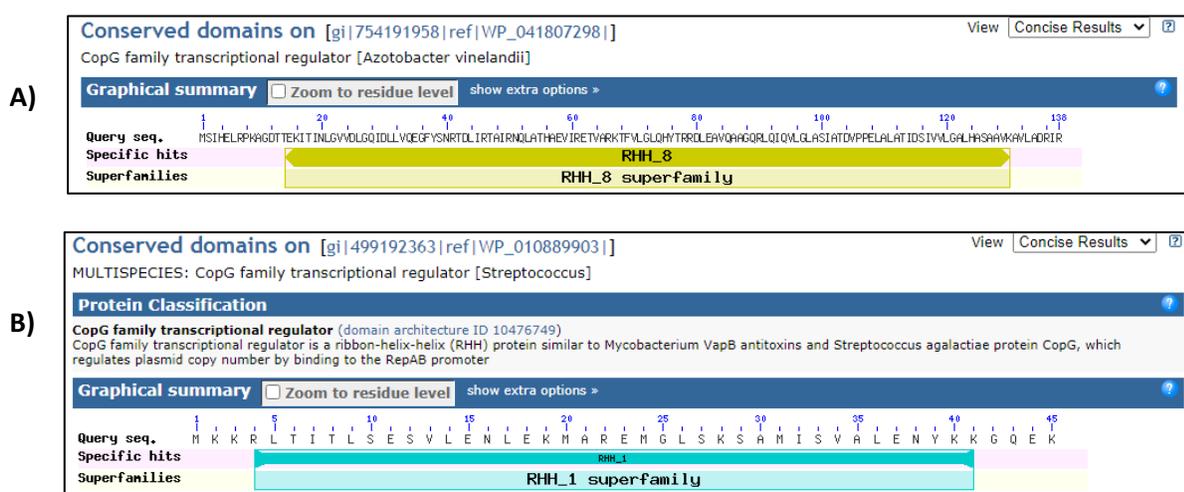
**Figura 26.** Promotores encontrados con SoftBerry.

Con respecto al regulador *Avin\_33510*, se realizó un análisis de la secuencia del locus que lo contiene. Se observó una región intergénica muy pequeña entre *Avin\_33510* y *Avin\_33500*, de apenas 31 pb, y una búsqueda de promotores con el software



Softberry, localizó dos potenciales promotores. El primero se localiza a 32 pb río arriba de la región codificante del gen *Avin\_33510*, y el segundo se encontró 334 pb río arriba del gen *Avin\_33500*, superpuesto a la región codificante de *Avin\_33510* (Figura 26).

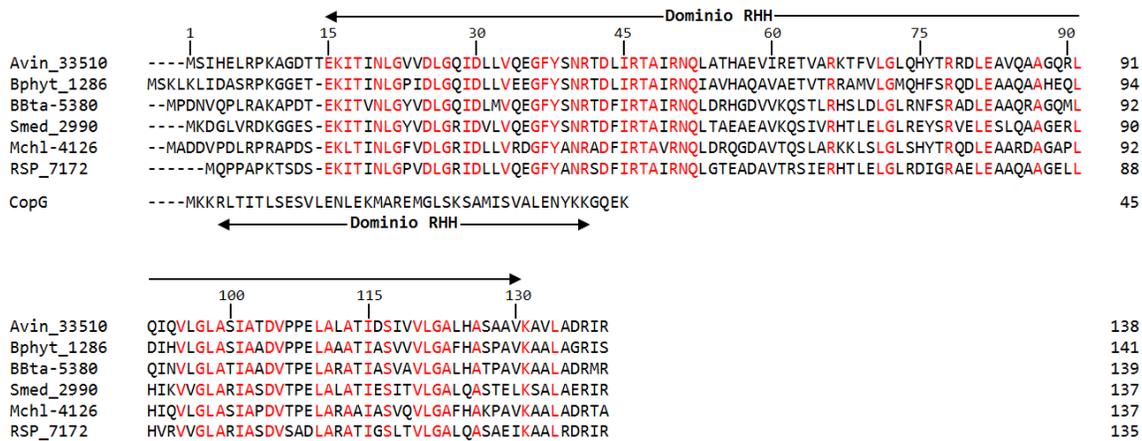
Como se mencionó anteriormente, ya están reportadas las características generales de los reguladores de la familia CopG y, dado que no están reportados más que para la regulación de número de copias de plásmidos, se decidió realizar una búsqueda de ortólogos del gen *Avin\_33510* para observar su disposición y el contexto genético, e investigar si también están ligados a posibles genes de metabolismo de PHB o a otros procesos. Curiosamente, ninguno de los genes ortólogos encontrados tiene localizado cerca al gen *repB* o algún gen homólogo relacionado con la replicación de plásmidos, como se ha reportado. En la mayoría de los ortólogos se localiza adyacente un gen de PHB depolimerasa o de esterasa que pertenece a la familia de las PHB depolimerasas (Figura 27), además, todos tienen una región intergénica pequeña.



**Figura 28.** Dominios conservados identificados en la proteína (A) *Avin\_33510* y en (B) CopG, en la base de datos de NCBI.

