



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

Papel de las proteínas con una posible hélice AKP en el
proceso de segregación de los gránulos de PHB en
Caulobacter crescentus

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A:

Paulina Anaya Cárdenas

DIRECTOR DE TESIS:

Dr. Sebastian Poggio Ghilarducci



Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2016



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.

1. Datos del alumno
Anaya
Cárdenas
Paulina
55 22 13 33 31
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
309016685
2. Datos del tutor
Dr.
Sebastian
Poggio
Ghilarducci
3. Datos del sinodal 1
Dra.
María de los Ángeles
Cancino
Rodezno
4. Datos del sinodal 2
Dr.
Fernando
Suaste
Olmos
5. Datos del sinodal 3
Dra.
Laura
Kawasaki
Watanabe
6. Datos del sinodal 4
M. en C. B.
Vanessa
Vega
García
7. Datos del trabajo escrito
Papel de las proteínas con una posible hélice AKP en el proceso de segregación de los gránulos de PHB en *Caulobacter crescentus*
74 p
2016

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por la educación profesional que me ha brindado y por el honor que representa formar parte de tan estimada institución.

A Aurora Ventura Osorio, por recibirme siempre con una sonrisa y por su apoyo técnico.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), por su apoyo para la realización de esta tesis (PAPIIT-IA101314).

ÍNDICE

| | |
|---|--------------|
| <u>Resumen</u> | 1 |
| <u>Introducción</u> | 2-28 |
| <u>Polihidroxialcanoatos (PHAs)</u> | 3-5 |
| <u>Polihidroxiacetato (PHA)</u> | 3-5 |
| <u>Polihidroxiacetoacetato (PHAc)</u> | 3-5 |
| <u>Polihidroxiadipato (PHAD)</u> | 3-5 |
| <u>Polihidroxiisovalerato (PHIV)</u> | 3-5 |
| <u>Polihidroxiisobutirato (PHIB)</u> | 3-5 |
| <u>Polihidroxiisobutirato (PHB)</u> | 5-6 |
| <u>Síntesis del PHB</u> | 6-7 |
| <u>Estructura del gránulo de PHA</u> | 7-11 |
| <u>Proteínas asociadas al gránulo de PHB (PAGPs)</u> | 11-15 |
| <u>PHA Sintasa (PhaC)</u> | 12-13 |
| <u>PHA Regulatoria (PhaR)</u> | 13-14 |
| <u>PHA Depolimerasa (PhaZ)</u> | 14 |
| <u>Fasina (PhaP)</u> | 15 |
| <u>Un tipo particular de fasinas</u> | 16-20 |
| <u>PhaM</u> | 16-18 |
| <u>PhaF</u> | 18-20 |
| <u>Hélice AK</u> | 21-22 |
| <u>Hélice AKP en la histona de unión H1</u> | 23-24 |
| <u>Hélice AKP de tipo histona H1 en el regulador AlgP y AlgR3</u> | 24-25 |
| <u>Formación y segregación de los gránulos de PHB</u> | 26-28 |
| <u>Antecedentes</u> | 28-31 |
| <u>Hipótesis</u> | 32 |
| <u>Objetivo</u> | 32 |
| <u>Objetivos Particulares</u> | 32 |
| <u>Material y Métodos</u> | 33-43 |

| | |
|---|--------------|
| <u>Resultados</u> | 44-59 |
| I. <u>Determinación de las proteínas con una posible hélice AKP candidatas que participan en el proceso de segregación de los gránulos de PHB.</u> | 44-48 |
| II. <u>Determinación de la posible función de las proteínas con una posible hélice AKP, cc2135 y cc3658, en el proceso de segregación de los gránulos de PHB.</u> | 49-59 |
| a) <u>Mutantes por sustitución con casete de resistencia a Espectinomicina</u> | 49-52 |
| b) <u>Localización <i>in vivo</i> de las proteínas cc2135 y cc3658</u> | 53-55 |
| c) <u>Análisis semicuantitativo de las proteínas de fusión cc2135 y cc3658 con mCherry mediante <i>Western blot</i></u> | 56-57 |
| d) <u>Análisis del número de gránulos por células</u> | 57-59 |
| III. <u>Secuenciación nucleotídica</u> | 59 |
| <u>Discusión</u> | 60-62 |
| <u>Conclusión</u> | 63 |
| <u>Referencias bibliográficas</u> | 64-69 |

RESUMEN

Caulobacter crescentus es una α -proteobacteria acuática que se distribuye tanto en lagos como en arroyos, principalmente en ambientes oligotróficos, desarrollando diferentes estrategias de adaptación a estos ambientes.

Una de estas adaptaciones es la producción de materiales de reservas como lo son los polihidroxialcanoatos (PHAs). *C. crescentus* puede producir polihidroxibutirato (PHB) en respuesta a una condición de exceso de carbono y deficiencia de fosfato y nitrógeno en el medio.

Estos biopoliésteres se almacenan en inclusiones celulares de alto peso molecular conocidos como gránulos de PHAs. Se ha demostrado que estas inclusiones se segregan de manera homogénea entre la célula madre y la célula hija, con ayuda de proteínas asociadas como lo son PhaF en *Pseudomonas putida* y PhaM en *Ralstonia eutropha*, las cuáles presentan una hélice AKP que permite la interacción entre el gránulo y el nucleóide.

En el presente trabajo se evaluó si la hélice AKP representa una característica importante para la proteína encargada de la segregación de los gránulos de PHB en *C. crescentus*. Para ello se realizó un análisis bioinformático con la finalidad de encontrar proteínas en el genoma de *C. crescentus* que presentan una posible hélice AKP, obteniendo como resultado dos posibles candidatas, las proteínas cc2135 y cc3658. Se demostró que las fusiones de las proteínas cc2135 y cc3658 con mCherry, no colocalizan con los gránulos de PHB, y que las cepas mutantes de estos genes, no muestran un fenotipo que permita asociarlas al proceso de segregación de los gránulos. Estos resultados demuestran que las proteínas cc2135 y cc3658 no están relacionadas con el proceso de segregación de los gránulos de PHB en *C. crescentus*.

Finalmente, con este trabajo se propone plantear nuevas estrategias para reconocer cómo ocurre la interacción gránulo-DNA y entender el proceso de segregación de los gránulos de PHB en la bacteria oligotrófica *C. crescentus*.

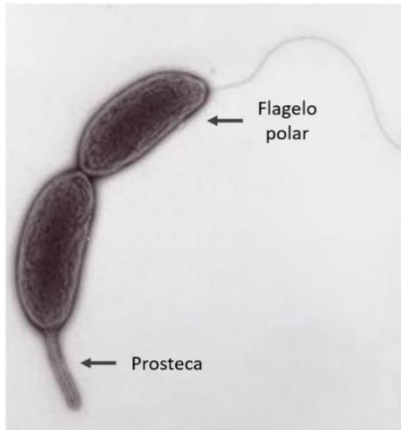
INTRODUCCIÓN

Las bacterias presentan una gran diversidad de estructuras e inclusiones que les facilitan su adaptación y sobrevivencia a diferentes ambientes. Algunos ejemplos de estas estructuras son las vesículas de gas, que funcionan como flotadores, permitiéndoles un desplazamiento vertical en las columnas de agua, los magnetosomas, que les confieren la capacidad de orientarse a los campos magnéticos, y la síntesis de algunos materiales de reserva como los polihidroxicanoatos (Pfeifer, 2012; Blakemore, 1975; Stubbe *et al.*, 2005).

Caulobacter crescentus es una α -proteobacteria acuática que se distribuye tanto en lagos como en arroyos, principalmente en ambientes oligotróficos ([ver figura 1](#)) (Poindexter, 1981). Tiene un ciclo celular asimétrico con dos tipos celulares, una célula motil con un flagelo polar y una célula no motil prostecada (Gober *et al.*, 1995).

La adaptación de *C. crescentus* para sobrevivir en condiciones oligotróficas incluye la habilidad de crecer lentamente bajo condiciones de pocos nutrientes, la elongación de la prosteca para incrementar la superficie para una mayor obtención de nutrientes, e incluso detener la progresión del ciclo celular en condiciones de privación de nitrógeno y carbono (England *et al.*, 2010; Lesley *et al.*, 2008; Wagner *et al.*, 2006).

Además de esto, *C. crescentus* es capaz de producir polihidroxicanoatos (PHAs) y otros polímeros, como reserva de carbono y energía. Se ha demostrado que esta bacteria produce polihidroxibutirato (PHB) como un producto de su metabolismo en condiciones de deficiencia de nitrógeno y fosfato, con un exceso de carbono en el ambiente (Poindexter, 1964).



Taxonomía

Clase: Alfa Proteobacteria

Orden: Caulobacterales

Familia: Caulobacteraceae

Género: *Caulobacter*

Nombre binomial: *Caulobacter crescentus*

Figura 1. Micrografía electrónica de una célula predivisiva de *C. crescentus* en tinción negativa con acetato de uranil. Esta alfa proteobacteria presenta dos formas a lo largo de su ciclo celular, una célula con un flagelo polar y una célula con una extensión de la membrana llamada prosteca. Joe Pogliano Laboratory, University of California. 2009.

Polihidroxicanoatos (PHAs)

Los polihidroxicanoatos (PHAs) son biopoliésteres sintetizados por varios microorganismos como reserva de carbono y energía, los cuales en cuerpos de inclusión insolubles en el citoplasma denominados gránulos de PHAs.

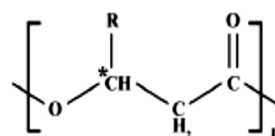
La gran mayoría de géneros de bacterias y arqueas de la familia *Halobacteriaceae* producen este tipo de polímeros en condiciones de exceso de fuentes de carbono y limitaciones de otros nutrientes como nitrógeno, azufre, fosfatos, hierro, magnesio, potasio u oxígeno entre otros (Han *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 1992; Madison *et al.*, 1999; Steinbüchel *et al.*, 2001). Su producción ocurre durante la fase exponencial, exponencial tardía o en fase estacionaria, pero cuando las condiciones son menos favorables, dada la disminución de los nutrientes disponibles en el medio, estos polímeros son degradados a sus monómeros para poder ser empleados por la célula.

Entre las especies más estudiadas que generan inclusiones de PHA se encuentran *Ralstonia eutropha*, *Pseudomonas sp.*, *Azotobacter vinelandii*, *Methylobacterium sp.*, *Agrobacterium sp.*, *Rhodobacter sphaeroides*, *Bacillus spp.*, *Spirulina platensis*, entre otras (Madison *et al.*, 1999).

La estructura química lineal de los PHAs está compuesta por monómeros de ácidos grasos 3-hidroxi, que se condensan a través de la formación de un enlace éster entre el grupo carboxilo de uno de los monómeros y el grupo hidroxilo del siguiente monómero, formando así cadenas de distinta longitud (Madison *et al.*, 1999).

Cada monómero tiene una cadena lateral (R) que usualmente es un grupo alquil saturado, pero que también puede tener grupo alquil no saturado, o un grupo alquilo ramificado, entre otros. Es esta característica la que le da gran variedad a este grupo de biopolímeros ([ver figura 2](#)).

Sus propiedades dependen del tamaño de la cadena lateral de tipo alquil, que determina si son considerados como termoplásticos (R: metil o etil) o elastómeros (Stubbe *et al.*, 2005).



Poli (3-hidroxialcanoato)

| Grupo R | No. carbono | Polímero de PHA |
|----------|-----------------|---|
| Metil | C ₄ | Poli (3-hidroxi butirato) |
| Etil | C ₅ | Poli (3-hidroxi valerato) |
| Propil | C ₆ | Poli (3-hidroxi hexanoato) |
| Butil | C ₇ | Poli (3-hidroxi heptanoato) |
| Pentil | C ₈ | Poli (3-hidroxi octanoato) |
| Hexil | C ₉ | Poli (3-hidroxi nonanoato) |
| Heptil | C ₁₀ | Poli (3-hidroxi decanoato) |
| Octil | C ₁₁ | Poli (3-hidroxi undecanoato) |
| Nonil | C ₁₂ | Poli (3-hidroxi dodecanoato) |
| Decil | C ₁₃ | Poli (3-hidroxi tridecanoato) |
| Undecil | C ₁₄ | Poli (3-hidroxi tetradecanoato) |
| Dodecil | C ₁₅ | Poli (3-hidroxi pentadecanoato) |
| Tridecil | C ₁₆ | Poli (3-hidroxi hexadecanoato) |

Figura 2. Estructura química de los polihidroxialcanoatos. Biopolíésteres compuestos de monómeros de ácidos grasos 3-hidroxi cuya diferencia radica en un grupo R variable, los cuales son sintetizados por un gran número de microorganismos. Modificada de Tan *et al.* 2014.

Dependiendo del número de átomos de carbono que tienen los monómeros, los PHAs se han clasificados en tres grupos: lo de cadenas cortas (*scI*PHA) con 3 a 5 átomos de carbono, los de cadena mediana (*mcI*PHA) con 6 a 14 átomos de carbono, y los de cadena larga (*lcI*PHA) con 15 o más átomos de carbono (Shah *et al.*, 2008). Se han descrito más de 150 monómeros distintos, aunque este número va en aumento debido a la manipulación química y física de los preexistentes (Zinn *et al.*, 2005).

Factores como las fuentes de carbono empleadas en el medio de cultivo, las diferentes rutas metabólicas que coinciden en los monómeros de hidroxiacil-CoA, el amplio espectro de sustratos que pueden emplear las PHA sintasas, así como la especificidad de las PHA sintasas de cada organismo, promueven la gran diversidad de este grupo de polímeros, potenciando las múltiples aplicaciones de estos polímeros en la industria (Steinbüchel *et al.*, 2003; Stubbe *et al.*, 2005; Volova *et al.*, 2013).

Polihidroxiбутирато (PHB)

El primer polihidroxiálcanoato descubierto, y por ende el más estudiado, es el polihidroxiбутирато (PHB). El PHB es un polímero compuesto por cadenas lineales de monómeros de (*R*)-3-hidroxiбутирато. El PHB es uno de los PHAs más simples ya que contiene un grupo metilo en su cadena lateral ([ver figura 3](#)).

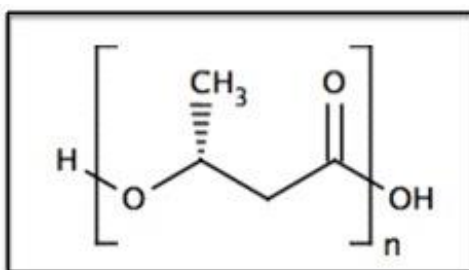


Figura 3. Estructura química del monómero de polihidroxiбутирато (PHB). Poliéster más sencillo con un metilo como grupo R de la cadena.

Dependiendo de las unidades de 3HB que tenga la cadena, el PHB se clasifica en tres grupos: los de alto peso molecular con más de 10^3 residuos de 3HB, los de bajo peso molecular con 100-200 unidades de 3HB, y un tercer grupo conjugado con menos de 30 unidades de 3HB, los cuales están covalentemente unidos a proteínas (Reusch, 1995; Dawes, 1988; Kusaka *et al.*, 1997).

Ralstonia eutropha H16, actualmente llamada *Curpiavidus necator*, se ha convertido en el organismo modelo para el estudio de PHAs de cadena corta ($_{scl}$ PHA), mientras que *Pseudomonas putida* es el organismo modelo para el estudio de los PHAs de cadena media ($_{mcl}$ PHA).

Síntesis del PHB

En el metabolismo celular se produce acetil-coenzima A, un compuesto clave en el metabolismo celular que es convertido a polihidroxibutirato a través de tres enzimas biosintéticas en condiciones metabólicas restrictivas, donde existe un alto contenido de carbono y una deficiencia de algún elemento en el medio.

En el primer paso, la 3-cetotiolasa (PhaA) combina dos moléculas de acetil-CoA para formar acetoacetil-CoA. La acetoacetil-CoA reductasa (PhaB) reduce el acetoacetil-CoA a 3-hidroxiacetil-CoA. Finalmente, la PHB sintasa (PhaC) polimeriza el 3-hidroxiacetil-CoA a (P)3HB, el cual se agrega en gránulos de un tamaño variable de entre 50 y 500 nm de diámetro ([ver figura 4](#)) (Steinbüchel *et al.*, 1992).

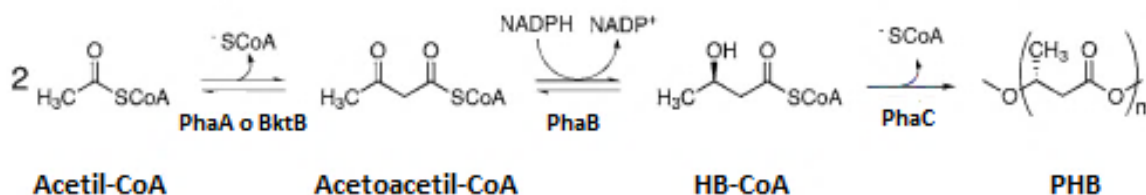


Figura 4. Ruta metabólica de síntesis de PHB. La síntesis se explica previamente en el texto. (BktB, β -cetoliase que participa en la síntesis de β -cetovaleril-CoA). Modificada de Stubbe *et al.*, 2005.

Durante el crecimiento bacteriano normal, la 3-cetotiolasa es inhibida por la coenzima-A libre, producto del ciclo de Krebs, sin embargo, en condiciones donde la entrada de acetil-CoA al Ciclo de Krebs está restringido, debido una condición limitante en el metabolismo, éste se dirige a la biosíntesis de PHB (Ratledge *et al.*, 2001).

Lo genes *phbA*, *phbB* y *phbC*, que codifican para las tres enzimas biosintéticas antes mencionadas, se encuentran frecuentemente agrupados y organizados en un solo operón llamado *phbCAB*, el cual fue inicialmente identificado en 18 diferentes especies (Merrick *et al.*, 1964), sin embargo, este orden no prevalece en todos los genomas, lo que incide en la regulación variable de la síntesis de estos biopolímeros. En *C. crescentus* las proteínas biosintéticas están codificadas por genes dispersos en el cromosoma, por lo tanto, no están en la misma sintonía.

Para la producción de PHAs, se han empleado un gran número de fuentes de carbono entre las que se incluyen sacáridos como fructuosa, maltosa, lactosa, xilosa, arabinosa, entre otras; n - alcanos como hexano, octano, dodecano, etc.; n-ácidos alcanóicos como ácido acético, ácido propiónico, ácido valérico, ácido oleico, etc.; n-alcoholes como metanol, etanol, octanol, glicerol, etc.; y gases como metano y dióxido carbono (Verlinden *et al.*, 2007; Anderson *et al.*, 1990).

Incluso se han probado otras fuentes de carbono de desecho como aceite de cocina, desechos de vinagre, desechos de comida, desechos agrícolas, entre muchas otras fuentes que promueven un reciclaje de estos materiales de manera ecológica con ayuda de estos microorganismos (Verlinden *et al.*, 2007).

Estructura del gránulo de PHA

Los polihidroxicanoatos se acumulan de manera intracelular en inclusiones insolubles de gran peso molecular ([ver figura 5](#)). Aunque se ha mostrado que estos gránulos presentan una estructura más compleja que la simple congregación del polímero, su estructura no está del todo clara. En particular la naturaleza y la composición de la superficie de los gránulos ha sido un punto de discusión controversial en la literatura en las últimas décadas.

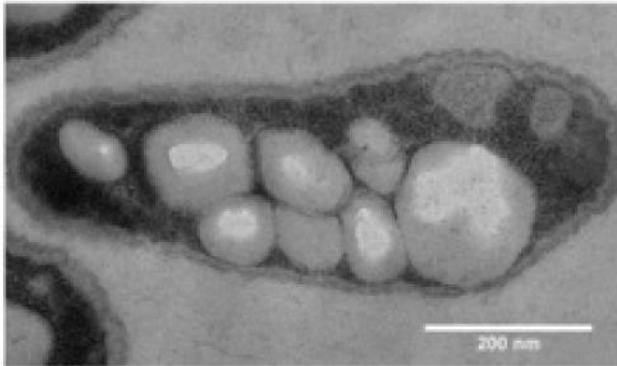


Figura 5. Gránulos de PHAs en *R. eutropha*, tras 3 horas de crecimiento en un cultivo adicionado con 0.2% de gluconato de sodio que promueve la síntesis de polihidroxicanoatos. Wahl *et al.*, 2012.

Merrick y sus colegas fueron los primeros en denotar que los gránulos de PHB eran sensibles a la desnaturalización, y posteriormente Griebel logró determinar la composición de los mismos, proponiendo que contenían un 97% del polímero, un 1.87% de proteínas y solo una cantidad traza de lípidos como ácido fosfátidico y un compuesto no determinado soluble en acetona (Merrick *et al.*, 1964; Griebel *et al.*, 1968). Este estudio, ha sido la única evidencia de la existencia de una monocapa lipídica en donde se encuentran embebidas proteínas que regulan la estructura y síntesis del polímero.

Posteriormente, se demostró por microscopía electrónica, la existencia de una membrana con un grosor de 15-20 nm en los gránulos de PHA en *B. megaterium* y *B. cereus* resultados que posteriormente fueron corroborados por imágenes de criofractura, donde se observó la existencia de una capa sólida entre la membrana y el interior del gránulo (Lundgren *et al.*, 1964; Dunlop *et al.*, 1973).

