



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Capacidad de interactuar con el
ADN del dominio HhH de la proteína
PhaH de *Caulobacter crescentus*

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

**GUILLERMO TONATIUH LEGORRETA
HISSNER**

TUTOR

DR. SEBASTIÁN POGGIO GHILARDUCCI

Ciudad Universitaria, CD. MX. 2023





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



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.

Hoja de Datos del Jurado

1.	Datos del alumno
Apellido paterno	Legorreta
Apellido materno	Hissner
Nombre(s)	Guillermo Tonatiuh
Teléfono	55 30 20 07 36
Universidad	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad	Facultad de Ciencias
Carrera	Biología
Número de cuenta	316345796
2.	Datos del tutor
Grado	Dr.
Nombre(s)	Sebastián
Apellido paterno	Poggio
Apellido materno	Ghilarducci
3.	Datos del sinodal 1
Grado	Dra.
Nombre(s)	Laura
Apellido paterno	Kawasaki
Apellido materno	Watanabe
4.	Datos del sinodal 2
Grado	Dr.
Nombre(s)	César Noé
Apellido paterno	Cortés
Apellido materno	Rubio
5.	Datos del sinodal 3
Grado	Biól.
Nombre(s)	Saúl
Apellido paterno	Cano
Apellido materno	Colín
6.	Datos del sinodal 4
Grado	M. en C. Biom.
Nombre(s)	Horacio
Apellido paterno	Villafán
Apellido materno	Monroy
7.	Datos del trabajo escrito
Título	Capacidad de interactuar con el ADN del dominio HhH de la proteína PhaH de <i>Caulobacter crescentus</i>
Número de páginas	71 páginas
Año	2023

«Lo que sabemos es una gota de agua, lo que ignoramos es el océano»

Isaac Newton

AGRADECIMIENTOS

A mi papá por apoyarme incondicionalmente, darme salidas tras un mal día y creer en mí cuando nadie más lo hacía. A mi mamá por siempre apoyarme en malos momentos, ser una amiga más en mi vida y enseñarme los valores que hoy tengo. A mi hermana por aprender de ella a ser exigente conmigo mismo y perseverante, y su amor incondicional en todo momento.

A mi tía Alejandra por haber sido la mejor tía, consentirme los fines de semana y sus valiosos consejos hasta el final. A mi tío Guillermo por siempre preocuparse, quererme y estar siempre para mí. A mis tíos Miguel y Rebeca por darme asilo en tiempos de escuela y por tan buenas y reflexivas pláticas.

A mis abuelos Guillermo y Beatriz por darme tanto amor y buenos fines de semana con comida deliciosa y valiosos recuerdos.

A mis amigos de la vida Kevin, Fausto y Alan por siempre estar en buenos y malos momentos, su amistad duradera, consejos y apoyo incondicional. Gracias por 17 años de amistad y contando.

A mis queridos amigos de la carrera y que siempre tendrán un lugar en mi corazón Sandra Paola Lara, Jennifer Olvera y Alejandra Rivera, gracias por las risas durante las clases, por buenas pláticas y consejos, prácticas de campo juntos, aprendizajes en el Laboratorio, pero sobretodo gracias por seguir teniendo su amistad.

Al Dr. Sebastián Poggio por enseñarme lo que sabe, ser muy paciente conmigo y mi mentor durante esta etapa de mi vida que me ha ayudado a crecer de una manera que nunca creí. A Aurora Osorio por el apoyo en el Laboratorio, consejos para mejorar, su paciencia y soluciones ante las adversidades. A Thelma y Luis David por aclararme siempre mis dudas. A mis sinodales por darme consejos y revisar minuciosamente mi trabajo escrito.

A mi familia y amigos que no pude mencionar, gracias a todos.

ÍNDICE

RESUMEN	8
INTRODUCCIÓN	9
Generalidades de <i>Caulobacter crescentus</i>	9
Ciclo celular y regulación de <i>C. crescentus</i>	11
Polihidroxicanoatos	14
Polihidroxi butirato	16
Síntesis del PHB	17
Proteínas asociadas al gránulo (PGAPs)	18
PHA sintasa (PhaC)	19
PHA despolimerasa (PhaZ)	21
Fasinas (PhaPs)	21
Otro tipo de fasinas	23
PhaR	24
PhaM	24
PhaF	26
Formación y segregación de gránulos	26
PhaH es una proteína asociada al carbonosoma que posee dos dominios HhH	28
HIPÓTESIS	31
OBJETIVO	31
Objetivos particulares	31
MATERIALES Y MÉTODOS	32
Cepas bacterianas y medios de cultivo	32
Cultivo de <i>Escherichia coli</i>	34
Criopreservación de las cepas obtenidas	34
Diseño de oligonucleótidos	34
Amplificación de CC_1098 mediante PCR	34
Electroforesis	35
Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.	35
Digestión de purificación de PCR	36
Transformación bacteriana por electroporación	36
Preparación de minipreps (purificación de plásmido en pequeña escala)	36
Purificación de plásmidos con el Kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN)	37
Transformación química a <i>E. coli</i> por método de CaCl ₂	38
Inducción bacteriana utilizando IPTG y Arabinosa	38
Fluorescencia de células <i>E. coli</i> con la construcción mCherry1098ΔhH	39

Crecimiento de cultivos con diferentes concentraciones de Cloranfénicol	39
Inducción de las proteínas YFP y mCherry-1098 Δ hH, filamentación y compactación	39
Estrategia de clonación	40
RESULTADOS	45
La proteína <i>CC_1098</i> es una proteína que posee dos dominios HhH	45
Localización de la proteína mCherry-HhH en <i>E. coli</i>	47
Establecimiento de las condiciones de inducción de la compactación del nucleoide y la filamentación celular	48
El dominio HhH de la proteína PhaH colocalizó con el nucleoide en células filamentadas.	51
La colocalización del dominio HhH de la proteína PhaH con la región del nucleoide generan un patrón similar	53
Comparación de localización de mCherry-HhH con una proteína soluble fluorescente	55
DISCUSIÓN	58
CONCLUSIONES	61
PERSPECTIVAS	61
ANEXOS	62
ABREVIATURAS	64
GLOSARIO	64
REFERENCIAS	65
BIBLIOGRAFÍA	71

RESUMEN

Las bacterias presentan reservorios energéticos conocidos como inclusiones, que son acúmulos de sustancias orgánicas o inorgánicas que se originan dentro del citoplasma bajo determinadas condiciones de crecimiento y su función es almacenar energía.

Algunos ejemplos son: inclusiones de polisacáridos (almidón o glucógeno), gránulos de cianoficina, gránulos de polifosfato, glóbulos de azufre y gránulos de ácido poli- β -hidroxibutírico conocidos como PHB.

Estos gránulos de PHB son polímeros de monómeros de ácidos grasos 3-hidroxiilo y están provistos de una cubierta protéica, en las cuales se encuentran proteínas asociadas al gránulo (PGAPs) que sirven para su síntesis, degradación y estabilidad. Un grupo importante de estas PGAPS son las fasininas, que su función es regular el tamaño, número de gránulos y evitar interacciones inespecíficas, así como llegar a promover la unión con el DNA. Esta capacidad de unión al DNA la logran a través de motivos estructurales PAKKA, dominios de tipo histona con repeticiones en tándem similares a AAKP, es decir, motivos con capacidad de unión al DNA.

En el estudio de Salinas, et al., 2023 se obtuvo que en *C. crescentus* existe una proteína (CC_1098 o PhaH) que tiene una localización citoplasmática similar a la de los gránulos de PHB y está conformada por un dominio hélice hidrofóbica en la región amino terminal y dos dominios Helix-hairpin-Helix (HhH) en la región carboxilo terminal.

En este trabajo se evaluó la capacidad de unión al DNA por parte del dominio HhH de la proteína PhaH de *C. crescentus*. Para lograr este objetivo se realizaron fusiones de proteínas fluorescentes con el dominio HhH y se probaron en *E. coli* para determinar la localización del dominio dentro de la célula y observar si colocalizaba con el DNA, manteniendo así la función característica de estos dominios.

El dominio HhH de la proteína PhaH de *C. crescentus* colocaliza con la región del nucleóide en *E. coli*; la unión con el DNA por parte del dominio HhH es inespecífica debido a que no toda la cantidad de proteína fluorescente se acumula en la región del nucleóide; a través de un ensayo EMSA se corroboró que la proteína mCherry-HhH posee afinidad hacia el DNA.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias disponen de una gran diversidad de mecanismos y adaptaciones que les permiten administrar su tasa de crecimiento de acuerdo con la disponibilidad de nutrientes, para lograr así un alta tasa de supervivencia en condiciones de algún tipo de estrés. Un ejemplo de esto se observa cuando existe estrés nutricional, es decir, cuando se tiene una fuente de carbono disponible, el crecimiento se verá limitado ya sea por la baja o nula concentración de otros nutrientes esenciales. El exceso de carbono se almacenará en diferentes compuestos y servirán como reservorios de energía en algunos casos. Un tipo frecuente de polímero de almacenamiento son los polihidroxialcanoatos (PHA), que se acumulan y forman gránulos comúnmente llamados carbonosomas, y en donde el polihidroxialcanoato más común es el poli-3-hidroxibutirato o también llamado PHB (Jendrosseck, 2009; Rehm, 2006).

Entre las bacterias adaptadas a estos ambientes pobres, se encuentra *Caulobacter crescentus*, una α -proteobacteria que habita en aguas dulces oligotróficas (Poindexter, 1981) tales como lagos, y que experimentan una constante privación de nutrientes.

Generalidades de *Caulobacter crescentus*

C. crescentus, pertenece al orden de las Caulobacterales, un grupo de bacterias caracterizadas en un principio por su inusual morfología y la presencia de una prosteca o tallo, además de un soporte o adhesivo, junto con un particular ciclo de vida dimórfico (**Figura 1**), lo cual significa que tienen dos estados o formas diferentes de desarrollarse en su ciclo de vida; en este caso una forma sésil y una forma mótil. Sin embargo, dentro de la familia Caulobacteraceae se albergan géneros prostecados y no prostecados. Estos organismos prostecados usualmente se adhieren a superficies utilizando la prosteca en un extremo y forman células flageladas en el otro extremo polar (Hughes, Jiang, & Brun, 2012).

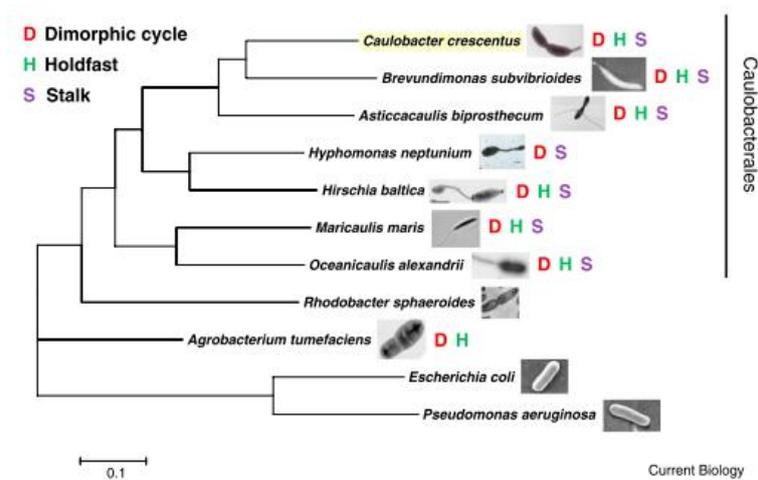


Figura 1. Orden de las Caulobacterales, caracterizadas por ciclos celulares dimórficos, adhesivos polares y tallos conservados en diversas α -proteobacterias. Tomado de Hughes et al., 2012.

Otra característica que hace muy especial a *C. crescentus*, es la habilidad de ésta para vivir y prosperar en ambientes acuáticos pobres en nutrientes, ya sean lagos o cuerpos de agua pequeños. Esta capacidad que posee para prosperar en ambientes pobres, lo logra a través de su ciclo de vida dimórfico. Pues, a diferencia de bacterias como *E. coli* o *B. subtilis*, *C. crescentus* se divide de forma asimétrica y produce células hijas genéticamente idénticas pero morfológicamente distintas: una célula sésil prostecada y una célula móvil flagelada más pequeña (Hughes, Jiang, & Brun, 2012).

La célula sésil se caracteriza morfológicamente por la presencia de una prosteca que también se llega a reconocer como tallo. Esta estructura se origina en el polo opuesto del sitio de la división celular; y algunos estudios han revelado que consta de una membrana citoplásmica, una capa de peptidoglicano y una membrana externa. La principal función de la prosteca radica en que ésta se alarga en condiciones de estrés nutricional, expandiendo el área de la superficie de la envoltura celular y mejorando así la absorción al aumentar la relación superficie contra volumen (Klein et al., 2013). En el extremo libre de la prosteca, se encuentra el soporte o adhesivo que promueve la unión a la superficie, junto con la adhesión a otras células y/o formación de biopelículas (Govers & Jacobs-Wagner, 2020).

Por otra parte la célula flagelada presenta un único flagelo polar y varios pilios. Este flagelo es sintetizado en el polo opuesto al prostecado durante la división celular

antes de que los citoplasmas de las células hijas se separen y está presente y activo solo durante el periodo de movilidad, cuya fase es posterior a la división celular, pues el filamento del flagelo se pierde al diferenciarse en una célula prostecada. El flagelo liberado consiste en un filamento de un diámetro aproximado de 19 nm (Klein et al., 2013).

Ciclo celular y regulación de *C. crescentus*

Caulobacter posee algunas características que la convierten en un modelo bacteriano de estudio, gracias a su regulación genética, división celular asimétrica y a su sincronización del ciclo celular (Abraham, Rohde, & Bennisar, 2014).

En el proceso de división celular en *Caulobacter*, las células flageladas no replican su DNA y son incapaces de iniciar la replicación hasta llegar a la fase de transición de la célula prostecada, en donde la replicación cromosómica se inicia en un origen llamado Cori. La replicación del DNA procede bidireccionalmente hasta que todo el cromosoma se ha replicado en la etapa anterior a la división (Ozaki, 2019).

Gráficamente, esto se puede observar en la **Figura 2** que comienza cuando la progenie prostecada replica y segrega su DNA en la fase S del ciclo celular. La progenie móvil no replicará el cromosoma hasta el final del período motil denominado fase G1. Eventualmente, la célula móvil se someterá a una eyección flagelar, biogénesis de la prosteca y síntesis del adheviso (transición de G1-S) para diferenciarse en la fase G2-M (Jensen, Wang, & Shapiro, 2002).

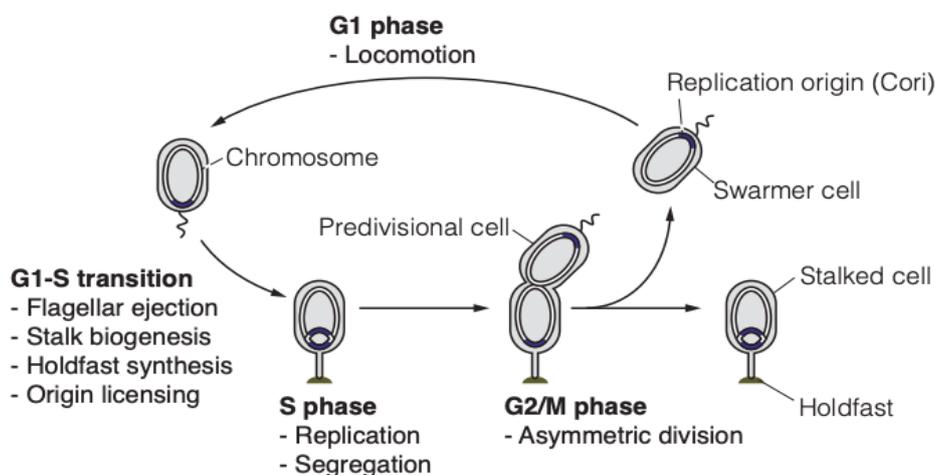


Figura 2. División celular en *C. crescentus* y sus pasos. Tomado de Ozaki, 2019.

Para responder la pregunta de cómo se coordina el ciclo celular, varios grupos de trabajo demostraron que para que ocurra el ciclo celular en *C. crescentus* se necesitan reguladores maestros. Entre ellos, DnaA, CtrA y GcrA que afectan directamente la expresión de numerosos genes al actuar como reguladores transcripcionales, mientras que un cuarto regulador maestro, CcrM, regula la transcripción a través de la metilación del DNA en sitios específicos a lo largo del genoma (Govers & Jacobs-Wagner, 2020).

Además, observaron que cuando *Caulobacter* está lista para llevar a cabo la división celular, la progenie continúa con el ciclo celular iniciándolo con una constricción celular. Posterior a esto, se comienza el ensamblaje del flagelo y una vez que la citocinesis termina, el flagelo empieza a rotar y se comienza la síntesis de los pilios, como se observa en la **Figura 3** (Govers & Jacobs-Wagner, 2020).

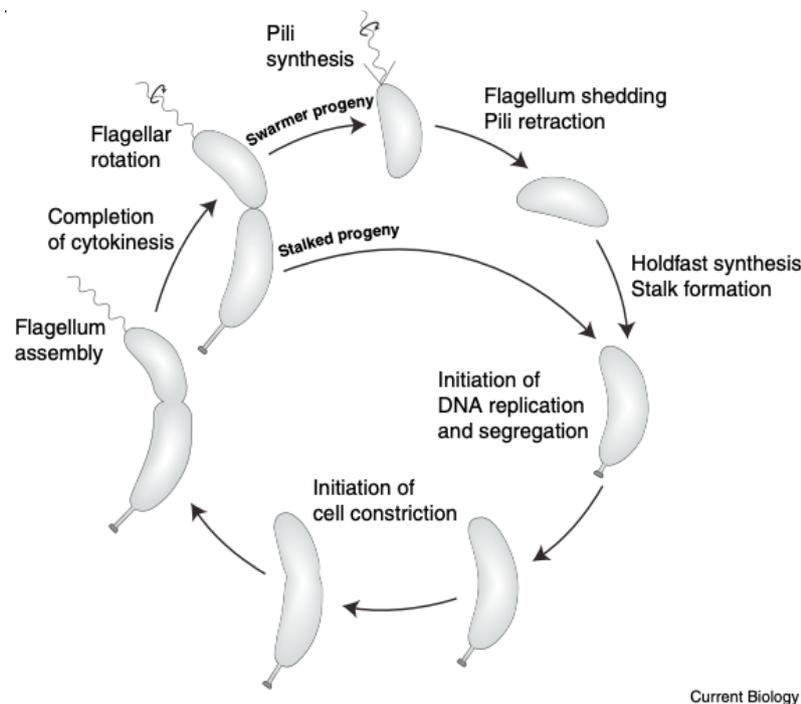


Figura 3. Ciclo de vida dimórfico de *Caulobacter*. Modificado de Govers & Jacobs-Wagner, 2020.

La célula móvil resultante de la síntesis de los pilios y el flagelo, permanecerá en este estado por un tiempo indefinido que dependerá de las condiciones de cultivo. La duración de esta etapa de motilidad es controlada de forma parcial por la respuesta mediada por el segundo mensajero conocido como tetrafosfato o pentafosfato

de guanosina ((p)ppGpp) (Boutte & Crosson, 2011; Juengert et al., 2017). Cuando la célula flagelada esta lista para diferenciarse, ésta pierde el flagelo por medio de la proteólisis específica de la proteína flagelar FliF, que está medida por la actividad de PleD que cataliza la formación de c-di-GMP (Curtis & Brun, 2010). Así mismo, se retraerán los pilos y comenzará la síntesis de la prosteca y adhesivo. La prosteca crecerá a partir del mismo polo donde se encontraba el flagelo.

Uno de los estímulos ambientales clásicos que influyen en la morfología de las células de *C. crescentus*, la duración de la etapa de motilidad y por ende el ciclo celular, es la disponibilidad de fosfato.

En el proceso de diferenciación morfológica provocado por la privación de fosfato, hay una proteína muy importante que se denomina SpoT. Se trata de una enzima que cataliza la síntesis e hidrólisis de (p)ppGpp. Se conoce que los niveles bajos de (p)ppGpp se mantienen en las células durante el crecimiento normal, pero los niveles aumentan cuando las células carecen de carbono, nitrógeno o aminoácidos, es decir, en condiciones de bajos nutrientes. Este (p)ppGpp ralentiza y controla la transición del ciclo celular, tal vez para permitir que la célula flagelada tenga más tiempo para buscar nutrientes antes de diferenciarse (Woldemeskel & Goley, 2017).

Lo anterior se ve ejemplificado en la **Figura 4**, en donde se puede observar que en condiciones de abundancia de nutrientes, las células móviles se diferencian para convertirse en células prostecadas **(1)**, esta diferenciación es inhibida por el ppGpp **(2)**. En cambio la síntesis de (p)ppGpp hace que las células prostecadas se vuelvan más pequeñas **(3)**. Por último, **(4)** la falta de fosfato hace que las células de *Caulobacter* alarguen sus tallos y aumenten el volumen celular. Cuando son crecidas en presencia de fosfatos pero por periodos largos en la fase estacionaria tardía **(5)**, las células se volverán filamentadas y adoptarán una morfología enrollada o helicoidal (Woldemeskel & Goley, 2017).

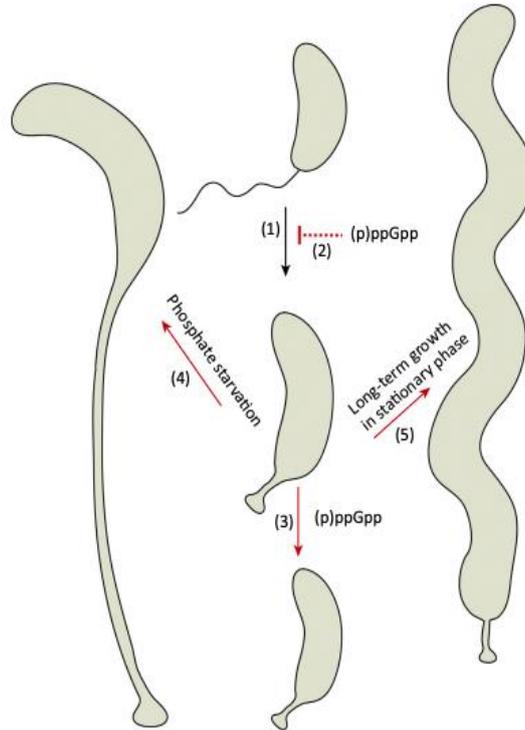


Figura 4. Los cambios ambientales influyen en la morfología celular de *Caulobacter*.
Modificado de Woldemeskel & Goley, 2017.