Otro hecho peculiar fue que, tras observar individualmente cada ortólogo encontrado, ninguno corresponde con los reguladores ya caracterizados experimentalmente de la familia CopG. Esto nos llevó a revisar las diferencias entre la proteína *Avin\_33510* y en el regulador CopG de *Streptococcus agalactiae*, que es el regulador mejor caracterizado, que los distinguieran uno de otro. Observando la secuencia de aminoácidos de cada proteína, la primera diferencia entre ambas proteínas es que *Avin\_33510* es mucho más grande que CopG (Figura 28), *Avin\_33510* tiene una cadena de 138 aminoácidos mientras que CopG solo 45 aminoácidos, siendo esta última la proteína más pequeña reportada en microorganismos (Del Solar *et al.*, 2002). Indagando en la base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information) en búsqueda de dominios conservados, podemos observar que ambas proteínas poseen un dominio RHH con la diferencia de que el dominio de CopG (Figura 28B) es más corto que el de *Avin\_33510* (Figura 28A).

Al realizar un alineamiento mediante el algoritmo BlastP utilizando como base la secuencia de la proteína Avin\_33510, se observó que entre algunas proteínas con mayor similitud se encuentran las que están codificadas por los genes ortólogos a *Avin\_33510* de la figura 27 y pertenecen a bacterias productoras de PHAs. En los reguladores con dominios RHH, la región que se une al DNA es la hoja  $\beta$  que está al inicio del dominio y es la más conservada (Schreiter & Drennan, 2007), por lo que sería posible que los residuos 15 al 45 de Avin\_33510 conformen la hoja  $\beta$ . Se puede notar también al compararla con CopG, que el dominio RHH es de distinto tamaño (Figura 29).



**Figura 29.** Alineamiento de secuencias homólogas a Avin\_33510. Bphyt\_1286 es el homólogo en *Paraburkholderia phytofirmans* PsJN, BBta-5380 en *Bradyrhizobium* sp. BTAi1, Smed\_2990 en *Sinorhizobium medicae* WSM419, Mchl-4126 en *M. extorquens* CM4 y RSP\_7172 en *R. sphaeroides* 2.4.1.

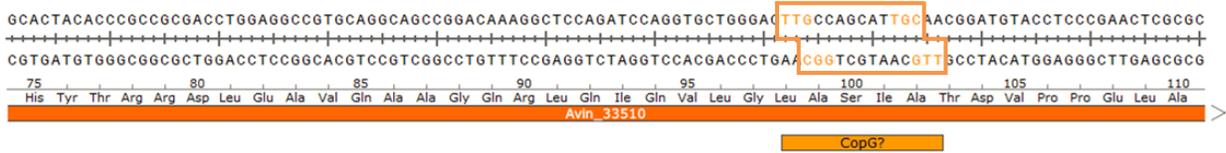
La información recabada sugeriría que existe un grupo de reguladores de la familia CopG que no se han estudiado en la literatura y que no participan en el proceso de replicación de plásmidos, sino que podrían estar involucrados en la regulación del metabolismo de PHB al encontrarse río arriba de genes de la familia de las PHB depolimerasas.



**Figura 30.** Sitio de unión a CopG con las bases de contacto encerradas en rectángulos (Del Solar *et al.*, 2002).

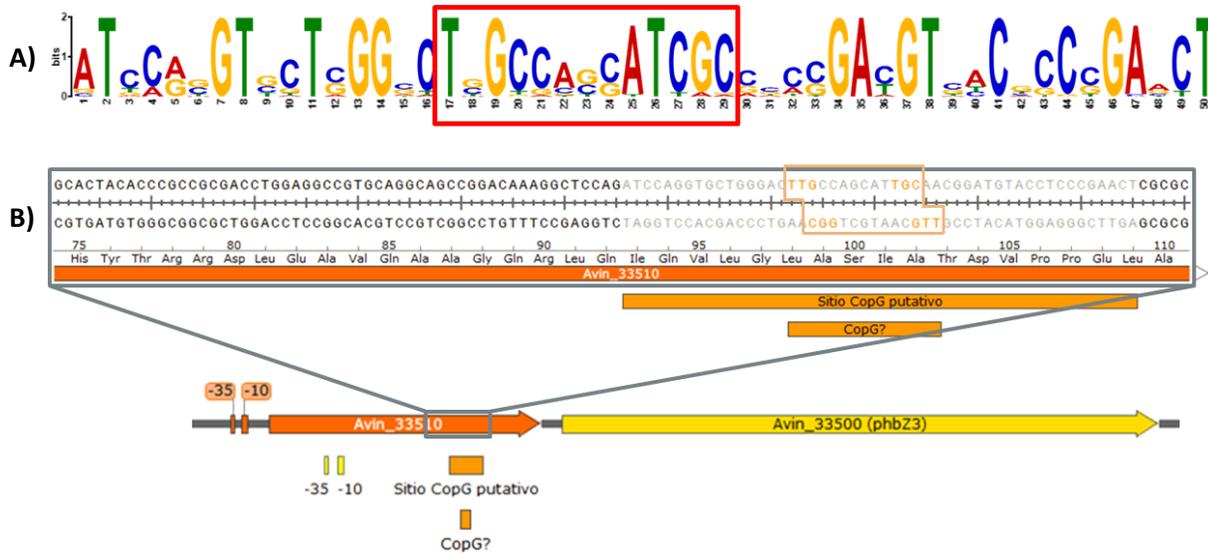
Una vez hecha la distinción entre los reguladores CopG que participan en replicación de plásmidos y los que posiblemente participan en metabolismo de PHB, se decidió determinar si la regulación que llevan a cabo estos últimos es similar a la que llevan a cabo los primeros, que funcionan como represores. Tomando en cuenta que todos los ortólogos a *Avin\_33510* poseen el dominio de dimerización RHH, se planteó realizar una búsqueda del posible sitio en el DNA al que se uniría la proteína para reprimir a sus blancos. El sitio que se encuentra conservado tanto en el propio promotor de los

reguladores CopG reportados como en el promotor del gen *repB* que es el gen que, generalmente es regulado y se encuentra río abajo, se ilustra en la figura 30.