En experimentos realizados en 1964 y 1997, se determinó que la capa que rodea los gránulos tiene un grosor de 4 nm, lo que excluye la posibilidad de la existencia de una bicapa lipídica, la cual debería tener un grosor de 12 nm (Mayer *et al.*, 1997; Boatman, 1964).

En 1993, De Koning y Maxwell propusieron la existencia de una monocapa compuesta de fosfolípidos, resultado que nunca fue observado de nuevo (De Koning *et al.*, 1993).

En otro modelo propuesto, se sugirió la existencia de una capa proteica que envolvía al gránulo, similar a la capa superficial presente en algunas bacterias (Jurassek *et al.*, 2002; Steinbüchel *et al.*, 1995). Con este dato comenzaron varios estudios para determinar si la capa era de origen proteico o lipídico.

En el 2007, Jendrossek y colegas, por medio de transmisión electrónica identificaron, en la superficie de los gránulos de PHB de la bacteria *Caryophanon latum*, una capa paracristalina con partículas con un tamaño de aproximadamente 8 nm. Con este estudio se postuló, que dichas partículas, representaban a todas las proteínas asociadas al gránulo (PAGPs), las cuales cubren gran parte de la superficie de los gránulos, regulando la estructura y biogénesis del polímero (ver figura 6) (Jendrossek *et al.*, 2007).

En ensayos utilizando fusiones de las proteínas asociadas a los gránulos de PHB con proteínas fluorescentes, se ha mostrado la colocalización de varias proteínas en la superficie del gránulo, apoyando la idea de una capa proteica que recubre al gránulo.

Con la purificación de los gránulos y análisis por SDS-PAGE, se ha demostrado la presencia de un gran número de proteínas asociadas a los gránulos de PHAs, algunas de las que ya se sabía de su interacción, como la PHA sintasa, las fasinas, la PHA regulatoria y las depolimerasas. Además de esto, se encontraron otras proteínas asociadas a ellos, como algunas proteínas de membrana externa, proteínas citoplásmicas, e incluso proteínas del Ciclo de Krebs. Sin embargo, estos datos han sido bastantes cuestionados, ya que se cree que su asociación ocurre por las características hidrofóbicas de los gránulos, y no por una asociación real, puesto que durante el proceso de purificación de los gránulos estas proteínas se asocian a ellos (Jendrossek *et al.*, 2014).

Es en 2016, que se termina la controversia de la composición de los gránulos de PHAs con el trabajo realizado por Stephanie Bresan y coautores, los cuales comprueban que los gránulos de PHB en α -proteobacterias, β -proteobacterias y γ -proteobacterias no contienen fosfolípidos, sino que tienen una superficie compuesta de proteínas (PAGPs), las cuales se asocian con su síntesis y regulación (Bresan *et al.*, 2016).

Esto lo propusieron tras observar la expresión *in vivo* de proteínas fusionadas al dominio de unión a fosfolípidos (LactC2) de la lactacaderina, y a proteínas fluorescentes en dos organismos modelo, *R. eutropha* y *P. putida*, que les permitieron determinar la composición de la superficie de los gránulos de PHB. En estos ensayos no observaron una colocalización de las fusiones con LactC2 con los gránulos de PHB, lo que comprueba que los gránulos no presentan una capa compuesta por fosfolípidos (Bresan *et al.*, 2016).

Por el contrario, en otro de los modelos bacterianos también evaluados en dicho estudio, *Escherichia coli*, sí se observó una colocalización de las proteínas fusionadas al dominio LactC2 con algunos de los gránulos, y proponen que la composición de éstos podría ser diferente debido a que es una bacteria transgénica que no sintetiza polihidroxicanoatos intrínsecamente. Junto con estos resultados se observó que los gránulos en *E. coli* se localizan cercanos a los polos celulares, al contrario, de lo observado en *P. putida* y *R. eutropha*, cuyos gránulos se localizan cercanos a un elemento mediador que proponen es el nucleoide, dada la asociación de los gránulos de PHB con el DNA a través de las proteínas PhaF y PhaM, respectivamente (Bresan *et al.*, 2016).

Asimismo, se observó la expresión de estas construcciones en *Magnetospirillum gryphiswaldense*, una bacteria que además de sintetizar gránulos de PHB también sintetiza magnetosomas, estructuras compuestas por una superficie lipídica. Se demostró que las fusiones con el dominio LactC2 sí colocalizan con las cadenas de magnetosomas, pero no con los gránulos de PHB (Bresan *et al.*, 2016).

Este último experimento fue el que permitió concluir que los gránulos de PHB, en estos grupos de bacterias, no tienen una superficie compuesta por fosfolípidos como se creía, sino por una capa proteica donde se asocian varias proteínas ([ver figura 6](#)).

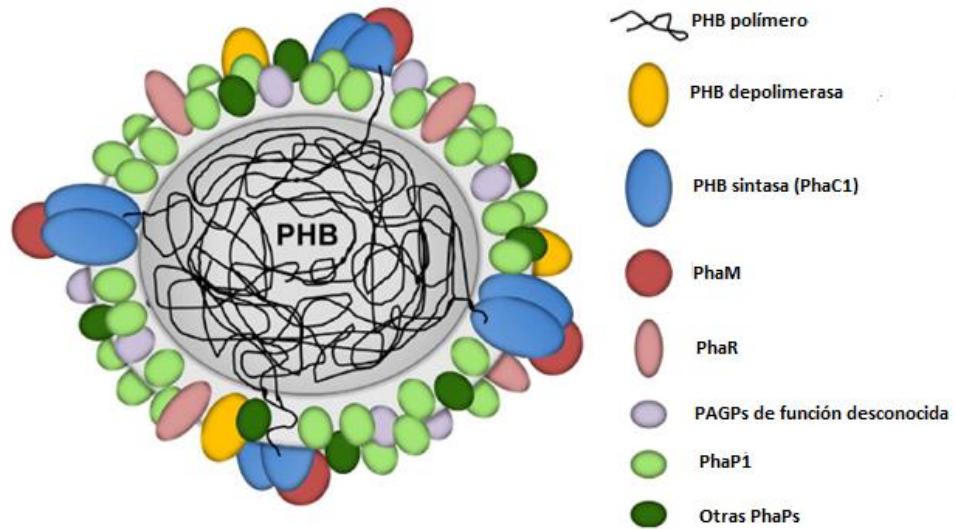


Figura 6. Modelo *in vivo* de un gránulo de PHB en *Ralstonia eutropha*. Asociación de proteínas involucradas en la síntesis, la regulación, y la estructura de los PHAs. PHB: polihidroxiobutirato, PHB depolimerasa: enzima que depolimeriza el polímero a sus monómeros, PHB sintasa: enzima que polimeriza el 3-hidroxiobutiril-CoA a (P)3HB, PhaM: fasina encargada de la segregación de los gránulos de PHB, PhaR: regulador negativo de la síntesis de las fasinas, PhaP1: fasina más abundante, PhaPs otras fasinas con múltiples funciones. Modificada de Bresan *et al.*, 2016.

Proteínas asociadas al gránulo de PHB (PAGPs)

A lo largo del estudio de los PHAs, se han identificado a los genes que regulan la homeostasis de estos biopolímeros, entre los que destacan los que codifican para las enzimas biosintéticas, pero además de esto, se han identificado un gran número de proteínas que se encuentran asociadas al gránulo (PAGPs), y que regulan múltiples características de estas inclusiones celulares ([ver figura 6](#)).

PHA Sintasa (PhaC)



La PHA sintasa es clave en la síntesis de PHA, ya que cataliza la polimerización del hidroxiaxil-CoA a PHA y a CoA libre. La asociación de esta enzima se ha demostrado por múltiples metodologías, con la superficie de los gránulos, e incluso se ha demostrado que es la única proteína, entre todas las que se asocian al gránulo, que es necesaria para la formación del mismo (Jendrossek, 2009; Pötter *et al.*, 2006).

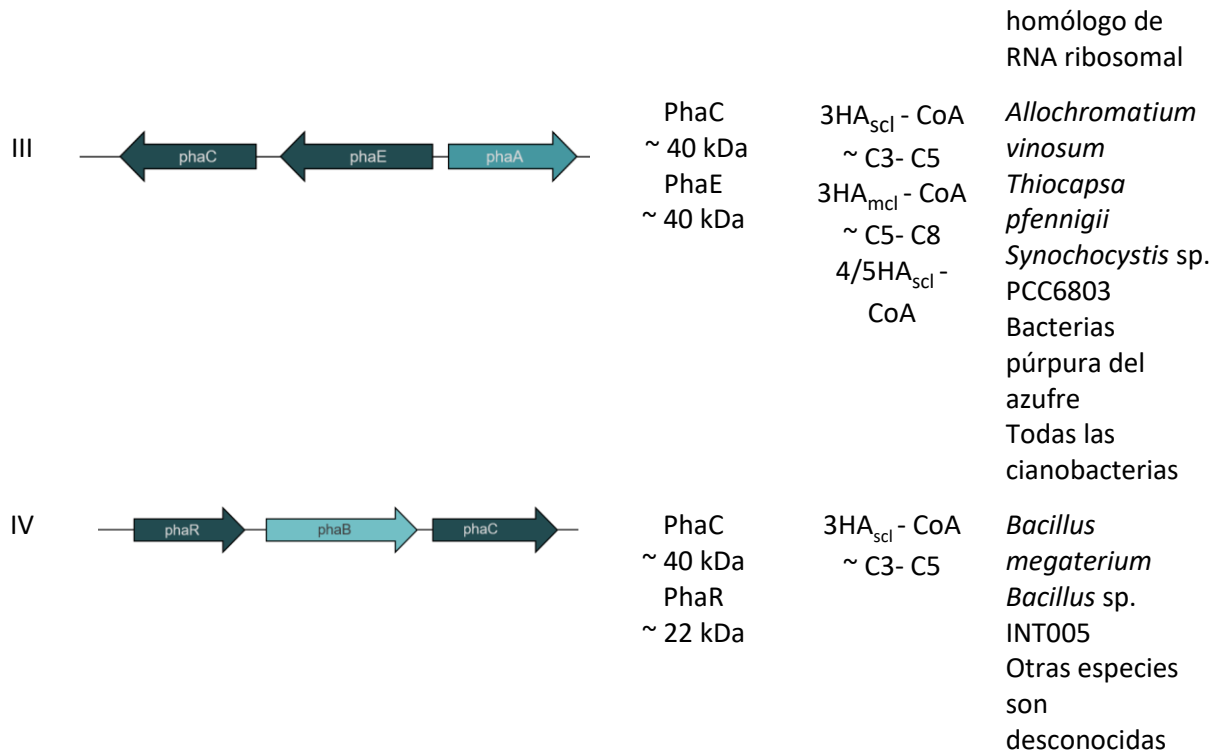
Estas enzimas están divididas en cuatro clases, de acuerdo a las subunidades que la componen y a la especificidad de su sustrato.

La clase I, representada por la sintasa de *R. eutropha* produce $_{scl}$ PHAs, mientras que la sintasa presente en las *Pseudomonas* es de clase II y sintetiza $_{mcl}$ PHAs. Ambas PHA sintasas tienen un solo tipo de subunidad con un tamaño aproximado de 60 a 70 kDa ([ver figura 7](#)) (Steinbüchel *et al.*, 2006).

Por el contrario, las PHA sintasas de tipo III, presentes por ejemplo en *Allochromatium vinosum*, y la clase IV presente solamente en el género *Bacillus*, tienen dos subunidades, PhaC/PhaE y PhaC/PhaR, respectivamente ([ver figura 7](#)) (Steinbüchel *et al.*, 2001).

Las sintasas de poliésteres se pueden dividir en 4 clases (actualizada de Steinbüchel *et al.*, 2001)

| Clase | Estructura general del operón PHA | Subunidades | Sustrato | Especies representativas |
|-------|---|-------------|--|---|
| I |  | ~ 60-73 kDa | 3HA $_{scl}$ - CoA 4HA $_{scl}$ - CoA 5HA $_{scl}$ - CoA 3MA $_{scl}$ - CoA ~ C3- C5 | <i>Ralstonia eutropha</i> <i>Sinorhizobium melioli</i> <i>Burkholderia</i> sp. Otras bacterias |
| II |  | ~ 60-65 kDa | 3HA $_{scl}$ - CoA ~ C5- C14 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Pseudomonas putida</i> Todas las pseudomonas que pertenecen al Grupo I |



PHA: polihidroxialcanoato, 3MA: 3-mercaptoalcanoato, *sp*: especie y otras abreviaturas se muestran en el texto.

Figura 7. Tipos de poliéster sintasas (PhaCs). Las sintasas de estos poliésteres pueden dividirse en 4 clases, de acuerdo a las subunidades que las componen y a la especificidad de su sustrato. Modificada de Pötter *et al.*, 2006.

PHA Regulatoria (PhaR)

La síntesis del gránulo de PHA depende fundamentalmente del estado metabólico de la célula, sin embargo, también está regulada por un factor transcripcional llamado PhaR. Con base a los estudios en *R. eutropha* se propuso un modelo para explicar como ocurre esta regulación en bacterias.

En condiciones que no permiten la biosíntesis de PHA, PhaR se une al promotor de *phaP*, inhibiendo así la transcripción de las fasinias, mientras que, en condiciones permisivas, la PhaC sintetiza las cadenas de poliéster, promoviendo que PhaR, que tiene afinidad por superficies hidrofóbicas, se una al gránulo, perdiendo su interacción con el promotor, y permitiendo así la

transcripción de las fasinas, las cuales, a su vez, incrementan la actividad de la sintasa (Pötter *et al.*, 2002).

Se ha probado que PhaR es capaz de interactuar con los gránulos de PHAs tanto en condiciones *in vitro* como *in vivo*. Esto sugiere que tiene una bifuncionalidad, pudiendo interactuar con el DNA y con el gránulo de PHA. Es considerado el primer regulador en interactuar directamente con el polímero de PHA de manera inespecífica sin importar la forma de P(3HB) que tenga, ya sea cristalina, amorfa o compuesta de oligómeros de 3HB (Maehara *et al.*, 2002).

PHA Depolimerasa (PhaZ)

El almacenamiento de reservas de energía y carbono, como son los PHAs, representan una estrategia de adaptación de los microorganismos a condiciones no favorables. Si bien el almacenamiento de los mismos es muy importante, también lo es la despolimerización o movilización de ellos para poder emplearlos como fuente de energía en procesos celulares indispensables para su desarrollo. Se sabe que muchas especies que sintetizan PHAs son capaces de realizar de una a dos divisiones celulares en ausencia de una fuente exógena de carbono si otros nutrientes se encuentran en el medio, dependiendo únicamente de estas reservas (Handrick *et al.*, 2000; Pötter *et al.*, 2006).

Las enzimas encargadas de la movilización de los gránulos de PHAs son las PHA depolimerasas (PhaZs), las cuales pueden actuar tanto intracelular como extracelularmente. Estas enzimas pertenecen a la familia de las hidrolasas, ya que actúan sobre los enlaces éster carboxílico entre los monómeros de los ácidos.

La degradación extracelular ha sido la más estudiada, y se sabe que puede ocurrir tanto en ambientes aeróbicos como anaeróbicos. Varias especies de bacterias y hongos aprovechan estas reservas del medio como fuentes de energía o carbono. La velocidad de biodegradación del polímero depende de varios factores, incluyendo el pH, el área superficial del polímero, la misma actividad microbiana, la temperatura, la humedad y la presencia de otros nutrientes (Lee, 1996).

En cuanto a las características del polímero que afectan esta velocidad, se incluyen la composición monomérica del polímero, el nivel de cristalinidad o de regiones amorfas, a mayor cristalinidad menor biodegradación), y el peso molecular, donde los polímeros de bajo peso molecular se

degradan más rápido que los de alto peso molecular (Nishida *et al.*, 1995; Spyros *et al.*, 1997; Jendrossek *et al.*, 2002; Jendrossek *et al.*, 1996).

Fasina (PhaP)

Las fasinas son proteínas no catalíticas, de un bajo peso molecular, que están compuestas predominantemente por una conformación de tipo α -hélice, de regiones desordenadas que les otorgan flexibilidad, regiones de interacción espiral-espiral y de naturaleza anfipática, que les permiten estabilizar los gránulos, previniendo su coalescencia (Mezzina *et al.*, 2016).

Además de su función estructural, las fasinas presentan otro tipo de funciones como lo son la activación de la depolimerización de PHAs, aumentan la expresión y actividad de las PHAs sintetasas, participan en la segregación de los gránulos de PHAs y presentan actividad de chaperonas (Mezzina *et al.*, 2016).

A pesar de que no presentan dominios hidrofóbicos, entendidos como de asociación al gránulo, se ha demostrado que tienen una alta afinidad por los gránulos de PHAs en ensayos tanto *in vivo* como *in vitro*, y que esta interacción no depende de un dominio sino de la proteína completa (Neumann *et al.*, 2008; Mezzina *et al.*, 2014)

Son además de ello, las proteínas más abundantes de la superficie del gránulo de PHA, ya que se sintetizan en grandes cantidades bajo condiciones de almacenamiento de energía, representando hasta un 5% del total proteico celular y un 98% de las proteínas presentes en el gránulo, y su síntesis está regulada por la concentración de polímero, ya que en condiciones que no permiten la síntesis de PHAs la síntesis de éstas disminuye (Stubbe *et al.*, 2005; Junker *et al.*, 2001).

Se sabe además que las fasinas no son esenciales para la acumulación de PHA, pero que las cepas incapaces de sintetizarlas forman un gránulo de gran tamaño. Por el contrario, la sobreexpresión de éstas, promueve la formación de varios gránulos de menor tamaño. Esta asociación con el tamaño del gránulo se ha observado tanto *in vivo* como *in vitro*, además de que su síntesis y abundancia está estrechamente ligada con la acumulación del polímero (Pötter *et al.*, 2006).

Un tipo particular de fasinas

PhaM

Esta proteína de *R. eutropha* se descubrió como una proteína asociada al gránulo a través de ensayos de doble híbrido. PhaM tiene propiedades de fasina, además de que es capaz de unirse al DNA de manera inespecífica a través de su dominio carboxilo terminal, el cual presenta un alto contenido de alaninas y lisinas, dos aminoácidos altamente helicogénicos, así como prolinas, los cuales conforman motivos PAKKA, reminiscentes de las proteínas de tipo histonas (Wahl *et al.*, 2012). Se demostró que esta proteína interactúa con PhaC y PhaP5 *in vivo*, pero no con otras proteínas asociadas al gránulo, lo que demuestra una estrecha relación entre estas proteínas (Wahl *et al.*, 2012).

Como punto fundamental del estudio, se observó que en la mutante en PhaM, presenta una afectación en la segregación de los gránulos hacia las células hijas, por lo que se le implicó en una función diferente al de otras fasinas estudiadas al controlar un proceso fundamental, como es la distribución equitativa de estas inclusiones celulares (Wahl *et al.*, 2012).

También, se observó una afectación en el número de gránulos, reconociéndose una reducción de 3-6 gránulos medianos, a 1 ó 2 gránulos de gran tamaño en la cepa $\Delta phaM$ ([ver figura 8B](#)), lo que demuestra su papel como una proteína de tipo fasina. La sobreexpresión de PhaM permitió ver una mayor interacción de los gránulos con la región del nucleóide ([ver figura 8C](#)) (Wahl *et al.*, 2012).

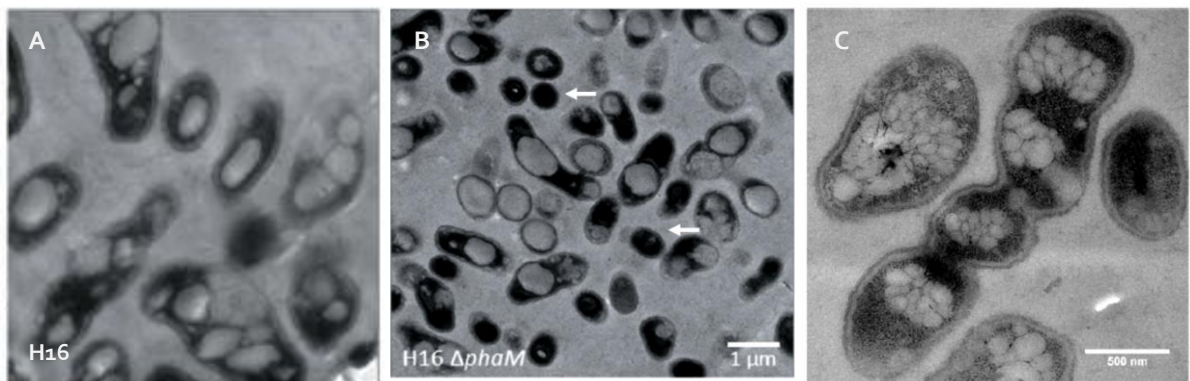


Figura 8. Fenotipos de la cepa mutante *phaM* (B) y de la sobreexpresión de PhaM (C) en *R. eutropha* con respecto a la cepa silvestre H16 (A) En la imagen B se señalan células sin gránulos de PHB. Modificada de Pfeiffer *et al.* 2011 y Wahl *et al.*, 2012.