Por tanto (p)ppGpp ejerce sus efectos sobre el ciclo celular, al afectar los niveles de CtrA y DnaA, cada uno de los cuales afecta directamente el inicio de la replicación del DNA y regula la expresión de docenas de genes necesarios para la progresión del ciclo celular (Hughes et al., 2012; Woldemeskel & Goley, 2017).

Polihidroxicanoatos

Los PHAs son biopoliésteres sintetizados por muchas bacterias Gram positivas y Gram negativas en respuesta a ambientes con abundantes fuentes de carbono, pero limitados en nutrientes como nitrógeno, fósforo, magnesio, entre otros. Estos polímeros se acumulan y almacenan en el citoplasma celular como inclusiones insolubles en agua, y actúan principalmente como reservas de carbono y energía (Reddy, Ghai, Rashmi, & Kalia, 2003; Sudesh, Abe, & Doi, 2000).

Los PHAs son polímeros compuestos de monómeros de ácidos grasos 3-hidroxilo, y que se condensan a través de la formación de enlaces éster entre el grupo carboxilo e hidroxilo de los monómeros, formando así cadenas cortas y medianas, como se muestra

en la **Figura 5** (Madison & Huisman, 1999; Mcadam, Fournet, Mcdonald, & Mojicevic, 2020).

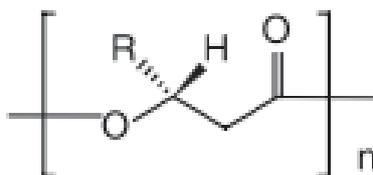


Figura 5. Poly(3-hidroxiacanoato). Modificado de (Verlinden, Hill, Kenward, Williams, & Radecka, 2007).

Los PHA de cadena corta (scl-PHA) se componen de 3 a 5 átomos de carbono, siendo ejemplos de éstos el 3-hidroxiбутирато (3HB), 4-hidroxiбутирато (4HB), o 3-hidroxiуалерато (3HV). Mientras que PHA de cadena larga (mcl-PHA) consisten de cadenas de 6 a 14 átomos de carbonos, siendo representantes el 3-hidroxiуексаноато (HHx), 3-hidroxiдоcanoato (HD) o incluso unidades de monómeros de cadena más larga (ver **Figura 6**). La longitud de las unidades monoméricas determinan las propiedades de los polímeros resultantes, siendo los PHA de cadena corta considerados como termoplásticos (Mcadam et al., 2020), es decir, son polímeros que se pueden ablandar y derretir mediante la aplicación de calor, y se pueden procesar en estado ablandado por calor o en estado líquido. Además de representar la ventaja del reciclaje, tienen mayor ductilidad y resistencia al impacto que los polímeros termoestables, que no pueden ser derretidos y vueltos a moldear (Mallick, 2010).

Grupo R	Nombre completo	Abreviación
CH ₃	Poli(3-hidroxiбутирато)	PHB
CH ₂ CH ₃	Poli(3-hidroxiуалерато)	PHV
CH ₂ CH ₂ CH ₃	Poli(3-hidroxiуексаноато)	PHHx

Figura 6. PHAs y sus grupos R correspondientes. Modificado de Verlinden et al., 2007.

Además de la función metabólica que cumplen los PHAs, éstos también desempeñan otras funciones protectoras ante situaciones de estrés, ya sea estabilizando frente a choques de calor, bajas temperaturas, congelamiento, choques osmóticos, presión oxidativa y radiación UV. Esta protección se debe a diversos factores como la presencia

del polímero, la formación de otros compuestos protectores a partir del polímero y a la degradación intensiva del PHA (Boutte & Crosson, 2011; Obruca et al., 2020).

Por último, los gránulos de PHA suelen tener un diámetro de 0.3 a 0.5 μm , y consisten en un núcleo de poliéster hidrófobo rodeado por una capa anfifílica que permite la solubilización del polímero (insoluble en agua) dentro del citoplasma. Además, estos gránulos están cubiertos por proteínas asociadas a gránulos de PHA (PGAPs), que incluyen a la PHA sintasa (PhaC), PHA depolimerasa (PhaZ), proteínas de superficie llamadas fasinas y algunas proteínas reguladoras (PhaR) (ver **Figura 7**) (Obruca et al., 2020).

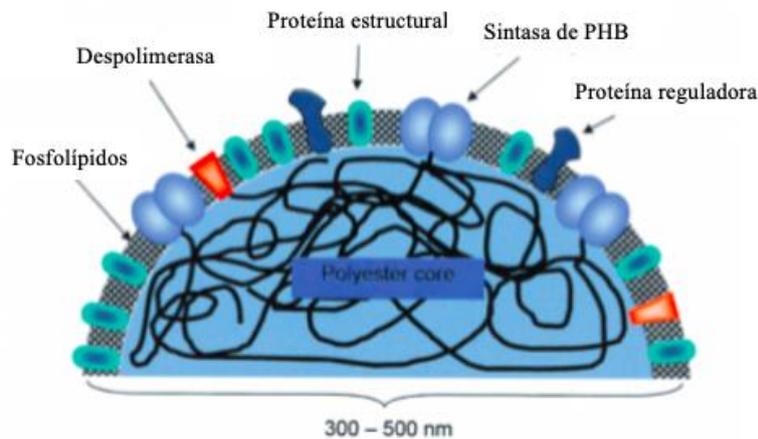


Figura 7. Representación esquemática de un gránulo de PHA con proteínas asociadas a gránulos. Modificado de Grage et al., 2009.

Polihidroxibutirato

De los PHAs existentes, el más común es el poli 3-hidroxibutirato o PHB (ver **Figura 8**), que se identificó y aisló por primera vez en la bacteria *Bacillus* sp. en 1926 por Lemoigne (Verlinden et al., 2007). Desde entonces se ha documentado la acumulación de PHA en al menos 75 géneros de bacterias y algunas arqueas (Buckley, 2013; Reddy et al., 2003).

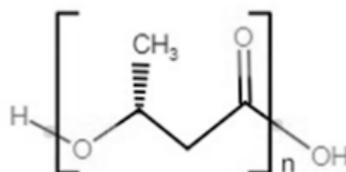


Figura 8. Estructura general del PHB. Modificado de Mcadam et al., 2020.

Se ha demostrado en trabajos anteriores como el de Poindexter, 1981 (**Figura 9**), que el polihidroxibutirato (PHB) es un producto del metabolismo de *C. crescentus* durante condiciones de privación de nitrógeno y fosfato, siendo la concentración baja de fosfato el principal desencadenante de la producción de PHB (Poindexter, 1981; Qi & Rehm, 2001).

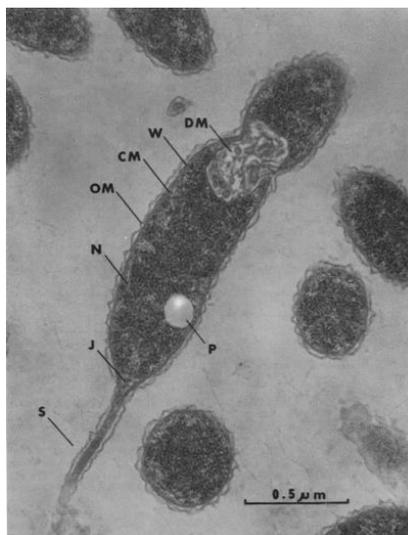


Figura 9. Sección longitudinal a través de una célula en división de *C. crescentus*, siendo la letra P el gránulo de PHB. Tomado de Poindexter, 1981.

Actualmente existen pocos antecedentes de trabajos relacionados con *C. crescentus* y la formación o regulación de los gránulos de PHB, por ejemplo Qingsheng Qi & Rehm, 2001 investigaron la biosíntesis del PHB y obtuvieron que la acumulación de PHAs contribuía a aproximadamente al 18% del peso seco celular en presencia de glucosa y presentaba una sintasa de PHB particularmente grande, de aproximadamente 673 residuos de aminoácidos.

Síntesis del PHB

Para la síntesis del PHB es necesario la presencia de acetil-coenzima A, un compuesto clave en el metabolismo celular y que es convertido a PHB a través de tres enzimas.

La vía bioquímica de síntesis del PHB (**Figura 10**) comienza con la condensación de dos moléculas de acetil-CoA a acetoacetil-CoA, producida por la enzima 3-cetotiolasa, PhaA. Posteriormente, ocurre la reducción de acetoacetil-CoA, por la enzima reductasa

PhaB, al precursor monomérico de PHB, 3-hidroxi butiril-CoA (3HB-CoA), y éste se polimeriza a PHB por la PHB sintasa o PhaC (Jendrossek & Pfeiffer, 2014).

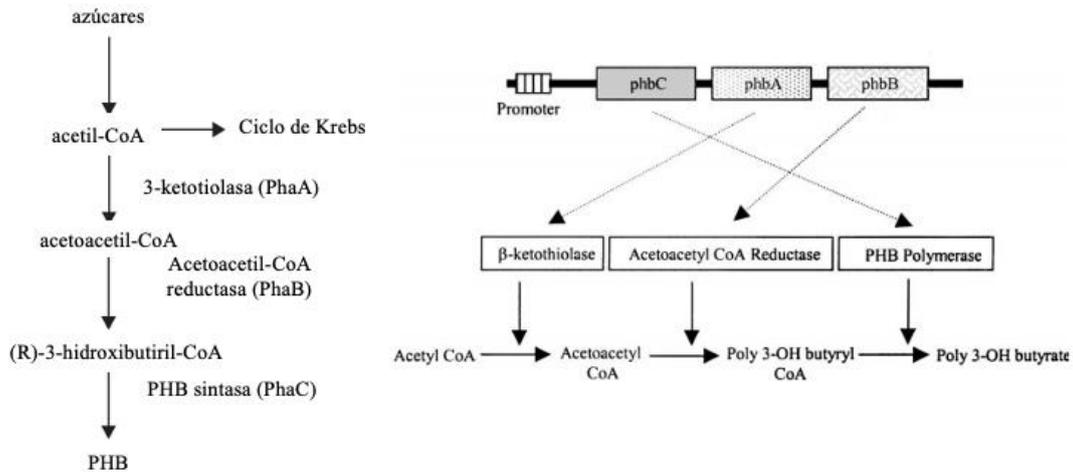


Figura 10. Síntesis de PHB y proteínas implicadas. Modificado de Reddy et al., 2003; Verlinden et al., 2007

En muchos organismos productores de PHB, como lo son *Ralstonia eutropha*, *Synechococcus*, *Bacillus*, entre otros, los genes biosintéticos de PHB están agrupados en un operón llamado phaCAB que codifica para las enzimas o proteínas anteriormente mencionadas (Merrick & Doudoroff, 1964), como se muestra en la **Figura 10**. Sin embargo, el orden no prevalece en todas las especies bacterianas. En este caso, *C. crescentus* posee un arreglo diferente puesto que los genes codificantes están dispersos en el cromosoma, entre ellos phaZ, phaR, phaA, phaB, phaC y phaP (**Figura 11**).

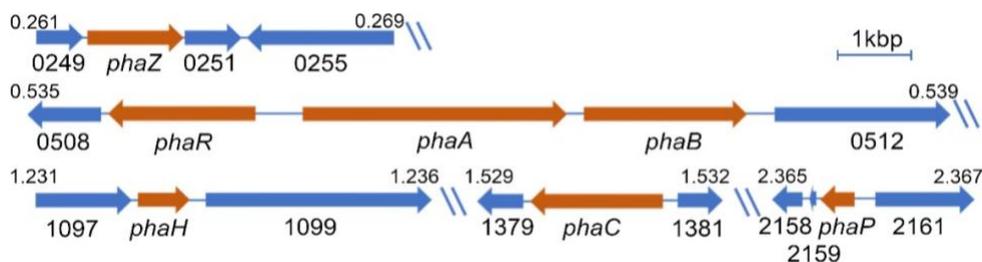


Figura 11. Genes correspondientes a *C. crescentus* en el PHB. Tomado de Salinas et al., 2023.

Proteínas asociadas al gránulo (PGAPs)

A lo largo del estudio de los PHAs, específicamente con el PHB, se han identificado una diversidad de proteínas y genes que regulan la homeostasis de estos

biopolímeros; sin embargo, dependiendo del modelo bacteriano utilizado, será la variedad que se tendrá de proteínas asociadas al gránulo conocidas como PGAPs.

Cabe decir que a pesar de la gran variedad de PGAPs que actualmente se han descrito, el modelo general utiliza a *Ralstonia eutropha*, ahí se han identificado dieciséis proteínas PGAPs utilizando un análisis comparativo de proteomas de gránulos de PHB aislados (**Figura 12**). Las PGAPs son las siguientes: PHB sintasas PhaC1 y PhaC2, PHB despolimerasa PhaZa1, otras tres supuestas hidrolasas, fasinas PhaP1 a PhaP8, PhaR y PhaM (Jendrossek, 2020).

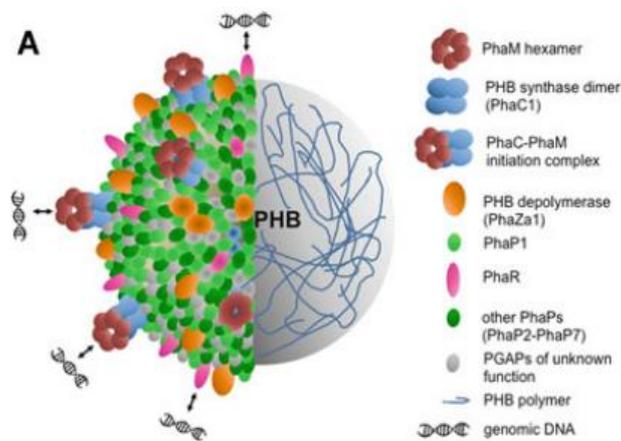


Figura 12. Carbonosoma de PHB. (A). Las proteínas PGAP de la capa superficial están simbolizadas en la mitad izquierda del gránulo de PHB. La asociación de PhaM y de PhaR a regiones del genoma se indica mediante el símbolo de una hélice de DNA. Modificado de Jendrossek, 2020.

Las 16 PGAPs que han sido identificadas se pueden clasificar en 4 subgrupos: (1) PHB sintasas (PhaC), (2) fasinas (PhaPs), (3) PHB despolimerasas (PhaZ) e hidrolasas relacionadas y (4) proteínas con capacidad de unión adicional al DNA, PhaM y otras relacionadas (Jendrossek, 2020).

PHA sintasa (PhaC)

Son proteínas responsables de la síntesis de cadenas poliméricas. Usan como sustrato una gran variedad de cadenas de ácidos grasos 3-hidroxilo-CoA y otras moléculas relacionadas como el 4-hidroxibutirato. Estos recursos los obtienen de varias rutas metabólicas; sin embargo, la más relevante es la β -oxidación de los ácidos grasos y

dependiendo la especie bacteriana y disponibilidad de sustratos se poseerán diferentes tipos de sintasas y utilizarán otras rutas metabólicas (García, 2014).

En la capa superficial de los gránulos de PHB se encuentran estas sintasas (PhaC) que desempeñan un papel clave en el anabolismo del PHB y según su estructura, subunidades y tipo de sustrato, se pueden clasificar en 4 tipos (Rehm, 2003) como se muestra en la **Figura 13**.

Class	Subunits	Species	Substrate
I	 ~60–73 kDa	<i>Cupriavidus necator</i>	3HA _{SCL} -CoA (~C3–C5) 4HA _{SCL} -CoA, 5HA _{SCL} -CoA, 3MA _{SCL} -CoA
II	 ~60–65 kDa	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3HA _{MCL} -CoA (~≥C5)
III	 ~40 kDa ~40 kD	<i>Allochromatium vinosum</i>	3HA _{MCL} -CoA (3HA _{MCL} -CoA [~C6–C8], 4HA-CoA, 5HA-CoA)
IV	 ~40 kDa ~22 kDa	<i>Bacillus megaterium</i>	3HA _{SCL} -CoA

Figura 13. PHA sintasas se dividen en cuatro clases. Modificado de Rehm, 2006.

Se han descrito 4 clases de PHA sintasas, de las cuales dos de ellas (clases I y II) tienen un único tipo de subunidad, con una masa molecular entre 60 y 73 kDa y se diferencian por el tipo de sustratos que son capaces de polimerizar. En este caso, el tipo I se encarga de polimerizar cadenas cortas de carbonos (scl-PHA), mientras que el tipo II polimerizará cadenas medianas de carbonos (mcl-PHA). Las sintasas tipo I son características de *Ralstonia eutropha*, mientras que las de clase II de *Pseudomonas aeruginosa* (García, 2014; Qi & Rehm, 2001).

Las otras dos clases (III y IV) son enzimas heterodiméricas que catalizan la reacción de polimerización de sustratos de cadena corta; en la clase III se encuentra la PHA sintasa de *Allochromatium vinosum*, con dos subunidades distintas (PhaC y PhaE) de 40 kDa cada una. Las sintasas de arqueas descritas hasta la fecha parecen presentar homología con las pertenecientes a la clase III. Y por otra parte, las de clase IV presentan una subunidad de 40 kDa (PhaC) y otra de 22 kDa (PhaR) y son representadas usualmente por el género *Bacillus* (García, 2014; Grage et al., 2009).

De igual forma, este PHB se puede movilizar cuando la fuente de carbono se agota, para lo cual la despolimerasa (PhaZ) forma parte integral de la capa superficial

protéica de los gránulos catalizando la reacción de hidrólisis de los polímeros de PHB para que se conviertan en acetil coA, y vuelvan a iniciar el ciclo.

PHA despolimerasa (PhaZ)

Son proteínas encargadas de la movilización del polímero de PHB y estas se clasifican en dos tipos: las intracelulares y extracelulares. Las despolimerasas de PHB intracelulares son las enzimas clave para la reutilización (movilización) del polímero de PHB en la propia cepa acumuladora de PHB, catalizando la escisión de PHA en monómeros u oligómeros, para que puedan volver a convertirse en acetil-CoA (García, 2014; Jendrossek, 2020).

Las despolimerasas de PHB intracelulares comparten sólo una pequeña homología con las extracelulares, pues estas últimas son secretadas por especies que degradan el PHA y que pueden utilizar PHB desnaturalizado exógeno como fuente de carbono, pero no necesariamente acumulan PHB (Jendrossek, 2020).

Si bien no se ha podido detectar la actividad despolimerasa PHB extracelular en *R. eutropha*, esta especie tiene un alto número de enzimas intracelulares con actividad despolimerasa de PHB: la despolimerasa PHB intracelular PhaZa1 es la principal despolimerasa responsable de la movilización de PHB en células con privación de carbono (Jendrossek, 2020; Jendrossek & Pfeiffer, 2014; Juengert et al., 2017).

Por último, cabe destacar que además de PhaZa1, *R. eutropha* tiene otras cuatro despolimerasas PHB putativas (PhaZa2-PhaZa5) (Beeby, Cho, Stubbe, & Jensen, 2012; York et al., 2003). Todas estas isoenzimas de PhaZa comparten una similitud sustancial de residuos de aminoácidos y junto con otras hidrolasas conforman el grupo de las PhaZ, por la relación que tienen a la hora de colocalizarse con los gránulos de PHB en sus productos génicos (Jendrossek & Pfeiffer, 2014).

Fasinas (PhaPs)

Por otra parte, una característica común de los carbonosomas en todas las especies formadoras de gránulos de PHB, es la presencia de una o varias proteínas llamadas fasinas o PhaPs.

Las fasinas son proteínas pequeñas de naturaleza anfifílica que cubren una parte considerable de la superficie del gránulo y se cree que median la interacción entre el núcleo del polímero hidrofóbico y el citoplasma hidrofílico (Steinbüchel et al., 1995). Son abundantes en la superficie del gránulo, representando hasta el 5% de la proteína celular total (Grage et al., 2009). Aunque no están directamente involucradas en la síntesis de PHB, estas proteínas se expresan mayoritariamente en condiciones de acumulación de PHB, jugando un papel importante regulando el tamaño y número de gránulos, evitando interacciones inespecíficas de otras proteínas, activando PhaC y en la partición de los gránulos durante la división celular (Maestro & Sanz, 2017; Obruca et al., 2020).

Actualmente, se siguen descubriendo nuevas fasinas y proteínas que ayudan a la formación y segregación del PHB en la célula; sin embargo, se ha determinado que las fasinas principalmente activan la despolimerización de PHA, aumentan la expresión y actividad de las PHA sintetasas, participando en la segregación de gránulos de PHA y teniendo actividades de chaperona tanto *in vivo* como *in vitro* (Jendrossek, 2009; Mezzina & Pettinari, 2016). Estas propiedades sugieren que las fasinas podrían desempeñar un papel activo en la protección contra el estrés relacionado con el PHA y la mejora del estado físico.

La primera fasina fue identificada en 1994 por Pieper-Fürst y Steinbüchel, cuando encontraron una proteína de bajo peso molecular (GA14 o PhaP1) asociada con gránulos de PHA en *Rhodococcus ruber*. PhaP1 fue la proteína predominante presente en los gránulos, formando una capa en su superficie y se descubrió mediante la caracterización de mutantes inducidos por transposones, que tenían una capacidad reducida, pero no completamente abolida, para acumular PHB (Jendrossek, 2020; Mezzina & Pettinari, 2016).

Debido a lo mencionado anteriormente, se propuso que las fasinas PhaP determinan la relación superficie/volumen de los gránulos de PHB producidos: en ausencia de PhaP1, *R. eutropha* sintetizaba menos PHB formando un solo gránulo de PHB muy grande; mientras que una sobreproducción de PhaP1 conducía a la formación de un mayor número de gránulos de PHB inusualmente pequeños (Cho, Brigham, Sinskey, & Stubbe, 2012; M. Mezzina, Wetzler, Catone, Bucci, & Paola, 2014).

En *C. crescentus* existen pocos trabajos sobre PHB; sin embargo, *Buckley, 2013* menciona que la principal función descrita de PhaP en esta bacteria es promover una mayor producción de PHB en la célula, similar a PhaP1, comprobando que muchos aspectos del modelo de formación de gránulos desarrollado con base en estudios en *R. eutropha* son ciertos para organismos que acumulan PHB a niveles mucho más bajos, como lo es *C. crescentus*.

Finalmente, la observación de que las fasininas tienen un fuerte impacto en el tamaño de los gránulos de PHB producidos se ha demostrado para muchas especies que acumulan PHA (Sun, Li, Hu, Chen, & Tian, 2019). Sorprendentemente, se han identificado ocho proteínas fasininas (PhaP1-PhaP8) en gránulos de PHB aislados de *R. eutropha* y diversas proteínas hidrolasas homólogas en otras bacterias (Jendrosseck, 2020), por lo que el estudio de estas proteínas sigue siendo imperante en el estudio del PHB.