**Figura 31.** Sitio encontrado en búsqueda manual de sitios CopG.

Se inició con una búsqueda manual del posible sitio dentro de la secuencia de los genes *Avin\_33500* y *Avin\_33510*, y se encontró una región similar al consenso reportado (Figura 30), con las bases que hacen contacto con la proteína, conservadas, pero que difiere en las bases intermedias (Figura 31). Contrario a lo reportado, el sitio identificado no se encuentra sobre la región -35 de ninguno de los dos posibles promotores encontrados antes, sino que se encuentra sobre la región codificante del gen *Avin\_33510*, río abajo de ambos promotores y río arriba del inicio del gen *Avin\_33500*.



**Figura 32.** Resultados de la búsqueda de sitios de unión a CopG. (A) Sitio conservado en ortólogos de *Avin\_33510*, encerradas en rojo están las bases que corresponderían al sitio de unión CopG. (B) Sitio conservado dentro del gen *Avin\_33510*.

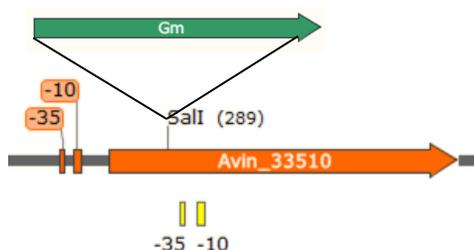
Para corroborar este hallazgo, se realizó una búsqueda bioinformática de sitios conservados en los ortólogos de *Avin\_33510* encontrados anteriormente a través del algoritmo MEME y se encontró una región conservada de 30 pb dentro de la cual se encuentra el sitio hallado de forma manual (Figura 32). De manera interesante, el sitio encontrado presenta ciertas diferencias con el sitio reportado en la bibliografía ya que no se encuentra sobre ni cerca del sitio -35 de alguno de los dos posibles promotores y una de las bases de contacto que se reportan (Figura 30) no está conservada, lo que hace pensar en dos posibilidades: la primera es que, probablemente, el sitio de unión putativo a CopG en los ortólogos a *Avin\_33510* es un poco distinto al sitio reportado en los

reguladores del número de copias de plásmidos pero conserva cierta similitud; y la segunda es que se trate de un motivo conservado pero que no sea un sitio de unión a la proteína.

Los resultados anteriores sugieren que tanto *Avin\_33510* como sus ortólogos pertenecen a un grupo diferente de reguladores de la familia CopG que no estarían involucrados en la regulación de replicación de plásmidos sino en metabolismo de PHB. A continuación se decidió analizar el fenotipo de acumulación de PHB y los patrones de expresión del gen de la PHB depolimerasa *Avin\_33500* en la mutante OP33510 para determinar si este regulador, efectivamente, podría controlar esos procesos.

## 7.6 ANÁLISIS FENOTÍPICO DE LA CEPA MUTANTE OP33510 Y LA SILVESTRE OP

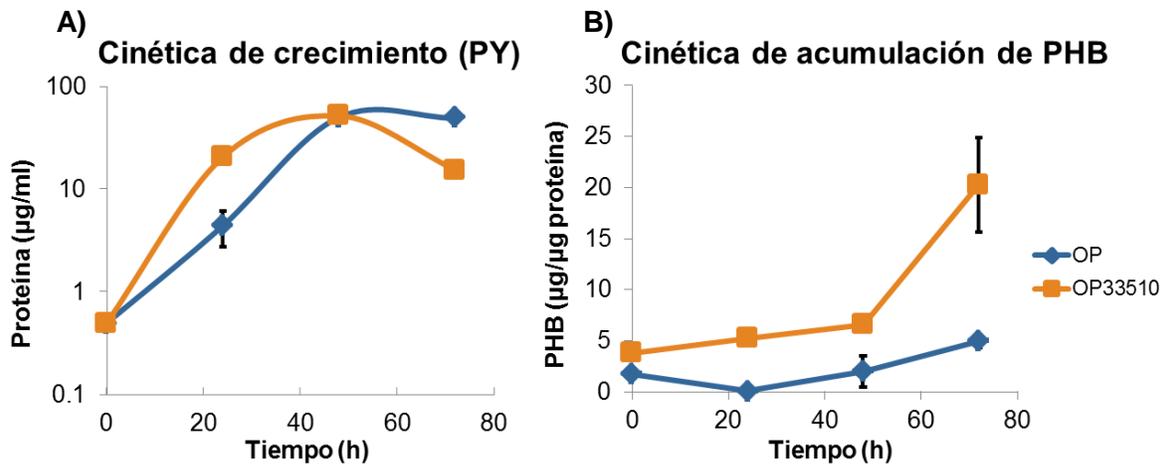
Para iniciar con el análisis fenotípico, se trabajó con las cepas OP33510 (u OP33510NP) y OP33510P, las cuales tienen insertado un casete de resistencia a gentamicina en un sitio Sall dentro de la región codificante del gen *Avin\_33510* (Figura 33), que se encuentra entre los dos promotores encontrados con Softberry sin sobrelapar a ninguno.