Ensayos por microscopía de transmisión electrónica, confirmaron que PhaM es responsable de la interacción de los gránulos al nucleoide, ya que es capaz de interactuar con el DNA de manera inespecífica, y con la fasina, PhaP5, regulando la localización y distribución de los gránulos de PHA (Pfeiffer *et al.*, 2011).

Además de esto, ensayos de fluorescencia, donde la proteína PhaM se fusionó con la proteína fluorescente eYFP, demostraron su colocalización en los gránulos de PHB, además de confirmar que éstos se asocian con la región del nucleoide (Pfeiffer *et al.*, 2011).

Con ello se concluyó que la localización subcelular de los gránulos depende de al menos 3 proteínas, PhaM, PhaP5 y la PHB sintasa, PhaC1, las cuales regulan el proceso de segregación de los gránulos de PHA en la división celular en un modelo que podría semejar al propuesto por Pfeiffer y colaboradores ([ver figura 9](#)) (Pfeiffer *et al.*, 2011).

Posteriormente, Pfeiffer y Jendrosseck, demostraron que PhaM es un activador de la PHB sintasa, phaC1, en donde la interacción de PhaM con PhaC1, promueve la inmediata polimerización del 3HB-CoA, disminuyendo considerablemente la fase lag, la cual es característica de la síntesis del PHB debido a la dimerización de PhaC1, de un monómero inactivo a un dímero activo (Pfeiffer *et al.*, 2014).

Todos estos estudios reafirman la versatilidad de funciones de esta proteína en la biogénesis y estructura de los gránulos de polihidroxialcanoatos, confirmando la complejidad de este tipo de inclusiones celulares.

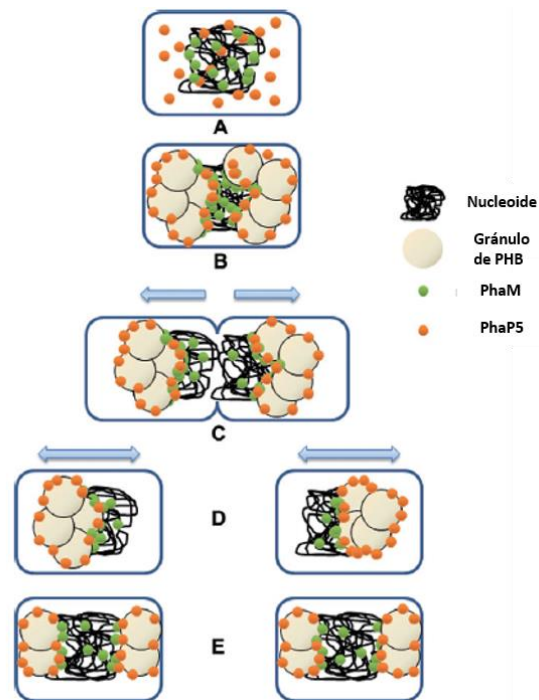


Figura 9. Papel de la proteína PhaM y PhaP5 en la formación y localización de los gránulos de PHB. Modelo propuesto tras encontrar la interacción en entre PhaM y PhaP5, que se cree es la que estabiliza la asociación del gránulo con el DNA. Modificada de Pfeiffer *et al.*, 2011.

PhaF

Otro de los modelos clave en el estudio de los PHAs, es *P. putida*, en donde también se identificó una proteína con múltiples funciones en la regulación de una gran variedad de características de los gránulos de PHAs.

La fasina PhaF presenta una estructura con dos dominios modulares característicos, un dominio amino terminal de tipo fasina que se une al gránulo, y de forma similar a PhaM, y un dominio carboxilo que contiene repeticiones continuas AAKP que permiten la unión inespecífica con el DNA ([ver figura 10](#)) (Maestro *et al.* 2013).

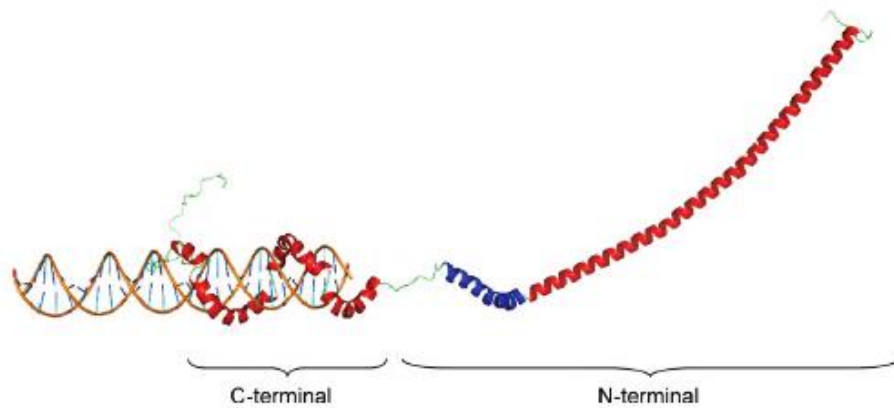


Figura 10. Modelo estructural de la PhaF monomérica interactuando con el DNA. En azul se muestra el zipper de leucinas, el dominio carboxilo terminal que permite la asociación con el DNA y el dominio amino terminal. Maestro *et al.*, 2013.

Se demostró que esta proteína juega un papel clave en la localización y segregación de los gránulos de PHB durante el ciclo celular, asegurando la repartición equitativa a las células hijas, ya que el fenotipo de la mutante $\Delta phaF$, causa una disrupción en el proceso de segregación, resultando en grupos de células que presentaban gránulos de PHA, y otros grupos que no los presentan ([ver figura 11](#)) (Galán *et al.*, 2011).

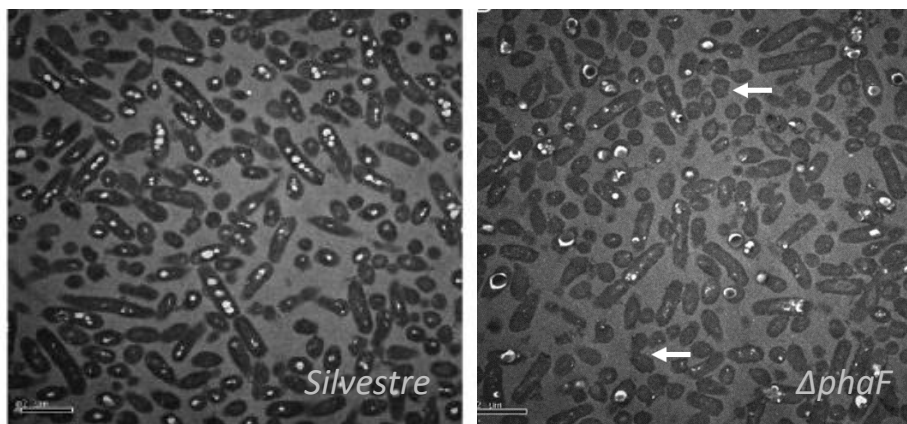


Figura 11. Micrografías del fenotipo de la cepa silvestre de *P. putida* (panel izquierdo) donde todas las células presentan al menos 1 gránulo, y del fenotipo de la mutante $\Delta phaF$ donde se señalan células sin gránulos (panel derecho). Células observadas después de 4 horas de incubación. Modificada de Galán *et al.* 2011.

Además de esto, se observó que el número y el tamaño promedio de los gránulos también es afectado en la cepa $\Delta phaF$, provocando una disminución en el número de gránulos de entre 5-8 gránulos por célula en la cepa silvestre, a solo de 1-4 gránulos en la cepa mutante (ver figura 12) (Galán *et al.*, 2011).

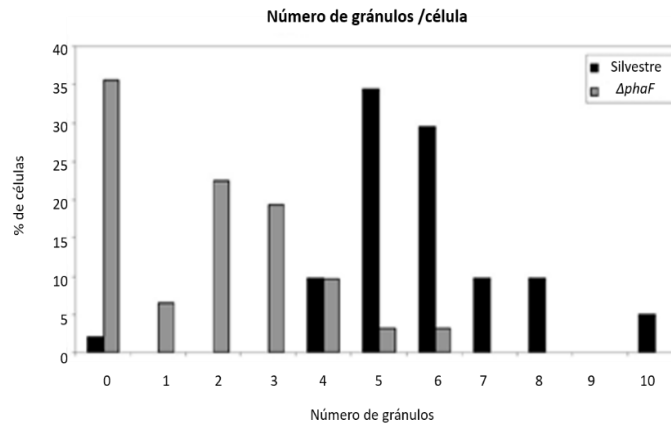


Figura 12. Determinación del número de gránulos en la cepa silvestre de *R. eutropha* (barras negras) y la cepa $\Delta phaF$ (barras grises). Modificada de Galán *et al.* 2011.

Junto con ello, se demostró que esta fasina también tiene un papel regulatorio sobre la expresión de la PHA sintasa, *phaC1*, ya que en la cepa $\Delta phaF$, su expresión aumenta aproximadamente 3.5 veces con respecto a la cepa silvestre. También se comprobó que otros genes del operón *phaC1ZC2D*, también se ven afectados, sugiriendo su función como un regulador negativo del grupo de genes involucrados en la síntesis de PHAs (Galán *et al.*, 2011).

Recientemente, Obeso y sus colegas, demostraron que esta proteína también controla la forma y el tamaño de una cepa de *Pseudomonas putida* que sobreproduce PHA, la cual presenta una morfología peculiar de estructuras microtubulares interconectadas en redes (Obeso *et al.*, 2015).

Todas estas evidencias, demuestran las múltiples funciones de esta proteína, tanto en el metabolismo de PHAs, como en s celulares importantes para la célula como lo es la segregación equitativa de los gránulos de PHA.

Hélice AK

Algo que destaca de las proteínas involucradas en la segregación de los gránulos de PHB, tanto en PhaF de *P. putida*, como en PhaM de *R. eutropha*, es el alto contenido de 3 aminoácidos: lisinas (K), prolinas (P) y alaninas (A), los cuales conforman un motivo AKP de tipo hélice en la región carboxilo terminal, que permite la asociación al DNA.

Para la proteína PhaF, se ha demostrado a través de ensayos de retardo en gel, que la interacción con el DNA es inespecífica, lo que confirma que este dominio de interacción es muy importante para modular el proceso de segregación de los gránulos (Galán *et al.*, 2011).

Los motivos de α -hélice son abundantes en histonas y en otras proteínas que interactúan con el DNA, como algunos reguladores transcripcionales.

La hélice más estudiada es la AKP, la cual se compone predominantemente o exclusivamente, de los aminoácidos lisinas (K), alaninas (A) y prolinas (P), en donde los residuos de lisina proveen la carga positiva para la interacción con la estructura del esqueleto de fosfato y carbono del DNA, mientras que los residuos de alanina le dan estabilidad a la hélice, y los residuos de prolina, permiten las torsiones de la misma. La disposición de los residuos de lisina y la frecuencia de los residuos de prolina en la hélice son variables, lo que sugiere que éste es un motivo muy versátil, en donde la estructura básica se adapta a las diferentes funciones de unión a DNA de un gran número de proteínas (Travers, 1993). A continuación, se muestran algunos ejemplos de proteínas que contienen el motivo AK ([ver Tabla 1](#)).

Tabla 1. Proteínas con un motivo AK (Travers, 1993).

| Motivo/Nombre de la proteína | Secuencia/Estructura | Características de las zonas de unión a DNA |
|---|---|---|
| a. Alto contenido de prolinas | | |
| SPKK Carboxilo terminal de histona H1 | | Rico en A-T \geq 5bp |
| Histona H2B del esperma del erizo de mar | [ST]P[RK][KR] [>6] | DNA rico en A-T? |
| SW15 Levadura | SPRKRCRPRK | |
| KPK Carboxilo terminal de histona H1 | [KR]P[KR] KPK | |
| Otros | | |
| Clase HU | Brazo de cinta β | Surco menor del DNA Secuencia variable |
| b. Hélice α | | |
| AK Carboxilo terminal de histona H1 | AAKK; AKKA, etc., α -hélice Rica en AK, variable Hélice libre de prolina | dsDNA |
| AKP Carboxilo terminal de histona H1 | Hélices con torsiones por la presencia de prolinas e.g. P(KAAK) _N P | |
| AlgR3 | e.g. (KPAA) _N | |
| Otros | | |
| ReCA | hélice de 24 residuos | ssDNA |

Hélice AKP en la histona de unión H1

El DNA en eucariontes se encuentra ordenado en un complejo nucleoprotéico llamado cromatina, conformado principalmente por las proteínas histonas.

Las histonas se agrupan en dos categorías: las histonas núcleo, H2A, H2B, H3 y H4, y las histonas de unión, H1. Las histonas núcleo son proteínas altamente conservadas, mientras que las histonas de unión son una familia altamente heterogénea (Kasinsky *et al.*, 2001).

Las histonas núcleo presentan un dominio plegado, y un dominio carboxilo y amino terminal, los cuales están menos estructurados, a los que se les conoce como las colas de histonas, las cuales pueden sufrir modificaciones post-traduccionales que regulan el estado de la cromatina, de una cromatina laxa o eucromatina transcripcionalmente activa, a una cromatina compacta o heterocromatina, transcripcionalmente inactiva. Al igual, las histonas de unión están organizadas en 3 dominios, un dominio globular, un dominio amino terminal y un dominio carboxilo terminal (Kasinsky *et al.*, 2001).

Las primeras histonas de unión que fueron purificadas presentaban una mayor composición de lisinas en su secuencia que las histonas núcleo, principalmente en la región carboxilo terminal (ver secuencia Histona H1). Esta distribución de lisinas (K) y alaninas (A), dos aminoácidos altamente helicogénicos, resultan en la formación de una organización de tipo hélice AK con torsiones ocasionados por la intercesión de prolinas, a la que se le ha llamado una hélice AKP (Kasinsky *et al.*, 2001).

A continuación, se muestra la secuencia de aminoácidos de la histona H1, donde se señalan en negritas, la región con las repeticiones AAKP.

```
>>HistonaH1
```

```
MSETAPAETATPAPVEKSPAKKKATKKAAGAGAARKKATGPPVSELITKAVAASKERNGLSLAALKKALA  
AGGYDVEKNNRIKLGKSLVSKGTLVQTKGTGASGSFKLNKKAASGEAKPKAKKAGAAKAKKPAGATPK  
KAKKAAGAKKAVKKTPKKAKKPAAAGVKKVAKSPKKAAAAKPKKATKSPAKPKAVKPKAAKPKAAKPKA  
AKPKAAKAKKAAAKK
```

Es por esta característica en el carboxilo terminal, que la histona H1 puede interactuar con el DNA de unión entre nucleosomas (Kasinsky *et al.*, 2001).

Varias proteínas que contienen este dominio hélice están incluidas en el grupo de las proteínas de unión a DNA, el cual está compuesto principalmente por factores transcripcionales, aunque como lo hemos visto, existen otro tipo de proteínas como la PhaM y PhaF, que modulan otras funciones como lo es el proceso de segregación de los gránulos de PHAs.

Hélice AKP de tipo histona H1 en el regulador AlgP y AlgR3

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria con una adaptación muy versátil a un gran número de ambientes. Como respuesta a cambios en las condiciones ambientales, esta bacteria es capaz de producir exopolisacáridos que le permite resistir a la desecación, a agentes oxidantes, y a la respuesta del hospedero (Franklin *et al.*, 2011).

AlgP y AlgR3 son reguladores transcripcionales muy importantes en la producción del alginato, uno de estos exopolisacáridos, que junto con otros reguladores como AlgR1, AlgR2 y AlgQ, promueven la expresión del gen *algD*, el cual codifica para la proteína GDPmanosa dehidrogenasa que forma parte de la ruta biosintética de este polisacárido (Franklin *et al.*, 2011).

Algo relevante de estos dos reguladores, AlgP y AlgR3, es la semejanza de su región carboxilo terminal con la histona H1, con un motivo con repeticiones de lisinas, prolinas, y alaninas (KPA) (ver secuencia AlgP y AlgR3).

A continuación, se muestran las secuencias de aminoácidos de los reguladores AlgR3 y AlgP, donde se señalan en negritas, las regiones con las repeticiones AKP.

```
>>AlgP
MSANKKPVTTPHLHLQQLSHSLVEHLEGACKQALVDSEKLLAKLEKQRGKAQEKLHKARTKIQDAKAGKT
KAQAKARETISDLEEALDTLTKARQADTRTYIVGLKRDVQESLKLQGVGKVKEAAGKALESRKAKPATKPA
AKAAAKPAVKTVAAKPAKPAKPAKPAKPAKPAKTAAAKPAKPTAKPAKPAKPAKTAAAKPAKPA
AKPVAKPAKPAKTAAAKPAKPAKPVAKPTAKPAKTAAAKPAKPAKPAKPAKPVAKSAAKPA
AKPAKPAKPAKPAKPAKPVAAKPAATKPATAPAAKPAATPSAPAAASSAASATPAAGSNGAAPTAS
```

>>AlgR3

```
MSANKKPVTTPLHLLQQLSHSLVEHLEGACKQALVDSEKLLAKLEKQRGKAQEKLHKARTKLQDAAKAGKT  
KAQAKARETISDLEEALDTLTKARQADTRTYIVGLKRDVQESLKLQGVGKVKKEAAGKALESRKAKPATKPA  
AKAAAKPAVKTVAAANAAKPAAKPAAKPAAKTAAAKPAAKPAAKPAAKPAAKTAAAKPAAKPAAKPV  
AKPAANAAKTAAAKPAAKPAAKPVAKPAAKPAAKTAAAKPAAKPAAKHVAKPAAKPAAKPAANAAKPA  
AKPAAKPVAAKPAAKPATAPAAANAAATPSAPAAAASSAASATPAAGSNGAAPTAS
```

AlgR3 es un regulador que contiene 340 aminoácidos, cuya secuencia es rica en lisinas con 40 residuos (12%), alaninas con 122 residuos (36%), y en prolinas con 37 residuos (11%). AlgR3 contiene 40 repeticiones del motivo AAKP, mientras que el regulador AlgP contiene 45 repeticiones del mismo motivo (Medvedkin *et al.*, 1995).

En el trabajo de Deretic y Konyecsní, se probó la interacción del dominio carboxilo terminal del regulador AlgP con el DNA, a través del diseño de un péptido de 50 monómeros que contenía las repeticiones del carboxilo terminal del regulador AlgP en un ensayo de cambio en la corrida electroforética, lo que comprueba que esta región con las repeticiones de AAKP es suficiente para la interacción con el DNA (Deretic *et al.*, 1990).

Mientras tanto Medvedkin y colegas, midieron la afinidad de péptidos con diferente número de repeticiones de los motivos AAKP y KKSP, la cual se encuentra en un rango que va de mM para 4 repeticiones, hasta M para 24 repeticiones. Como referencia la afinidad del represor LacI está en el orden de 10 pM. La afinidad de estos péptidos se incrementa al incorporar una quinta repetición al motivo ligeramente más grande AAKTA. Este resultado se explica por un mejor ajuste a la hélice del DNA del péptido resultante, ya que las repeticiones de los motivos originales producen un péptido con conformación de superhélice dextrógira que por sí misma resulta demasiado ajustada a la forma B del DNA. La interacción de estos péptidos se da con el surco mayor del DNA, donde cada 6 repeticiones del motivo AAKP cubren 5 nucleótidos (Medvedkin *et al.*, 1995).

Formación y segregación de los gránulos de PHB

Además del estudio de síntesis de este polímero, y de la diversidad proteica que regula su síntesis, el mecanismo que permite la formación de los gránulos de PHA en la célula ha sido un tema muy controversial.

Varias teorías acerca de la formación de los gránulos de PHB han surgido a lo largo de su estudio, especialmente a través del análisis con *R. eutropha*.

El primer modelo llamado el Modelo de Micelas, propone que dadas las características hidrofóbicas y la baja solubilidad de los gránulos de PHB en ambientes acuosos, las cadenas del polímero nacientes se agregan formando micelas en el citoplasma, a cuya superficie se unen las sintasas en un principio, y posteriormente las fasinas y otras proteínas asociadas ([ver figura 13A](#)) (Stubbe *et al.*, 2003, 2005).

El segundo modelo, llamado el Modelo de Gemación, asume que la PHB sintasa se localiza en o asociada de manera directa o indirecta a la membrana citoplásmica, liberando las cadenas nacientes a la bicapa, formándose los gránulos dentro de la membrana. Una vez que éstos alcanzan un mayor tamaño, otras proteínas comienzan a asociarse como las fasinas o la depolimerasa, y posteriormente los gránulos son liberados de la membrana ([ver figura 13B](#)) (Stubbe *et al.*, 2003, 2005).

En el tercer modelo, llamado el Modelo de los Andamios, se propone que la PHB sintasa se asocia a un elemento mediador aún no conocido en el centro de la célula, que sirve como andamio para la síntesis del polímero permitiendo la interacción con las proteínas asociadas y las cadenas del polímero ([ver figura 13C](#)) (Tian *et al.*, 2005).