Todos los resultados en diversos modelos indican que las fasininas tienen múltiples roles y funciones en el metabolismo de PHAs, que van desde sus funciones estructurales como componentes de la superficie del gránulo, hasta funciones reguladoras que afectan la expresión y actividad de diferentes enzimas (Mezzina & Pettinari, 2016), como se observa en la **Tabla 1**.

Tabla 1. Funciones adicionales de las fasininas. Modificado de Mezzina & Pettinari, 2016.

Phasin	Microorganism	Additional function(s) ^a	Reference(s)
PhaP _{Re}	<i>Ralstonia eutropha</i>	Increases specific activity of PhaC _{Re} and the activity of PhaC1 and PhaC2 from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>in vitro</i>	40
		Activates PHB degradation	38
PhaP _{Ah}	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Activates transcription of <i>phaC_{Ah}</i>	45
PhaP _{Sp}	<i>Synechocystis</i> sp. PCC 6803	Increases activity of PHB synthase <i>in vivo</i>	12
PhaM	<i>Ralstonia eutropha</i>	Physiological activator of PhaC _{Re}	41
ApdA	<i>Rhodospirillum rubrum</i>	Stimulates <i>in vitro</i> depolymerization by PHB depolymerase of <i>R. rubrum</i>	28
Mms16	<i>Magnetospirillum gryphiswaldense</i>	Activates PHB depolymerase from <i>R. rubrum</i> <i>in vitro</i>	39
PhbP	<i>Azotobacter vinelandii</i>	Increases alginate production	11, 56, 57
PhaP _{Ac}	<i>Aeromonas caviae</i>	Increases activity of PhaC _{Ac} but inhibits activity of PhaC from <i>R. eutropha</i> and <i>Delftia acidovorans</i> <i>in vitro</i> ; increases the solubility of PhaC _{Re} <i>in vitro</i> (chaperone-like activity)	42
PhaF _{Pp}	<i>Pseudomonas putida</i>	Binds to DNA through its histone-like domain in a nonspecific manner	44
		Is involved in PHA granule segregation during cell division	19
PhaP _{Az}	<i>Azotobacter</i> sp. FA8	Protects <i>E. coli</i> from stress caused by PHB accumulation, heat, and paraquat; has <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> chaperone activity	18

^aThe abilities to bind to the PHA granule surface and to affect the number and size of the granules are considered general properties of all phasins and are not indicated in the table.

Otro tipo de fasininas

Además de las fasininas conocidas como PhaPs, existe otra variedad más específica de fasininas, que son catalogadas como proteínas con capacidad de unión al DNA. Entre estas se pueden encontrar las fasininas PhaM y PhaF.

Principalmente, aquí vamos a revisar a las PGAPs que no solo se unen a los gránulos de PHB, sino también al DNA, entre las que se encuentran PhaR, PhaM y PhaF.

PhaR

PhaR es la fasin encargada de unirse a las regiones operadoras de phaP1 y phaP3. PhaR se encarga de reprimir la transcripción actuando como un represor regulador (York et al., 2003). Sin embargo, también es conocido que PhaR se une a la superficie de los gránulos de PHB, y en este caso, no puede reprimir ni la transcripción de los genes de fasin, ni las regiones operadoras a las que se une, y por ende, su propia transcripción (Jendrossek, 2020).

Como consecuencia de la unión al gránulo, se libera la represión de la transcripción y se forma PhaP1, PhaP3 y PhaR. No obstante, algo interesante de las fasinas phaP1 y phaP3, es que tienen una fuerte afinidad de unión al carbonosoma o gránulo de PHB, desplazando las moléculas de PhaR fuera del gránulo, y por ende, aumentando la probabilidad de unión de PhaR a las regiones operadoras de phaP1 y phaP3, lo que lleva a una represión de la transcripción (Jendrossek, 2020). Por lo tanto, la capacidad de unión dual de PhaR a los gránulos de PHB y al DNA asegura que la producción de proteínas PhaP1 y PhaP3 se detenga solo cuando la superficie de los gránulos de PHB esté cubierta con proteínas de fasin PhaP1 y PhaP3.

PhaM

Siguiendo con la caracterización de otras proteínas fasin, PhaM es una fasin que no se une directamente al PHB pero sí interactúa y une a la sintasa PhaC1, en *R. eutropha* (Pfeiffer & Jendrossek, 2011). Se ha purificado este complejo que forman y se ha visto que consiste en un dímero PhaC1 y un hexámero PhaM. La actividad de la sintasa en presencia de PhaM es aproximadamente tres veces mayor y la fase de reacción de la polimerización Gerngross & Martin, 1995 *in vitro* de PhaC1 se anula con la adición de PhaM (Jendrossek & Pfeiffer, 2014).

Gracias a estos trabajos en donde se observó la interacción entre PhaC1 y PhaM, se siguió estudiando a PhaM, llegando a observar la unión que tiene con la región del

nucleoide, que es la región de forma irregular dentro de la célula procariota que contiene todo el DNA o la mayoría del material genético de las células.

La parte C-terminal de PhaM es la responsable de esta capacidad de unión al DNA, pues alberga residuos de lisina de los motivos estructurales PAKKA, que son esenciales para la interacción, mientras que el extremo N-terminal de PhaM interactúa con la sintasa PhaC1; y como lo revela la mutagénesis dirigida al sitio de estos residuos, sin este dominio PAKKA no es posible la unión al nucleoide (Bresan & Jendrossek, 2017). El motivo estructural PAKKA es similar a regiones de proteínas de unión a DNA tipo histonas y proteínas relacionadas, y la estructura de la proteína se puede observar en el **Anexo 1**.

La duplicación del DNA genómico y la separación de los dos genomas durante la división celular distribuye los gránulos de PHB unidos al genoma a ambas células hijas (Jendrossek, 2020), en donde interesantemente destaca la participación de varias proteínas fasinas implicadas en este proceso de segregación de los gránulos, como lo son PhaF y PhaM; éstas contienen regiones con alto contenido de tres residuos de aminoácidos que son lisina (K), prolina (P) y alanina (A), los cuales pueden conformar un motivo estructural PAKKA, o en su caso, un motivo estructural de tipo hélice AKP en la región carboxilo terminal lo que permite la unión al DNA (Anaya-Cárdenas, 2016).

En el estudio de PhaM, la sobreexpresión de ésta dio como resultado la formación de muchos pequeños gránulos de PHB que siempre estaban unidos a la región del nucleoide, y por el contrario, los gránulos de PHB de las cepas mutantes de phaM se hicieron muy grandes y la distribución de los gránulos a las células hijas fue diferente, y dependiente de dos proteínas fasinas, PhaM y PhaP5 (Wahl, Schuth, Pfeiffer, Nussberger, & Jendrossek, 2012).

Como se mencionó anteriormente, se ha visto la capacidad de unirse al DNA en otra proteína conocida como PhaF. Este es un polipéptido similar a PhaM, y que es responsable de la unión de los gránulos de PHB al nucleoide, asegurando un número casi igual de gránulos de PHB después de la división celular (Wahl et al., 2012). Igualmente, se ha demostrado que PhaF está implicada en el control de la expresión de los genes phaC1 y phaI (Maestro & Sanz, 2017).

PhaF

PhaF es la fasina principal entre las especies de *Pseudomonas*, identificada principalmente en *P. putida* y *P. oleovorans*, y se encuentra estructuralmente organizada en dos dominios bien definidos (Prieto et al., 1999): el dominio de unión a PHA N-terminal que comparte similitud de secuencia con PhaI, y el resto del C-terminal que es un dominio similar a una histona con una alta carga positiva, y que contiene ocho repeticiones en tándem similares a AAKP (**Ver Anexo 1**), y es la región responsable de la unión no específica al DNA (Maestro & Sanz, 2017).

Los gránulos de PHB en *Pseudomonas* se observan como en la **Figura 14**. En este gránulo, las principales moléculas que participan son PhaI y PhaF formando heterodímeros, y sus respectivas sintasas y despolimerasas. PhaI comparte, junto con el dominio N-terminal de PhaF, una similitud sustancial de residuos de aminoácidos y dominios enrollados, sugiriendo que interactúan entre sí y forman heterodímeros que son los que tienen la función de adhesión e interacción con el DNA (Jendrossek, 2020).

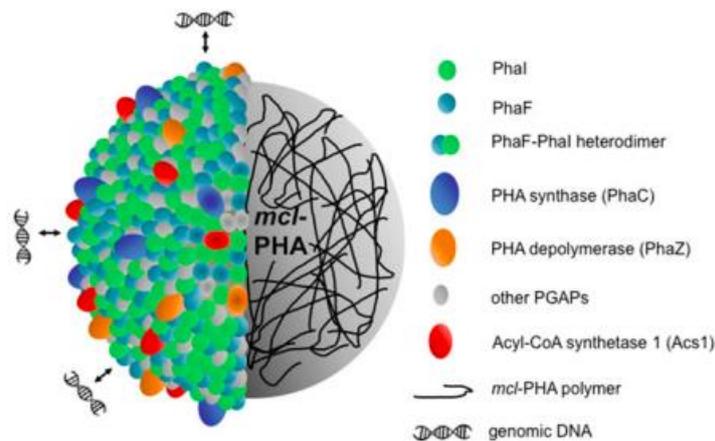


Figura 14. Vista esquemática de un carbonosoma en *P. putida*. Tomado de Jendrossek, 2020.

Por último, con *Pseudomonas* se ha visto que la falta de PhaF induce *in vivo* una reducción considerable del contenido total de polihidroxibutirato en la célula, ya que al detener la segregación de los gránulos no se da lugar a la heterogeneidad poblacional (Galán et al., 2011; Maestro & Sanz, 2017).

Formación y segregación de gránulos

Además de la diversa funcionalidad de las múltiples fasinas, la localización de los gránulos de PHA en el interior se ve afectada por los mecanismos de formación de

carbonosomas. Actualmente, existen cuatro mecanismos propuestos: 1) el modelo de micelas, 2) el modelo de gemación, 3) el modelo de andamio y 4) el modelo de polos celulares (**ver Figura 15**) (Jendrossek & Pfeiffer, 2014; Obruca et al., 2020).

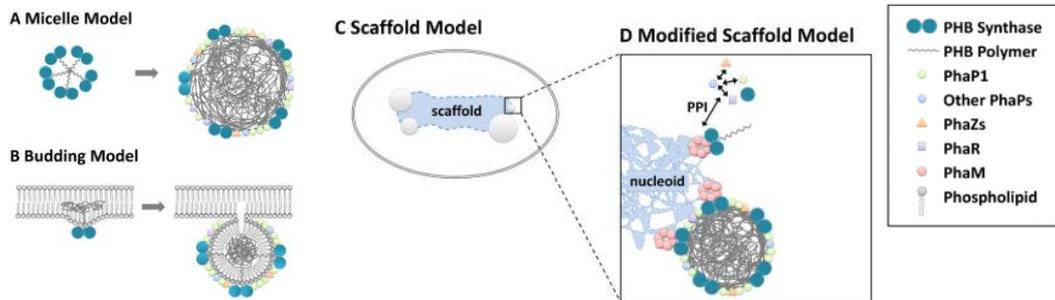


Figura 15. Diferentes modelos de la formación de gránulos de PHB. Modificado de Jendrossek & Pfeiffer, 2014.

- En el modelo de Micelas se asume que las moléculas de PHB sintasa solubles (citoplasmáticas) comienzan a sintetizar la molécula de PHB hidrófoba si la concentración del sustrato (3-hidroxi butiril-CoA) es alta, agregando las cadenas de polímero nacientes y formando estructuras similares a micelas en el citoplasma con moléculas de PhaC parcialmente hidrófilas sobre la superficie del polímero, fasinas y otras PGAP (Jendrossek & Pfeiffer, 2014; Rehm, 2006).
- En el modelo de gemación, se asume que la PHB sintasa está unida directa o indirectamente a la membrana citoplasmática y que la cadena de PHB en crecimiento se libera en la bicapa de la membrana, lo que lleva a la formación de gránulos dentro de la membrana citoplasmática, con la integración de oligómeros 3HB, conocida como oligo PHB. Posteriormente, los gránulos se desprenden, y las fasinas y PGAP se adhieren (Jendrossek & Pfeiffer, 2014).
- Por otra parte, en *R. eutropha* se ha investigado el modelo de andamio y polos celulares; sin embargo, siguen siendo debatibles para otras bacterias, puesto que el modelo de andamio asume que la PHB sintasa de los gránulos de PHB nacientes se une a una molécula de andamio aún desconocida dentro de la célula. En este caso, la localización subcelular de los gránulos de PHB depende de la localización de la célula acumuladora de PHB.

- Por último, en el modelo de los polos celulares, se sugiere que los gránulos de PHB se sintetizan en la periferia celular y/o cerca de la región del polo celular, formada por la fasina PhaM, que interactúa con el DNA y el nucleóide uniendo los gránulos de PHB al nucleóide bacteriano, iniciando así el proceso, mediante un complejo conocido como complejo PhaM-PhaC que ya se discutió anteriormente (Jendrossek & Pfeiffer, 2014).

PhaH es una proteína asociada al carbonosoma que posee dos dominios HhH

En un estudio reciente se realizó el análisis proteómico de las proteínas asociadas a los gránulos de PHB en *C. crescentus*. De ahí se obtuvo, que solamente una proteína adicional a las identificadas por métodos bioinformáticos (CC_1098 o PhaH) demostró una fuerte localización citoplasmática similar a la observada en los gránulos dentro de las células. Gracias a la secuenciación y a la búsqueda bioinformática de la proteína, se predijo que se trataba de una proteína citoplasmática con un dominio hélice hidrofóbica en la región amino terminal y dos dominios Helix-hairpin-Helix (HhH) en la región carboxilo terminal (Salinas et al., 2023).

Estos dominios HhH son muy reconocidos porque están presentes en las proteínas de unión a DNA no específicas de secuencias tanto en procariontes y eucariontes y son tramos de aproximadamente 20 residuos de aminoácidos. La interacción de este dominio con el DNA podría implicar la formación de puentes de hidrógeno entre los nitrógenos del esqueleto de la proteína y grupos fosfato del DNA; por lo que usualmente, el dominio HhH se encuentra en aquellas proteínas involucradas en actividades enzimáticas y de unión, generalmente encontrándose dos dominios HhH por proteína (Doherty, Serpell, & Ponting, 1996; Shao & Grishin, 2000), y en donde se han detectado en una amplia variedad de proteínas como DNA polimerasas, DNA ligasas dependientes de NAD⁺, endonucleasas, proteínas ribosómicas S13 y DNA glicosilasas (Trasviña-Arenas, Demir, Lin, & David, 2021).

En los primeros estudios sobre los dominios HhH se observó que éstos podían ser individuales o estar unidos en dos dominios. La estructura de un motivo HhH individual en varias proteínas fue analizado en detalle por Doherty et al., 1996, quien concluyó que las proteínas que contienen un solo dominio HhH no comparten un pliegue común y que

el dominio HhH en ellas existen como unidades más bien separadas. En otros estudios como el de Shao & Grishin, 2000, demostraron que los motivos HhH generalmente están involucrados en la formación de una estructura más grande formado por cinco hélices α que se denominan HhH_2 . Se trata de una unidad pseudo-doble compuesta por dos motivos HhH unidos mediante un conector α -hélice.

Además, se menciona que la presencia de dos motivos dentro de un dominio HhH_2 proporciona una unión simétrica en ambas cadenas de DNA y facilita la formación de interacciones más fuertes y en todas ellas parece plegar el DNA, específicamente en proteínas tales como RuvA, DNA polimerasa β , y dos motivos HhH adicionales recientemente detectados en las DNA glicosilasas (Shao & Grishin, 2000; Trasviña-Arenas et al., 2021).

Estructuralmente, el motivo HhH forma un par de hélices α antiparalelas conectadas por un bucle similar a una horquilla. Este bucle está involucrado en las interacciones con el DNA y generalmente contiene un patrón de secuencia consenso de glicina-aminoácido hidrofóbico-glicina (GhG), donde h es un residuo hidrofóbico que comúnmente es Ile, Val o Leu (**Figura 16**). La segunda G del consenso sirve como una tapa N-terminal de la segunda hélice α , y el residuo hidrofóbico h contribuye a las interacciones entre las dos hélices α del motivo (Thayer, Ahern, Xing, Cunningham, & Tainer, 1995).

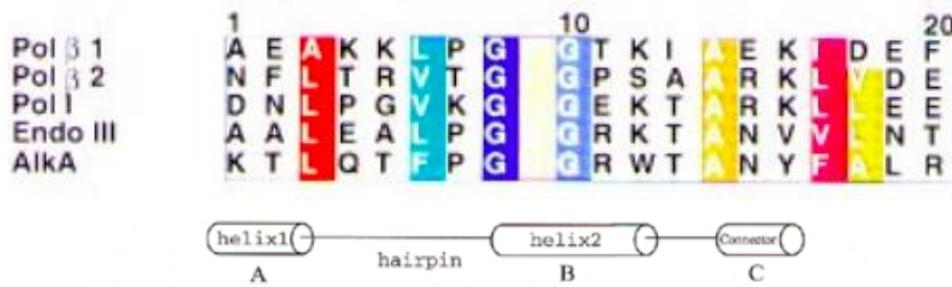


Figura 16. Motivo HhH y el patrón de secuencia GhG. Tomado y editado de Doherty et al., 1996; Shao & Grishin, 2000.

Continuando con la búsqueda bioinformática y tratando de visualizar a la proteína CC1098 o PhaH, se realizó una búsqueda en Alphafold y se encontró que la proteína PhaH o CC_1098 consta de aproximadamente 229 aminoácidos, con una predicción de dos dominios HhH al final de la proteína (**Figura 17**), teniendo en uno de ellos la

secuencia consenso GhG y algunos aminoácidos conservados, como era de esperarse en dominios HhH.

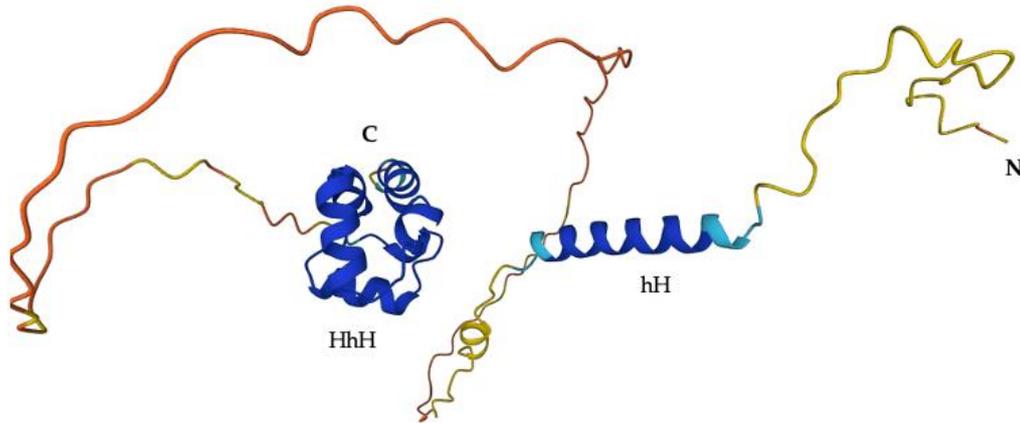


Figura 17. Estructura terciaria de PhaH predicha por AlphaFold. Tomado y editado de Jumper, 2021; Varadi, 2022.

En la **Figura 17** se observa con diferentes colores las diferentes regiones de la estructura de la proteína PhaH. Los colores representan una puntuación de confianza por residuo llamada (pLDDT); que va de 0 a 100. Cuando el color es azul fuerte existe una confianza alta de $>$ de 90; con color azul claro de 70-90; con color amarillo sería de 50-70, o sea bajo, y de color naranja por $<$ 50. Algunas regiones que tienen una puntuación de 50 pLDDT pueden no estar estructuradas de forma aislada, mientras que con el color azul fuerte y claro mostrarían un nivel de confianza alto en la estructura de la proteína (Jumper, 2021; Varadi, 2022). En este caso podemos alcanzar a observar en la **Figura 17** en el extremo amino, una hélice hidrofóbica con un nivel de confianza alto, al igual que dos dominios HhH localizados en el extremo carboxilo que representan nuestros dominios de estudio en este trabajo; sin embargo, existe una región de la proteína que se observa de color amarillo y naranja (posterior a la hélice hidrofóbica) que es probable no posea ningún tipo de plegamiento y esto ha sido confirmado en el trabajo de Salinas et al., 2023 que se trata de una región ácida.

Gracias a una búsqueda bioinformática y a la información proporcionada por el artículo de PhaH de Salinas et al., 2023, conocemos que PhaH es una proteína asociada a los carbonosomas de *C. crescentus* y posiblemente sea esencial para la distribución del nucleoide y/o viabilidad celular durante la fase estacionaria en condiciones de privación de nutrientes.

Es por ello que en este estudio se decidió estudiar únicamente los dominios HhH de la proteína PhaH de *C. crescentus* para determinar si esta interactúa o colocaliza con el DNA. Para lograr este objetivo se realizaron fusiones de proteínas fluorescentes, que nos permitieran determinar si el dominio HhH está implicado en mantener una interacción con el DNA.

HIPÓTESIS

Los dominios HhH (helix-hairpin-helix) presentes en enzimas que catalizan reacciones sobre el DNA como sustrato, les permiten su unión sin especificidad de secuencia; por lo que el dominio HhH encontrado en la proteína PhaH de *C. crescentus* podría interactuar uniéndose al DNA y colocalizando con su nucleoide.

OBJETIVO

Determinar si el dominio HhH de la proteína PhaH interactúa con el DNA al expresarla en *E. coli*.