**Figura 33.** Representación del sitio de inserción del casete de resistencia a gentamicina en la cepa OP33510.

La cepa OP33510 tiene el casete insertado en el mismo sentido del gen *Avin\_33510*, por lo que la transcripción continúa río abajo del casete; mientras que la cepa OP33510P lo tiene insertado en la dirección inversa, lo que hace que la transcripción se detenga al llegar al casete.

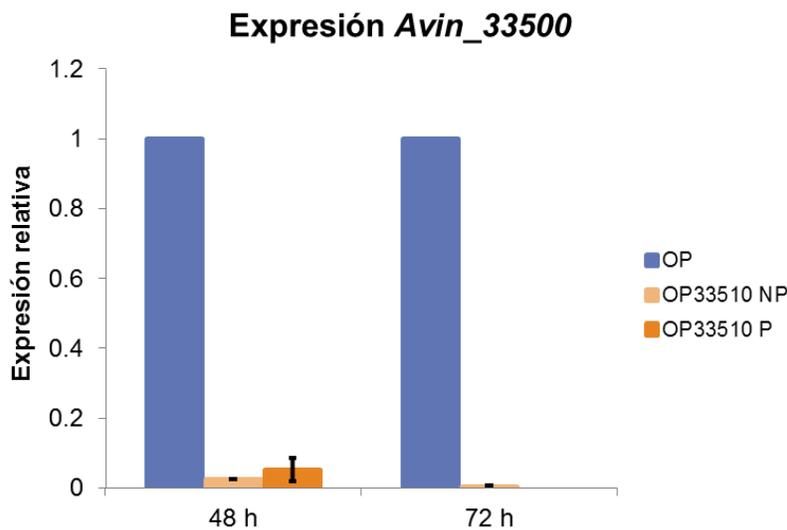
Se empezó trabajando con las dos cepas disponibles, OP y OP33510, las cuales se sembraron en medio rico PYS y se tomaron muestras del cultivo a las 24, 48 y 72 horas para analizar el crecimiento y la cuantificación de PHB. En la figura 34A se puede apreciar una diferencia en el crecimiento de ambas cepas a las 24 y a las 72 horas, sin embargo, la cantidad de PHB acumulado siempre es mayor en la cepa mutante OP33510 incluso a las 48 horas, cuando parece haber la misma cantidad de proteína en ambos cultivos, lo que indica que, a pesar de las diferencias en la curva del crecimiento, la ausencia del regulador en la mutante OP33510 provoca una mayor acumulación de PHB con respecto a la cepa silvestre OP (Figura 34B).



**Figura 34.** Cinética de crecimiento (A) y de acumulación de PHB (B) en la cepa silvestre OP y la cepa OP33510.

Los datos anteriores nos dejan la pregunta: Dado que la acumulación de PHB resulta del balance entre la síntesis y la degradación, que se sabe que pueden ocurrir simultáneamente (Yan *et al.*, 2000), ¿la mutación de *Avin\_33510* afecta positivamente el proceso de síntesis o la degradación? Para esclarecer este resultado, de la misma forma que con las cepas UW y *UWphbF*, se analizó la expresión del gen de la PHB depolimerasa *Avin\_33500* que se encuentra río abajo del gen *Avin\_33510*.

## 7.7 ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *Avin\_33500* EN LA MUTANTE OP33510



**Figura 35.** Expresión del gen *Avin\_33500* en la cepa silvestre OP y en la mutante polar y no polar del gen *Avin\_33510*. Las determinaciones se realizaron por RT-qPCR

Para determinar si el regulador *Avin\_33510* controla la expresión de la PHB depolimerasa *Avin\_33500*, se diseñaron oligonucleótidos para cuantificar la expresión del

gen *Avin\_33500* por RT-qPCR en las tres cepas: OP, OP33510P y OP33510NP, que ya estaban disponibles. Se crecieron en medio mínimo BS y se tomaron muestras a las 48 horas, cuando hay una mayor acumulación de PHB, y a las 72 horas cuando empieza a disminuir. Los resultados se ilustran en la figura 35.

Se observó que en ambas mutantes OP33510P y OP33510NP, se abatió la expresión del gen de la PHB depolimerasa *Avin\_33500*, lo que concuerda con la hipótesis de que la mutación en el regulador *Avin\_33510* afecta negativamente la expresión de la depolimerasa *Avin\_33500*, incrementando la acumulación de PHB.

Este resultado es muy interesante por el hecho de que el regulador *Avin\_33510* parece controlar de manera positiva la expresión del gen *Avin\_33500*, contrario a los reguladores de la familia CopG reportados que actúan reprimiendo la expresión de sus genes blanco. Otro dato que apoyaría la idea de que *Avin\_33510* no es un regulador negativo, es que el sitio CopG encontrado no se encuentra sobre ningún promotor, por lo que, aparentemente, no impediría la transcripción de ninguno de los dos genes.

El hecho de que entre *Avin\_33510* y *Avin\_33500* exista una región intergénica tan pequeña y el hallazgo de los promotores con el software SoftBerry, planteó la duda sobre si los dos promotores son funcionales o si ambos genes están formando un operón controlado por el promotor que se encuentra río arriba de *Avin\_33510*, esto debido a la lejanía del segundo promotor al gen *Avin\_33500*.

Para esclarecer este último punto se propone como perspectiva realizar una búsqueda de inicio de la transcripción de los genes *Avin\_33500* y *Avin\_33510*, así como realizar un EMSA para determinar si el regulador *Avin\_33510* se une al sitio CopG encontrado en el gen *Avin\_33510*.