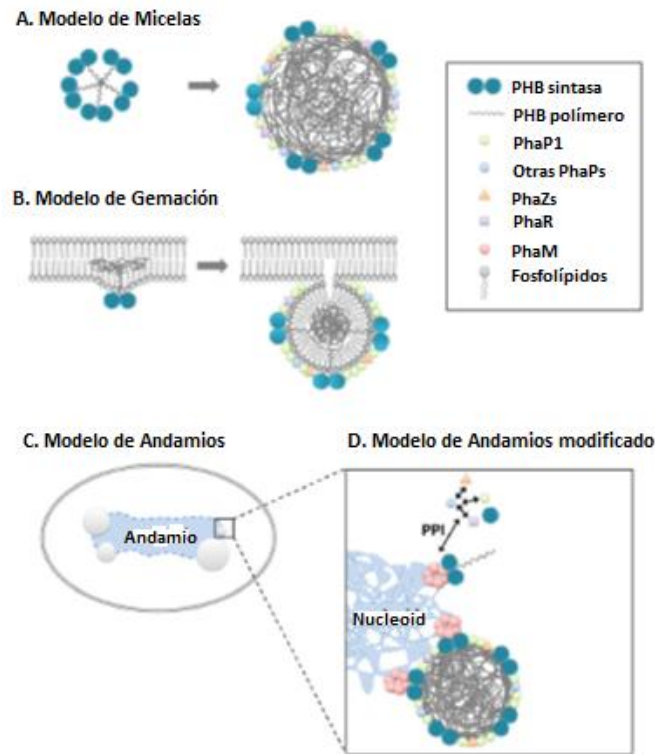


Figura 13. Modelos de la formación de los gránulos de PHB. Las características de cada modelo se explican en el texto. Modificada de Jendrossek y Pfeiffer, 2014.

Investigaciones recientes a partir de microscopía de fluorescencia en los modelos *R. eutropha*, *Rhodospirillum rubrum* y *Escherichia coli* recombinante, demuestran que la síntesis de los gránulos no ocurre azarosamente, sino que, en etapas tempranas de la síntesis, los gránulos de PHB se disponen cerca de la membrana celular y en los polos predominantemente.

Peters y Rehm, en el 2005, reportan por estudios de microscopía de fluorescencia en *Pseudomonas aeruginosa*, que los gránulos nacientes, se localizan en los polos celulares, y ocasionalmente en el centro de la célula. Posteriormente, se probó que en la mutante de *mukB*, la cual afecta la estructura y segregación del nucleoide, influye sobre el fenómeno de segregación de los gránulos de PHAs, siendo ésta, la primera evidencia de la relación entre la división celular y la segregación de los gránulos de PHAs (Peters *et al.*, 2005).

Esto propone que tal vez exista una estrecha relación entre los gránulos de PHB y el nucleoide, a través de una o varias proteínas que promuevan la interacción, propiciando una distribución equitativa de estas inclusiones de la célula madre a la célula hija tras la división celular.

Como se demostró, la proteína PhaF en *P. putida* y la proteína PhaM en *R. eutropha*, son necesarias para la distribución equitativa de los gránulos de PHB de la célula madre a la célula hija durante la división celular, a través de una hélice AKP en el carboxilo terminal que promueve la interacción entre el gránulo y el DNA (Pfeiffer *et al.*, 2011; Galán, 2011).

Pfeiffer y Dendrossek determinaron que los gránulos están envueltos por una capa proteica donde se asocian proteínas importantes en su biogénesis (PAGPs), como la sintasa PhaC1. Además de ello se evaluó el proceso de formación de los gránulos en *R. eutropha*, observando que ésta ocurre en la de los polos celulares y en el área de los sitios de formación del septum (Pfeiffer *et al.*, 2014).

Sus datos junto con los sugeridos por Tian, Sinsky y Stubbe, sugieren que los gránulos están asociados a elementos mediadores, los cuales proponen que son la región del nucleoide, lo que plantea una modificación al modelo de andamios ([ver figura 13D](#)) (Tian *et al.*, 2005).

ANTECEDENTES

Un ejemplo ya estudiado sobre el proceso de segregación de otro tipo de inclusiones celulares es el caso de los gránulos de polifosfato, donde la replicación y segregación del cromosoma modulan la biogénesis y la herencia de los gránulos de polifosfato en *C. crescentus*. Esto ocurre a través de la proteína polifosfato cinasa 1 (Ppk1), que contiene una cola positivamente cargada en el carboxilo terminal, la cual permite la interacción entre los gránulos y el nucleoide, encargándose de la correcta distribución de los mismos a la célula hija (Henry *et al.*, 2013).

La caracterización de la posición de los gránulos de PHB en *C. crescentus* mostró que estos se distribuyen equitativamente entre las células hijas, inclusive bajo condiciones de crecimiento en que las células tienen entre 1 y 2 gránulos dependiendo del estadio del ciclo celular en que se encuentren ([ver figura 14](#)) (Salinas, 2013). Esto sugiere que en *C. crescentus* existe un de segregación de estas estructuras, sin embargo, no se ha encontrado una proteína que regule el proceso de localización y segregación de los gránulos de PHB, como se describió para *R. eutropha* y *P. putida*.

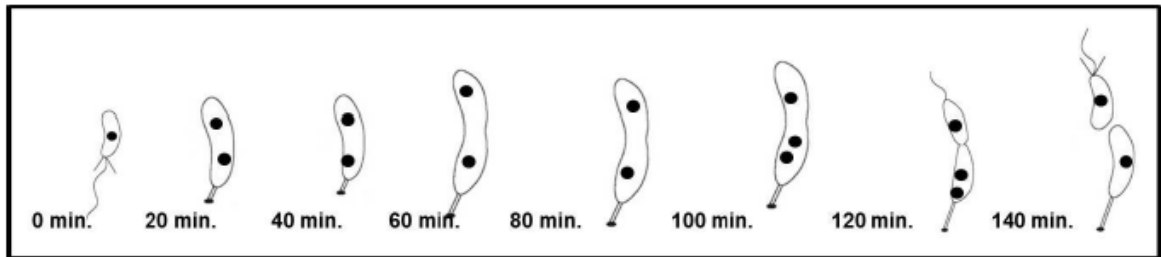


Figura 14. Representación esquemática de la dinámica de los gránulos de PHB durante el ciclo celular de *C. crescentus*, donde se muestra que los gránulos de PHB tienen una localización diferencial dependiendo de la etapa del ciclo celular en donde se encuentren proponiendo un mecanismo de segregación. Salinas, 2013.

Esta interrogante es la que permitió la elaboración de la hipótesis de nuestra línea de trabajo en el laboratorio, la cual es elucidar cómo ocurre el proceso de segregación de los gránulos de PHB, en el modelo clave del estudio del ciclo celular en bacterias, *C. crescentus*, postulando que la proteína que se encarga de la modulación de este proceso, debe presentar una hélice AKP que permita la interacción con el DNA, en un mecanismo semejante al previamente descrito para los gránulos de PHB en otras bacterias y de los gránulos de polifosfato en *C. crescentus*.

Como primer acercamiento para conocer si existía una proteína con una posible hélice AKP en el genoma de *C. crescentus*, se identificaron proteínas con un alto contenido de lisinas (20%) y alaninas (40%), a partir del desarrollo de un programa bioinformático que ayudo a reconocer en un marco de 30 aminoácidos, regiones con un alto contenido de estos aminoácidos. A partir de este análisis se obtuvieron 31 posibles proteínas.

Además de ello, se realizó un análisis bioinformático de alineamiento local para descartar la existencia de proteínas en el genoma de *C. crescentus* que tuvieran una similitud con las proteínas PhaM o la PhaF. El resultado demostró que en el genoma de *C. crescentus* no existen secuencias homologas a éstas.

Algunas de estas proteínas predichas por el análisis bioinformático, con un alto contenido de lisinas y alaninas, se enlistan en la siguiente tabla ([ver tabla 2](#)).

Tabla 2. Proteínas predichas bioinformáticamente que presentan un alto contenido de alaninas y lisinas.

| GEN | SECUENCIA DE AMINOÁCIDOS |
|---------|---|
| CC_0280 | MTMRSTLMLIAAGAAALSAAACSQEHAAEVKEGAKAAASDVKDAAHEIANDPDVKEAGTAIKESVKETGADLKD AAGEAGQELKEAGKDLKHDAKEGAAESKKQLHEATK |
| CC_0319 | MYAVIKTGGKQYRVQAGDLLVVEKLEGEPGA AVAFGEVLM LGEGEAVTVGAPTVDGAVVSGTLLETRKGEKVKIF KKIRRQGYRRTRGRHRQFESVVRVTSVAGAGKEAKWEGTIDLTPKVILDARARGLGDAAVPATIPAPVEAAPAKAE AAPKKKAAPKAAA KTEEGEA |
| CC_0430 | MKRIRLVDLPLIIGIFAPAFALLMLAVMAGGAILVQKSQSAALKQVVERDMRQNLEIQRISKRISNINGELFVVM T HKAGNIDVDKNDARMAAVLVETDAVKDLLALKSKLPAAEQPKIAELIKSLEECRSAIDTVSGMISVDFNMAAGFIA PFEEQYVKMTGQLDQVVAANQRIESES AKRQAQATAAMSVTIIMSLLLTGAVGALAF LVM TTRKSINDIAAAT DKLSKGDNSIDLEKMTRGDELGGIVTALKVFRDNQVHLEQLRADQEKSAA LTADERRSKEAAAAAAAEASLVVS NLAEGLEKLASGDLTFRVTADFPGDYRKLKDDFNAMGSLQETMKVIAASTDGLSTGADEIAHASDDLRSRTEQQ AASLEETAAALDELTA TVRRTAAGARQASDVVSTTRGEATHSGQVVHQAVS AMGEIEKSSGQISQIIGVIDEIAFQ TNLLALNAGVEAARAGEAGRGFAVVAQEVRALAQRSAAEAAKEIKALISSSTQQVSQGVSLVGQTGEALQRIVTKV GEIDALVTEIAASAAEQATGLNEVNTAVNQMDQVTQNAAMVEQSTAATHSLKGETAELVRLMARFQVGS GSS SYARPAVADAGHHAPARNPVAEQQARLNTFARPGRSSGSAALAQAPASDGWEEF |
| CC_0693 | LAAGCTKSITALTNWRGMVAHAAGMTAIACLRILFTADADMRAGDMPKHAQGVADAF LKAKWRKPRKCGAV APLAFVLADHNATELDPTEVQGLAVELEKVLFPNRP IGIQIALMTFEGDETAVLHFSALSQKELASLMAGEGYGGEP GRVHVVTADAVKMPVPTREEAKVYAAEKAKAAEAEK PAAAA PAAAA PAVQAPAPSPAKSAPAPAPT PAVAA KVVTPQRPADTGWWGVYDLSQGA FVGSTVAMRADLVEPPEDDAKLLKRD LVALTDVQAALKTASFGEIQASF GFWNLITPASQESYKARLSRYPLDARPRLTASIYGAPREASIGMLQQMRAQLSGAFAAMD LRITDPTFPVQGLPPE LLESVTLVLSGETEHDRLKQILKFVERKSAYA AKGVMQCVANVASAVELEACKVAGVVRVQGP AVTDFMDTPVA AADGAPLALAKSAA |

CC_1524 LRRRHVGVGAELTAFRILAAISCERLFWETGSRNQAVKTRAESANREISMIRTAMIAATALAASLAASAPAFADV
VGLWATPGNGGQVEISRCGNSLCGKLVTS DHIKTNPGLKDIKNKDESQRSRTLKNLQMLYDFSGGPTKWTGGKV
YNPEDGGVYAGTIELVSTTELKLGCVVAPLCKTQKWTRIR

CC_2135 MRREPAPIPPRSRTRFEWLWRLAADTAPPRNGPNPDRNALVTPDNKKDLRRMANALFLALALLAQDQGASP
QSPNAPPSDEYGYVAWCY GALGGYASLYDQVMPEVTRIEKAFPGPDGVEASLKTYPELRAQAQKDMKAFASAIT
AAEKASPRPISEYGGQV KRGAIIWQGAGSIDKARLAQMWSWSPPGDCEKRAKALEMKSSILGRALNYNAVS
ATSQAPVTAQSAPEQGPAPAPMAPPVAAAASTKAVSKTAPAKPAPAPPKAPAVKPAPVAAKEIIIDPANPAPC
AGSLIPAKRGGKDV LICKAD

CC_3004 MEAGRPMVTVTGRAGAMALMAYAKNAKGEPAIMLAKPAPAAATAAPNSPEARKAAEAAEALAKLKKDMRLGK
KNAIGDAKGRAKARLQQVVEQLKLLKKIYANDPKAMAKALAAA KAVKDYGKAAKEAGELYAQDFANLPD
TATDPEGAAAQRSKIEDEAKMEAAGDQDFIKMTREISRLRDELQTAKTKGILTQPGKFERSEEVKEAEDELKDLK
MTEDLDQQVRQDMPPGS
LMTLAA

CC_3441 MAETVLLIHGYGCAGDVWGPVAERLKAEGYRVEAPTIRSAVRTVDGPKPGVAGLSLADYLAEMSALAQTLAKET
GKKPLVFGHSMGGLIAQKLAEAGHASALVLFAPASPADARGPKLSPVFTFLNMALQAKPETKAGKMWKTGFKF
GVMNAVPPASRHDALYATMVHDSGQVLADLAWPKDPNRTAYVDSAKVTVPILVLAGALDRTPLDVQRIGRK
YASADIKIYPNNAHYLIDEPNTMKILDDVIAWLRGKTQAPAAKVEPAPAPAAPAPAPAKAPEPAAAAPEPVKA
AEPASPPKAAAPKADAKPKATAKAPVAKKAAKAAEAPAKSAAAPKAKAPAAPKAAAAAKPAE
AKPKTAAKAPAAETAPAAKPAAPKAAKPAKTATKAAPAAKAPAAPKAAKAPATKAPAKSSPKAKK

CC_3502 MKTLTLLGVCAALALTAAPAPKVTAADAWCRPAPTAMAGGCYVTLTAGVDDRLVAVETTAARGEIHTMS
MDGGVMRMRKLADGLALPAGKAVALKPGADHIMVIGPKIALTEGAQVPLTLKFQKAKPVKVTAVVKMPPKPA
MSGMH

CC_3658 LSRWRRPFRDDRPKVRRPKVRRRLKVMRAIVLSVVLVAVPVAQQQTPAMPPLSDYVPTFGTQSARPAAPTPPG
PEAPVSTAPQAAPPVDPTQAPEALDPLADLIAQSAQTLDEEAAETAAPAPRRRGRILPIPPPEPEAPTPGAYLT
TAQIYELRVKGSVAAAQNLQGPLDGSWKVTDADGAELYALQIVDKAGGASELEGAWRDVRRPGSVGSTGLIDDL
RQEGDQIARFSPRGGASAVLTLRPAGYEAWSGELYENGASVGVQAERILPQAPPGYESPRGPPYVWPPRVAASR
PAPAAKAVCSTKGKKGKALKAAKAKCAAAAKSKASA AKGKSKATAARKGKSKATAKSTR

HIPÓTESIS

La proteína que participa en el proceso de segregación de los gránulos de PHB en *Caulobacter crescentus* presenta una hélice AKP en el carboxilo terminal.

OBJETIVO

Identificar, si las proteínas con una posible hélice AKP, están asociadas en el proceso de segregación de los gránulos de PHB en *Caulobacter crescentus*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Identificar las proteínas candidatas, con una posible hélice AKP, que podrían estar involucradas en el proceso de segregación de los gránulos de PHB en *Caulobacter crescentus*.
- Analizar si la localización *in vivo* de las proteínas propuestas, corresponde con la de los gránulos de PHB.
- Determinar, si las mutantes de los genes que codifican para las proteínas propuestas, tiene un efecto en el proceso de segregación de los gránulos de PHB en *Caulobacter crescentus*.

MATERIAL Y MÉTODOS

La colección de cepas y plásmidos empleados en el presente trabajo se enlistan a continuación.

| Cepa | Características | Referencia |
|--|--|------------------------------|
| <i>Caulobacter crescentus</i> | | |
| CB15N | Cepa NA1000 mutante en la formación del holdfast | Evinger <i>et al.</i> , 1997 |
| CB15NpNPTS Δ 2135up Ω down | Construcción de la Δ 2135, sustitución del gen por el casete de resistencia a Espectinomicina Ω . Resistencia a Kanamicina (Km) y Espectinomicina (Spc). | Este trabajo |
| CB15N 2135:: Ω | Cepa con la sustitución del gen cc2135 por el casete de resistencia a Espectinomicina Ω en el DNA cromosomal. Resistencia a Espectinomicina (Spc). | Este trabajo |
| CB15NpNPTS Δ 3658up Ω down | Construcción de la Δ 3658, sustitución del gen por el casete de resistencia a Espectinomicina Ω . Resistencia a Kanamicina (Km) y Espectinomicina (Spc). | Este trabajo |
| CB15N 3658:: Ω | Cepa con la sustitución del gen cc3658 por el casete de resistencia a Espectinomicina Ω en el DNA cromosomal. Resistencia a Espectinomicina (Spc). | Este trabajo |
| CB15N:: Δ 2135mcherry | Fusión carboxilo terminal de la proteína cc2135 con la proteína mCherry. Resistencia a Kanamicina (Km). | Este trabajo |

| | | |
|--------------------------------|--|--------------|
| <i>CB15N::3658mcherry</i> | Fusión carboxilo terminal de la proteína cc3658 con la proteína mCherry. Resistencia a Kanamicina (Km). | Este trabajo |
| <i>Escherichia coli</i> | | |
| <i>TOP10</i> | One Shot® TOP10 células competentes | Invitrogen |
| <i>DH5α</i> | Contiene el plásmido pRK2013, que permite la transferencia de información genética por conjugación. Resistencia a Kanamicina (Km) | |
| <i>TOP10pNPTSΔ2135updown</i> | Construcción con la región río arriba y río abajo del gen cc2135. Resistencia a Kanamicina (Km). | Este trabajo |
| <i>TOP10pNPTSΔ3658updown</i> | Construcción con la región río arriba y río abajo del gen cc3658. Resistencia a Kanamicina (Km). | Este trabajo |
| <i>TOP10pNPTSΔ2135upΩdown</i> | Construcción de la Δ2135, sustitución del gen por el casete de resistencia a Espectinomicina Ω. Resistencia a Kanamicina (Km) y Espectinomicina (Spc). | Este trabajo |
| <i>TOP10pNPTSΔ3658upΩdown</i> | Construcción de la Δ3658, sustitución del gen por el casete de resistencia a Espectinomicina Ω. Resistencia a Kanamicina (Km) y Espectinomicina (Spc). | Este trabajo |
| <i>TOP10pCHYC2::2135</i> | Fusión carboxilo terminal de la proteína cc2135 con la proteína mCherry. Resistencia a Kanamicina (Km). | Este trabajo |

| | | |
|--------------------------|--|-----------------------------------|
| <i>TOP10pCHYC2::3658</i> | Fusión carboxilo terminal de la proteína cc3658 con la proteína mCherry. Resistencia a Kanamicina (Km). | Este trabajo |
| Plásmidos | | |
| <i>pNPTS138</i> | Plásmido suicida que contiene al gen <i>sacB</i> . Resistencia a Kanamicina (Km). Integración <i>in locus</i> . | |
| <i>pCHYC2</i> | Vector de fusión carboxilo terminal con proteína fluorescente mCherry Resistencia a Kanamicina (Km). Integración <i>in locus</i> . | Thanbichler <i>et al.</i> 2007 |

I. Medio y condiciones de cultivo

Para crecer las cepas de *Escherichia coli*, se cultivaron aeróbicamente en agitación constante a 200 rpm, a 37 °C, en medio Luria-Bertani (LB), el cual contiene por litro: 10 g de bacto triptona, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl. Para crecer las cepas de *C. crescentus* se cultivaron en medio rico PYE, el cual contiene por litro: 2 g de bacto peptona, 1 g de extracto de levadura, 1 ml de MgSO₄ 1 M y 0.5 ml CaCl₂ 1M. Para evaluar condiciones de síntesis de PHB se empleó el medio M5GG alto fosfato y bajo fosfato, el cual contiene por litro: 1 ml de NaCl 1M, 1 ml de KCl 1M, 10 ml de NH₄Cl₂ 5%, 2 ml de glutamato de sodio 500 mM, 0.5 ml de MgSO₄ 1 M, 10 ml de glucosa, 1 ml de FeSO₄ 10 mM más EDTA 10 mM, 0.5 ml de CaCl₂ 1m y en el caso de bajo fosfato 0.25 ml de fosfatos 0.05 mM y para alto fosfato 10 ml de fosfatos 0.05 mM.

Cuando se requirió agregar antibiótico a los medios de cultivo se emplearon las siguientes concentraciones: para *E. coli*, Kanamicina 50 µg/mL y Espectinomicina 50 µg/mL. Para *C. crescentus*, Kanamicina 5 µg/mL, y Espectinomicina 25 µg/mL.