Objetivos particulares

- Establecer las condiciones para compactar el nucleoide en la cepa *MG1655* de *E. coli* siguiendo la metodología de Zimmerman.
- Diseñar y construir un plásmido que permita la expresión simultánea en *E. coli* de la fusión del dominio HhH de la proteína PhaH con la proteína fluorescente mCherry y la proteína fluorescente YFP.
- Establecer las condiciones de inducción de las proteínas fluorescentes en las fusiones obtenidas, y tras realizar la filamentación y compactación.
- Comprobar mediante un análisis de colocalización si el dominio HhH colocaliza con el nucleoide compactado.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas bacterianas y medios de cultivo

Tabla 2. Plásmidos y cepas utilizadas en este trabajo			
Nombre	Resistencia a antibiótico	Descripción/Genotipo	Referencia
CB15N		Cepa silvestre de <i>C. crescentus</i>	
Top 10		Cepa de <i>E. coli</i> para clonaciones generales con la capacidad de selección de colonias blancas y azules	Invitrogen
MG1655T7	Tetraciclina	Cepa de <i>E. coli</i> derivada de la cepa <i>K-12</i> con un promotor de T7 polimerasa	Este trabajo
MG1655T7:: pACYCDuet mCherry109DhH	Cloranfenicol	Cepa <i>E. coli</i> con plásmido Duet expresando proteína mcherry1098DhH	Este trabajo
pVCHYN-4	Gentamicina	Plásmido utilizado en la integración de fusiones mCherry N-terminales inducibles por vanilato en el locus <i>vanA</i> en <i>C. crescentus</i>	(Thanbichler, Iniesta, & Shapiro, 2007)
pVYFPN-2	Kanamicina	Plásmido utilizado en la integración de fusiones YFP N-terminales inducibles por vanilato en el locus <i>vanA</i> en <i>C. crescentus</i>	(Thanbichler et al., 2007)
pVYFPN-4	Gentamicina		
pVYFPN-6	Cloranfenicol		
pXYFPN-2	Kanamicina	Plásmido utilizado en la integración de fusiones YFP N-	(Thanbichler et al., 2007)

pXYFPN-4	Gentamicina	terminales inducibles por xilosa en el locus <i>vanA</i> en <i>C. crescentus</i>	
pVVENN-2	Kanamicina	Plásmido utilizado en la integración de fusiones VEN N-terminales inducibles por vanilato en el locus <i>vanA</i> en <i>C. crescentus</i>	(Thanbichler et al., 2007)
pVVENN-4	Gentamicina		
pVVENN-6	Cloranfenicol		
pXVENN-2	Kanamicina	Plásmido utilizado la integración de fusiones VEN N-terminales inducibles por xilosa en el locus <i>vanA</i> en <i>C. crescentus</i>	(Thanbichler et al., 2007)
pXVENN-4	Gentamicina		
pXVENN-6	Cloranfenicol		
pACYC-Duet1	Cloranfenicol	Plásmido para la coexpresión de dos genes. El vector codifica dos sitios de clonación múltiple (MCS), cada uno de los cuales está retrocedido por un promotor T7, un operador lac y un sitio de unión al ribosoma.	Novagen, Sigma-Aldrich
pACYC-Duet1::mCherry1098DhH	Cloranfenicol	Plásmido con la proteína mCherry1098DhH	Este trabajo
pACYC-Duet1::mCherry1098DhH YFP	Cloranfenicol	Plásmido con la proteína mCherry1098DhH y YFP	Este trabajo

Tabla 3. Oligonucleótidos utilizados en este trabajo

Nombre del oligo	Secuencia 5' -> 3'
Oligo 909: 1098Nfus F1 SacI	CAAAGAGCTCGCGAGGCGGTGAACCTGGAAGC

<p>Oligo 910: 1098Nfus R1 NheI</p>	<p>CAAAGCTAGCGGCTGAGAGCCCCTACCCCTCC</p>
<p>Oligo 945: mCherry F1 EcoRI</p>	<p>CAAAGAATTCGATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGG</p>
<p>Oligo 585: 1098 R3 EcoRI</p>	<p>CAAAGAATTCAGAGCCCCTACCCCTCCGAAG</p>

Cultivo de *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* Top10 y MG1655 fueron crecidas en medio LB (1L: 10g bactotripton, 5g extracto de levadura y 10g NaCl). Para cultivos en medio sólido se agregó 15g/L de Bacto Agar, y se añadieron antibióticos en casos necesarios, Kanamicina 0.5% 10µl/ml, Gentamicina 0.3% 5µl/ml y Cloranfenicol 0.1% 2µl/ml. Ambas cepas se crecieron a 37°C en condición de agitación.

Criopreservación de las cepas obtenidas

Para preservar las cepas bacterianas de interés, se añaden 900µl de cultivo en fase estacionaria y 100µl de DMSO; se agitó muy bien por inversión y se almacenó a -70°C.

Métodos de Genética Molecular

Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se modelaron utilizando el programa DNAMAN, en donde se revisó la temperatura de desnaturalización (T_m), autocomplementariedad y la inserción de sitios de restricción. Los oligonucleótidos utilizados pueden ser consultados en la **Tabla 3**.

Amplificación de CC_1098 mediante PCR

Para iniciar el proceso de clonación bacteriana, primero se identificó bioinformáticamente la región que se quería amplificar de la proteína CC1098, por lo que se usaron los primers 909 y 910. Seguido a esto, se realizó un PCR con los siguientes elementos: 8µl de agua, 12.5µl de Buffer2x, 2.5µl dNTPS (2pM), 1µl de cada

oligonucleótido, 0.2µl de DNA Polimerasa Prime Star y 1µl de DNA de CB15N. El programa de PCR fue el siguiente: 95° C durante 2min, 30 ciclos consistentes de 94° C durante 35 seg, 58° C durante 15 seg, 72° C durante 1 min, y un último paso de 72° C durante 10 min.

Electroforesis

Se realizó un gel de agarosa mediante el pesaje de 0.3 g de agarosa, agregando 35 ml de Buffer E 1x y calentando la mezcla aproximadamente 20-30 segundos en el microondas. Posteriormente, se dejó enfriar y se agrega la cantidad de agua evaporada durante el proceso. Por último, se vertió la agarosa y se esperó 20 minutos hasta que el gel estuviera solidificado. Ya con el gel listo y solidificado, se corren las muestras de DNA.

Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.

Este proceso de purificación de productos de PCR se utiliza para purificar y extraer DNA a partir de geles de agarosa. Para esto, tiene que prepararse un gel de agarosa al 1% y correrse la muestra de DNA. Se tiñe el gel con bromuro de etidio y se corta la banda que contenga la muestra de interés con ayuda de un transiluminador de luz UV de longitud de onda larga (365nm), procurando un tiempo de exposición mínima. La banda del gel cortado se pasó a un tubo Eppendorf libre de DNAsas, se añadieron 300µl del Buffer de captura y se incubó 5 minutos a 65° C en el Termoblock para disolver el gel. Se revisó que la mezcla disuelta sea de color amarillo o naranja pálido. Si no es el caso, se agregan 5µl de Acetato de Sodio 3M pH 5.

Para cada purificación realizada, se colocó una columna GFX MicroSpin en un tubo de recolección. Se centrifugó la mezcla obtenida aproximadamente 20 segundos a 5,000 rpm, y se transfirió hasta 800µl de esta misma mezcla a la columna y al tubo de recolección. Se centrifugó la mezcla a 10,000 rpm por 30 segundos, y se retiró la columna del tubo de recolección para decantarlo en la columna nuevamente. Se repitió el mismo procedimiento 4 a 5 veces. Posteriormente, se agregó 500µl del Buffer de lavado (Wash Buffer), y se centrifugó a 10,000 rpm por 60 segundos una sola vez. Luego, se retiró el sobrenadante del tubo de recolección y se transfirió la columna a un nuevo tubo Eppendorf libre de DNAsas. Por último, se agregó 10-50µl del Buffer de Elución o 40µl

de agua libre de DNAsas para centrifugarse a 10,000 rpm durante 60 segundos y obtener el DNA ya purificado.

Digestión de purificación de PCR

La primera digestión se realizó utilizando con el plásmido pvCHYN4 y el producto del PCR de los oligos 909 y 910, con el objetivo de clonar el fragmento HhH de la proteína CC1098 en este plásmido. Para eso, fue necesario agregar las enzimas de restricción SacI y NheI.

La segunda digestión fue realizada utilizando el plásmido pACYC-Duet1 y el producto de los oligos 585 y 945, para clonar la proteína de fusión mCherry-1098HhH. Para esto, se agregó únicamente la enzima EcoRI, el buffer propio de la enzima, el plásmido, agua, RNAsa y se incubó a 37°C por 45 a 60 minutos. Posteriormente, se agregó fosfatasa SAP y ligasa para unirlos.

Transformación bacteriana por electroporación

Para este procedimiento, se obtuvieron células electrocompetentes de *E.coli* (Top10) y se agregaron 40µl a una celda de electroporación, junto con el producto de la clonación que se encuentra en el plásmido pvCHYN4 (1µl). Se dio un choque en el electroporador a 1800V y se pasó a recuperar las células en 1 ml de medio LB a 37°C durante una hora.

Posteriormente, se centrifugaron las células por 1 minuto a 10,000 rpm. El producto se decantó y plaqueó en cajas de Petri con medio, en este caso, con resistencia a Gentamicina. Las colonias transformadas se formaron de manera aislada y se seleccionaron algunas para purificar los plásmidos a pequeña escala (minipreps).

Preparación de minipreps (purificación de plásmido en pequeña escala)

Para aislar el DNA plasmídico de las colonias transformadas, se siguió el protocolo conocido como Minipreps. Primeramente, se colocaron cultivos de las colonias de interés en 10ml de medio LB, y se dejaron crecer durante toda la noche (overnight culture). Al siguiente día, estos cultivos se centrifugaron en tubos Eppendorf a 14,500 rpm por 60 segundos, descartando posteriormente un poco del sobrenadante. Seguido a esto, se realizó una mezcla maestra (master mix) conteniendo 300 µl de solución STET (8%

sacarosa, 5% tritón, 50 mM EDTA pH 8, 50 mM Tris-HCl pH 8) y 30 μ l de lisozima (10 μ l/ml) por cada miniprep que se preparó. Se agrega el equivalente a cada tubo y se colocó el tubo en agua hirviendo durante 45 segundos para posteriormente centrifugarlo a 14500 rpm durante 20 minutos. El sobrenadante se pasó a otro tubo de 1.5 ml, y se le agregó 300 μ l de isopropanol mezclándolo hasta homogeneizar. Después, se incubó en hielo durante 10 minutos, y se centrifugó por 20 minutos a 14,500 rpm para lograr la precipitación del DNA plasmídico. Por último, el sobrenadante se descartó, y quedó un pequeño botón el cual se lavó con 500 μ l de etanol al 70%. El alcohol se decantó en una sanita, y el precipitado restante se dejó secar en el Termoblock a 65°C por 10 minutos. El DNA se resuspendió en 40 μ l de agua desionizada.

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

Se realizó la purificación del plásmido a partir de cultivos de toda la noche (overnight cultures). Este cultivo de aproximadamente 10 ml se introdujo en 4 tubos Eppendorf, hasta tope, procurando terminar los 10ml de medio. Posteriormente, se centrifugaron 1 minuto a 10,000 rpm los 4 tubitos Eppendorf y se decantaron tratando de dejar intacto el botón formado. Nuevamente se centrifugó 1 minuto a 10000 rpm y se decantó. Más adelante, se utilizó el vórtex con el fin de homogeneizar la pastilla formada y finalmente se resuspendió el botón bacteriano en 250 μ l del Buffer P1. Si el buffer no contiene RNAsas, se agregan 6 μ l de éstas.

Más adelante, se añadieron 250 μ l del Buffer P2 (lisis) y se invirtió el tubo Eppendorf cuidadosamente de 4 a 6 veces durante máximo 5 minutos, por lo cual, transcurridos este tiempo se agregaron 350 μ l del Buffer N3 (neutralización) y nuevamente se invirtió de 4 a 6 veces los tubos Eppendorf. Se centrifugó durante 10 minutos a 14,500 rpm y se agregó el sobrenadante de cada tubo a una columna QIAGEN. Se esperó 1 minuto tras agregarlos a la columna y se centrifugaron los 3 tubos a 10,000 rpm por 30 segundos. Se agregó nuevamente el sobrenadante obtenido a la columna y se centrifugó a 10,000 rpm por 30 segundos. Se descartó el sobrenadante y se agregaron 500 μ l de Buffer PB a la columna y se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 segundos. Como siguiente paso, se decantó sobrenadante y se agregó 750 μ l de Buffer PE a la columna, y nuevamente se centrifugó a 10,000 rpm durante 60 segundos. Se esperó 1 minuto y se descartó el sobrenadante de

los tubos. Se centrifugó nuevamente durante 60 segundos a 10,000 rpm para remover el wash buffer y se procedió a pasar la columna QIAprep a un nuevo tubo de 1.5ml (ésteril).

Por último, el plásmido purificado se resuspendió en 80µl de agua libre de DNAsas al centro de la columna y se esperó 1 minuto. Se centrifugó durante 1 minuto a 10000 rpm. Para cuantificar la concentración del plásmido obtenido, se midió en un Nanodrop y se obtuvo una cantidad de 32.8ng/µl para el plásmido pACYC-Duet1.

Transformación química a *E. coli* por método de CaCl₂

Para la incorporación del DNA plasmídico dentro de las células, se utilizó la técnica de competencia de células bacterianas por CaCl₂. Como primer paso, se inocularon 10ml de medio LB (Luria-Bertani) que contenía la cepa de *E. coli* mG1655, cultivándose a 37°C, hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. Se esperó a que se llegara a una densidad óptica de 0.5 y se procedió a transferirlas a hielo en donde se incubaron durante 10 minutos, para posteriormente centrifugarlas a 5,000 rpm durante 5 minutos. Seguido a la centrifugación, se resuspendieron las células en 5ml de CaCl₂ 100mM y se 15 minutos en hielo durante 15 minutos.

Después, se volvieron a centrifugar las células durante 5 minutos a 5,000 rpm y se resuspendieron en 0.8ml de CaCl₂ 100mM y se dejaron incubando en hielo durante 1 hora. Tras la incubación en hielo, se tomaron 200µl de la suspensión bacteriana y se agregaron a un tubo Eppendorf que contenía 3µl de plásmido. Nuevamente, se dejó incubar en hielo, y transcurridos los 30 minutos se realizó un choque térmico a 42°C durante 2 minutos. La suspensión se mantuvo en hielo durante 2 minutos, y enseguida se añadieron 800µl de medio LB y se incubó la suspensión bacteriana a 37°C durante 1 hora. Por último, la suspensión bacteriana se centrifugó 20 segundos a 5000 rpm para homogeneizar y se sembró en un medio selectivo que contenía Cloranfenicol.

Inducción bacteriana utilizando IPTG y Arabinosa

Para comprobar si la transformación fue exitosa, además de realizar la digestión enzimática, electroforesis y minipreps, se realizó la inducción en *E. coli* mG1655T7:mcherry-1098 con IPTG y Arabinosa. Para ello, se introdujo en 2 tubos Eppendorf (control e inducción) 2ml de medio con células *E. coli* competentes previamente transformadas químicamente utilizando CaCl₂. Al tubo de inducción, se le

adicionó 20µl de IPTG 1mM y 40µl de Arabinosa al 0.2%. Por último, se dejaron inducir durante 1 hora y se observaron las células al microscopio.

Fluorescencia de células *E. coli* con la construcción mCherry1098ΔhH

Para los ensayos de microscopia de fluorescencia se realizaron camas de agarosa sobre portaobjetos; para este procedimiento se agregó en un tubo de ensayo 0.075 g de agarosa y 5ml de sales M2 1x, y calentando posteriormente el tubo (destapado) directamente sobre la flama del mechero, hasta observar que la agarosa se encontrara completamente disuelta. Se dejó enfriar un poco la agarosa y se colocaron de 700 a 800µl de agarosa sobre un portaobjetos limpio con 3 cubreobjetos apilados en ambos extremos. Después de colocar la solución, se cubrió lo más rápidamente posible con otro portaobjetos y se mantuvo ahí hasta que la agarosa solidificara (aproximadamente 5 minutos). Una vez polimerizada la agarosa, se deslizó con mucho cuidado el portaobjetos de arriba y quedó expuesta así la cama de agarosa. Inmediatamente, se colocaron de 1-2µl de la muestra de células *E. coli* y se colocó un cubreobjetos. La muestra se guardó en una cámara húmeda y se observó tanto en microscopio de campo claro y de fluorescencia con el objetivo 100x utilizando aceite de inmersión.

Crecimiento de cultivos con diferentes concentraciones de Cloranfenicol

Se procedió a realizar un ensayo con diferentes concentraciones de Cloranfenicol (Cloran) al 1%, en este caso 20µg/ml, 40µg/ml y 60µg/ml, para observar qué tanto disminuía la densidad óptica tras una hora de incubación. Esto se logró inoculando 8ml de medio LB con la cepa de *E. coli mG1655T7* en un tubo de ensayo, y agregando 2ml del mismo a cuatro tubos diferentes (control, 10x, 20x y 30x). Posteriormente, se agregó la cantidad requerida de Cloranfenicol 2µl/ml a cada tubo, que en este caso fueron 0µl, 40µl, 80µl y 120µl, respectivamente. Finalmente, se dejó incubar durante 1 hora y se midió densidad óptica de la muestras utilizando un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600nm.

Inducción de las proteínas YFP y mCherry-1098ΔhH, filamentación y compactación

Las células fueron crecidas en medio LB Cm Tc durante toda la noche a 37°C y al día siguiente se reinocularon en el mismo medio y se crecieron hasta llegar a una densidad óptica de ≈ 0.1 . Tras alcanzar la densidad óptica, se añadieron los inductores IPTG y

Arabinosa a una concentración final de 1mM de IPTG y arabinosa al 0.1%, y se dejaron incubar a 37°C durante una hora. Posterior a la inducción de las proteínas fluorescentes y para filamentar a las células (Hou et al., 2020), se agregó el antibiótico cefalexina a una concentración final de 3µg/ml, y se dejaron incubando durante 30 minutos. Después de ocurrida la filamentación y debido a que las células continúan creciendo, se agregó cloranfenicol (600µg/ml) para detener la síntesis de proteínas y compactar los nucleoides siguiendo la metodología de Zimmerman, 2002, 2006. Se dejaron compactar durante 40 a 45 minutos aproximadamente utilizando cloranfenicol, y se concentraron las células mediante centrifugación a un volumen de 200µl dentro de tubos Eppendorf. Para la tinción de los nucleoides y el DNA, se utilizó DAPI (50µg/ml) a una concentración final de 0.5µg/ml (1:100), y se dejaron reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente o incubando a 37°C por 15 minutos. En el tiempo restante se prepararonn camas de agarosa y PBS al 1%, y se colocó una gotita de 1µl de las células y posteriormente se colocó el cubreobjetos. Por último, se observaron las muestras utilizando el microscopio de fluorescencia con los filtros YFP, mCherry y DAPI.

Estrategia de clonación

El objetivo de la clonación fue insertar un gen objetivo dentro de un plásmido y amplificarlo n veces, para poder, en nuestro caso, expresar el gen de interés. El plásmido se introdujo en las bacterias mediante un proceso de transformación y las bacterias que portaban el plásmido fueron seleccionadas mediante la adición de antibióticos específicos. Como parte de las metodologías anteriormente mencionadas, aquí se ejemplifica el procedimiento de clonación que se llevó a cabo. En un principio se obtuvo la secuencia de la proteína CC1098 en la base de datos de NCBI (**AAK23082**) y se diseñaron los oligonucleótidos (primers) necesarios para amplificar la secuencia del dominio HhH (**Figura 18**).

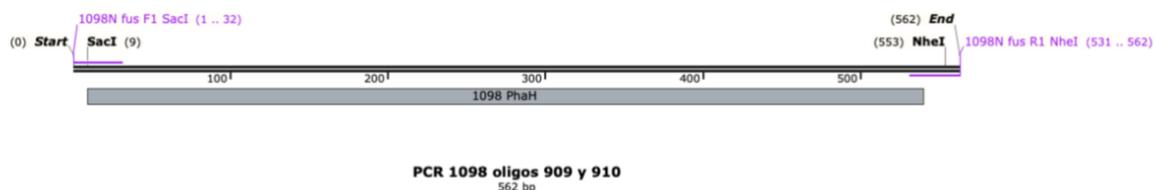


Figura 18. Proteína CC_1098 (dominio HhH) con sus respectivos primers.

Posteriormente al diseño de los oligonucleótidos que portan adicionalmente a los extremos algunos sitios de restricción específicos, se realizó la PCR de la secuencia CC1098 utilizando los oligos 1098N fus F1 SacI y 1098N fus R1 NheI. El resultado de la amplificación se puede observar en la **Figura 19**.

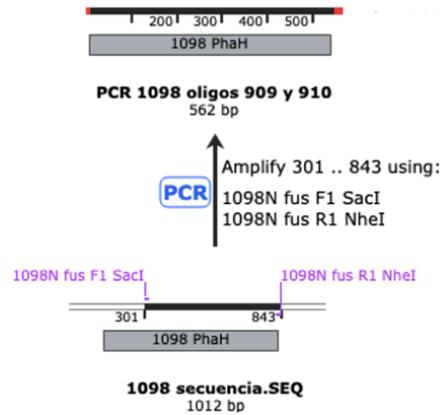


Figura 19. Estrategia de amplificación de la región HhH de la proteína PhaH (CC1098) utilizando los primers 1098N fus F1 SacI (forward) y 1098N fus R1 NheI (reverse).

Seguido a esto, se purificó el amplicón y se procedió a realizar la digestión enzimática e inserción del fragmento que posee SacI y NheI dentro del plásmido pvCHYN4, como se muestra en la **Figura 20**.

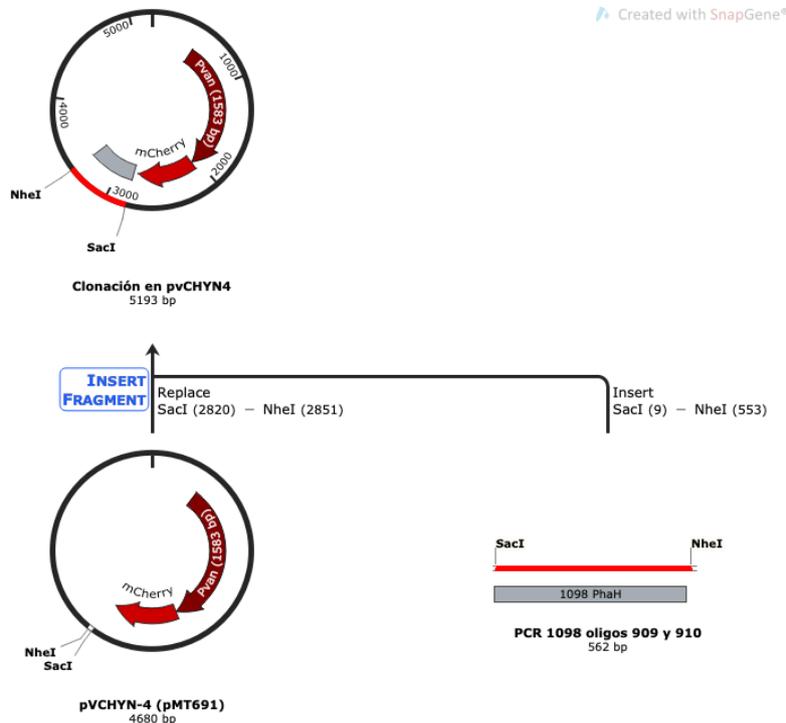


Figura 20. Estrategia de clonación del fragmento de PhaH flanqueado por los sitios de restricción SacI y NheI dentro del plásmido pvCHYN-4.