Para finalizar, se puede concluir que el regulador *Avin\_33510* no parece actuar como los reguladores CopG reportados, además de que parece ser un regulador positivo en lugar de uno negativo como los de esa familia. Esto nos hace preguntarnos si *Avin\_33510* y sus ortólogos realmente pertenecen a la familia CopG o en realidad están formando otro grupo de reguladores dentro de la superfamilia RHH ya que dentro de esta familia sí existen reguladores positivos reportados (Tabla 8).

Sería posible que todos los reguladores ortólogos a *Avin\_33510*, pertencieran al mismo grupo (ya sea dentro de la familia CopG o en una familia aparte dentro de la superfamilia de reguladores RHH) que podría tener un mecanismo de acción similar y actuar positivamente sobre genes involucrados con movilización de PHB. Esta idea es muy interesante y se plantea retomar en trabajos posteriores.

Nombre de la proteína y número de acceso*	Organismo o plásmido	Función	Tipo de regulador
Arc, P03050	Bacteriófago P22	Control de ciclo lítico del bacteriófago	Negativo
CopG, P13920	<i>Streptococcus</i> sp.	Control del número de copias del plásmido	Negativo
MetJ, P0A8U6	<i>Escherichia coli</i> y otras bacterias	Regulación de genes de biosíntesis de metionina AdoMet dependiente	Negativo
Omega, Q83UM6	Familia de plásmidos inc18 en bacterias Gram positivas	Control del número de copias del plásmido	Negativo
FitA, Q9RF92	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Antitoxina	Negativo
NikR, P0A6Z6	<i>E. coli</i> , <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Pyrococcus horikoshii</i> , otras bacterias y arqueas	Represión de recaptación de níquel Ni <sup>2+</sup> en <i>E. coli</i> , inducción de ureasa en <i>H. pylori</i>	Negativo en <i>E. coli</i> , negativo y positivo en <i>H. pylori</i>
CcdA, Q46995	Plásmido F	Antitoxina	Negativo
Mnt, P03049	Bacteriófago P22	Control de ciclo lítico del bacteriófago	Negativo
ParG, Q70W75	Plásmido multidrogaresistente TP228	Partición de plásmido	Negativo
PutA, P09546	<i>Escherichia coli</i> y otras bacterias	Regulación de genes de utilización de prolina, oxidación de prolina a glutamato	Negativo
HP0222, Q9ZML0	<i>H. pylori</i>	Desconocida	Desconocido
AlgZ, Q9RPY7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Regulación de biosíntesis de alginato y motilidad	Positivo y negativo
ParD, P22995	Plásmido de amplio rango de hospedero RP4-RK2	Antitoxina	Negativo
7kMk, Q8TH48	<i>Methanopyrus kandleri</i>	Desconocida	Desconocido
TrwA, Q04229	Plásmido R388	Regulación de conjugación bacteriana	Negativo
TraY, P06627	Plásmido F	Regulación de conjugación bacteriana	Positivo

**Tabla 8.** Reguladores transcripcionales RHH caracterizados (Schreiter & Drennan, 2007).

## 8. CONCLUSIONES

- PhbF participa el proceso de movilización de PHB al regular negativamente la expresión de la phasina PhbP1, PhbP2 y la PHB depolimerasa PhbZ1.
- PhbF regula de manera directa la expresión de *phbP1*.
- PhbF regula negativamente la cantidad de transcritos del gen *phbP2* a partir de las 48 horas.

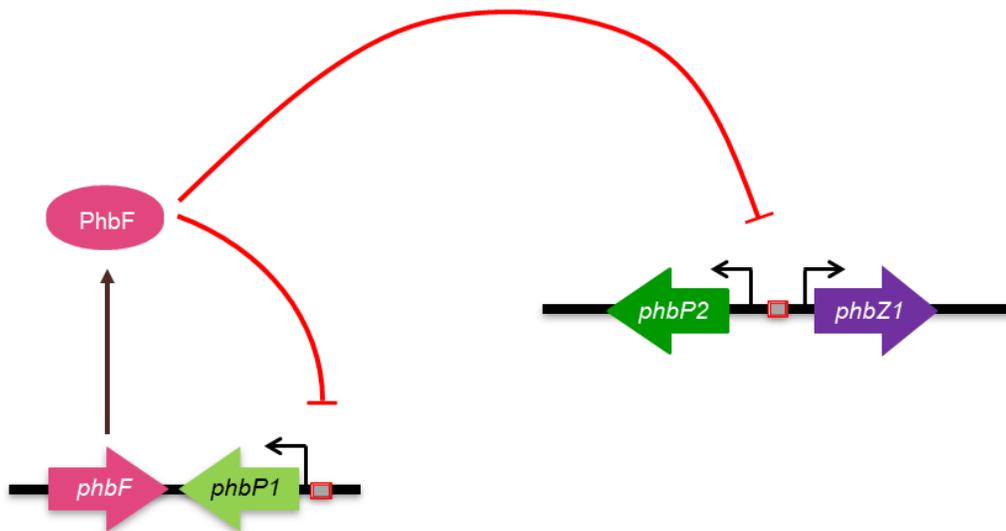
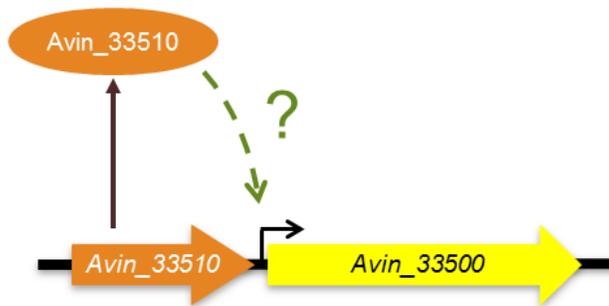


Figura 36. Esquema de la regulación ejercida por PhbF

- Avin\_33510 participa en el proceso de movilización de PHB al regular positivamente la expresión de la PHB depolimerasa Avin\_33500
- Avin\_33510 es un regulador distinto a los reguladores transcripcionales de la familia CopG ya caracterizados, pues regula a una PHB depolimerasa y parece pertenecer a otro grupo todavía no descrito, ya que se encuentra ligada a genes de PHB depolimerasas de diversas bacterias productoras de este polimero.