II. Competencia y transformación por el método de CaCl₂

Para la incorporación de DNA plasmídico foráneo se empleó la técnica de competencia de células bacterianas por CaCl₂. Como primer paso se inocularon 10 mL de medio LB (Luria-Bertani) con la cepa de *E. coli* JM103 o CB15N, por transformar, cultivándolas a 37 °C para *E. coli* o a 30°C para *C. crescentus*, hasta alcanzar la fase exponencial. Posteriormente se transfirieron al hielo donde se incubaron por 10 minutos, para luego centrifugarlas a 5000 rpm por 5 minutos a 4 °C y recolectar el paquete celular. A este paquete celular se le agregaron 5 mL de CaCl₂ 100 mM frío y se incubaron en hielo por 20 minutos. Luego el paquete celular se resuspendió en 600 µL de CaCl₂ 100 mM frío y se dejó incubar de 1 a 24 horas. Una alícuota de estas células se transfirió a un tubo de microcentrífuga y se agregó de 20 a 50 ng de plásmido. Después de incubar en hielo por 30 minutos se realizó un choque térmico a 42 °C por 2 minutos y se regresó al hielo por otros 2 minutos. Enseguida se añadieron 800 µL de LB y se incubó a 37 °C por 1 hora. Las células se colectaron y se sembraron en medio selectivo.

III. Transformación por electroporación

Para la incorporación de diferentes plásmidos se empleó el siguiente protocolo de transformación física por electroshock. Primeramente, se resuspendió, ya sea la reacción de ligación o el plásmido puro de interés, para luego agregar 1 µl de dichas reacciones a 40 µl de células electrocompetentes (*E. coli* TOP10/CB15N). Posteriormente se electroporaron en una celda de electroporación a 1.75kV en el caso de *E. coli* o a 1.60 kV para *C. crescentus*. En seguida, se recuperaron las células en 1 ml de medio LB para *E. coli* o PYE para *C. crescentus*, y se incubó en agitación por 1 hora a 37°C para *E. coli* a 30°C para *C. crescentus*. Transcurrido este tiempo se centrifugó por 1 minuto a 14 rpm. El paquete celular se resuspendió en el medio restante, y luego se espatuló en una caja de agar sólido LB / PYE con el antibiótico selectivo, dejándola incubar toda la noche a 37°C para *E. coli* 30°C para *C. crescentus*.

IV. Conjugación

Para transferir el plásmido de interés de una cepa donadora a una cepa receptora se realizó la inducción de conjugación bacteriana. En condiciones estériles, se transfirieron 1 ml de la cepa CB15N y 200 µl de la cepa donadora y de la cepa DH5α (Helper) en fase estacionaria, a un mismo microtubo. Posteriormente se centrifugó 1 minuto a 14000 rpm y se descartó todo el sobrenadante. Luego se realizaron 3 lavados con medio PYE, retirando en cada paso de

centrifugación el sobrenadante. El paquete celular final se resuspendió con 100 μ l de medio PYE y se colocó en el centro de una caja PYE a 30°C por 6 horas. Finalmente, con un asa de cultivo, se estrieron algunas células en una caja con medio selectivo (ácido nalidíxico y la resistencia del plásmido).

V. Microscopía de epifluorescencia

Para la observación en el microscopio de fluorescencia, se prepararon previamente laminillas de agarosa al 1.5 de acuerdo al siguiente procedimiento. En un tubo de ensayo, se pesaron 0.06 g de agarosa, y se le agregaron 4ml de buffer de sales M2 1x sin NH_4Cl , colocando el tubo a la flama del mechero hasta disolver completamente la agarosa. Con una micropipeta, se tomaron 700 μ l de agarosa disuelta, y se esparcieron sobre un portaobjetos, cubriendo con otro portaobjetos. Al cuajar la agarosa, se retiró uno de los portaobjetos cuidadosamente. Sobre la agarosa se colocó 1 μ l de la muestra a observar y sobre ella, un cubreobjetos.

Para observar las cepas de *C. crescentus* con la microscopía de epifluorescencia, se incubaron inicialmente hasta la fase estacionaria en medio M5GG alto fosfatos y medio M5GG bajo fosfatos, y posteriormente se reinocularon hasta alcanzar una densidad óptica aproximada de 0.5 DO_{600} . Posteriormente se tomó 1 ml del cultivo y se centrifugó en un tubo Eppendorf por 1 minuto a 14000 rpm. Luego se resuspendió suavemente. Para las tinciones de los gránulos de PHB, el cultivo se concentró a 50 μ l y se le añadieron 3 μ l de una solución 1:1 del colorante fluorescente Azul de Nilo A (Sigma), homogeneizando suavemente las células. Posteriormente se colocaron 3 μ l de las células en una laminilla de agarosa y se tomaron imágenes con el microscopio de epifluorescencia, usando el filtro B-2A (Chroma).

Para las construcciones carboxilo terminal con mCherry se colocaron 3 μ l del cultivo en una laminilla de agarosa, para luego tomar imágenes a través del microscopio de epifluorescencia usando el filtro Y2E/CTR (Chroma). Las imágenes fueron editadas con el programa ImageJ, donde se realizó el empalme de la epifluorescencia y las imágenes en campo claro.

VI. Ensayo de *Western blot* anti-mCherry

Para la corroborar la detección de la proteína 2135-mCherry y 3658-mCherry, se realizó un ensayo semicuantitativo tipo *Western blot*, utilizando el anticuerpo anti-mCherry. Se prepararon extractos protéicos totales de las cepas pCHYC2::2135, pCHYC2::3658, CB15N y OmpA::mCherry de cultivos a 0.3 DO₆₀₀, los cuales se resuspendieron en Magic Mix 1x. Luego se sonicaron con dos pulsos de 10 segundos a 15 kHz, e inmediatamente se hirvieron 10 minutos en baño María. Las proteínas se separaron por electroforesis en un gel de acrilamida al 12% (2 ml de acrilamida bisacrilamida, 1.875 ml de Tris 1M pH 8.8, 50 µl de dodecilsulfato sódico SDS, 40 µl de persulfato de amonio 10 %, 1 ml de H₂O desionizada y 3 µl de tetrametiletilenediamina TEMED (Sigma)) y al 4 % (335 µl de acrilamida bisacrilamida, 312.5 µl de Tris 1M pH 6.8, 25 µl de dodecilsulfato sódico SDS, 25 µl de persulfato de amonio 10%, 1.8 ml de H₂O desionizada y 1.5 µl de tetrametiletilenediamina (TEMED) a 25mM en un amortiguador de proteínas (14.4 g de glicina, 3 g de Tris Base, 10 ml de SDS 10 % para un litro de buffer).

Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa en un cámara de transferencia con Buffer de Transferencia (0.32 g de carbonato de sodio, 0.84 g de bicarbonato de sodio, 200 ml de metanol y aforando con H₂O destilada fría a un litro), superponiendo el gel de electroforesis con la membrana a 250mA por una hora en agitación. Posteriormente la membrana se bloqueó con una solución TBS Tween 1x Leche 1% durante toda la noche en agitación (TBS Tween 1x 50 ml TBS 10x en 450 ml de agua más 500 ml de Tween (usb)).

Tras el bloqueo con leche, se realizaron 3 lavados de 15 minutos con TBS Tween, y posteriormente se incubó la membrana con el anticuerpo primario contra mCherry (1:15000) por una hora en agitación. Tras este tiempo, se realizaron 4 lavados con TBS Tween por 15 minutos para retirar el excedente del anticuerpo, e inmediatamente se incubó la membrana con el anticuerpo secundario, α -ratón (1:20000) por 30 minutos en agitación. Posteriormente se lavó la membrana 3 veces con TBS Tween, para finalmente agregar la solución Tropix (AB) (950 µl Tropix-CDP Star y 50 µl de Tropix Nitroblock), cubriendo completamente la membrana por 5 minutos. Como último paso, se prosiguió a revelar las placas R-X, exponiendo la placa con la membrana a tiempos diferentes.

VII. Técnicas de manipulación del DNA

a. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para las mutantes por sustitución con casete de resistencia a espectinomicina de los genes cc2135 y cc3658 se diseñaron dos oligonucleótidos a partir del primer inicio de la traducción de ambas proteínas, para amplificar la región río arriba del gen, y dos oligonucleótidos para amplificar la región río abajo del gen, los cuales se enlistan en la siguiente tabla, empleando como DNA molde el DNA cromosomal de *C. crescentus*.

| Gen de interés | Dirección | Secuencia 5' a 3' | Enzima de restricción |
|----------------|-----------|---|-----------------------|
| 2135::Ω | F1 | CAA ACTAGT GAGCTCATCCTGCGACACCATG | SpeI |
| | R1 | CAA AAGCTT GGGCTAGGAAGAGGGCGTTCG | HindIII |
| | F2 | GAA AAGCTT AAGTCGCCTCTTCAGGGGGAG | HindIII |
| | R2 | GAA GAATTC GGCTCGACCCGCTGTTCAAGG | EcoRI |
| 3658::Ω | F1 | GAA GAATTC TGGTGCCCAAGGTCAATGATG | EcoRI |
| | R1 | GAA GGATCC TTCAACCGCCGCTAACCTTG | BamHi |
| | F2 | CAA GGATCC CAAGGGCAAGAGCAAGGCGAC | BamHi |
| | R2 | CAA AAGCTT GAGGTTCTGGACAAGGCCGAC | HindIII |

Para las construcciones carboxilo terminal se diseñaron 2 oligonucleótidos para amplificar 400 pb de la región C-terminal de cada uno de los genes, verificando que la construcción quedará en fase

con la proteína fluorescente de fusión mCherry. Los oligonucleótidos empleados se presentan a continuación.

| Gen de interés | Dirección | Secuencia 5' a 3' | Enzima de restricción |
|----------------|-----------|--|-----------------------|
| cc2135 | F1 | GAA GAATTC TC GTCCGCCTTGCAGATCAAGACGTC | EcoRI |
| | R1 | GAA AAGCTT CTGGCCCAGATGTGGATGAGCTG | HindIII |
| cc3658 | F1 | GAA GAATTC TC ACGCGTACTTTTCTTGGCCGTC | EcoRI |
| | R1 | GAA AAGCTT GACAAGAGGGCGATCAGATCATC | HindIII |

b. Purificación de Plásmido en pequeña escala (Mini-preparaciones hervidas)

Para aislar el DNA plasmídico de las células de interés, se siguió el protocolo conocido como Minipreps. Primeramente, se colocaron cultivos de 10 ml de *E. coli* con los plásmidos de interés, que crecieron hasta fase estacionaria durante toda la noche. Estos cultivos se centrifugaron en un microtubo a 14000 rpm por 10 minutos, descartando posteriormente el sobrenadante. Al paquete celular se le agregaron 300 µl de solución STET (8% sacarosa, 5% tritón, 50 mM EDTA pH 8, 50 mM Tris-HCl pH 8) y 30 µl de lisozima (10 µl/ml), resuspendiendo las células con vórtex. Inmediatamente después, se colocó el tubo en agua hirviendo por 45 segundos, para posteriormente centrifugarlo a 14000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante se traspasó a otro microtubo, agregándole 300 µl de isopropanol y mezclándolo hasta homogeneizarlo. Después se dejó incubar por 10 minutos en hielo, para luego centrifugarlo a 14000 rpm durante 20 minutos en una centrifuga fría para lograr la precipitación del DNA plasmídico. El sobrenadante se descartó y el DNA precipitado se lavó con 400 µl de etanol al 70%, mezclando por inversión. El alcohol se retiró y el precipitado restante se dejó secar a 70°C durante 10 minutos. Finalmente, el DNA se resuspendió en 35 µl de H₂O desionizada.

c. Clonación (Ligación y digestión)

De acuerdo a protocolos estándares del fabricante, se realizaron digestiones de DNA con enzimas de restricción comerciales (Invitrogen, Roche y New England Labs). Las soluciones se prepararon con 1x de Buffer, 0.5 μ l de la enzima de restricción, una concentración de 0.1 a 1 mg/ μ l del DNA y H₂O, las cuales se incubaron a 37°C por un tiempo variable de 2 a 6 horas, dependiendo de la enzima en uso.

Las reacciones de ligación se realizaron en un volumen total de 10 μ l, con una concentración de 20 a 40 ng del vector, y 2 o 3 veces más la concentración del fragmento a insertar (solución 1:2 ó 1:3), un amortiguador de ligación 1x con ATP y 1 μ l de la enzima T4 DNA Ligasa (Invitrogen). Ésta se incubó por 16 horas a 16°C.

VIII. Construcciones

a. Mutantes por sustitución con casete de resistencia a espectinomicina

Para las mutantes por sustitución con casete de resistencia a espectinomicina de los genes cc2135 y cc3658, se realizaron amplificaciones por PCR de 600 pb río arriba (up) y 600 pb río abajo (down) aproximadamente de los genes en cuestión, las cuales se ligaron y amplificaron de nuevo por PCR, para obtener un fragmento de DNA 2135updown y 3658updown. Posteriormente se ligaron las construcciones al plásmido integrativo pNPTS138, con el cual se transformó a la cepa TOP10 de *E. coli*. Tras la comprobación de la correcta inserción de la construcción updown al plásmido, se prosiguió a purificar el plásmido. Luego se digirió para poder insertar el casete de resistencia a Espectinomicina (Ω) del plásmido pBOR. Luego de comprobar la correcta ligación del casete, se purificaron dichos plásmidos, pNPTS Δ 2135up Ω down y pNPTS Δ 3658up Ω down, y luego se transformó en la cepa de *C. crescentus*, CB15N. Para sustituir el gen nativo, y reemplazarlo por el alelo mutante Δ 2135 y Δ 3658, se sembró la cepa en una caja PYESacSpe, promoviendo la selección negativa de colonias en donde se haya integrado la copia mutante en el cromosoma por recombinación, dada la codificación del gen *sacB* en el plásmido integrativo pNPTS138. Este tipo de plásmidos promueven la recombinación y la pérdida del plásmido, ya que la expresión de *sacB* en bacterias gram negativas que crecen en presencia de 5% de sucrosa es tóxica.

b. Construcciones carboxilo terminal con mCherry

Para las construcciones carboxilo terminal en fase con la proteína fluorescente mCherry, se amplificaron por PCR, 400 pb de la región carboxilo terminal de los genes cc2135 y cc3658. Los fragmentos de DNA se digirieron, y ligaron al plásmido integrativo de construcción carboxilo terminal mCherry pCHYC2, en donde se corroboró su correcta inserción en la secuencia del plásmido. Posteriormente se transformó en la cepa TOP10 de *E. coli* y se purificaron los plásmidos, pCHYC2:2135 y pCHYC2:3658, para luego transformar la cepa CB15N de *C. crescentus*.

IX. Purificación de banda y de plásmidos a gran escala

Para la purificación de la amplificación de PCR, se utilizaron columnas (Qiagen). Se siguieron las instrucciones del protocolo del fabricante sin ninguna modificación. Para la purificación de fragmentos de DNA se realizó una electroforesis y después, se prosiguió a realizar el protocolo del kit de purificación de DNA y Banda de Gel de Illustra GFX. Para ello se cortó con ayuda de un cúter la banda de amplificación esperada, y se colocó en un microtubo, al cual se le añadieron 300 μ l de Buffer tipo 3. Luego se colocó a 60°C por 15 minutos para disolver la agarosa, mezclando por inversión constantemente. Posteriormente se transfirió la solución a una columna blanca y se centrifugó a 14000 rpm por 30 segundos. El precipitado se volvió a pasar por la columna al menos 3 veces. En seguida se le agregaron 500 μ l del Buffer de lavado tipo 1 a la columna blanca, y se centrifugó a 14000 rpm por 30 segundos. La columna se transfirió a un tubo microtubo nuevo, y se le adicionaron 40 μ l del Buffer de tipo 4, esperando 1 minuto para permitir la interacción con la columna. Finalmente se centrifugó a 14000 rpm por un minuto.

X. Extracción de DNA cromosomal

Para la extracción de DNA cromosomal se utilizó un cultivo de *C. crescentus* de toda la noche y se realizó el siguiente protocolo. El cultivo de 3 ml se transfirió a un tubo de centrifuga, y se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se descartó, y al paquete celular se le agregaron 500 μ l de Buffer TE (Tris-EDTA), 30 μ l de SDS y 5 μ l de proteinasa K. La reacción se incubó por 30 minutos a 37°C. Posteriormente se agregaron 250 μ l de fenol pH 8 y 250 μ l de cloroformo, y por inversión manual, se homogeneizó la solución hasta obtener una emulsión de color blanco. Luego se centrifugó a 14000 rpm por 10 minutos, tomando de ésta, la fracción acuosa de la solución lavando al menos 3 veces con fenol y cloroformo para limpiar el DNA. Para la

precipitación de DNA se agregaron 50 μ l de acetato de sodio, agitando suavemente por inversión. Posteriormente se agregaron 500 μ l de isopropanol, y el DNA extraído se colectó con ayuda de una pipeta Pasteur. El DNA recolectado se lavó con 1 ml de etanol al 70%, dejándolo secar a temperatura ambiente hasta volverse translúcido. Finalmente, se resuspendió en 300 μ l de H₂O desionizada, calentando 5 minutos a 70°C.

XI. Criopreservación de células en glicerol

Para la conservación de las cepas elaboradas de *E. coli* y *C. crescentus*, se utilizó un el método de criopreservación en glicerol agregando en un tubo estéril con glicerol al 65%, 900 μ l de cultivo con la cepa de interés, mezclando con vórtex para homogeneizar. Una vez mezclado, se colocó el tubo en hielo seco, y finalmente se guardaron en un ultracongelador a -70°C para posteriores estudios.

XII. Análisis de imágenes

Toda la información procesada se realizó usando el paquete de software comercial MATLAB 8.3.0.532, The MathWorks Inc., Natick, MA, 2014, empleando las herramientas MicrobeTracker y SpotFinderZ.

RESULTADOS

I. Determinación de las proteínas con una posible hélice AKP candidatas que participan en el proceso de segregación de los gránulos de PHB.

De un total de 31 proteínas propuestas en el análisis bioinformático con el programa que se diseñó en el laboratorio para encontrar proteínas con un alto contenido de alaninas y lisinas, se seleccionaron a las proteínas hipotéticas, cc2135 y cc3658, como posibles candidatas en la regulación del proceso de segregación de los gránulos de PHB en *C. crescentus* con base a los siguientes criterios:

- Ser proteínas sin una función descrita (proteínas hipotéticas)
- Ser proteínas conservadas en la familia Caulobacteraceae
- Poseer una hélice AKP evidente
- No presentar un péptido señal

Estas proteínas, cc2135 y cc3658, contienen una hélice AKP en el carboxilo terminal, similar a la de las proteínas PhaM en *R. eutropha* y PhaF en *P. putida*, con un alto contenido de lisinas y alaninas, lo que permitió asociarlas a una posible función en el proceso de segregación de los gránulos de PHB en *C. crescentus*.

A continuación, se muestran las secuencias de las proteínas PhaM, PhaF, cc2135 y cc3658, donde se señalan en negritas las regiones carboxilo terminal con un alto contenido de alaninas y lisinas.

PhaM *Ralstonia eutropha*

```
MFGQIPDFTNGFDFMRRLWGS GSGMPAGMMPGLQAMTPPMDLDDLKRIADLKAVESWLQLNTNLLRRTTIQG  
LEVQRATLVALQTFGNALSPEAMQSAMENVARAANTPSAAA PERDAGADADSGTQQEPPAAERPQAAA SDTD  
SALPPNAALWDDLQQQFNQIASSAAAAS IAPFGMGGVGGFGTAASPDAAAQAAAAKPKTDAPGKAASAGTG  
KPAARKAPAKKAPAKKAAKAKPARDAGNGEDNGKNGGNGANGSSAA
```

PhaF *Pseudomonas putida*

MAGKKNTEKEGSSWVGIEKYSRKIWLAGLGIYSKIDQDGPFLFDSLVDKGEKAEKQAKKTAEDVAETA
KSTTSRVSGVKDRALGKWSELEEFDKRLNSAISRLGVPSRNEIKAL**LHQQVDSLTKQIEKLT**GASVTP
ISSR**TAAAKPAASKAAAKPLAEAAAKPAAKTAAAKPAAKTAAAKPAAKPAAKVAAAKPAAKPAAAKPAAAKKPAV**
KKAPAKPAAAKPAAPAASAAPAATAAPAPAAAPVSSSTPSAPAGTGTLI

Se señala además un motivo de leucinas.

cc2135 *Caulobacter crescentus*

M₁RREPAPIPPRSRTRFEWLWLRLAADTAPPRNGPNPDRNALVTTDPNKKDLRR**M**₅₄ANALFLALALLA
QDGQAS PQSPNAPPSDEYGYVAVWCYALGGYASLYDQVMPEVTRIEKAFPGPDGVEASLKY
PELRAQAQKDMKAFASAITAAEKASPRPISEYGAQVKRGAAIWQGAGSIDKARLAQMWMSW
SPPGDCEKRAKALEMKSSILGRALNYNAVSATSQAPVTAQSAPEQGPAPAPMAPPVAAA
ASTKAVSKT**APAKPAPAPPKPKAPAVKPAVAA**
KEIIIDPANPAPCAGSLIPAKRGGKDV LICKAD

cc3658 *Caulobacter crescentus*

M₁SRWRRPFRDDRPKVRRPKVRRRLKVM**M**₂₈RAIVLSVVLVASPVLAQQQTPAMPPLSDYVPT
FGTQSARPAAPTPPGPEAPVSTAPQAAPPVDPDTPQAPEALDPLADLIAQSAQTLDEEAA
ETAAPAPRRRGRILPIPPPEPEAPPTPGAYLTTAQIYELRVKGSVAAAQNLQGPLDGS
WKVTDADGAELYALQIVDKAGGASELEGAWRDVRRP GSVGSTGLIDDLRQEGDQI
IARFSPRGGASAVLTLRPAGYEAWSGELYENGASVGVQAERILPQAPPGYESP
GRGPYVWPPRVAASRPAPAAKAVCSTKGKKGKAL**KAAKAKCAAAAKKSKASA
AKKSKATAARKKSKATA**
KKSTR

Asimismo, se realizó un análisis con el programa de predicción de péptido señal SignalP 4.1 para determinar si las proteínas cc2135 y cc3658 predecían un péptido señal.