Posteriormente, se realizó el proceso de transformación bacteriana utilizando a las células *E.coli Top10*. La transformación fue exitosa y se obtuvieron varias colonias aisladas utilizando un medio de cultivo adicionado con Gentamicina. Posteriormente, se escogieron algunas colonias aisladas y se realizaron mini preps bacterianos, para evaluarlos mediante electroforesis en geles de agarosa.

Seguido de la preparación y selección de los minipreps viables, se realizó la purificación del plásmido con columnas QIAGEN y posteriormente se realizó una amplificación del fragmento (mCherry de pVCHYN4 con 585 EcoRI) fusionado con mCherry utilizando los oligonucleótidos 1098 R3 EcoRI y mCherry F1 EcoRI, como se muestra en la **Figura 21**.

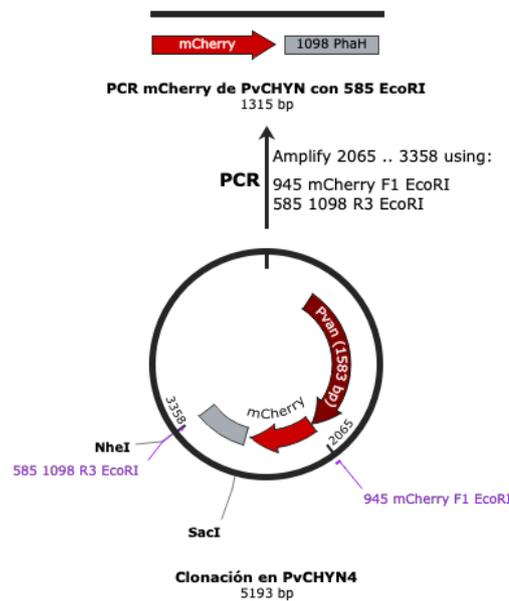


Figura 21. Estrategia de amplificación del fragmento 1098 HhH fusionado a mCherry, a partir de la construcción pVCHYN4-1098HhH utilizando los primers mCherry F1 EcoRI y 1098 R3 EcoRI.

El resultado de la amplificación se digirió enzimáticamente con las enzimas EcoRI, y dando como resultado un producto de 1315 pares de bases (pb) (**Figura 22**).

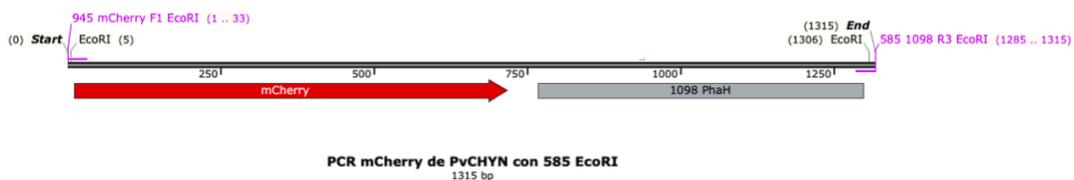


Figura 22. Secuencia de 1098 PhaH fusionado a mcherry (1315 pb). Se muestra la longitud de cada fragmento.

Una vez que se logró amplificar el fragmento de la proteína 1098mCherry utilizando los sitios de restricción EcoRI (en los extremos) dentro de plásmido comercial pACYC-Duet1 (**Figura 23**), el cual es un plásmido funcional utilizado para realizar inducciones debido a que posee un promotor lacI, dos MCS, RBS, un gen de resistencia a cloranfenicol y un promotor para la T7 RNA polimerasa, esencial para transcribir genes objetivo.

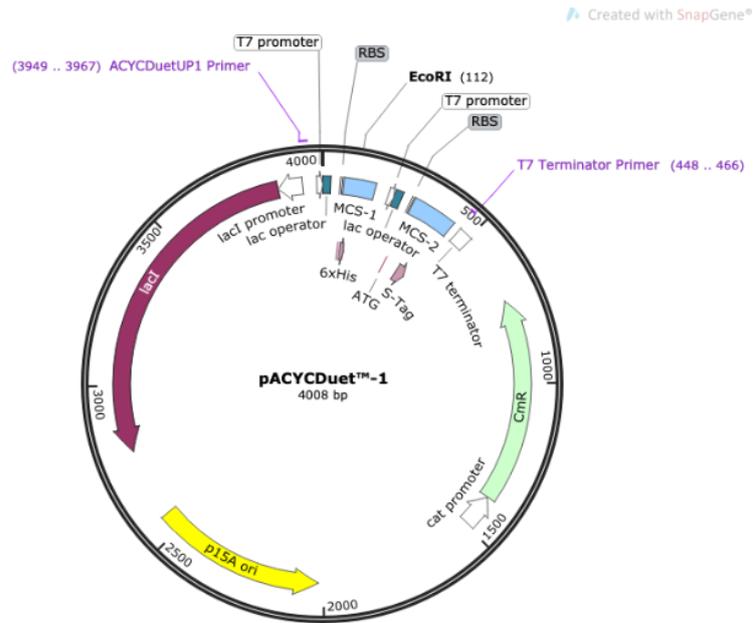


Figura 23. Organización genética del plásmido pACYC-Duet1.

La construcción se puede observar a continuación donde el plásmido pACYC-Duet1 (4008 pb) ahora posee un fragmento de 1306 pares de bases insertado en el MCS 1 en donde se localiza un sitio EcoRI, dando como resultado un plásmido con una longitud de 5314 pb (**Figura 24**).

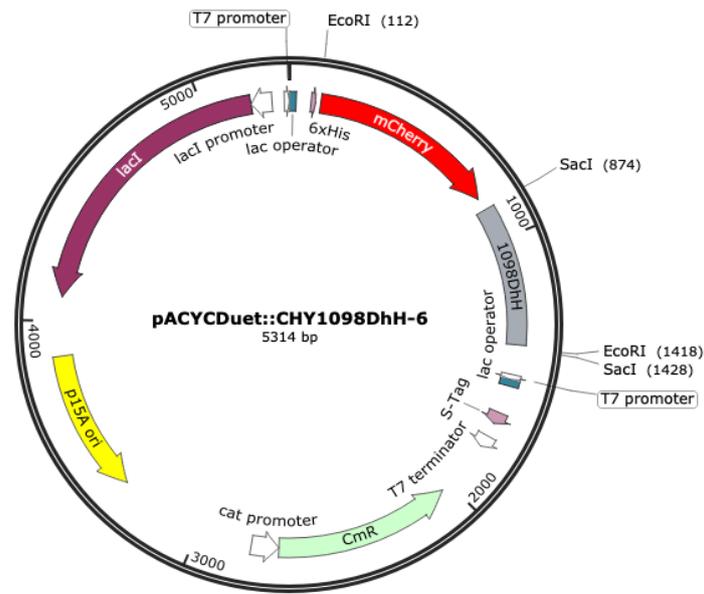


Figura 24. Inserción del fragmento mCherry-HhH dentro del plásmido pACYCDuet1, utilizado para la clonación bacteriana en células MG1655T7 *E. coli*. Creado con SnapGene.

Por último, se agregó la secuencia de la proteína YFP dentro del MCS-2 para obtener un control negativo clonando NdeI y EcoRV, teniendo como segunda construcción el siguiente plásmido (**Figura 25**).

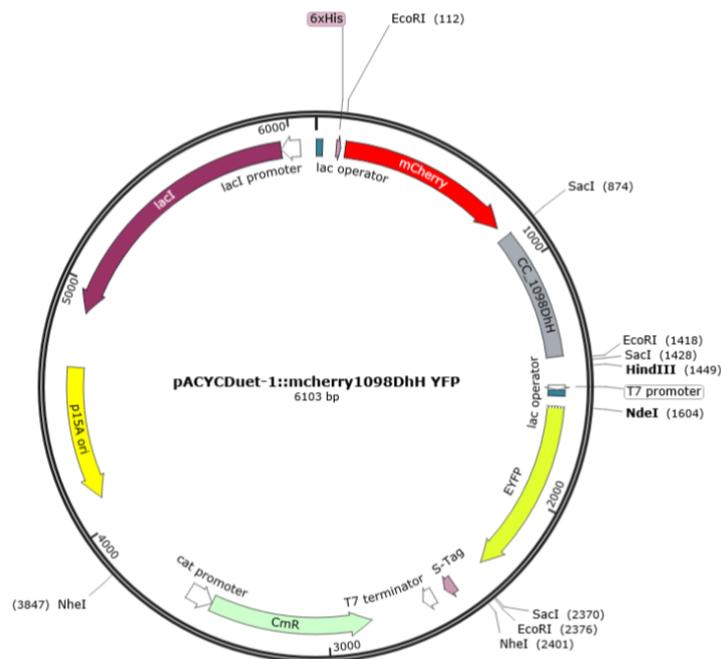


Figura 25. Plásmido pACYCDuet1:: CHY1098DhH YFP-6 utilizado para la expresión en células MG1655T7 *E. coli*. Creado con SnapGene.

RESULTADOS

La proteína *CC_1098* es una proteína que posee dos dominios HhH

En el artículo de Salinas et al., 2023, realizaron un análisis proteómico de los gránulos de PHB en *Caulobacter* y se obtuvo que de 9 proteínas, únicamente *CC_1098* colocalizaba con los gránulos (**Ver Anexo 2**). Por esta razón, se realizó una búsqueda bioinformática en CDD Search y se encontró que esta proteína tiene una lista de hits de importancia, debido a que se trata de dominios de unión al DNA. Entre estos se encuentra HhH (hélice horquilla hélice), rne (de ribonucleasas), entre otros (**Figura 26**).

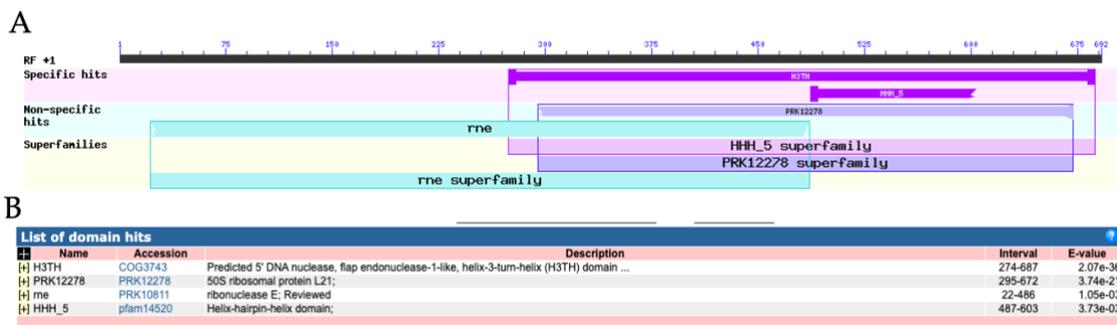


Figura 26. Búsqueda bioinformática en NCBI CD Search de hits de importancia en la proteína PhaH. **A.** Resumen gráfico de los hits obtenidos, hits específicos, no específicos y superfamilias. **B.** Lista de los hits y sus dominios, junto con intervalos y E-value.

En el estudio de Salinas et al., 2023, determinaron que la proteína PhaH posee dos dominios HhH (HhH_2) en el extremo carboxilo, aunque los resultados del programa CDD solo predijo uno. Por esta razón, se consideró necesario el realizar una fusión con una proteína fluorescente en el extremo amino terminal para expresar únicamente el dominio HhH_2 y así determinar si este dominio es capaz de interactuar con el DNA en células vivas.

Por otra parte, para poder identificar las proteínas relacionadas con PHB presentes en *C. crescentus*, se realizó una búsqueda bioinformática de todas las PGAPs presentes así como su localización en el genoma, como se muestra a continuación en la **Figura 27**. *C. crescentus* posee un arreglo diferente al de otras bacterias tales como *C. necator*, debido a que la sintasa se encuentra río arriba en el genoma y es sustituida por phaR.

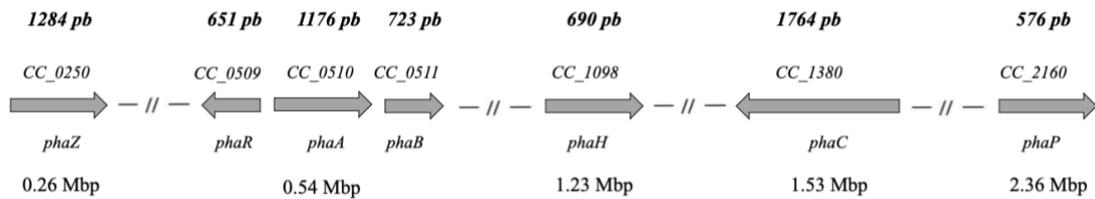


Figura 27. Contexto genómico de proteínas relacionadas con el PHB presentes en el genoma de *C. crescentus*.

Se puede observar en la **Figura 28** que el dominio HhH de la proteína 1098 se encuentra en el extremo carboxilo, específicamente entre los residuos de aminoácidos 163 a 229, y desde el residuo del aminoácido 16 al 49 se encuentra una hélice hidrofóbica.

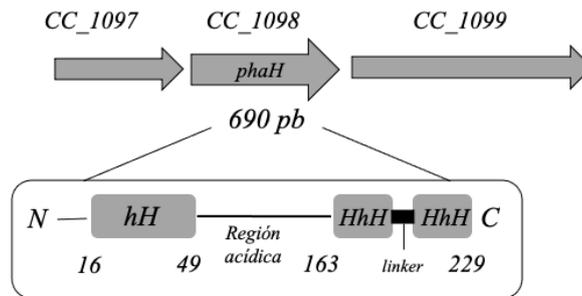


Figura 28. Contexto genómico y representación de la proteína PhaH.

De igual manera se pueden observar los gránulos de PHB encontrados en *C. crescentus* (**Figura 29**), en condición de crecimiento en medios mínimos con alto fosfato (**Figura 29A**) no se alcanzan a distinguir tan fácilmente los gránulos (flecha blanca) y la prosteca no se ve elongada (flecha negra), a diferencia de cuando crecen en un medio con bajo fosfato (**Figura 29B**) donde la prosteca se elonga (flecha negra) y se alcanzan a ver de tres a cuatro gránulos de PHB por célula (flecha blanca). Ya ejemplificadas las dos condiciones de crecimiento en *C. crescentus*, podemos ver en la **Figura 29C** la micrografía electrónica de células de CB15 cultivadas en medio bajo fosfato (M5IGG) y en donde se muestra la presencia de estos gránulos con mayor nitidez.

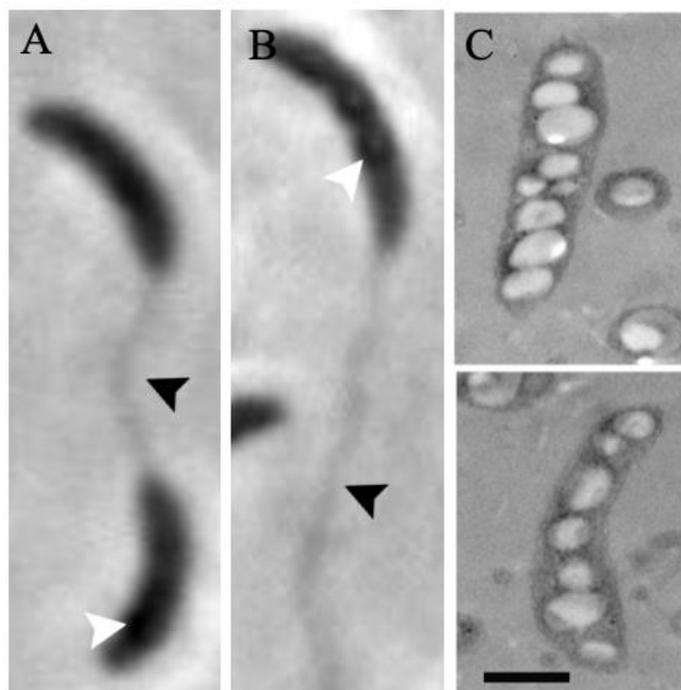


Figura 29. Gránulos de PHB. **A.** Células de *Caulobacter* crecidas en medio con alto fosfato. **B.** Células de *Caulobacter* crecidas en medio con bajo fosfato. **C.** Micrografía electrónica de células de CB15 cultivadas en medio bajo en fosfato (*M5IGG*) que se tiñieron para detectar PHB. Tomado y modificado de Salinas et al., 2023.

Localización de la proteína mCherry-HhH en *E. coli*

Para determinar si el dominio HhH de PhaH puede interactuar con el DNA en células vivas se decidió determinar si una fusión fluorescente con este dominio colocalizaba con el nucleóide bacteriano. Debido a que en *C. crescentus* el nucleóide se organiza a lo largo de la célula, se realizó una construcción expresando el dominio *HhH* fusionado a la proteína fluorescente mCherry en *E. coli*, utilizando el plásmido pACYC-Duet1. La construcción de este plásmido se describe en materiales y métodos. El plásmido permite la expresión de mCherry-PhaH bajo el control de los inductores IPTG y Arabinosa. Se realizó una curva de inducción y se ajustaron las condiciones para obtener una señal de fluorescencia apropiada. Como se alcanza a observar en la **Figura 30**, a altas concentraciones de los inductores, la fluorescencia detectada era muy alta, lo que nos imposibilitaría una visualización correcta de las regiones libres de DNA, por lo que se realizó una curva con diferentes concentraciones de inductores como las que se muestran en la **Figura 30**. Sin embargo, la nitidez de la imagen disminuía conforme disminuíamos la concentración de los inductores. La fluorescencia de la proteína mCherry ocupó todo el cuerpo celular, y si se considera que las regiones libres de DNA en las células de *E.*

coli son pequeñas, este resultado nos podría indicar una baja afinidad de la proteína por el nucleóide, lo que no nos permitiría distinguir entre la proteína unida, el nucleóide y la proteína libre.

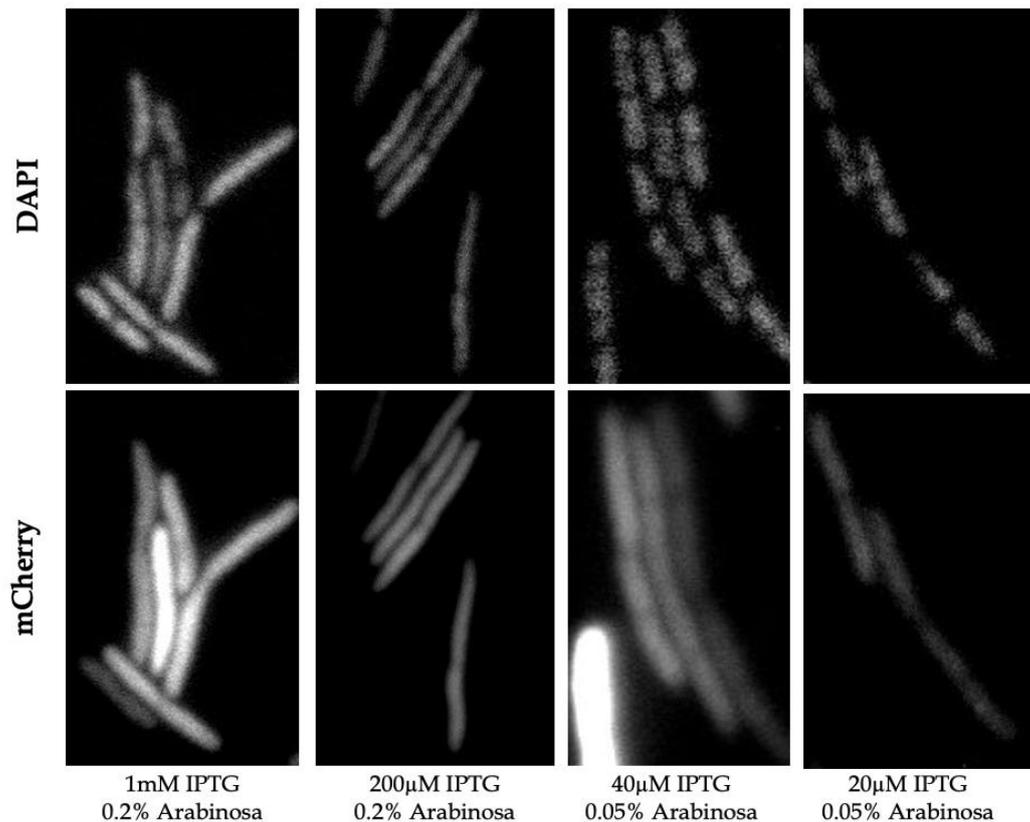


Figura 30. Fluorescencia de proteína mCherry-HhH y tinción con DAPI al utilizar distintas concentraciones de inductores (IPTG y arabinosa).

Debido a esta razón, se diseñó una estrategia en donde se pudiera determinar con mayor precisión si la localización de la proteína colocalizaba con la región del nucleóide.

Establecimiento de las condiciones de inducción de la compactación del nucleóide y la filamentación celular

Para incrementar el tamaño de las regiones libres de DNA se decidió inducir la compactación del nucleóide mediante la inhibición de la transcripción. La metodología de Zimmerman, 2006, requirió incubar las células a 37 °C con agitación en medio LB, y se añadió colorante fluorescente DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) en concentración final de 0,5 µg/ml al medio de crecimiento inicial para marcar el DNA de los nucleóides y posteriormente se trató con Cloranfenicol (30 µg/ml) durante 1 h en condiciones de crecimiento. Debido a que el plásmido utilizado confiere resistencia a este antibiótico

(**figura 31A**) se probó inicialmente con tres diferentes concentraciones (20, 40 y 60 $\mu\text{g/ml}$) de Cloranfenicol (**Figura 31**). Al evaluar la compactación en el nucleoide, se observó mayor efecto con la concentración de 60 $\mu\text{g/ml}$.