**Figura 37.** Esquema de la regulación ejercida por Avin\_33510

## 9. PERSPECTIVAS

- Corroborar si el efecto que ejerce PhbF sobre *phbZ1*, *phbP2* y sobre sí mismo, se lleva a cabo de manera directa.
- Determinar el inicio de la transcripción de los genes *Avin\_33500* y *Avin\_33510*, esto para saber si forman parte de una misma unidad transcripcional.
- Determinar los cambios en la expresión del gen *Avin\_33510* a través de fusiones transcripcionales para conocer el patrón de expresión y saber en qué fase hay mayor y menor expresión.
- Determinar si *Avin\_33510* se une al sitio de unión encontrado mediante la búsqueda bioinformática para saber el mecanismo de regulación, directo o indirecto.
- Recientemente, en *Bradyrhizobium diazoefficiens*, se ha reportado que la inactivación del regulador PhbF también tiene un efecto sobre la expresión de genes que no están involucrados en el metabolismo de PHB (Nishihata *et al.*, 2018). Por esta razón se considera interesante analizar dichos fenotipos para revelar si ese regulador actúa de manera similar en *Azotobacter vinelandii*, afectando otros fenotipos que no están involucrados con metabolismo de PHB.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

- Adaya, L., Muriel, L., Peña, C., Jendrossek, D., Espín, G., Tinoco-Valencia, R., Guzmán, J., Pfeiffer, D. & Segura, D. (2018) Inactivation of an intracellular poly-3-hydroxybutyrate depolymerase of *Azotobacter vinelandii* allows to obtain a polymer of uniform high molecular mass. *Applied Microbiology and Biotechnology* **102**, 2693-2707.
- Anjum, A., Zuber, M., Zia, K. M., Noreen, A., Anjum, M. N. & Tabasum, S. (2016) Microbial production of polyhydroxyalkanoates (PHAs) and its copolymers: A review of recent advancements. *International Journal of Biological Macromolecules* **89**, 161-174.
- Aoyagi, Y., Doi, Y. & Iwata, T. (2003) Mechanical properties and highly ordered structure of ultra-high-molecular-weight poly-[(R)-3-hydroxybutyrate] films: Effects of annealing and two-step drawing. *Polymer Degradation and Stability* **79**, 209-216.
- Bailey, T. L. & Elkan, C. (1994) Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers. *Proceedings. International Conference of Intelligent Systems for Molecular Biology* **2**, 28-36.
- Bedoya-Pérez, L. P., Muriel-Millán, L. F., Moreno, S., Quiroz-Rocha, E. Rivera-Gómez, N. & Espín, G. (2018) The pyrophosphohydrolase RppH is involved in the control of RsmA/CsrA expression in *Azotobacter vinelandii* and *Escherichia coli*. *Microbiological Research* **214**, 91-100.
- Bishop, P. E. & Brill, W. J. (1977) Genetic analysis of *Azotobacter vinelandii* mutant strains unable to fix Nitrogen. *Journal of Bacteriology* **130**, 954-956.
- Brigham, C. J., Reimer, E. N., Rha, C. & Sinskey A. J. (2012) Examination of PHB depolymerases in *Ralstonia eutropha*: Further elucidation of the roles of enzymes of PHB homeostasis. *AMB Express* **2**, 1-13.
- Canales, P. (2013) Sistema *phbF-phbP* en *Azotobacter vinelandii*. Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Castañeda, M., Guzmán, J., Moreno, S. & Espín, G. (2000) The GacS sensor kinase regulates alginate and poly- $\beta$ -hydroxybutyrate production in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* **182**, 2624-2628.
- Chen, G. Q. & Page, W. J. (1994) The effect of substrate on the molecular weight of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate produced by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Biotechnology letters* **16**, 155-160.
- Chen, G. Q. (2009) A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews* **38**, 2434-2446.
- Chen, H.J., Pan, S.C. & Shaw, G. C. (2009) Identification and characterization of a novel intracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Bacillus megaterium*. *Applied Environmental Microbiology* **75**, 5290-5299.
- Cho K. S., Ryu H. W., Park C. H. & Goodrich P. R. (2001). Utilization of Swine wastewater as a feedstock for the production of Polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **91**, 129-133.
- Chou, M. E. & Yang, M. K. (2010) Analyses of binding sequences of the PhaR protein of *Rhodobacter sphaeroides* FJ1. *FEMS Microbiology Letters* **302**, 138-143
- Handrick, R., Reinhardt, S., Focarete, M. L., Scandola, M., Adamus, G., Kowalczyk, M. & Jendrossek D. (2001) A new type of thermoalkalophilic hydrolase of *Paucimonas*