Utilizando la secuencia reportada en la anotación original se encontró un posible péptido señal en la proteína cc3658, sin embargo existen inicios alternativos de la traducción (marcados con negritas en las secuencias mostradas anteriormente).

El codón de inicio reportado es el inusual TTG y los primeros 16 codones están sobrelapados con el final del gen ubicado río arriba. Al realizar una predicción de péptido señal a partir de esta

primera metionina se predice un péptido señal en la posición 46 lo que nos hizo replantear, si este era el verdadero inicio de la traducción ([ver figura 15A](#)).

En la anotación de los genomas de bacterias del mismo género, la metionina de inicio de esta proteína se predice en la posición 28. Por el contrario, al hacer una predicción de péptido señal a partir de esta metionina (M_{28}), se predice que la proteína tiene un péptido señal con un sitio de corte por la peptidasa en el residuo 18 de la cadena polipeptídica, lo que denota su exportación al periplasma ([ver figura 15B](#)). Esto coincide con el inicio de corte predicho en el análisis a partir de la metionina reportada en el genoma (M_1) como inicio de la traducción de la proteína cc3658 ([ver figura 15A](#)).

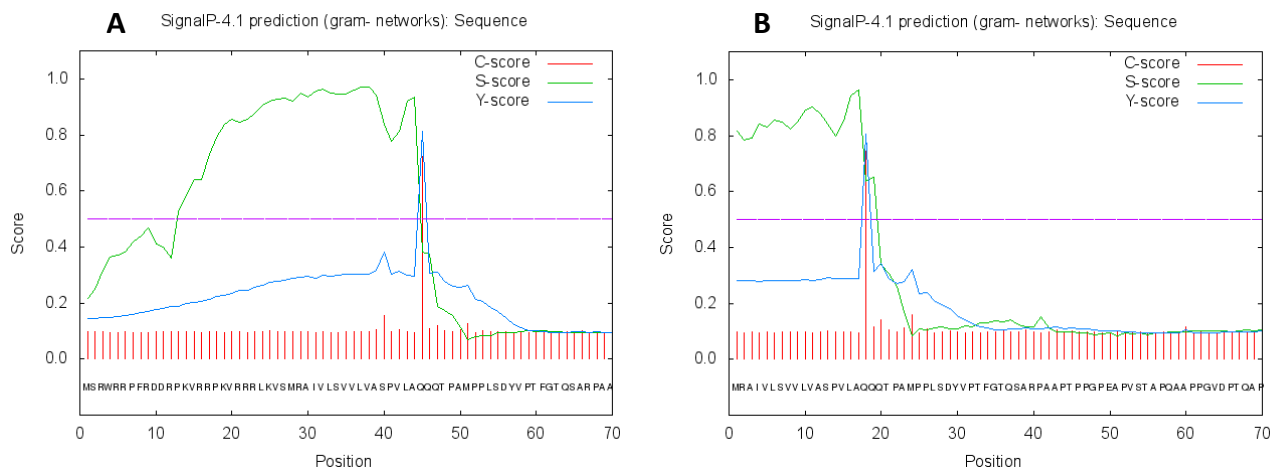


Figura 15 A- B. Predicción del sitio de corte del péptido señal en bacterias Gram Negativas. Resultado positivo a la presencia de un péptido señal en la proteína cc3658, contemplando ambos inicios de la traducción. **A.** Primer inicio de la traducción de la proteína cc3658. **B.** Segundo inicio de la traducción de la proteína cc3658. Valor-C (valor crudo de sitio de corte) el valor suele ser alto inmediatamente después del sitio de corte de la peptidasa. Valor-S (valor de péptido señal) distinguir entre proteínas con un péptido señal y proteínas que no lo tienen. Valor-Y (valor combinado del sitio de corte) promedio geométrico entre el valor C y el valor S, prediciendo un mejor sitio de corte de la peptidasa. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Petersen TN., Brunak S., von Heijne G. & Nielsen H. Nature Methods, 8:785-786, 2011.

En el caso de la proteína cc2135, también existen otros posibles inicios de la traducción (marcados con negritas en las secuencias mostradas anteriormente). No se predice un péptido señal considerando la primer metionina (M₁) ([ver figura 16A](#)). Considerando el segundo posible inicio de la traducción (M₅₄), tampoco se predice un péptido señal a pesar de que el valor S obtenido está por encima del valor crítico estimado por el programa ([ver figura 16B](#)).

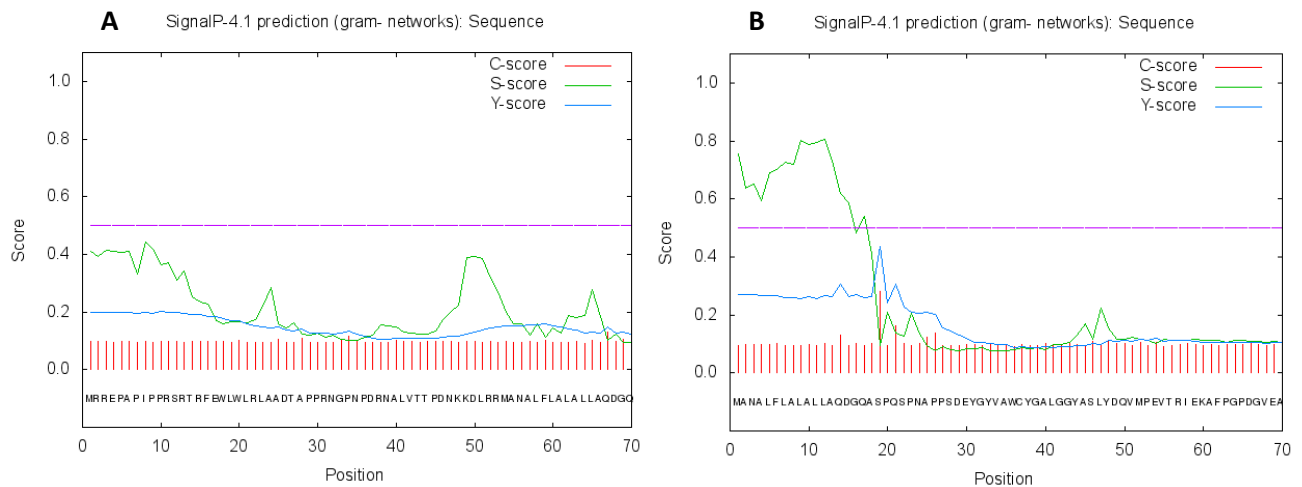


Figura 16 A- B. Predicción del sitio de corte del péptido señal en bacterias Gram Negativas. Resultado negativo a la presencia de un péptido señal en la proteína cc2135, contemplando ambos inicios de la traducción. **A.** Primer inicio de la traducción de la proteína cc2135 **B.** Segundo inicio de la traducción de la proteína cc2135. Valor-C (valor crudo de sitio de corte) el valor suele ser alto inmediatamente después del sitio de corte de la peptidasa. Valor-S (valor de péptido señal) distinguir entre proteínas con un péptido señal y proteínas que no lo tienen. Valor-Y (valor combinado del sitio de corte) promedio geométrico entre el valor C y el valor S, prediciendo un mejor sitio de corte de la peptidasa. SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions. Petersen TN., Brunak S., von Heijne G. & Nielsen H. Nature Methods, 8:785-786, 2011.

Junto con estos resultados, se analizaron las secuencias de estas proteínas, considerando ambos inicios de la traducción, con el programa de predicción de hélices transmembranales TMHMM Server v. 2.0, para reconocer si existían hélice transmembranales entendidas como la integración a la membrana o de regiones hidrofóbicas que pudieran interpretarse como la interacción con los gránulos de PHB.

Ambas proteínas no mostraron los valores necesarios para que se predijera una hélice transmembranal, aunque para la secuencia cc3658 a partir de la primera metionina de la proteína se puede predecir una región hidrófoba al inicio de la secuencia (ver figuras [17 A-B](#) y [18 A-B](#)).

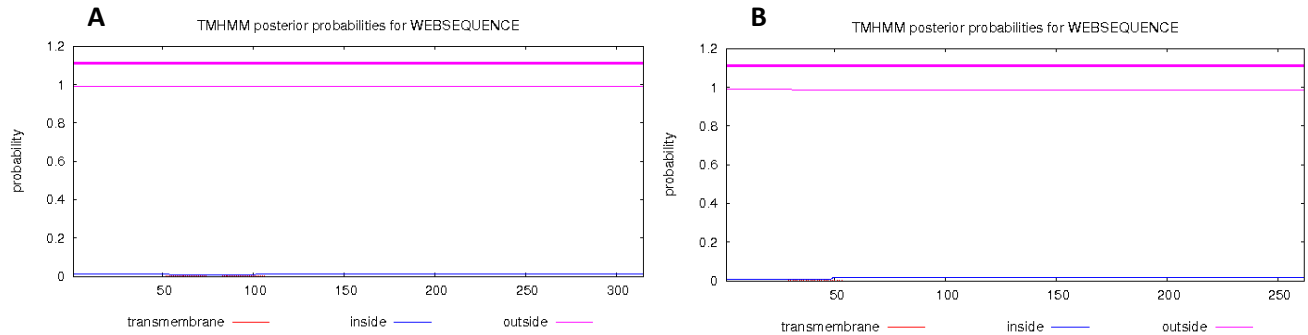


Figura 17 A-B. Predicción de hélice transmembranal de la proteína cc2135. Resultado negativo a la presencia de una hélice transmembranal en la proteína cc2135, contemplando ambos inicios de la traducción. **A.** Primer inicio de la traducción de la proteína cc2135. **B.** Segundo inicio de la traducción de la proteína cc2135. TMHMM Server v. 2.0.

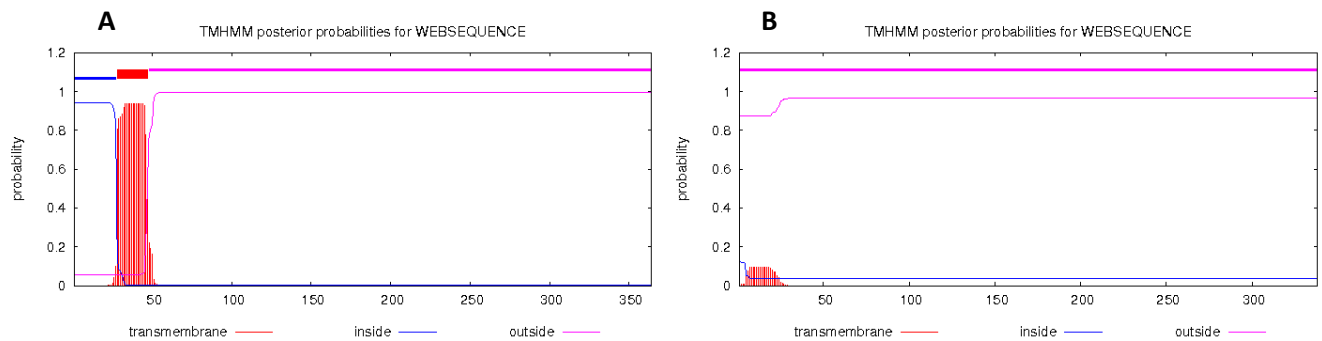


Figura 18 A-B. Predicción de hélice transmembranal. Resultados a la presencia de una hélice transmembranal en la proteína cc3658, contemplando ambos inicios de la traducción. **A.** Primer inicio de la traducción de la proteína cc3658 con un resultado positivo a la presencia de una región transmembranal. **B.** Segundo inicio de la traducción de la proteína cc3658. TMHMM Server v. 2.0.

Estos resultados predictivos no nos permitieron concluir por métodos bioinformáticos la localización de estas proteínas, por lo que se consideró continuar con el análisis experimental, para comprobar si estas proteínas participaban o no en el proceso de segregación de los gránulos de PHB en *C. crescentus*.

II. Determinación de la posible función de las proteínas con una posible hélice AKP, cc2135 y cc3658, en el proceso de segregación de los gránulos de PHB.

a) Mutantes por sustitución con casete de resistencia a espectinomicina

Para identificar la participación de las proteínas cc2135 y cc3658 en el proceso de segregación de los gránulos de PHB, se realizaron mutantes por sustitución con un casete de resistencia a espectinomicina, para evaluar si sus fenotipos son similares a los descritos en las mutantes de las proteínas PhaM en *R. eutropha* y PhaF en *P. putida*.

Posteriormente, las construcciones fueron comprobadas por PCR y por secuenciación nucleotídica, además de analizar las imágenes de epifluorescencia obtenidas.

Para observar las diferencias en la distribución de los gránulos de PHB, se realizó una tinción con el colorante fluorescente Azul de Nilo A, que tiñe específicamente estas inclusiones celulares dada sus características fisicoquímicas.

Para este análisis se evaluaron dos condiciones: una condición con una concentración alta en fosfatos (10 mM) y una condición baja en fosfatos (0.5 mM), la cual promueve la síntesis de PHB en *C. crescentus*.

Las imágenes obtenidas a través de microscopía de epifluorescencia se muestran a continuación (ver figuras [19](#) y [20](#)), las cuales fueron analizadas con el programa Matlab para obtener datos cuantitativos del número de gránulos por célula, así como el promedio de gránulos por célula.

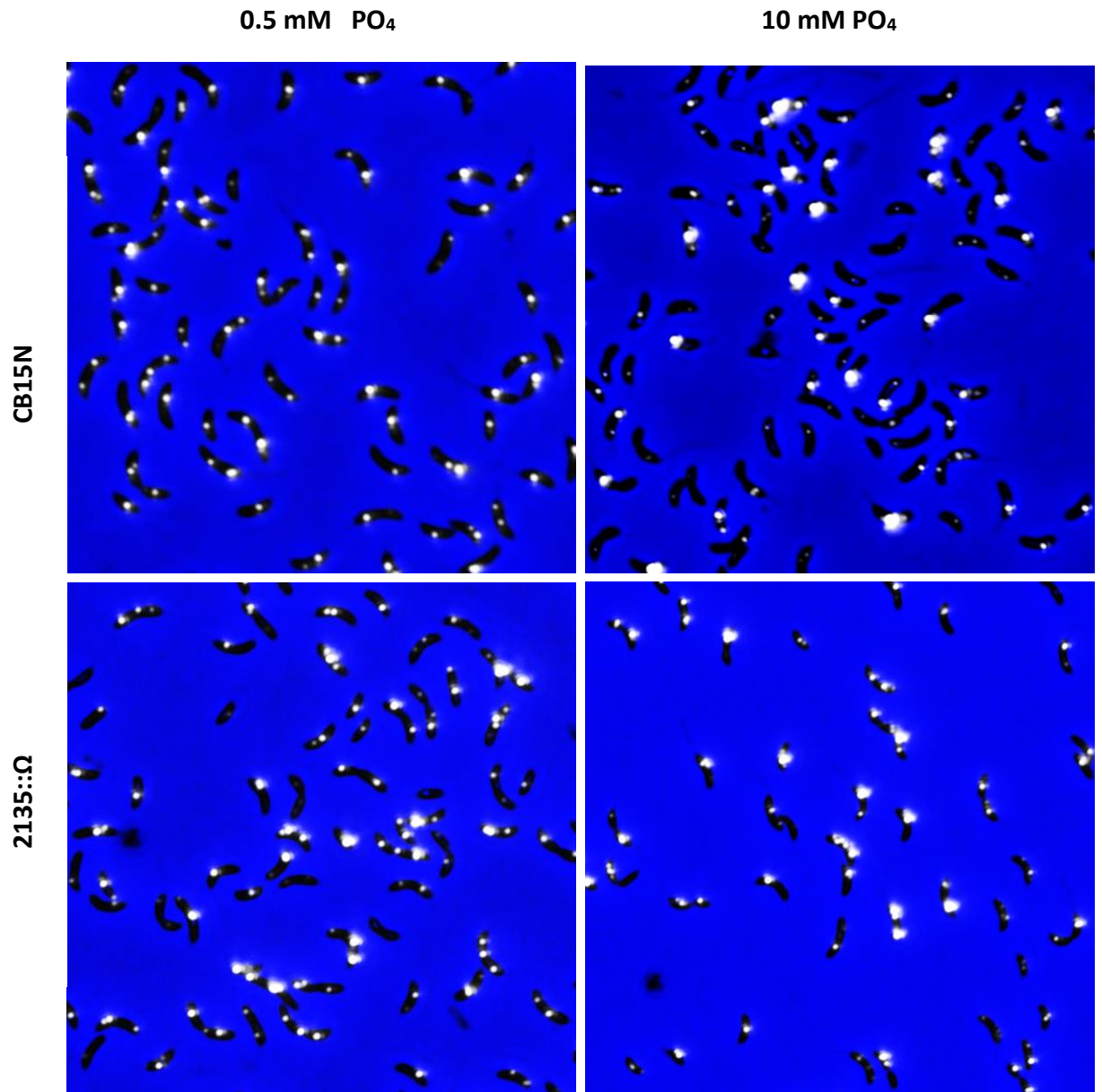


Figura 19. Imágenes de microscopía de epifluorescencia de la tinción con Azul de Nilo A de los gránulos de PHB de la mutante por sustitución del gen cc2135. Medio M5GG alto fosfato (10 mM de fosfatos) y bajo fosfato (0.5 mM de fosfatos). Células en una fase exponencial inicial (0.3 DO₆₀₀).

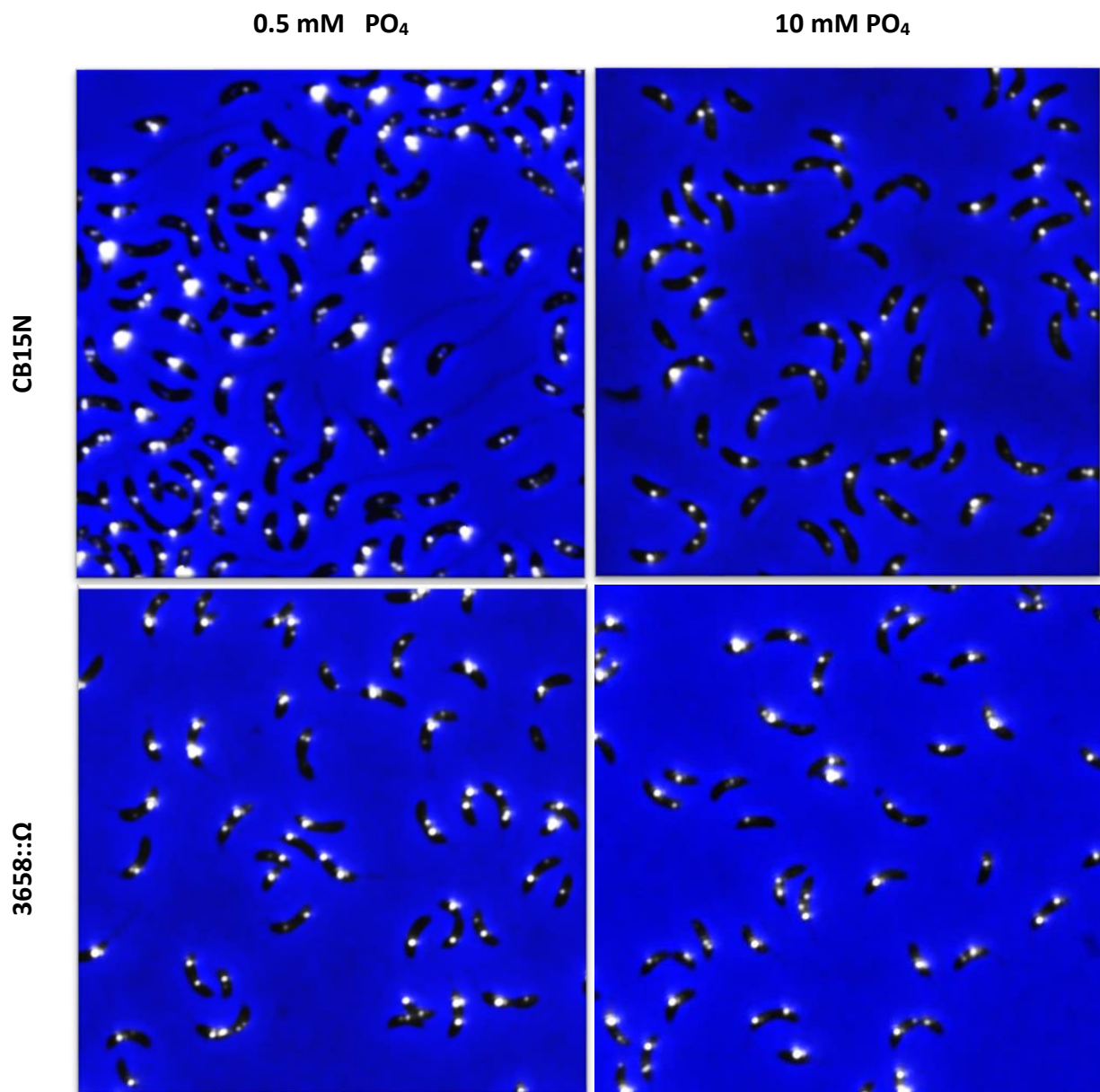


Figura 20. Imágenes de microscopía de epifluorescencia de la tinción con Azul de Nilo A de los gránulos de PHB de la mutante por sustitución del gen cc3658. Medio M5GG alto fosfato (10 mM de fosfatos) y bajo fosfato (0.5 mM de fosfatos). Células en una fase exponencial inicial (0.3 DO₆₀₀).