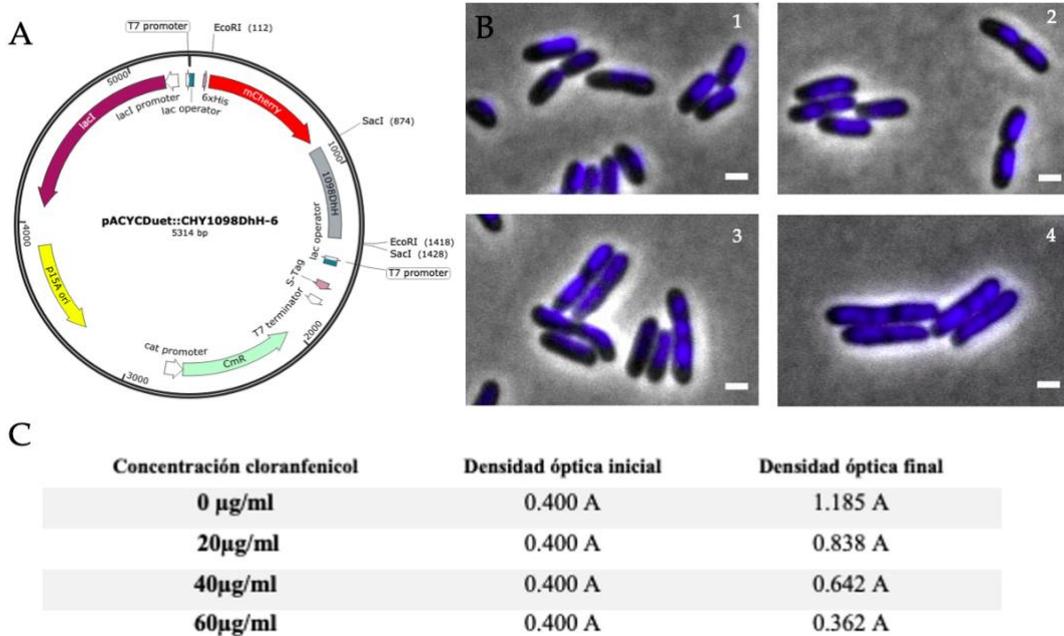


Figura 31. Compactación de nucleoide a diferentes concentraciones de Cloranfenicol. **A.** Construcción del plásmido pACYC-Duet1. **B.** Compactación de los nucleoides en ausencia de cloranfenicol (1), con 20 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol (2), 40 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol (3) y 60 $\mu\text{g/ml}$ de cloranfenicol (4). **C.** Tabla de densidades ópticas tras 1 hora de incubación con diferente concentración de cloranfenicol.

Al medir la densidad óptica a distintas concentraciones de cloranfenicol, se obtuvo que solo la concentración de 60 $\mu\text{g/ml}$, inhibió el crecimiento tras una hora de incubación (**Figura 31C**), lo que se refleja con la compactación del nucleoide bajo esta condición.

Como se puede observar en la **Figura 31**, a pesar de que ocurrió la compactación del nucleoide, el espacio citoplásmico libre de DNA fue todavía reducido, por lo que se decidió filamentar las células utilizando el tratamiento con cefalexina previo al tratamiento con cloranfenicol, siguiendo el protocolo reportado anteriormente (Ginez, 2020). La Cefalexina actúa preferencialmente sobre la enzima PBP3, inhibiendo así la síntesis de la pared celular durante el proceso de división, lo que culminó en la filamentación celular.

En las pruebas posteriores donde adicionalmente se filamentaron las células mediante un tratamiento previo con Cefalexina, se determinó que a concentraciones mayores de Cloranfenicol mejoraba la separación entre cada uno de los nucleoides y/o regiones libres de DNA (**Figura 32**).

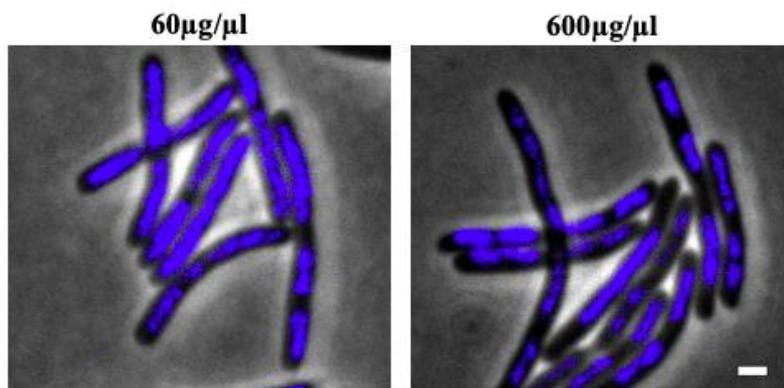


Figura 32. Compactación con cloranfenicol a 60µg/ml (izquierda) y 600µg/ml (derecha).

La mejor estrategia, consistió en que se expresaran las proteínas fluorescentes, se filamentaran las células y posteriormente ocurriera la compactación de los nucleoides, que a su vez tendría un efecto al inhibir la síntesis de proteínas y el crecimiento bacteriano, por lo que debía ser uno de los pasos finales previo a la tinción de los nucleoides mediante DAPI. Al final, los tiempos y la estrategia experimental quedó de la siguiente manera como se observa en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Estrategia de ensayo de filamentación con compactación de nucleoides y sus tiempos.

Paso	Tiempo	Proceso	Explicación del proceso
1	30 min	Cultivo a 0.1 D.O.	Dependiendo el ON y el tamaño del inoculo será el tiempo de espera hasta llegar a una D.O. de 0.1, la cual es óptima e indicada para iniciar la inducción de la proteína fluorescente.
2	1h	Inducción de las proteínas fluorescentes mCherry y YFP	Para el caso de la proteína mCherry, observamos que 1 hora fue suficiente para la maduración de la proteína, sin embargo, la YFP requería 1h 30 min en madurar. La concentración del inductor fueron 1mM de IPTG, Arabinosa al 0.2% para inducir ambas proteínas.
3	30 min	Filamentación con Cefalexina	La concentración que mostró un mayor efecto para la visualización de la filamentación de las células fue de 3mg/ml de Cefalexina.

4	30 min	Compactación de nucleoides	Debido al gen de resistencia a Cloranfenicol presente, se optó por utilizar una mayor concentración de Cloranfenicol que la utilizada en la metodología de Zimmerman, 2006.
5	15 min	Tinción de nucleoides con DAPI	Se resuspendieron las células en un menor volumen, y se agregó DAPI a una concentración final de 0.5µg/ml.

El dominio HhH de la proteína PhaH colocalizó con el nucleoide en células filamentadas.

Para determinar si la proteína de fusión mCherry-HhH colocalizaba con el nucleoide, primeramente se establecieron las condiciones de inducción de la proteína adicionando distintas concentraciones de Arabinosa e IPTG y se procedió a determinar cuál sería la concentración apropiada bajo las condiciones de filamentación de las células y compactación del nucleoide previamente ensayadas. Las concentraciones óptimas fueron 1mM de IPTG, Arabinosa al 0.2%, 3mg/ml de Cefalexina y 600 µg/ml de Cloranfenicol, respectivamente.

Al observar los resultados obtenidos por microscopía, se observó que tanto la fluorescencia del DAPI así como de mCherry colocalizaron con la región nucleoide y de la proteína fluorescente, como se observa a continuación en la **Figura 33**.

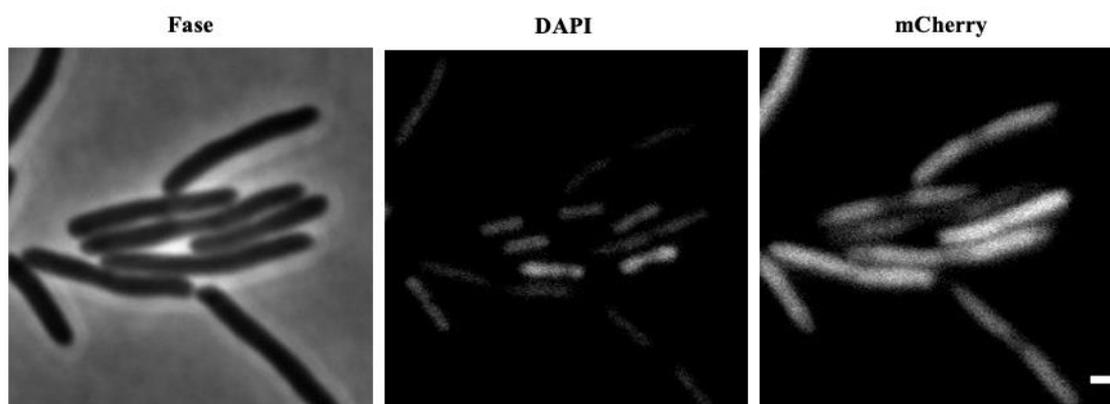


Figura 33. Fluorescencia de la proteína mCherry-HhH y tinción con DAPI. En esta imagen se observa a la izquierda la fase de células, en el centro se observan los nucleoides teñidos con DAPI y a la derecha la fluorescencia de la proteína mCherry-HhH. La barra en color blanco representa 1 µm.

En la microscopia de contraste de fases se observan claramente a las células filamentadas y se aprecian los sitios donde existió una constricción de la célula resultante por medio de un proceso de división que fue detenido por la Cefalexina. No se observó alguna característica morfológica que afectara la localización de la proteína mCherry-HhH o el nucleóide. Analizando la **Figura 33**, no se observó ninguna constricción o irregularidad en las células tomadas en fase, por lo que posteriormente se pasó a observar la tinción con el colorante DAPI. En la imagen central, se observa la localización del DNA compactado en la región del nucleóide. En la imagen de la derecha, se observa que la fluorescencia de la proteína mCherry-HhH adquirió un cambio en su intensidad a lo largo de las células. Las regiones más intensas colocalizaron con la señal del nucleóide, lo cual indica que justamente en donde se localizó el DNA existió una mayor cantidad de proteína fluorescente mCherry.

El fenómeno anterior también fue observado en la **Figura 34**. En la imagen de toma de fase las células parecen estar igualmente integras y el efecto de la separación de los nucleóides y la localización de la proteína mCherry-HhH fue la misma como en la **Figura 33**. Las flechas blancas indican los espacios en el DAPI y la proteína mCherry-HhH, y puede observarse existieron estas separaciones, pero en el caso de la señal de mCherry se observan regiones de menor intensidad y no completamente vacías como el caso de la fluorescencia con DAPI.

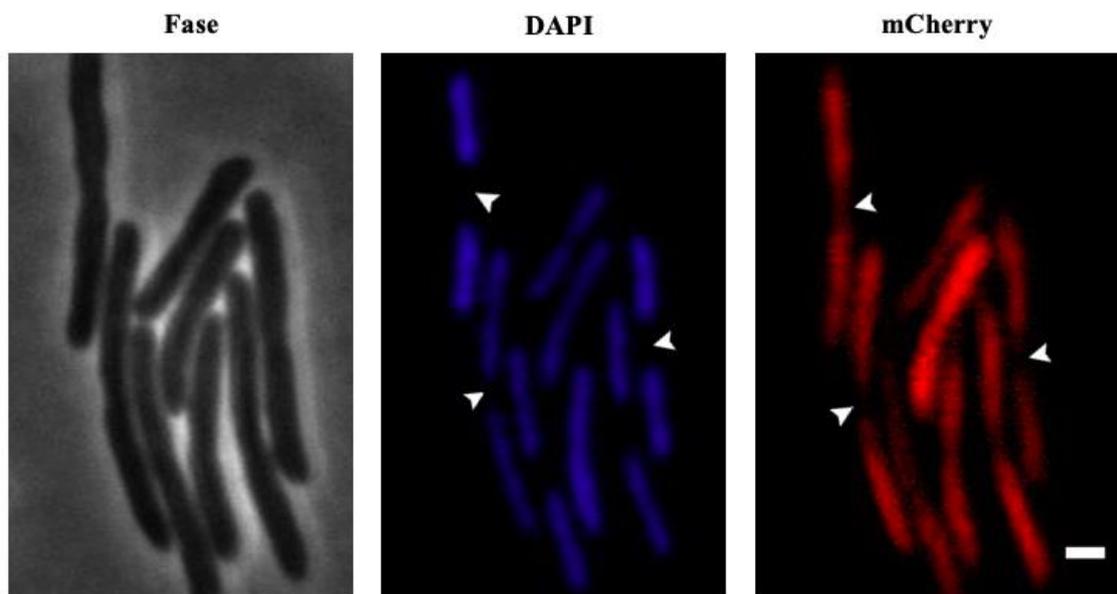


Figura 34. Tinción e inducción de *E. coli* MG165T7::pCHY1098-6 al adicionar cloranfenicol 1.2mg/ml de Cloranfenicol y 6 mg de Cefalexina.

La colocalización del dominio HhH de la proteína PhaH con la región del nucleóide generan un patrón similar

La colocalización de dos sondas puede identificarse por la aparición de estructuras cuyo color refleja la contribución combinada de ambas sondas cuando las imágenes de cada sonda se superponen o fusionan (**merge**) (Dunn, Kamocka, & McDonald, 2011). Como una primera aproximación para medir la colocalización, se decidió graficar los valores de fluorescencia tanto del DAPI como de mCherry a lo largo de la célula. Primeramente, se eligieron algunas células que aparecían en las fotografías y utilizando el programa ImageJ, se graficaron los valores de la escala de gris trazando una línea puntuada y siguiendo el eje longitudinal de la célula que se indica mediante una flecha blanca en la **Figura 35**.

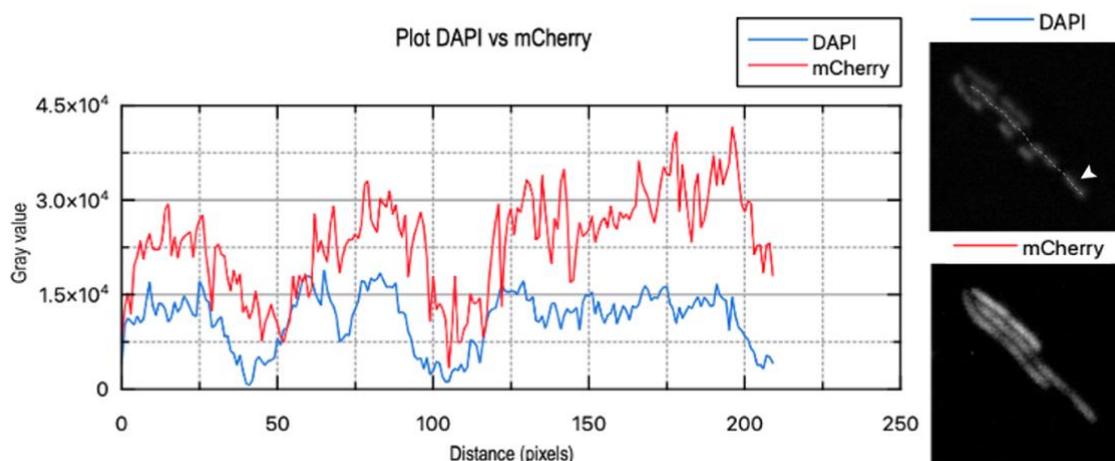


Figura 35. Plot de DAPI vs mCherry de una sección de fluorescencia de mCherry-HhH al adicionar 3mg de Cefalexina y 1.2 mg/ml de Cloranfenicol. La inducción se realizó utilizando Arabinosa al 0.05% e IPTG 20 μ M.

Los valores de la escala de gris provenientes de la **Figura 35** muestran que la fluorescencia del DAPI es significativamente menor en todo momento pues ésta no sobrepasa valores de 20000 vs el Gray Value, mientras que la fluorescencia de mCherry presenta picos y valores significativamente mayores (casi el doble). A pesar de no mostrar una colocalización completa, se mantuvo el mismo patrón en los valores de fluorescencia tanto de DAPI como de mCherry que son los picos mostrados con color azul y rojo, respectivamente.

Al contrario de lo que se mostró en la **Figura 35**, la gráfica de la **Figura 36** muestra picos en la fluorescencia de mCherry mucho más abruptos y llegando a ser

menores que los de DAPI, pero estas caídas se mantienen se mantienen tanto en DAPI como en mCherry.

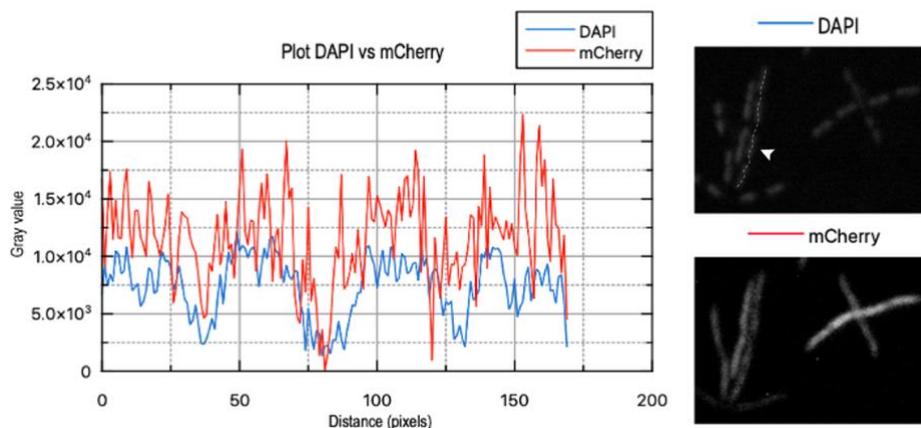


Figura 36. Plot de DAPI vs mCherry de otra sección de fluorescencia de mCherry-HhH al adicionar 3mg de Cefalexina y 1.2 mg/ml de Cloranfenicol. La inducción se realizó utilizando Arabinosa al 0.05% e IPTG 20 μ M.

Los resultados anteriores indican que, aunque la proteína mCherry-HhH se acumula en la región donde se encuentran los nucleoides, una proporción de la proteína se encuentra dispersa en el citoplasma.

Para obtener un valor estadístico, se realizó un análisis de colocación utilizando el programa “Colocalization Finder” de Image J. Este programa generó un diagrama de dispersión a partir de dos imágenes iniciales que tienen un mismo tamaño junto con una superposición RGB de las imágenes originales y el programa calculó el coeficiente de correlación. El análisis de una sección aislada de una imagen por este programa se muestra en la **Figura 37**, ahí se puede observar que la gráfica de dispersión mostró una correlación poco ajustada lo que se refleja en un coeficiente de Pearson obtenido de **0.6891**, indicando que hay una gran cantidad de ruido, datos dispersos y la tendencia no es totalmente lineal como se debería esperar.

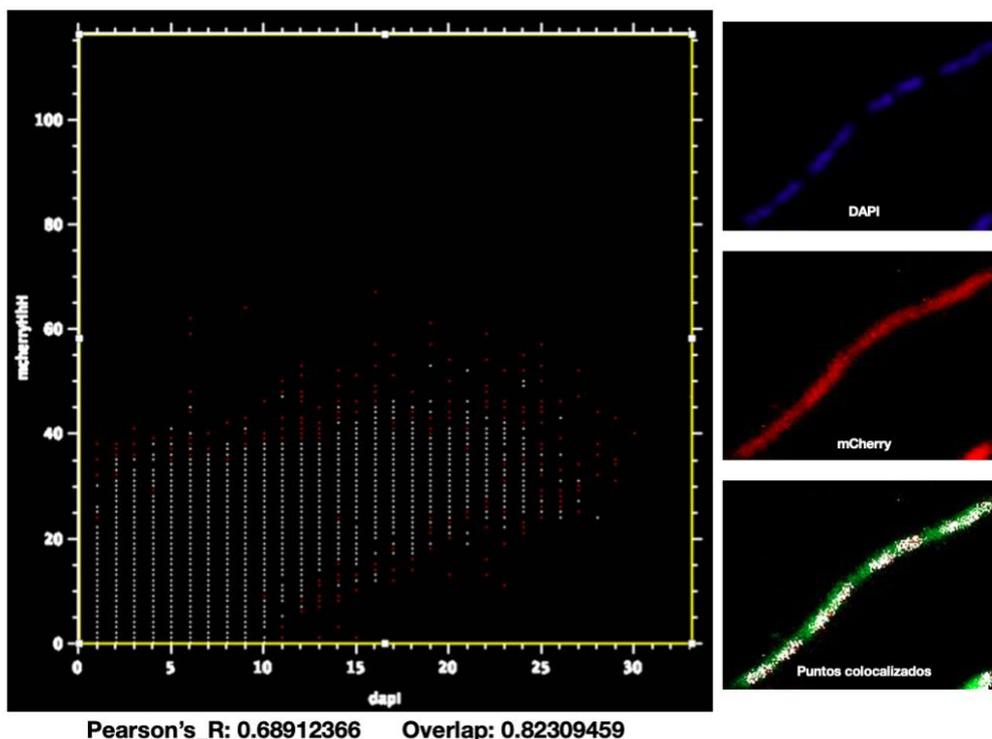


Figura 37. Scatter Plot de imagen con DAPI y mCherry de células *E. coli* *MGI1655T7::pCHY1098-6*. Se muestran 3 imágenes, la imagen superior con DAPI, la imagen central con mCherry y la imagen inferior mostrando los puntos colocalizados generados por el programa ImageJ.

A pesar de este valor bajo en la colocalización, aún no es posible descartar otras posibilidades que podrían dar como resultado el patrón de fluorescencia observado para la proteína de fusión mCherry-HhH, ya que no tuvimos un control negativo que nos permitiera determinar si los valores de colocalización obtenidos son diferentes a los de una proteína soluble.

Comparación de localización de mCherry-HhH con una proteína soluble fluorescente

Existen diversas posibles explicaciones para la colocalización parcial que fue observada, ya sea un exceso de la proteína fluorescente como primera posibilidad, pero observamos este patrón en las diferentes condiciones de inducción (**Figura 30**), descartando así a esta posibilidad. Una segunda explicación es que podría deberse a una baja afinidad de la proteína por el DNA, lo que podría resultar en una fracción de la proteína libre en el citoplasma. Por otro lado, si la proteína de fusión mCherry-HhH no

interactúa con el DNA, este patrón podría deberse a las invaginaciones en la célula que resultan en un espacio citoplásmico más pequeño y por lo tanto en una menor fluorescencia o a otro efecto causado por la filamentación o el tratamiento con Cloranfenicol.

Para obtener un control de la localización de una proteína soluble y poder determinar si la acumulación de mCherry-HhH en región del nucleóide se debía a la interacción con el DNA, se modificó el plásmido inicial para que expresara la proteína soluble fluorescente YFP junto con la proteína de fusión mCherry-HhH. La construcción de este plásmido se describe en la sección de Materiales y Métodos (**Figura 25**).

Posterior al establecimiento de las condiciones de inducción más adecuadas en las células filamentadas y tratadas con Cloranfenicol, se determinó la localización de las proteínas fluorescentes (YFP y mCherry-HhH) y de los nucleóides. En la **Figura 38** se observa una distribución uniforme de la proteína YFP a lo largo de la célula, sin observarse espacios o incremento en la fluorescencia donde estaría localizado el nucleóide o DNA. Sin embargo, la imagen de mCherry-HhH sigue mostrando la acumulación, incremento de fluorescencia y espacios entre los nucleóides (mismo que se había observado en un principio).