- lemoinei* with high specificity for amorphous polyesters of short-chain-length hydroxyalkanoic acids. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 36215-36224.
- Handrick, R., Reinhardt, S., Kimming, P. & Jendrossek, D. The “intracellular” poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) depolymerase of *Rhodospirillum rubrum* is a periplasm-located protein with specificity for native PHB and with structural similarity to extracellular PHB depolymerases. *Journal of Bacteriology* **186**, 7243-7253.
- Harding, K. G., Dennis, J. S., von Blottnitz, H. & Harrison, S. T. L. (2007) Environmental analysis of plastic production processes: Comparing petroleum-based polypropylene and polyethylene with biologically-based poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid using life cycle analysis. *Journal of Biotechnology* **130**, 57-66.
- Harlow & Lane (1988)
- Hernández-Eligio, A., Castellanos, M., Moreno, S. & Espín, G. (2011) Transcriptional activation of the *Azotobacter vinelandii* polyhydroxybutyrate biosynthetic genes *phbBAC* by PhbR and RpoS. *Microbiology* **157**, 3014-3023.
- Hernández-Eligio, A., Moreno, S., Castellanos, M., Castañeda, M., Nuñez, C., Muriel-Millán, L. F. & Espín, G. (2012) RsmA post-transcriptionally controls PhbR expression and polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Azotobacter vinelandii*. *Microbiology* **158**, 1953-1963.
- Kessler, B. & Witholt, B. (2001) Factors involved in the regulatory network of polyhydroxyalkanoate metabolism. *Journal of Biotechnology* **86**, 97-104.
- Khanna, S. & Srivastava, A. K. (2005) Recent advances in microbial polyhydroxyalkanoates. *Process Biochemistry* **40**, 607-619.
- Kim, B. S., Lee, S. C., Lee, S. Y., Chang, H., N., Chang, Y. K. & Woo, S. I. (1994) Production of poly(3-hydroxybutyric acid) by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with glucose concentration control. *Biotechnology and Bioengineering* **43**, 892-898.
- Knoll, M., Hamm, T. M., Wagner, F., Martinez, V. & Pleiss, J. (2009) The PHA depolymerase engineering database: A systematic analysis tool for the diverse family of polyhydroxyalkanoate (PHA) depolymerases. *BMC Bioinformatics* **10**, 89.
- Kung, S.-S., Chuang, Y.-C., Chen, C.-H. & Chien, C.-C. (2007) Isolation of polyhydroxyalkanoates-producing bacteria using a combination of phenotypic and genotypic approach. *Letters in Applied Microbiology* **44**, 364-371.
- Kusaka, S., Iwata, T. & Doi, Y. (1999) Properties and biodegradability of ultra-high-molecular-weight poly[(R)-3-hydroxybutyrate] produced by a recombinant *Escherichia coli*. *International Journal of Biological Macromolecules* **25**, 87-94.
- Law, J. H. & Slepecky, R. A. (1961) Assay of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid. *Journal of Bacteriology* **82**, 33-36.
- Lee, S. Y. (1996) Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Biotechnology and Bioengineering* **49**, 1-14.
- Lizarraga-Valderrama, L. R., Taylor, C. S., Claeysens, F., Haycock, J. W., Knowles, J. C. & Roy, I. (2019) Unidirectional neuronal cell growth and differentiation on aligned polyhydroxyalkanoate blend microfibres with varying diameters. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **13**, 1-14.
- López, N. I., Pettinari, M. J., Nickel, P. I. & Méndez, B. S. (2015) Polyhydroxyalkanoates: Much more than biodegradable plastics. *Advances in Applied Microbiology* **93**, 73-106.

- Maehara, A., Doi, Y., Nishiyama, T., Takagi, Y., Ueda, S., Nakado, H. & Yamane, T. (2001) PhaR, a protein 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 Microbiology Letters* **200**, 9-15.
- Maldonado, R., Jiménez, J. & Casadesús, J. (1994) Changes of ploidy during the *Azotobacter vinelandii* growth cycle. *Journal of Bacteriology* **176**, 3911-3919.
- Manchak, J. & Page, W. J. (1994) Control of polyhydroxyalkanoate synthesis in *Azotobacter vinelandii* strain UWD. *Microbiology* **140**, 953-963.
- Moyao, A. (2018) Análisis del gen Avin\_33500 de *Azotobacter vinelandii* y su implicación en la degradación de PHB. Tesis de Licenciatura. Universidad Politécnica del Estado de Morelos.
- Możejko-Ciesielska, J & Kiewisz, R. (2016) Bacterial polyhydroxyalkanoates: Still fabulous? *Microbiological Research* **192**, 271-282.
- Muriel-Millán, L. F., Castellanos, M., Hernández-Eligio, A., Moreno, S. & Espín, G. (2014) Posttranscriptional regulation of PhbR, the transcriptional activator of polyhydroxybutyrate synthesis, by iron and the sRNA ArrF in *Azotobacter vinelandii*. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology* **98**, 2173-2182.
- Muriel-Millán, L. F., Moreno, S., Gallegos-Monterrosa, R. & Espín, G. (2017) Unphosphorylated EIIA<sup>Ntr</sup> induces ClpAP-mediated degradation of RpoS in *Azotobacter vinelandii*. *Molecular Microbiology* **104**, 197-211.
- Noguez, R., Segura, D., Moreno, S., Hernández, A., Juárez, K. & Espín, G. (2008) Enzyme I<sup>Ntr</sup>, NPr and IIA<sup>Ntr</sup> are involved in regulation of the Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthetic genes in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* **15**, 244-254.
- Page, W. J., Manchak, J. & Rudy, B. (1992) Formation of Poly (Hydroxybutyrate-Co-Hydroxyvalerate) by *Azotobacter vinelandii* UWD. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 2866-2873.
- Peña, C., Castillo, T., García, A., Millán, M. & Segura, D. (2014) Biotechnological strategies to improve production of microbial poly-(3-hydroxybutyrate): a review of recent research work. *Microbial Biotechnology* **7**, 278-293.
- Peralta-Gil, M., Segura, D., Guzmán, J., Servín-González, L. & Espín, G. (2002) Expression of the *Azotobacter vinelandii* poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthetic *phbBAC* operon is driven by two overlapping promoters and is dependent on the transcriptional activator PhbR. *Journal of Bacteriology* **184**, 5672-5677.
- Pettinari, M. J., Vázquez, G. J., Silbersmidt, D., Rehm, B., Steinbüchel, A. & Méndez, B. S. (2001) Poly(3-hydroxybutyrate) synthesis genes in *Azotobacter* sp. Strain FA8. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 5331-5334.
- Poole R. K. & Hill S. (1997) Respiratory protection of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii* — Roles of the terminal oxidases. *Bioscience reports* **17**, 303-317.
- Pötter, M., Müller, H. & Steinbüchel, 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.