Para comprobar la correcta sustitución de los genes *cc2135* y *cc3658*, por el casete de resistencia a Espectinomicina (Ω), se amplificaron mediante PCR los *loci* de las mutantes de los genes de interés, con los oligonucleótidos, *del2135f1* y *del2135r2* para la mutante *cc2135*, y con los oligos *del3658f1* y *del3658r2* para la mutante *cc3658*. Los productos de PCR del alelo interrumpido *2135::\Omega* y *3658::\Omega* tienen un tamaño aproximado de 3295 pb y 3280 pb respectivamente, los cuales corresponden al tercer y quinto carril, como puede verse por electroforesis en el gel de agarosa ([ver figura 21](#)).

Como punto de comparación, se amplificó el locus que contiene al gen *cc2135* y al gen *cc3658* respectivamente, cuyos tamaños son de 2233 pb y 2362 pb, los cuales corresponden al segundo y cuarto carril ([ver figura 21](#)).

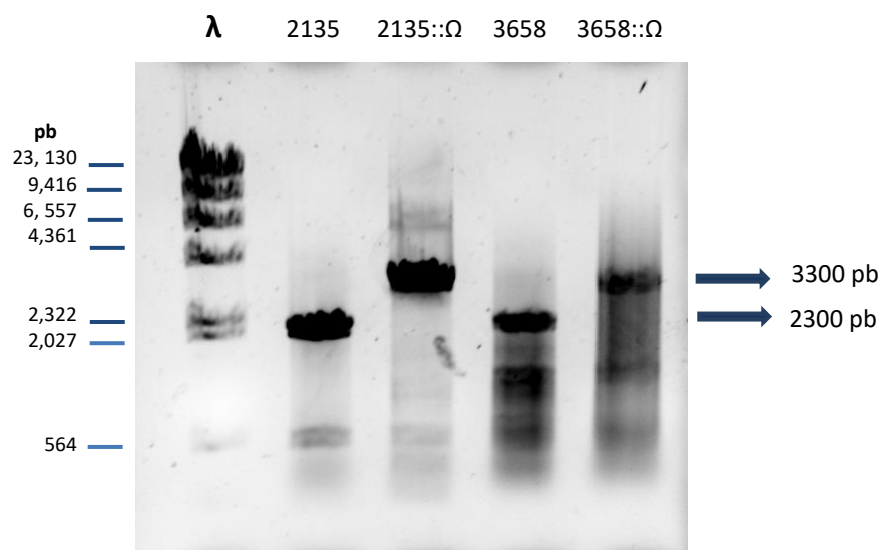


Figura 21. Amplificaciones comprobatorias por PCR de la mutación de los genes *cc2135* y *cc3658* en un gel 0.1% agarosa.

b) Localización *in vivo* de las proteínas cc2135 y cc3658

Para determinar si existe una colocalización de las proteínas cc2135 y cc3658 con los gránulos de PHB, se fusionaron los genes con la proteína fluorescente mCherry en el carboxilo terminal.

Los resultados de la microscopía de epifluorescencia se presentan a continuación, donde se muestra la epifluorescencia con mCherry, así como la epifluorescencia con Azul de Nilo A, para la tinción de los gránulos de PHB.

La fusión cc2135mCherry muestra un patrón de localización periplásmica, dado que existe señal fluorescente en la periferia de las células y en la prosteca donde no existe citoplasma ([ver figura 22](#)). Esto sugiere que esta proteína se exporta al periplasma.

2135mCherry

Epifluorescencia por mCherry

Tinción de gránulos con Azul de Nilo A

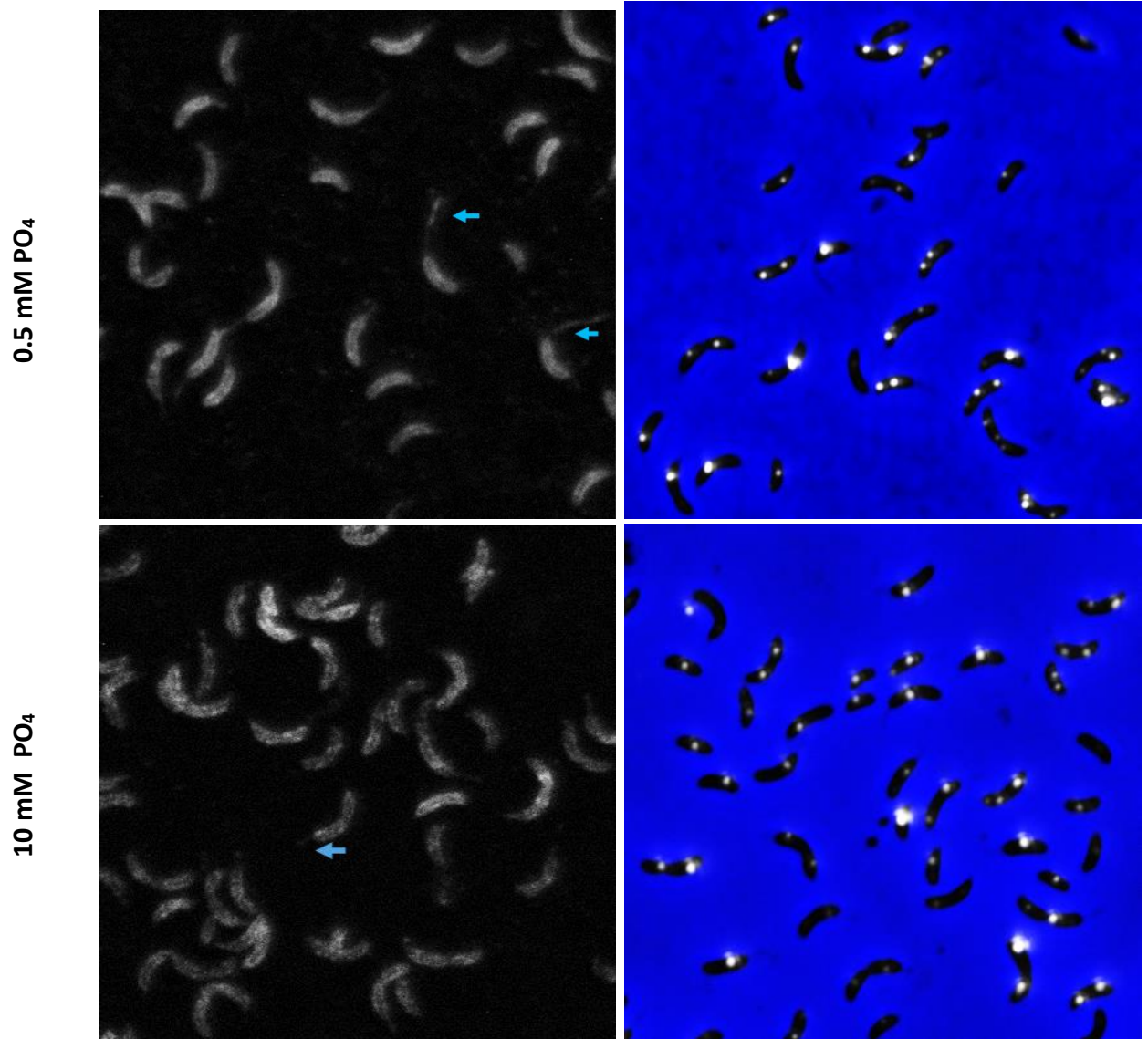


Figura 22. Imágenes de microscopía de epifluorescencia de la construcción carboxilo terminal de la proteína cc2135 con mCherry y su respectiva tinción de los gránulos de PHB con Azul de Nilo A. Medio M5GG alto fosfato (10 mM de fosfatos) y bajo fosfato (0.5 mM de fosfatos). Las proteasas se señalan con flechas azules. Células en una fase exponencial inicial (0.3 DO₆₀₀).

En cuanto a la fusión cc3658mCherry no se observa fluorescencia, ya que a pesar de una alta exposición (4s), no se logra observar ningún indicio de expresión de la proteína ([ver figura 23](#)).

Esto pudiera deberse a una baja expresión de la proteína, o a que la proteína no se expresa en las condiciones analizadas.

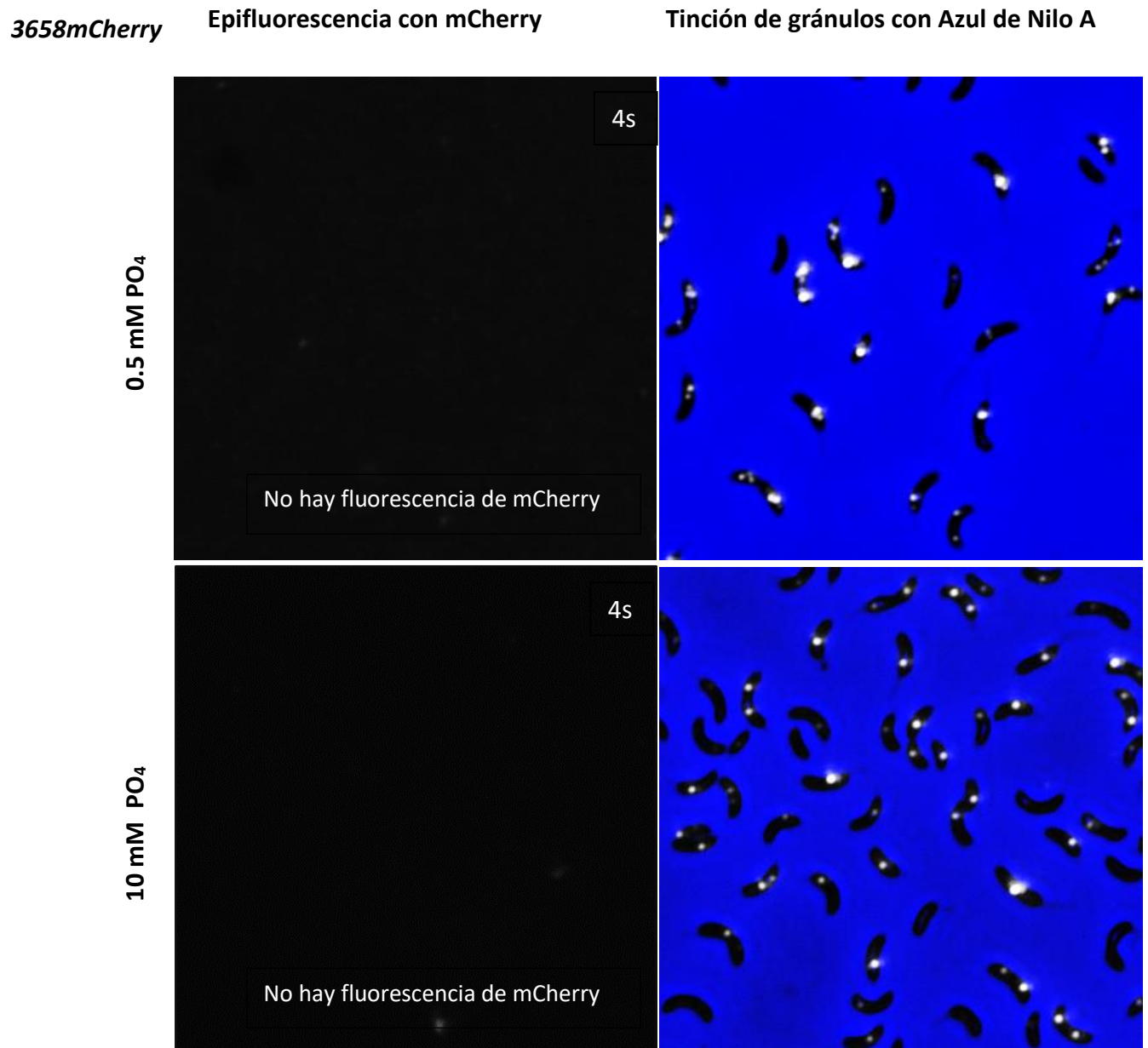


Figura 23. Imágenes de microscopía de epifluorescencia de la construcción carboxilo terminal de la proteína cc3658 con mCherry y su respectiva tinción de los gránulos de PHB con Azul de Nilo A. Medio M5GG alto fosfato (10 mM de fosfatos) y bajo fosfato (0.5 mM de fosfatos). Células en una fase exponencial inicial (0.3 DO₆₀₀).

c) Análisis semicuantitativo de las proteínas de fusión cc2135 y cc3658 con mCherry mediante *Western blot*

Para corroborar la expresión de las proteínas 2135 y 3658 fusionadas en el carboxilo terminal con la proteína fluorescente con mCherry, se realizó un análisis semicuantitativo de tipo *Western blot*, utilizando el anticuerpo contra la proteína mCherry (28.8kDa). Para ello se realizaron extractos proteicos totales de estas cepas, así como de un control positivo, en este caso la cepa silvestre (CB15N) donde no tendría que detectarse la presencia de mCherry, y un control positivo, donde se empleó una cepa con la construcción OmpAmCherry de *C. crescentus*.

La detección de la fusión 2135mCherry, se observa por la señal de la proteína, estimada en un peso de 61.8 kDa, que corresponde con el peso esperado para la fusión 2135mCherry en ambas condiciones, alto y bajo fosfato ([ver figura 24](#)).

La fusión 3658mCherry, con un peso esperado de 66.8 kDa, no se detecta en el análisis de *Western blot* anti mCherry, tanto en el medio M5GG de alto fosfato como en el medio M5GG de bajo fosfato ([ver figura 24](#)), lo que coincide con el resultado visto en las imágenes de microscopía de epifluorescencia ([ver figura 23](#)), sugiriendo que esta proteína no se expresa en estas condiciones de cultivo o bien, que tiene una expresión muy baja para ser detectada por esta técnica.

Junto con ello, se muestra que en el control negativo *CB15N* no se detecta la presencia de la proteína mCherry tanto en la condición de alto como en la condición de bajo fosfato, mientras que en el control positivo (*OmpAmcherry*) se detecta la presencia de una proteína con un peso de 90 kDa que corresponde con el peso esperado para la fusión OmpAmCherry ([ver figura 24](#)).

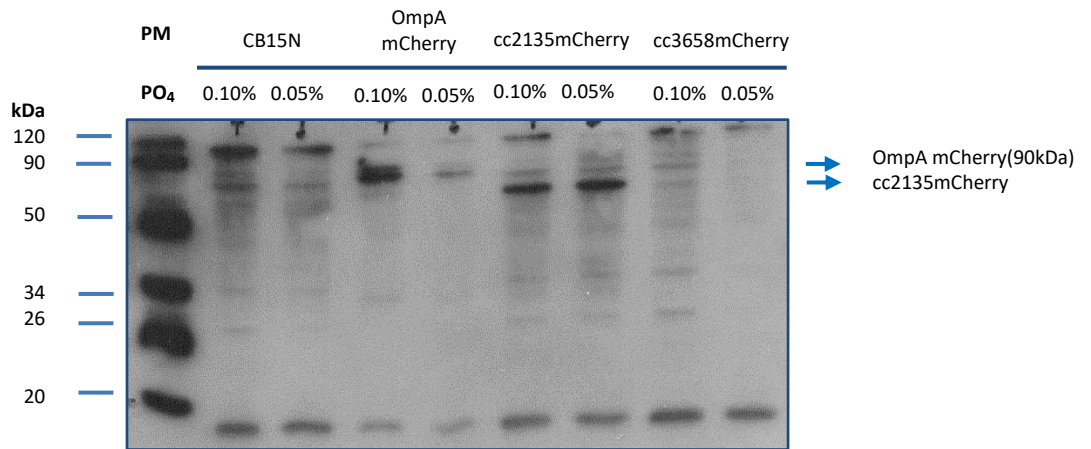


Figura 24. *Western blot* anti mCherry de las proteínas cc2135mCherry y cc3658mCherry. Medio M5GG alto fosfato (0.1%) y bajo fosfato (0.05%) PM: Thermo Scientific Prestained Protein Molecular Weight Marker. Controles negativos: CB15N sin plásmido. Controles positivos: OmpAmCherry. Peso molecular esperado de proteína cc2135mCherry (61.8kDa), proteína cc3658mCherry (66.8kDa) y OmpAmCherry (90kDa).

d) Análisis del número de gránulos por células

Utilizando el programa MicrobeTracker, se determinó a partir de las imágenes de epifluorescencia de la tinción con Azul de Nilo A, el número de gránulos por célula en la cepa silvestre (*CB15N*), la cepa *2135::Ω*, la cepa *3658::Ω*, la cepa *2135mCherry* y la cepa *3658mCherry* en ambas condiciones empleadas, alto fosfato (0.5 mM) y bajo fosfato (10 mM) ([ver figura 25 A-B](#)) (Sliusarenko *et al.*, 2011).

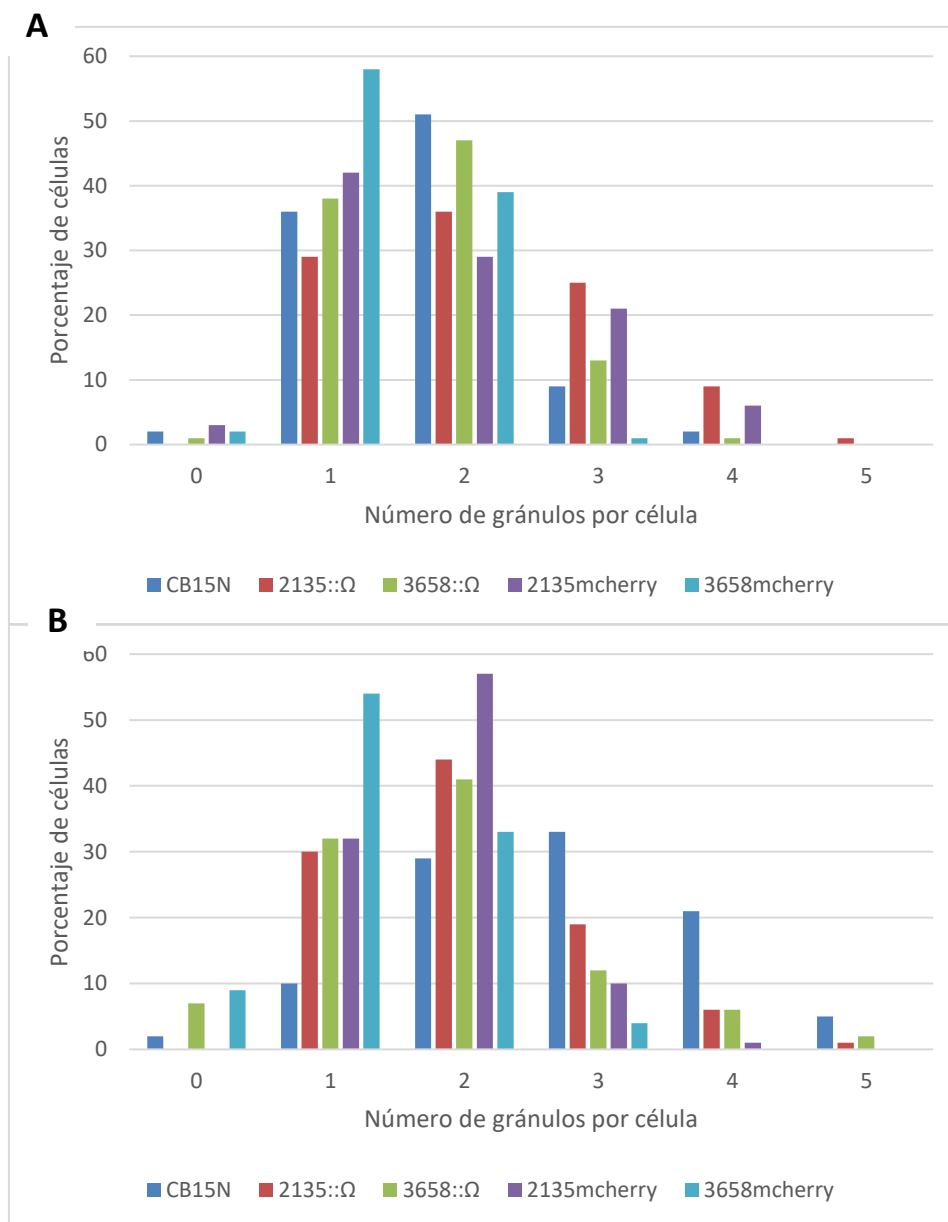


Figura 25. Número de gránulos por célula. **A:** medio M5GG alto fosfato (10 mM). **B:** medio M5GG bajo fosfato (0.5 mM).