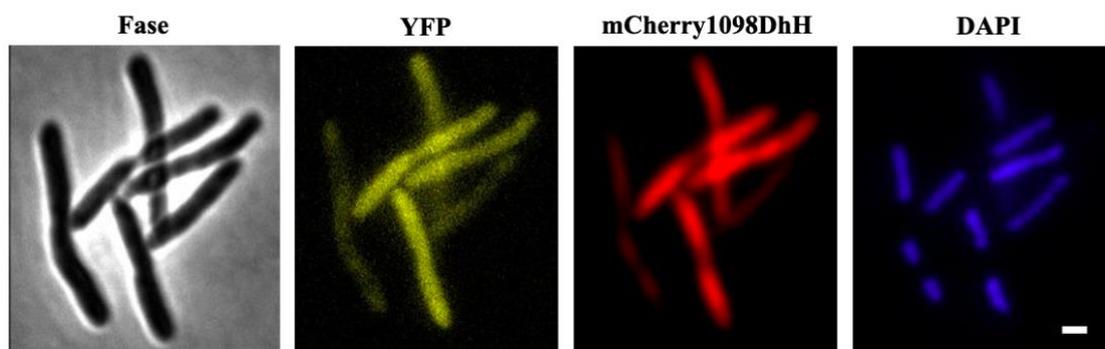


Figura 38. Tinción e inducción de *E. coli* MG165T7::pCHY1098DhH YFP-6 adicionando 600μg/ml de Cloranfenicol y 3 mg de Cefalexina. La barra en color blanco representa 1 μm.

Como parte de los análisis de colocalización que presentamos previamente, también se realizó una gráfica de dispersión ahora con la proteína YFP para obtener el valor de R de Pearson. Se tomó una fotografía de las células filamentadas y se analizó la colocalización de la proteína de fusión y de la YFP contra el nucleóide (**Figura 39**).

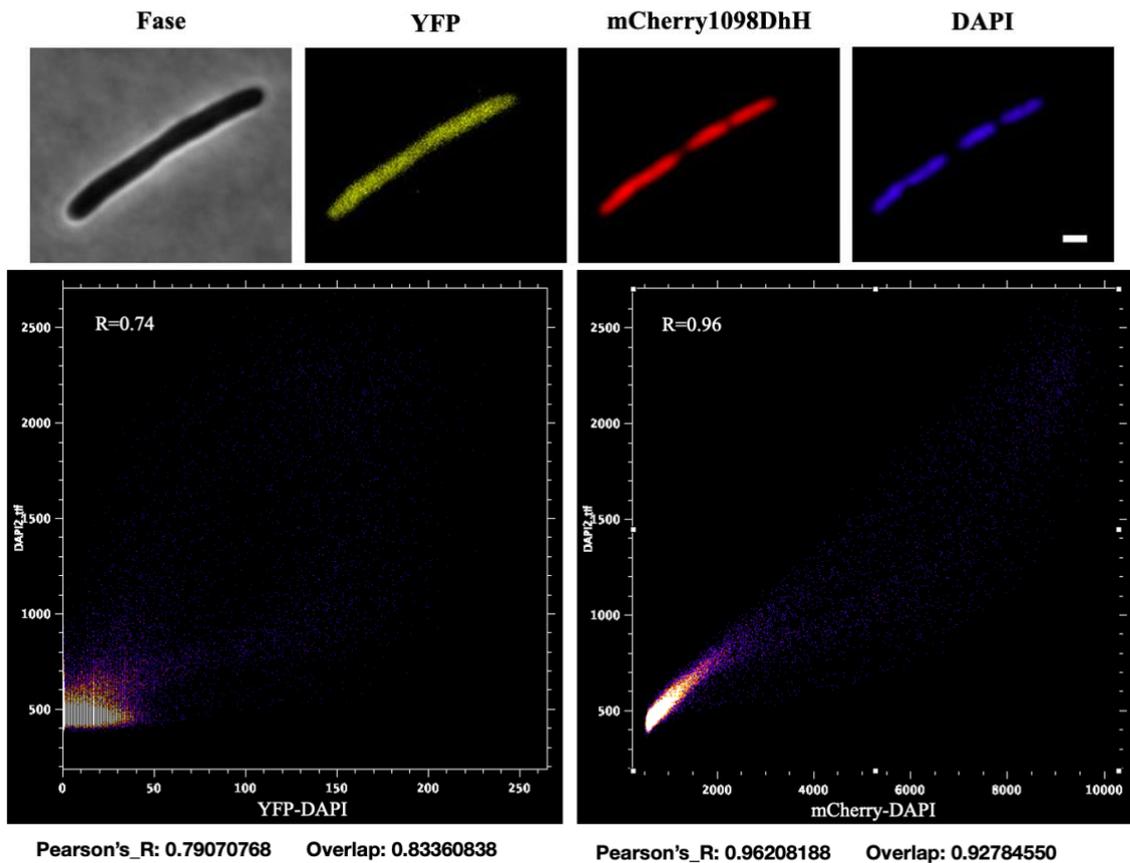


Figura 39. Scatter Plot de imágenes con YFP-DAPI (lado izquierdo) y mCherry-DAPI (lado derecho). En las imágenes superiores se observa la toma de células *E. coli* MG1655T7::pCHY1098-YFP y los canales correspondientes, y en las imágenes inferiores se observan las gráficas de dispersión.

En el análisis de colocalización utilizando las dos proteínas, nosotros esperaríamos que la proteína YFP (control) que no está fusionada al dominio HhH se encontrara localizada en el citoplasma sin ninguna afinidad hacia el DNA. En cambio, esperaríamos que la proteína mCherry fusionada al dominio HhH mostrara afinidad de unión al DNA y un valor mayor en el coeficiente R de Pearson. La gráfica de dispersión en la **Figura 39**, ahora comparando a ambas proteínas muestra valores más congruentes con un análisis de colocalización. En este caso el control YFP tuvo un valor de R de Pearson de 0.79 mientras que con mCherry tuvo un valor de R de 0.96. El mismo efecto se pudo observar también en el **Anexo 3**, lo que sugiere que ocurre una interacción entre el dominio HhH de la proteína PhaH de *C. crescentus* y el DNA.

DISCUSIÓN

De acuerdo a las condiciones de crecimiento, los granulos de PHB llegan a ocupar casi la totalidad del espacio intracelular por lo que es necesario la participación de un mecanismo celular para poder integrarlos a su organización intracelular. En *C. necator* o *R. eutropha*, la proteína PhaM permite la asociación de los granulos de PHB tanto con el DNA como con la sintasa PhaC1. Se ha propuesto que los granulos de PHB se segregan con el nucleoide por medio de la acción de PhaM, además PhaM influye en el tamaño de los granulos, la actividad de la sintasa y la iniciación en la formación de otros granulos (Bresan & Jendrosseck, 2017; Wahl et al., 2012). Por otra parte, en *P. aeruginosa*, la fasina PhaF posee un dominio tipo histona con carga altamente positiva en la región media del C-terminal, poseyendo ocho repeticiones en tándem similares a AAKP, y una sección N-terminal con un alta similitud de secuencia a PhaI. La proteína PhaF es necesaria para distribuir los granulos de PHB a lo largo de la célula en un patrón de "aguja" y, en la ausencia de PhaF, el contenido total de PHB se reduce y se agrupan, dando como resultado una distribución desigual en la célula y entre células hijas tras la división celular (Galán et al., 2011; Maestro & Sanz, 2017).

El hallazgo de la proteína PhaH en *C. crescentus* es relevante ya que la presencia de esta proteína es capaz de mediar la interacción de los granulos de PHB con el nucleoide. El objetivo de este trabajo fue realizar un ensayo que pudiera demostrar la interacción del dominio HhH de PhaH con el DNA.

Al realizar una comparación entre los dominios HhH con los dominios HtH, encontramos que los dominios HtH se unen al DNA mediante la interacción de la hélice con el surco principal mayor y actúan como reguladores transcripcionales, mientras que en los dominios HhH, la segunda hélice no es capaz de sobresalir de la superficie de la proteína y por tanto no puede interactuar con el surco principal. Algunos estudios cristalográficos como el de Thayer et al., 1995, sugieren que la interacción del dominio HhH con el DNA ocurre mediante los aminoácidos localizados en el bucle, y esta secuencia es altamente conservada (L-P-G-V), y en el extremo N-terminal de la segunda hélice, formando puentes de hidrógeno entre los nitrógenos del esqueleto y los grupos fosfato presentes en el DNA (Doherty et al., 1996). Sin embargo, una de las principales diferencias entre los dominios se refleja a nivel funcional, ya que los dominios HtH se

encuentran en proteínas reguladoras de genes y los dominios HhH en proteínas involucradas en actividades enzimáticas sin unirse que no requieren una secuencia específica.

Los resultados mostrados sobre la compactación del nucleóide y la expresión de la proteína mCherry-HhH demostraron que es necesaria la filamentación previa con el objetivo de aumentar la distancia entre los nucleóides y así obtener una visualización exitosa y demostrar que existe una colocalización del dominio HhH de phaH con la región del nucleóide, en donde se observa un patrón similar pero con distintos valores de fluorescencia, hecho que llega a ser muy común en estudios de colocalización (Cordelières, F. P. & Bolte, 2014; Dunn et al., 2011) sin que afecte la validez del resultado.

Respecto a los resultados del ensayo de colocalización, se obtuvo una R con un valor de aproximado de 0.68, lo cual nos dice que la colocalización no tuvo una relación fuerte en la sobreposición de imágenes, pero no negativo. Como menciona Dunn, et al., 2011, en algunos casos se puede esperar que la distribución de dos sondas se superponga aunque no siempre ocurre proporcionalmente, y esto puede ser explicado por factores como: la cantidad de proteína expresada, imagen de mala calidad u otros diversos factores. En este caso, nosotros pensamos que el dominio HhH interactúa con el DNA pero la interacción es de baja afinidad, lo que resulta en una colocalización parcial.

Generalmente se hace alusión a que los valores del Coeficiente de Pearson que se acercan a 0 o 1 demuestran de manera convincente ya sea la ausencia o la presencia de colocalización respectivamente. Dunn et al., 2011 hace referencia a que la pregunta estadística no es diferente a la de comparar dos grupos, excepto a que, en lugar de evaluar la magnitud de la diferencia entre dos grupos, uno evalúa la diferencia entre el valor medido para el grupo experimental versus uno que se considera nulo, como el ensayo de la YFP. En este ensayo obtuvimos que el valor de R para la YFP fue de 0.79, mientras que para la mCherry fue de 0.96, tratándose de una célula aislada. Esto nos demuestra que a diferencia del grupo control YFP, con la proteína mCherry-HhH se obtuvo una diferencia significativa y hace alusión que al tratarse de un dominio HhH no puede esperarse el 100% de colocalización, pero sí es capaz de diferenciarse del control negativo.

Nuestra hipótesis de que el dominio HhH de PhaH colocalizaría con el DNA debido las características de estos dominios fue correcta ya que demostramos que existe una afinidad de unión y se observa una colocalización en las células que poseen algún grado de compactación del nucleóide. Los resultados de la fusión con la proteína fluorescente mCherry demostraron que el dominio HhH a pesar de tratarse de un dominio de unión inespecífico, este se une y demuestra una localización citoplasmática similar a la del DNA. Entonces, el dominio C-terminal de PhaH (HhH) interactúa con el DNA, mientras que el N-terminal forma una hélice hidrofóbica con la cual podría unirse directamente al polímero o aumentar la actividad sintasa de PhaC u otras fasininas.

Dado que PhaH presenta dos dominios HhH en la región C-terminal y una hélice hidrofóbica en el N-terminal, se hipotetizó en un principio que PhaH tendría una función de unión específica, que interactuaría directamente con los grupos fosfatos del DNA y quizás generaría un complejo que ayudara a movilizar a los gránulos de PHB a una región específica, sin embargo, el trabajo de Salinas et al., 2023 demostró que la proteína PhaH es una fasinina que es reclutada al carbonosoma a través de su dominio hélice hidrofóbica hH, y participa en la unión al polímero o a otras PGAPs.

En el trabajo de Salinas et al., 2023, realizaron mutantes tanto en los dominios de PhaH (es decir de la región hH, HhH) y en la proteína completa. Lograron observar y determinar que la hélice hidrofóbica es requerida para la acumulación máxima de PHB y el mantenimiento durante la fase de crecimiento estacionaria, **mientras que el dominio HhH determina el tamaño de los gránulos y su distribución dentro de la célula.**

Por otra parte, algunas de las limitaciones de este trabajo consistieron en que los ensayos se realizaron únicamente en la bacteria *E. coli*. Este trabajo demostró la interacción del dominio HhH de phaH con el DNA. El trabajo de Salinas et al., 2023, demostró que la proteína *PhaH*₅₄₋₂₂₈ (dominio HhH) expresada como una fusión 6His y purificada por medio de cromatografía de afinidad de metales con el objetivo de realizar un ensayo de movilidad electroforética (EMSA), el cual se observa en el **Anexo 4**, y en donde se logró observar que al incubarse con 1 µg de proteína purificada, ésta se unió al DNA y retardó la migración del fragmento de DNA.

En resumen, la proteína PhaH es requerida para conseguir niveles normales en la acumulación de PHB y el mantenimiento del PHB acumulado, esto gracias a que la presencia del dominio hélice hidrofóbica es suficiente para mantener y alcanzar la máxima densidad óptica y concentración del PHB, mientras que el dominio HhH es requerido para mantener el tamaño y la distribución de los gránulos, puesto que la mutante *phaHΔHhH* tuvo una mayor proporción de gránulos de PHB de menor tamaño y una distribución más amplia del tamaño de gránulos que el tipo silvestre (Salinas et al., 2023).

Junto con las imágenes, gráficas y valores de colocalización presentados en este trabajo y el ensayo EMSA realizado en el trabajo de Salinas et al., 2023, podemos asegurar que la proteína PhaH es relevante y necesaria para la acumulación y el mantenimiento completo de PHB en *Caulobacter* y su dominio HhH es funcional permitiéndole interactuar con el DNA de manera inespecífica.

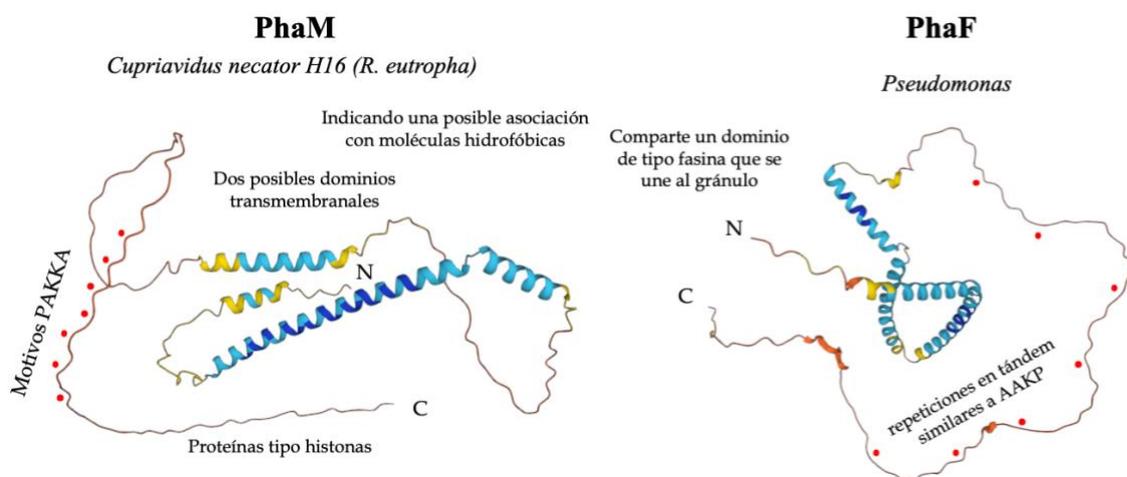
CONCLUSIONES

El dominio HhH de la proteína PhaH de *C. crescentus* colocaliza con la región del nucleoide en *E. coli*, estos resultados son apoyados por el control negativo y el ensayo EMSA, evidenciando que la proteína mCherry-HhH posee afinidad hacia el DNA. Es posible que la proteína PhaH al poseer un dominio funcional de unión al DNA posea también funciones similares a las proteínas PhaM y PhaF, que determinan el tamaño de los gránulos y su distribución.

PERSPECTIVAS

- Realizar una construcción únicamente expresando la proteína mCherry y observar el efecto al inducirla, filamentarla y compactar los nucleoides.
- Evaluar el efecto de un control positivo con una proteína conocida que se sabe se une al DNA de manera específica, igualmente etiquetada con la proteína mCherry.
- Realizar una construcción con el dominio hélice hidrofóbica del amino terminal de la proteína PhaH de *C. crescentus* y evaluar el efecto.
- Realizar una construcción con la proteína phaH completa y evaluar si el dominio hélice hidrofóbica influye en la colocalización con el nucleoide.

ANEXOS

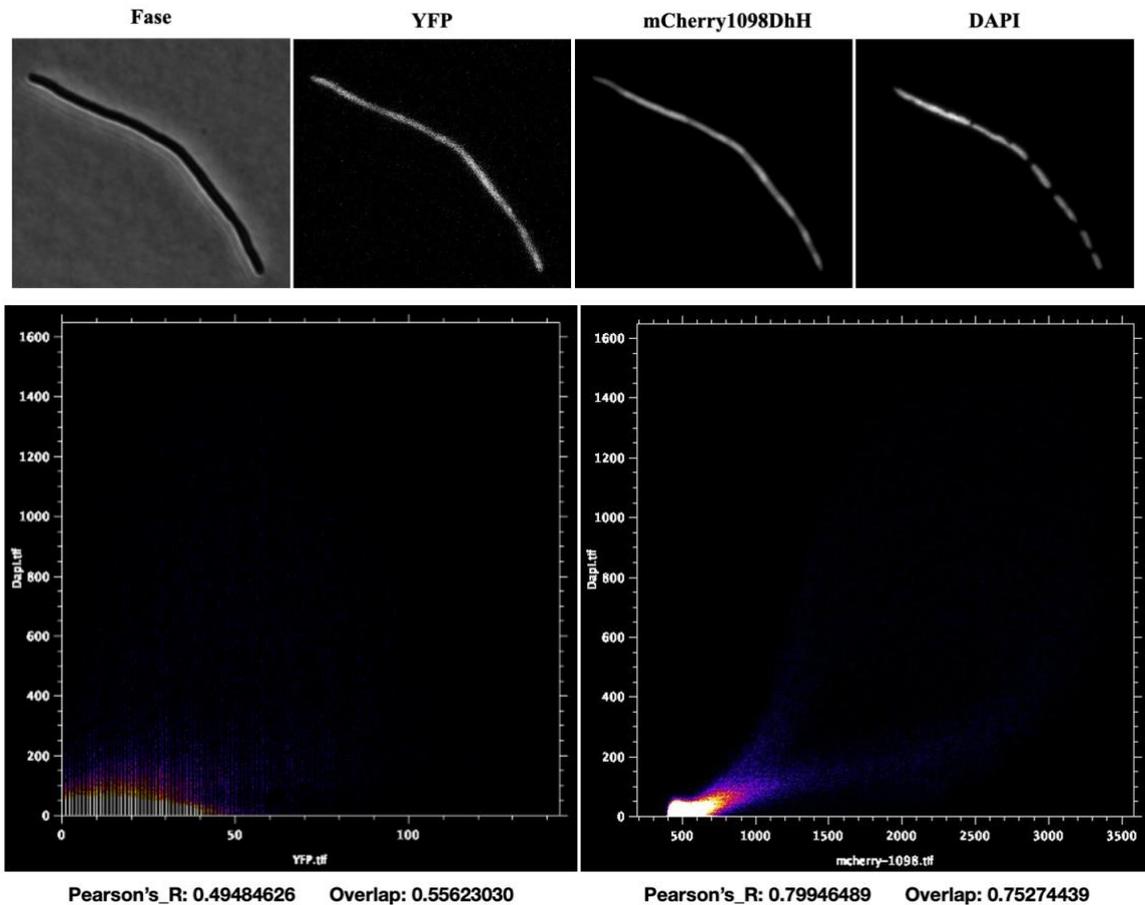


Anexo 1. Estructuras de las proteínas PhaM y PhaF.