- Pötter, M. & Steinbüchel, A. (2005) Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: Impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. *Biomacromolecules* **6**, 552-560.
- Punita, Jafri S., Reddy M. A. & Das H. K. (1989) Multiple chromosomes of *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* **171**, 3133-3138.
- Sabra W., Zeng A. P. & Deckwer W. D. (2001) Bacterial alginate: physiology, product quality and process aspects. *Applied Microbiology and Biotechnology* **56**, 315-325.
- Sadoff H. L. (1975) Encystment and germination in *Azotobacter vinelandii*. *Bacteriological reviews* **39**, 516-539.
- Saegusa, H., Shiraki, M., Kanai, C. & Saito, T. (2001) Cloning of an Intracellular Poly [D(-)-3-hydroxybutyrate] depolymerase gene from *Ralstonia eutropha* H16 and characterization of the gene product. *Journal of Bacteriology* **183**, 94-100.
- Schreiter, E. R. & Drennan, C. L. (2007) Ribbon–helix–helix transcription factors: variations on a theme. *Nature Reviews Microbiology* **5**, 710-720.
- Segura, D. & Espín, G. (1998) Mutational inactivation of a gene homologous to *Escherichia coli ptsP* affects poly- $\beta$ -hydroxybutyrate accumulation and Nitrogen fixation in *Azotobacter vinelandii*. *Journal of Bacteriology* **180**, 4790-4798.
- Segura, D., Vargas, E. & Espín, G. (2000)  $\beta$ -Ketothiolase genes in *Azotobacter vinelandii*. *Gene* **260**, 113-120.
- Segura, D., Cruz, T. & Espín, G. (2003) Encystment and alkylresorcinol production by *Azotobacter vinelandii* strains impaired in poly- $\beta$ -hydroxybutyrate synthesis. *Archives of Microbiology* **179**, 437-443.
- Shägger, H. & Jagow, G. (1978) *Analytical Biochemistry* **166**, 368-379.
- Tian, J., Sinskey, A. J. & Stubee, J. (2005) Kinetic studies of polyhydroxybutyrate granule formation in *Wautersia eutropha* H16 by Transmission Electron Microscopy. *Journal of Bacteriology* **187**, 3814-3824.
- Urtuvia, V., Villegas, P., González, M. & Seeger, M. (2014) Bacterial production of the biodegradable plastics polyhydroxyalkanoates. *International Journal of Biological Macromolecules* **70**, 208-213.
- Vela G. R. (1974) Survival of *Azotobacter* in dry soil. *Applied Microbiology* **28**, 77-79.
- Velázquez-Sánchez, C., Espín, G., Peña, C. & Segura, D. (2020) The modification of regulatory circuits involved in the control of polyhydroxyalkanoates metabolism to improve their production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* **8**, 1-22.
- Williams, S. F. & Martin, D. P. (2001) Application of PHAs in medicine and pharmacy. *Biopolymers* **10**, 91-121.
- Wilson, K. J., Sessitch, A., Corbo, J. C., Giller, K. E., Akkermans, A. D. L. & Jefferson, R. A. (1995)  $\beta$ -Glucuronidase (GUS) transposons for ecological and genetic studies of rhizobia and other Gram-negative bacteria. *Microbiology* **141**, 1691-1705.
- Wu, G., Moir, A. J. G., Sawers, G., Hill, S. & Poole, R. K. (2001) Biosynthesis of poly-L-hydroxybutyrate (PHB) is controlled by CydR (Fnr) in the obligate aerobe *Azotobacter vinelandii*. *FEMS Microbiology letters* **194**, 215-220.
- Wu, Q., Wang, Y. & Chen, G. Q. (2009) Medical application of microbial biopolyesters polyhydroxyalkanoates. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology* **37**, 1-12.

- Yamada, M., Yamashita, K., Wakuda, A., Ichimura, K., Maehara, A., Maeda, M. & Taguchi, S. (2007) Autoregulator Protein PhaR for biosynthesis of Polyhydroxybutyrate [P(3HB)] possibly has two separate domains that bind to the target DNA and P(3HB): Functional mapping of amino acid residues responsible for DNA binding. *Journal of Bacteriology* **189**, 1118-11127.
- York, G. M., Stubbe, J. & Sinskey, A. J. (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.