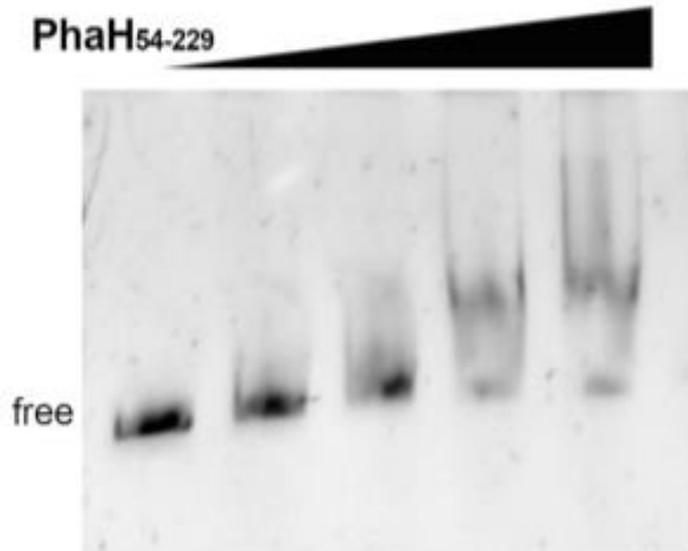
1	Q9A703	30S	Rib.proteinS2	54	B8H6A4	mech-sensitive ch	107	Q9A2N1	Succinate dehy
2	Q0C5Q5	ABC	transporter	55	Q9A6W0	Met_dep_hyd C	108	Q9A2M9	Succinate dehy
3	Q9A3A5	ABC	transporter	56	B8GYN1	Methyltransferase	109	Q9ABE2	Sulfate-binding
4	Q9A849	ABC	transporter	57	Q9A5W1	MotA/TolQ/ExbB	110	Q9A747	Thioredoxin
5	Q9A869	ABC	transporter	58	Q9A3H1	MotA/TolQ/ExbB	111	Q9AB57	Thioredoxin_4
6	Q9A5X7	ABC	transporter	59	Q9A399	NAD(P) transhyd	112	Q2F5H9	TipN
7	B8GXT0	ABC	transporter	60	Q9A3A1	NAD(P) transhyd	113	Q9ABN5	TolC
8	Q9A2K5	ABC-multidrug		61	Q9A6Y0	NADH dehy	114	Q9ABK3	TonB dep rec
9	Q9A2J0	α2_macroglubulin		62	Q9A6Y5	NADH dehy	115	B8GYT9	TonB dep rec
10	Q9A5A8	Aminopeptidase		63	Q9A6Y7	NADH dehy	116	Q9AAY8	TonB dep rec
11	Q9A2J6	Aminopeptidase N		64	Q9A6X1	NADH-oxidor	117	Q9AA84	TonB dep rec
12	Q9A2V8	ATP synthase		65	Q9A6X2	NADH-oxidor	118	Q9A9L0	TonB dep rec
13	Q9A2V7	ATP synthase		66	Q9A6X4	NADH-oxidor	119	Q9A9I9	TonB dep rec
14	Q9A866	ATP synthase		67	Q9A2G1	NADH-oxidor	120	Q9A9I5	TonB dep rec
15	Q9A865	ATP synthase		68	Q9A3A6	NatB superfamily	121	B8H3K1	TonB dep rec
16	Q9A2V9	ATP synthase		69	Q9A3J2	NfeD-like	122	Q9A961	TonB dep rec
17	Q9A2V6	ATP synthase		70	B8H1B8	OAR protein	123	Q9A958	TonB dep rec
18	Q9A2W1	ATP synthase		71	B8H5M9	OM protein	124	Q9A956	TonB dep rec
19	Q8IVF5	Autotransporter		72	Q9ABM6	OmpA family	125	Q9A7Q4	TonB dep rec
20	Q9A711	Bana		73	Q9A3H5	OmpA family	126	B8GX2J	TonB dep rec
21	Q9A6C9	Band		74	Q9A9P9	OmpA-related	127	Q9A6E5	TonB dep rec
22	Q9A8I8	BandE		75	Q9AB80	OM protein	128	Q9A608	TonB dep rec
23	Q9A3J1	Band 7/Mec-2		76	Q9ABK5	PBP1A family	129	Q9A4B3	TonB dep rec
24	Q9ABR3	b-barrel porin2		77	Q9A3Y3	Pep-pro cis-trans	130	Q9A442	TonB dep rec
25	Q9A5J1	Carboxypeptidase		78	B8GYC0	PhaZ	131	B8H3J6	TonB dep rec
26	Q9K688	CckA		79	B8GY00	PhaF	132	Q9A3Q6	TonB dep rec
27	Q9L718	CpaB		80	B8H557	PhaC	133	Q9A3F1	TonB dep rec
28	Q9A7M6	curli biogenesis		81	Q9A8I5	PO4 acyltransf	134	B8H4T5	TonB dep rec
29	Q9A2Z9	Cyt-C oxidase		82	P0CAV9	PhoU	135	B8H5J4	TonB dep rec
30	Q9A4A2	Cyt-C		83	Q9A7R7	PQQ enzyme	136	Q9ABQ5	TonB dep rec
31	Q9AA44	Cyt-D oxidase		84	Q9A9P7	Protease 4	137	B8GY80	TonB dep rec
32	Q9AAW9	Cytochrome b		85	B8GX51	Meth-transf	138	Q9A7H3	TonB dep rec
33	Q9A232	dehydratase		86	Q9A8J0	proton pump	139	B8H1S6	TonB dep rec
34	Q9A6K0	Dehydrogenase		87	B8GYG4	PatB	140	Q9AAX0	Ubi-cytc reduct
35	Q9RQQ9	DivL		88	Q9A3R5	Putrescine-bind	141	Q9AAW8	Ubi-cytc reduct
36	O54478	DNA topo-4		89	Q0RX30	ribosome-factor Y	142	Q9AAP9	Uncharacterized
37	Q9A6D0	DnaJ-related		90	Q9AA69	Rieske 2Fe-2S	143	Q9A996	Uncharacterized
38	Q9A698	DsbB		91	Q9A821	MreB	144	Q9ABA0	Uncharacterized
39	Q9A8L9	ubiq oxidor		92	Q9A732	Rotamase	145	Q9A4I1	Uncharacterized
40	Q9ABQ6	ElpS		93	O85351	RsaE	146	B8H5H7	Uncharacterized
41	Q9ABA9	ExbD		94	Q84DQ3	RsaD	147	B8GW26	Uncharacterized
42	Q9A8K9	FF domain protein		95	Q9A8K0	Mtase	148	Q9A214	Uncharacterized
43	B8GXB6	FliL		96	Q9A2Q3	SCO1/2 family	149	Q9ABZ5	Uncharacterized
44	B8H444	FtsH		97	Q9A6U2	SecD	150	Q9A7R8	Uncharacterized
45	Q9A5I2	Glucokinase		98	Q9ABQ3	SecD	151	Q9A2K2	Uncharacterized
46	Q9A8R2	GumC superfamily		99	Q913J8	SecE	152	B8GXL5	Uncharacterized
47	Q9A8Z2	HlyD family		100	Q9A6U3	SecF	153	Q9A895	Uncharacterized
48	Q9A6K1	HlyD family		101	Q9ABQ0	SecG	154	Q9A6H1	Uncharacterized
49	Q9A3K7	HlyD family		102	Q9A2W5	ser aminopeptid	155	B8H330	Uncharacterized
50	Q9A2V1	LenA family		103	B8GZ10	SH3 containing	156	Q9A3J7	Uncharacterized
51	Q9ABC6	LPLAT superfamily		104	Q9A5B4	SPPH/Band 7	157	Q9A6U1	YajC
52	B8H116	LysM family		105	Q9A6A4	StpD	158	B8H1E8	YidC
53	Q0Q986	McpA		106	B8H646	Succinate dehy			

Anexo 2. Lista de proteínas identificadas en la fracción de carbonosomas. Las proteínas están organizadas alfabéticamente según su descripción. La predicción de su localización se indica

mediante el color de las letras, **negro-citoplasmático**; **azul-membrana interna**; **verde-periplásmico**; **rojo-membrana externa**. Las proteínas relacionadas con PHB están sombreadas. Los puntos rojos indican las proteínas que se seleccionaron para el análisis. Tomado de Salinas et al., 2023.



Anexo 3. Scatter Plot de imágenes con YFP-DAPI (lado izquierdo) y mCherry-DAPI (lado derecho). En la imagen superior se observa la toma de células *E. coli* MG1655T7::pCHY1098-YFP, así como los canales correspondientes, y en las imágenes inferiores se muestran las gráficas de dispersión.



Anexo 4. 6His-PhaH54-229 purificado mediante cromatografía de afinidad de metales. La pureza de la proteína eluida se examinó mediante electroforesis desnaturalizante. Se cargó 1 μ g de proteína. Tomado de Salinas et al., 2023.

ABREVIATURAS

DAPI – 4',6-diamidino-2-fenilindol

DNA – Ácido desoxirribonucleico

PHA – Polihidroxialcanoato

PHB – Polihidroxibutirato

IPTG – Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

c-di-GMP – Diguanilato cíclico

GLOSARIO

Anfifílica: Que tiene un extremo hidrofílico y otro hidrófobo.

Adhesivo: En la célula prostecada de *Caulobacter*, existe una estructura de tallo tubular que sobresale de un polo que tiene un “adhesivo” de sujeción en su extremo, con el que se adhiere a las superficies.

DAPI: Tinte fluorescente que se une fuertemente a las regiones ricas en adenina y timina del ADN.

Dominio: Es la parte de una cadena polipeptídica que es independientemente estable o puede hacer movimientos como una sola entidad respecto a la proteína completa.

Dominios enrollados: Los dominios enrollados son dominios proteicos muy extendidos implicados en diversos procesos que van desde proporcionar rigidez estructural hasta la transducción de cambios conformacionales. Constan de dos o más hélices α que se enrollan entre sí para formar un haz superenrollado regular.

Filamentación: Crecimiento anómalo de ciertas bacterias, como *E. coli*, en las que las células continúan alargándose pero no se dividen (sin formación de septos).

Gram positivas: Células procariotas que poseen una membrana y una pared celular compuesta de una capa gruesa de peptidoglicano.

Gram negativas: Células procariotas que tienen una capa delgada de peptidoglicano unida a una membrana exterior por lipoproteínas.

c-di-GMP: es un segundo mensajero bacteriano global que controla una amplia gama de procesos celulares que contribuyen a la adaptación de la superficie, la formación de biopelículas, la progresión del ciclo celular y la virulencia.

Nucleoide: región de forma irregular dentro de la célula que contiene todo el DNA o la mayoría del material genético de las células procariotas.

REFERENCIAS

- Abraham, W. R., Rohde, M., & Bennasar, A. (2014). *The Family Caulobacteraceae. The Prokaryotes*. https://doi.org/10.1007/978-3-642-30197-1_259
- Anaya-Cárdenas, P. (2016). *Papel de las proteínas con una posible hélice AKP en el proceso de segregación de los gránulos de PHB en Caulobacter crescentus*. Universidad Nacional Autónoma de México.
- Beeby, M., Cho, M., Stubbe, J., & Jensen, G. J. (2012). Growth and localization of polyhydroxybutyrate granules in *Ralstonia eutropha*. *Journal of Bacteriology*, 194(5), 1092–1099. <https://doi.org/10.1128/JB.06125-11>
- Boutte, C. C., & Crosson, S. (2011). The complex logic of stringent response regulation in *Caulobacter crescentus*: Starvation signalling in an oligotrophic environment. *Molecular Microbiology*, 80(3), 695–714. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2011.07602.X>
- Bresan, S., & Jendrossek, D. (2017). New Insights into PhaM-PhaC-Mediated Localization of Polyhydroxybutyrate Granules in *Ralstonia eutropha* H16. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(12). <https://doi.org/10.1128/AEM>

- Buckley, R. M. (2013). *The role of the phasin PhaP in promoting polyhydroxybutyrate (PHB) granule formation in Caulobacter crescentus*. *B.A. Biolo*, 441.
- Cho, M., Brigham, C. J., Sinskey, A. J., & Stubbe, J. (2012). Purification of polyhydroxybutyrate synthase from its native organism, *Ralstonia eutropha*: Implications for the initiation and elongation of polymer formation in vivo. *Biochemistry*, 51(11), 2276–2288. <https://doi.org/10.1021/BI2013596>
- Cordelières, F. P. & Bolte, S. (2014). Experimenters' guide to colocalization studies. <https://doi.org/doi:10.1016/b978-0-12-420138-5.00021-5>
- Curtis, P. D., & Brun, Y. V. (2010). Getting in the Loop: Regulation of Development in *Caulobacter crescentus*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(1), 1092–2172. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00040-09>
- Doherty, A. J., Serpell, L. C., & Ponting, C. P. (1996). The helix-hairpin-helix DNA-binding motif: a structural basis for non-sequence-specific recognition of DNA. *Nucleic Acids Research*, 24(13), 2488–2497.
- Dunn, K. W., Kamocka, M. M., & McDonald, J. H. (2011). A practical guide to evaluating colocalization in biological microscopy. *American Journal of Physiology - Cell Physiology*, 300(4), C723. <https://doi.org/10.1152/AJPCELL.00462.2010>
- Galán, B., Dinjaski, N., Maestro, B., De Eugenio, L. I., Escapa, I. F., Sanz, J. M., ... Prieto, M. A. (2011). Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* KT2442. *Molecular Microbiology*, 79(2), 402–418. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2958.2010.07450.X>
- García, J. (2014). *Universidad Complutense de Madrid. Tesis Doctoral. PHB despolimerasas de Streptomyces exfoliatus y Streptomyces ascomycinicus. Caracterización de enzimas con potencial aplicación biotecnológica Memoria para optar al grado de Doctor presentada por*. Retrieved from www.nordenestudio.com
- Gerngross, T. U., & Martin, D. P. (1995). Enzyme-catalyzed synthesis of poly[(R)-(-)-3-hydroxybutyrate]: Formation of macroscopic granules in vitro (molecular weight control of polymers/substrate specificity of polyhydroxyalkanoate synthase/CoA-requiring enzymes/non-template-derived polymerases). *Applied Biological Sciences*, 92, 6279–6283.
- Ginez, L. D. (2020). *Caracterización de los mecanismos involucrados en la difusión limitada de la proteína OmpA2 de Caulobacter crescentus/ tesis que para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biomédicas*. UNAM.

- Govers, S. K., & Jacobs-Wagner, C. (2020). *Caulobacter crescentus*: model system extraordinaire. *Current Biology*, 30(19), R1151–R1158. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2020.07.033>
- Grage, K., Jahns, A. C., Parlane, N., Palanisamy, R., Rasiah, I. A., Atwood, J. A., & Rehm, B. H. A. (2009). Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: Biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications. *Biomacromolecules*, 10(4), 660–669. <https://doi.org/10.1021/BM801394S>
- Hou, S., Jia, Z., Kryszczuk, K., Chen, D., Wang, L., Holyst, R., & Feng, X. (2020). Joint effect of surfactants and cephalexin on the formation of *Escherichia coli* filament. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 199. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2020.110750>
- Hughes, V., Jiang, C., & Brun, Y. (2012). *Caulobacter crescentus*. *Curbio*, 22, R507–R509. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.05.036>
- Jendrossek, D. (2009). Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). *Journal of Bacteriology*, 191(10), 3195–3202. <https://doi.org/10.1128/JB.01723-08>
- Jendrossek, D. (2020). *Carbonosomes*. In: Jendrossek D. (eds) *Bacterial Organelles and Organelle-like Inclusions*. (Second Edi, Vol. 34; Alexander Steinbüchel, Ed.). https://doi.org/doi.org/10.1007/978-3-030-60173-7_10
- Jendrossek, D., & Pfeiffer, D. (2014). New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate). *Environmental Microbiology*, 16(8), 2357–2373. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12356>
- Jensen, R. B., Wang, S. C., & Shapiro, L. (2002). Dynamic Localization of proteins and DNA during a bacterial cell cycle. *Nature Reviews Molecular Microbiology*, 3(3), 167–176. <https://doi.org/10.1038/nrm758>
- Juengert, J. R., Borisova, M., Mayer, C., Wolz, C., Brigham, C. J., Sinskey, A. J., & Jendrossek, D. (2017). Absence of ppGpp leads to increased mobilization of intermediately accumulated poly(3-hydroxybutyrate) in *Ralstonia eutropha* H16. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(13), 755–772. <https://doi.org/10.1128/AEM.00755-17/FORMAT/EPUB>
- Jumper, J. et al. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*.

- Klein, E. A., Schlimpert, S., Hughes, V., Brun, Y. V., Thanbichler, M., & Gitai, Z. (2013). Physiological role of stalk lengthening in *Caulobacter crescentus*. *Communicative & Integrative Biology*, 6(4). <https://doi.org/10.4161/CIB.24561>
- Madison, L. L., & Huisman, G. W. (1999). Metabolic Engineering of Poly(3-Hydroxyalkanoates): From DNA to Plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 63(1), 21–53. <https://doi.org/10.1128/MMBR.63.1.21-53.1999>
- Maestro, B., & Sanz, J. M. (2017). Minireview Polyhydroxyalkanoate-associated phasins as phylogenetically heterogeneous, multipurpose proteins. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1323–1337. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12718>
- Mallick, P. K. (2010). Thermoplastics and thermoplastic-matrix composites for lightweight automotive structures. *Materials, Design and Manufacturing for Lightweight Vehicles*, 174–207. <https://doi.org/10.1533/9781845697822.1.174>
- Mcadam, B., Fournet, M. B., McDonald, P., & Mojicevic, M. (2020). *polymers Production of Polyhydroxybutyrate (PHB) and Factors Impacting Its Chemical and Mechanical Characteristics*. <https://doi.org/10.3390/polym12122908>
- Merrick, J. M., & Doudoroff, M. (1964). Intracellular enzyme system. *Journal of Bacteriology*, 88(1), 60–71.
- Mezzina, M. P., & Pettinari, M. J. (2016). *Phasins, Multifaceted Polyhydroxyalkanoate Granule-Associated Proteins*. <https://doi.org/10.1128/AEM.01161-16>
- Mezzina, M., Wetzler, D., Catone, M., Bucci, H., & Paola, D. (2014). A Phasin with Many Faces: Structural Insights on PhaP from *Azotobacter* sp. FA8. *PLoS ONE*, 9(7), 103012. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103012>
- Nelson, D. L. (2019). *Lehninger. Principios de Bioquímica Ed.7º (7º Edición)*. OMEGA.
- Obruca, S., Sedlacek, P., Slaninova, E., Fritz, I., Daffert, C., Meixner, K., ... Koller, M. (2020). Novel unexpected functions of PHA granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(11), 4795–4810. <https://doi.org/10.1007/S00253-020-10568-1>
- Ozaki, S. (2019). Regulation of replication initiation: lessons from *Caulobacter crescentus*. *Genes & Genetic Systems*, doi:10.1266/ggs.19-00011.
- Pfeiffer, D., & Jendrossek, D. (2011). Interaction between poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins as revealed by two-hybrid analysis and identification of a new phasin in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology*, 157(10), 2795–2807. <https://doi.org/10.1099/mic.0.051508-0>
- Poindexter, J. S. (1981). The *Caulobacters*: Ubiquitous Unusual Bacteria. *Microbiological Reviews*, 45(1), 123–179.

- Prieto, M. A., Bu'ehler, B., Bu'ehler, B., Jung, K., Witholt, B., & Kessler, B. (1999). PhaF, a Polyhydroxyalkanoate-Granule-Associated Protein of *Pseudomonas oleovorans* GPo1 Involved in the Regulatory Expression System for pha Genes. *Journal of Bacteriology*, *181*(3), 858–868.
- Qi, Q., & Rehm, B. H. A. (2001). Polyhydroxybutyrate biosynthesis in *Caulobacter crescentus*: molecular characterization of the polyhydroxybutyrate synthase. *Microbiology*, *147*, 3353–3358.
- Reddy, C. S. K., Ghai, R., Rashmi, & Kalia, V. C. (2003). Polyhydroxyalkanoates: An overview. *Bioresource Technology*, *87*(2), 137–146. [https://doi.org/10.1016/S0960-8524\(02\)00212-2](https://doi.org/10.1016/S0960-8524(02)00212-2)
- Rehm, B. H. A. (2003). Polyester synthases: Natural catalysts for plastics. *Biochemical Journal*, *376*(1), 15–33. <https://doi.org/10.1042/BJ20031254>
- Rehm, B. H. A. (2006). Genetics and biochemistry of polyhydroxyalkanoate granule self-assembly: The key role of polyester synthases. *Biotechnology Letters*, *28*(4), 207–213. <https://doi.org/10.1007/S10529-005-5521-4>
- Salinas, A. L., Osorio, A., Legorreta-Hissner, T., Lara-Martinez, R., Jimenez-Garcia, L. F., Camarena, L., & Poggio, S. (2023). A new type of phasin characterized by the presence of a helix-hairpin-helix domain is required for normal polyhydroxybutyrate accumulation and granule organization in *Caulobacter crescentus*. *Molecular Microbiology*. <https://doi.org/10.1111/MMI.15124>
- Shao, X., & Grishin, N. V. (2000). Common fold in helix-hairpin-helix proteins. *Nucleic Acids Research*, *28*(14), 2643–2650.
- Steinbüchel, A., Aerts, K., Liebergesell, M., Wieczorek, R., Babel, W., Föllner, C., & , ... Valentin, H. E. (1995). Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. *Canadian Journal of Microbiology*, *41*(13), 94–105 | [10.1139/m95-175](https://doi.org/10.1139/m95-175). Retrieved January 7, 2022, from <https://doi.org/10.1139/m95-175>
- Sudesh, K., Abe, H., & Doi, Y. (2000). Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: Biological polyesters. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, *25*(10), 1503–1555. [https://doi.org/10.1016/S0079-6700\(00\)00035-6](https://doi.org/10.1016/S0079-6700(00)00035-6)
- Sun, Y.-W., Li, Y., Hu, Y., Chen, W.-X., & Tian, C.-F. (2019). *Coordinated Regulation of the Size and Number of Polyhydroxybutyrate Granules by Core and Accessory Phasins in the Facultative Microsymbiont Sinorhizobium fredii NGR234*. <https://doi.org/10.1128/AEM.00717-19>

- Thanbichler, M., Iniesta, A. A., & Shapiro, L. (2007). A comprehensive set of plasmids for vanillate - And xylose-inducible gene expression in *Caulobacter crescentus*. *Nucleic Acids Research*, *35*(20). <https://doi.org/10.1093/nar/gkm818>
- Thayer, M. M., Ahern, H., Xing, D., Cunningham, R. P., & Tainer, J. A. (1995). Novel DNA binding motifs in the DNA repair enzyme endonuclease III crystal structure. *The EMBO Journal*, *14*(16), 4108–4120.
- Trasviña-Arenas, C. H., Demir, M., Lin, W. J., & David, S. S. (2021). Structure, function and evolution of the Helix-hairpin-Helix DNA glycosylase superfamily: Piecing together the evolutionary puzzle of DNA base damage repair mechanisms. *DNA Repair*, *108*. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2021.103231>
- Varadi, M. et al. (2022). AlphaFold Protein Structure Database: massively expanding the structural coverage of protein-sequence space with high-accuracy models. *Nucleic Acids Research*.
- Verlinden, R. A. J., Hill, D. J., Kenward, M. A., Williams, C. D., & Radecka, I. (2007). Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of Applied Microbiology*, *102*(6), 1437–1449. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2672.2007.03335.X>
- Wahl, A., Schuth, N., Pfeiffer, D., Nussberger, S., & Jendrossek, D. (2012). *PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in Ralstonia eutropha*. Retrieved from <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/12/262>
- Woldemeskel, S. A., & Goley, E. D. (2017). Shapeshifting to Survive: Shape Determination and Regulation in *Caulobacter crescentus* The Study of Bacterial Shape: Why and How? *Trends in Microbiology*, *xx*. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2017.03.006>
- York, G. M., Lupberger, J., Tian, J., Lawrence, A. G., Stubbe, J., & Sinskey, A. J. (2003). *Ralstonia eutropha* H16 Encodes Two and Possibly Three Intracellular Poly[D-(?)-3-Hydroxybutyrate] Depolymerase Genes. *Journal of Bacteriology*, *185*(13), 3788–3794. <https://doi.org/10.1128/JB.185.13.3788-3794.2003>
- Zimmerman, S. B. (2002). Toroidal nucleoids in *Escherichia coli* exposed to chloramphenicol. *Journal of Structural Biology*, *138*(3), 199–206. [https://doi.org/10.1016/S1047-8477\(02\)00036-9](https://doi.org/10.1016/S1047-8477(02)00036-9)
- Zimmerman, S. B. (2006). Shape and compaction of *Escherichia coli* nucleoids. *Journal of Structural Biology*, *156*(2), 255–261. <https://doi.org/10.1016/J.JSB.2006.03.022>

BIBLIOGRAFÍA

Nelson, D. L. (2019). *Lehninger. Principios de Bioquímica Ed.7º*. Estados Unidos: OMEGA.

Alberts, B. (2004). *Biología Molecular de la célula. Ed. 4º* Estados Unidos: OMEGA.