En este análisis se observaron diferencias en el número de gránulos de por célula en las distintas cepas, pero no es la distribución, sin embargo, en ningún caso se observó un incremento en el número de células sin gránulos, lo que sugiere que la segregación de los gránulos de PHB ocurre de forma normal en todas las cepas.

También se evaluó el promedio de número de gránulos por célula, para evaluar si existía una diferencia evidente entre ambas condiciones. Como se observa existe una diferencia en el promedio de número de gránulos por célula entre la condición de alto y bajo fosfato ([ver figura 26 A-B](#)).

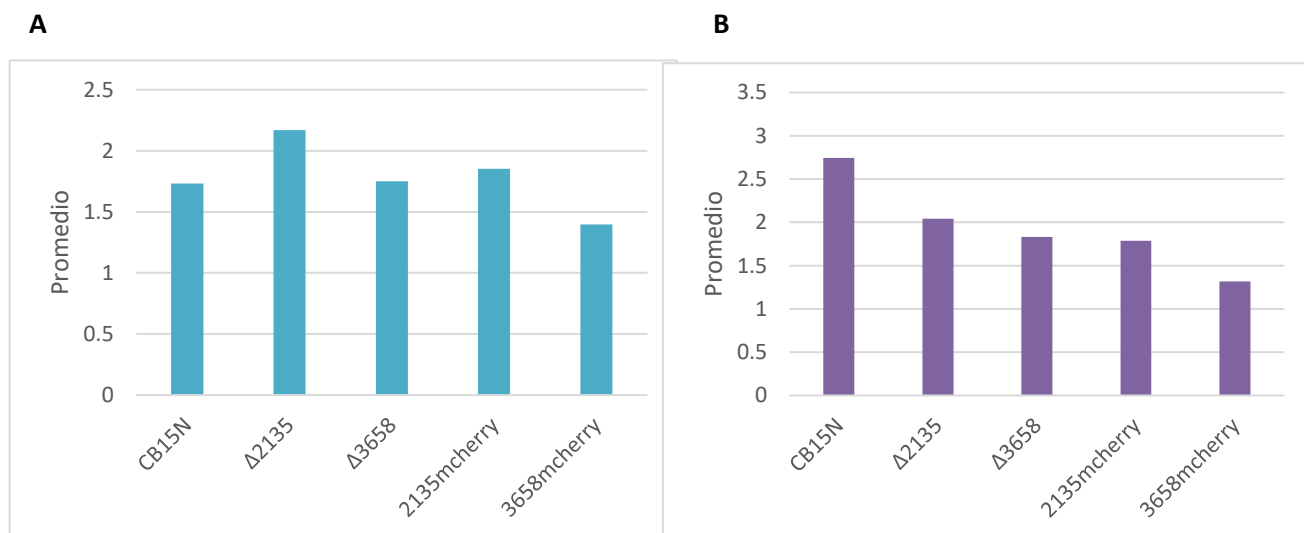


Figura 26. Promedio de gránulos por células. Condición A: medio M5GG alto fosfato (10 mM). Condición B: medio M5GG bajo fosfato (0.5 mM).

III. Secuenciación nucleotídica

Las construcciones realizadas en el presente trabajo fueron verificadas por secuenciación nucleotídica para comprobar la correcta inserción de los fragmentos de DNA de interés a los plásmidos empleados (pNPTS138 y pCHYC2). No se encontraron cambios en la secuencia, lo que corrobora que las construcciones fueron realizadas correctamente.

DISCUSIÓN

La hipótesis del laboratorio propone que existe un proceso de segregación dirigida de los gránulos de PHB, en donde la división celular promueve una distribución equitativa de estas inclusiones entre la célula madre y la célula hija en el modelo bacteriano, *C. crescentus* como ocurre con *R. eutropha* y *P. putida*, proponiendo que los gránulos de PHB interactúan con el nucleoide a través de una proteína con una posible hélice AKP en el carboxilo terminal.

En el trabajo experimental realizado en la presente tesis, se evaluó la participación de las proteínas cc2135 y cc3658 con una región con un alto contenido de alaninas y lisinas encontradas bioinformáticamente, en el proceso de segregación de los gránulos de PHB. Para ello se empleó una estrategia experimental en la que se realizaron mutaciones por sustitución de estos genes, y la fusión carboxilo terminal de estas proteínas con la proteína fluorescente mCherry para identificar su localización *in vivo*.

Los resultados obtenidos en las mutantes por sustitución de las proteínas cc2135 y cc3658, que se observan en las imágenes con tinción Azul de Nilo A (ver figuras [19](#) y figura [20](#)), muestran que todas las células tienen al menos un granulo, lo que sugiere que no existe una deficiencia en el proceso de segregación de los gránulos de PHB, como se demostró en las mutantes de $\Delta phaM$ y $\Delta phaF$ donde se observaron grupos de células que presentan inclusiones, y otros grupos de células que no las presentan (ver [figura8B](#) y [11](#)).

Además de ello, en la misma referencia, no se demostró afectación evidente en el tamaño de los gránulos de PHB (ver figuras [19](#) y [20](#)), como se observó en los artículos de Pfeiffer y Galán, donde al mutar a las proteínas PhaM y PhaF, se muestra una reducción en el tamaño de los gránulos (ver figuras [8B](#) y [11](#)) (Pfeiffer *et al.*, 2011; Galán *et al.*, 2011).

Las mutantes por sustitución realizadas fueron verificadas por secuenciación nucleotídica y por PCR para comprobar los resultados obtenidos ([ver figura 21](#)).

Para corroborar los datos obtenidos de la tinción de los gránulos de PHB, se realizó un análisis cuantitativo para definir el número de gránulos por célula. Estas imágenes se analizaron con el programa MicrobeTracker y posteriormente se realizó un análisis para reconocer si existía alguna diferencia en el número de gránulos por célula con respecto a la cepa silvestre *CB15N*.

Las gráficas de los resultados obtenidos de este análisis muestran que existe una diferencia en el promedio de gránulos, de las cepas mutantes y las cepas fusionadas a mCherry, con respecto a la cepa silvestre, en la condición de bajo fosfato, ya que parecen no responder a esta condición limitante, comportándose de igual manera que en la condición de alto fosfato, al contrario de lo que se observa en la cepa silvestre donde sí existe un aumento esperado en el promedio de gránulos en la condición de bajo fosfato que promueve la síntesis de PHB (ver figura [26 A-B](#)). Esto parece proponer que las cepas mutantes presentan una afectación fisiológica de respuesta al fosfato o en el crecimiento que no se evaluó en el presente trabajo.

Específicamente en las gráficas del número de gránulos por células, puede observarse que sí existe una variación en el número de gránulos por célula con respecto a la cepa silvestre, principalmente en el análisis de la condición de bajo fosfato. Sin embargo, es posible señalar que la distribución de los gránulos prevalece, observando en todos los casos de 1 a 4 gránulos como en la cepa silvestre (ver figura [25 A-B](#)), al contrario de lo que se observaba en el caso de PhaF, donde la distribución de gránulos variaba con respecto a la cepa silvestre ([ver figura 12](#)).

Es de notar, que no se observa un aumento del número de células sin gránulos, que reflejaría una afectación en el proceso de segregación de los gránulos de PHB, como se describió en los artículos de las proteínas PhaM y PhaF, con lo que podemos decir que no son proteínas asociadas al proceso de segregación de los gránulos de PHB (ver figuras [12](#) y [25 A-B](#)) (Pfeiffer *et al.*, 2011; Galán *et al.*, 2011).

En cuanto a las fusiones carboxilo terminal con mCherry de las proteínas cc2135 y cc3658, no se observó una colocación de la epifluorescencia con los gránulos de PHB, lo que muestra que estas proteínas no tienen una interacción directa *in vivo* con los gránulos de PHB (ver figura [22](#) y [23](#)).

La epifluorescencia de la fusión cc2135mCherry sugiere que tiene un patrón de localización periplásmica, a pesar de que de acuerdo con la anotación original del genoma se esperaba que su epifluorescencia fuera citoplásmica ya que no se predecía un péptido señal (ver figuras [16A](#) y [22](#)).

En cuanto al ensayo de *Western blot*, se observa la detección de la proteína cc2135mCherry con un peso molecular de 61.8 kDa ([ver figura 24](#)).

En cuanto a la localización de la fusión carboxilo terminal de la proteína cc3658 con mcherry, no se detectó señal de epifluorescencia en las imágenes ([ver figura 23](#)), ni se observa una detección con el anticuerpo mCherry en el ensayo de *Western blot* ([ver figura 24](#)), lo que propone que esta proteína no se expresa en las condiciones probadas o presenta una expresión muy baja.

El análisis bioinformático realizado previamente en el laboratorio muestra uno de los problemas de las predicciones bioinformáticas, donde estudios *in silico* fallan *in vivo*, al realizarse estrategias experimentales que comprueben dichas aproximaciones.

El trabajo en la presente tesis, como el trabajo experimental, proponen que el proceso de segregación de los gránulos de PHB en *C. crescentus* pudiera estar regulado por una proteína o proteínas que presenten otra característica a la hélice AKP, que permita la interacción entre el gránulo de PHB y el nucleóide.

Una de las condiciones para la selección de las proteínas candidatas fue que no tuvieran una función predicha, esta condición dejó fuera de este estudio a la proteína cc3441 con la mejor hélice AKP predicha, encontrada tanto por medios bioinformáticos como a través de la caracterización proteómica de gránulos de PHB purificados. Dicha proteína tiene un dominio catalítico α/β hidrolasa y está en operón con otras proteínas con funciones relacionadas a la hidrólisis de sustratos, lo que sugería que no estaba involucrada en la segregación de los gránulos de PHB. Una fusión fluorescente de esta proteína mostró una localización membranal, confirmando que esta proteína no se asocia a los gránulos, y que la hélice AKP parece no ser una característica importante para la interacción gránulo-DNA.

Con base en este trabajo, se pueden proponer otras aproximaciones que permitan reconocer a la proteína, o en su caso, proteínas que se encarguen de la segregación de los gránulos de PHB. Para ello se sugiere realizar un ensayo de coinmunoprecipitación, empleando proteínas asociadas al gránulo ya descritas como la PhaC o las fasinias en *C. crescentus*, y analizar aquellas proteínas que interactúen *in vivo* con éstas. Si bien no es el único análisis para reconocer interacciones entre proteínas, consideramos que sería una excelente segunda aproximación para identificar a esta proteína encargada de la interacción gránulo-DNA, y a su vez, permitirnos reconocer las interacciones de manera *in vivo* entre las proteínas asociadas al gránulo, y describir su participación en este modelo bacteriano.

CONCLUSIÓN

El presente trabajo demuestra que las proteínas cc2135 y cc3658 no están relacionadas con el proceso de segregación de los gránulos de PHB en *C. crescentus*, ya que las mutantes de los genes que codifican para estas proteínas no muestran un fenotipo asociado a la segregación de los gránulos, a pesar de su semejanza en la posible hélice AKP presente en las proteínas PhaM y PhaF.

Ambas proteínas no colocalizan con los gránulos, y junto con el análisis del péptido señal, demuestran que no son proteínas asociadas a los gránulos de PHB.

Con base en este resultado negativo, podemos proponer que la segregación de los gránulos de PHB en *C. crescentus* no depende de una proteína con una hélice AKP, y que la proteína encargada de ello debe presentar otras características que permitan la interacción gránulo-DNA. Este resultado hace sentido si se considera que *C. crescentus* es una bacteria adaptada a medios con baja disponibilidad de nutrientes, por lo que es de esperarse que en condiciones naturales de crecimiento no pueda almacenar un compuesto de reserva como el PHB, y que la segregación de éste dependa de un mecanismo más refinado que la simple asociación inespecífica con el nucleóide.

Finalmente podemos descartar esta aproximación bioinformática, y continuar el trabajo empleando otro tipo de estrategias para caracterizar el proceso de segregación de los gránulos de PHB en *C. crescentus*.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anderson, A. and Dawes, E. *Ocurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates*. Microbiol.Rev. 54, 450-472.
2. Blakemore, R. 1975. *Magnetotactic Bacteria*. Science. New Series. 190 (214): 377-379.
3. Boatman, ES. 1964. *Observations on the fine structure of spheroplasts of Rhodospirillum rubrum*. J Cell Biol 20:297–311
4. Bresan, S., Sznajder, A., Hauf, W., Forchhammer, K., Pfeiffer, D. and Jendrossek, D. 2016. *Polyhydroxyalkanoate (PHA) Granules Have no Phospholipids*. Scientific Reports 6:26612.
5. Dawes, E. 1988. Polyhydroxybutyrate: An intriguing biopolymer. Bioscience Reports 8 (6) 537-547;
6. De Koning, G. and Maxwell, I. 1993. *Biosynthesis of poly-(R)-3-hydroxyalkanoate: an emulsion polymerization*. J Environ Polym Degrad 1:223–226
7. Deretic, V. and Knonyecsni, W. 1990. *A procaryotic regulatory factor with a histone H1-like carboxy-terminal domain: clonal variation of repeats within algP, a gene involved in regulation of mucoidy in Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol. 172(10): 5544–5554.
8. Dunlop, W. and Robards, A. 1973. *Ultrastructural Study of Poly-β-Hydroxybutyrate Granules from Bacillus cereus*. Journal of Bacteriology. 3 (114): 1271-1280.
9. England, J., Perchuk, B., Laub, M. and Gober, J. 2010. *Global Regulation of Gene Expression and Cell Differentiation in Caulobacter crescentus in Response to Nutrient Availability*. J Bacteriol. 192(3): 819–833.
10. Evinger, M. and Agabian, N. 1977. *Envelope-associated nucleoid from Caulobacter crescentus stalked and swarmer cells*. J Bacteriol. Oct;132(1):294-301.
11. Franklin, M., Nivens, D., Weadge, J. and Howell, P. 2011. *Biosynthesis of the Pseudomonas aeruginosa Extracellular Polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl*. Front Microbiol. 2: 167.
12. Galán, B., Dinjaski, N., Maestro, B., Eugenio, L.I., Escapa, I. F., Sanz, J. M., García, J.L. and Prieto, M.A. 2011. *Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoates granules in Pseudomonas putida KT2442*. Molecular Microbiology 79(2): 402-418.
13. Gober, J.W. and Marques, M.V. 1995. *Regulation of Cellular Differentiation in Caulobacter crescentus*. Microbiological Reviews 59(1): 31–47.

14. Griebel, R., Smith, Z. and Merrick, J.M. 1968. *Metabolism of poly-beta-hydroxybutyrate. I. Purification, composition, and properties of native poly-beta-hydroxybutyrate granules from Bacillus megaterium*. *Biochemistry* 7: 3676–3681.
15. Han, J., Lu, Q., Zhou, L. Zhou, J. and Xiang, H. *Appl. Environ. Microbiol.* 2007. *Molecular Characterization of the phaECHm Genes, Required for Biosynthesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) in the Extremely Halophilic Archaeon Haloarcula marismortui*. *Microbiol.* 73: 6058–6065.
16. Handrick, R., Reinhardt, S. and Jendrossek, D. 2000. *Mobilization of poly(3-hydroxybutyrate) in Ralstonia eutropha*. *J. Bacteriol.* 182:5916–5918
17. Jendrossek, D. and Handrick, R. 2002. *Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates*. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 403-432.
18. Jendrossek, D., Schirmer, A. and Schlege, H.G. 1996. *Biodegradation of polyhydroxyalkanoic acids*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46: 451-463.
19. Jendrossek, D. 2009. *Polyhydroxyalkanoate Granules Are Complex Subcellular Organelles (Carbonosomes)*. *J. Bacteriol.* 191:3195-3202.
20. Jendrossek, D. and 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.
21. Jendrossek, D., Selchow, O., and Hoppert, M. 2007. *Poly(3-hydroxybutyrate) granules at the early stages of formation are localized close to the cytoplasmic membrane in Caryophanon latum*. *Appl Environ Microbiol* 73: 586–593
22. Jurassek, L. and Marchessault R. 2002. *The role of phasins in the morphogenesis of Poly(3-Hydroxybutyrate) granules*. *Biomacromolecules.* 3:256-261.
23. Kasinky, H., Lewis, J., Dacks, J. and Ausió, J. 2001. *Origin of H1 linker histones*. *The FASEB Journal* 15(1): 34-42
24. Kusaka, S., Abe, H., Lee, S.Y. And Doi, Y. 1997. *Molecular mass of poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] produced in a recombinant Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 47(2):140-3.
25. Lee, S.Y. 1996. *Bacterial polyhydroxyalkanoates*. *Biotechnol. Bioeng.* 49: 1-14.
26. Lesley, J.A. and Shapiro, L. 2008. *SpoT Regulates DnaA Stability and Initiation of DNA Replication in Carbon-Starved Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* 190 (20): 6867-6880

27. Lundgren, D. and Pfister, R. 1964. *Structure of Poly -β-hydroxybutyric Acid Granules*. Gen. Microbiol. 34: 441-446.
28. Madison, L.L. and Huisman, G.W. 1999. *Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic*. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 63: 21–53.
29. Maehara, A., Taguchi, S., Nishiyama, T., Yamane, T. and Doi, Y. 2002. *A Repressor Protein, PhaR, Regulates Polyhydroxyalkanoate (PHA) Synthesis via Its Direct Interaction with PHA*. Journal of Bacteriology, 184(14): 3992–4002.
30. Maestro, B., Galán, B., Alfonso, C., Rivas, G., Prieto, M.A. and Sanz, J.M. 2013. *A New Family of Intrinsically Disordered Proteins: Structural Characterization of the Major Phasin PhaF from Pseudomonas putida KT2440*. PLoS ONE 8(2): e56904.
31. Mayer, F. and Hoppert, M. 1997. *Determination of the thickness of a boundary layer surrounding bacterial PHA inclusion bodies, and implications for models describing the molecular architecture of this layer*. J Basic Microbiol 37:45–52
32. Medvedkin, VN., Permyakov EA, Klimenko LV, Mitin YV, Matsushima, N., Nakayama, S. and Kretsinger, RH. 1995. *Interactions of (Ala*Ala*Lys*Pro)_n and (Lys*Lys*Ser*Pro)_n with DNA. Proposed coiled-coil structure of AlgR3 and AlgP from Pseudomonas aeruginosa*. Protein Eng 8: 63–70.
33. Merrick, J. and Doudoroff, M. 1964. *Depolymerization of poly-beta-hydroxybutyrate by an intracellular enzyme system*. J. Bacteriol. 88: 60-71.
34. Mezzina, MP and Pettinari, M. 2016. *Phasins, the multifacetic polyhydroxyalkanoate granule associated proteins*. Manuscript sin publicar.
35. Mezzina, MP., Wetzler, DE., Catone, MV., Bucci, H., Di Paola, M. and Pettinari, ML. 2014. *A Phasin with Many Faces: Structural Insights on PhaP from Azotobacter sp. FA8*. PLoS ONE 9(7): e103012.
36. Neumann, L., Spinozzi, F., Sinibaldi, R., Rustichelli, F., Pötter, M. and Steinbüchel, A. 2008. *Binding of the Major Phasin, PhaP1, from Ralstonia eutropha H16 to Poly(3-Hydroxybutyrate) Granules*. J Bacteriol. 190:2911-2919.
37. Nishida, H. NS Tokiwa, Y. 1995. *Confirmation of colonization of degrading bacterium strain Sc-17 on poly(3-hydroxybutyrate) cast film*. J. Environ. Polym. Degr. 3: 187-197.

38. Obeso, J., Gómez-Bostrán, J.L., Olivera, E. R. and Luengo, J.M. 2015. *The phasin PhaF controls bacterial shape and size in a network-forming strain in Pseudomonas putida*. Journal of Biotechnology 199: 17-20.
39. Peters, V. and Rehm, B. 2005. *In vivo monitoring of PHA granule formation using GFP-labeled PHA synthase*. FEMS Microbiology Letters 248: 93-100.
40. Pfeifer, F. 2012. *Distribution, formation and regulation of gas vesicles*. Nat Rev Microbiol. 10(10):705-15
41. Pfeiffer, D. and Jendrossek, D. 2014. *PhaM is the physiological activator of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) synthase (PhaC1) in Ralstonia eutropha*. Applied and Environmental Micro. 80: 555-563.
42. Pfeiffer, D., Wahl, A. and Jendrossek, D. 2011. *Identification of a multifunctional protein, PhaM, that determines number, surface to volume ratio, subcellular localization and distribution to daughter cells of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, granules in Ralstonia eutropha H16*. Molecular Microbiology 82: 936-951.
43. Poindexter, J. 1981. *The caulobacters: ubiquitous unusual bacteria*. Microbiol Rev. 45(1): 123–179
44. Poindexter, J. 1964. *Biological Properties and Classification of the Caulobacter Group*. Bacteriol Rev 28: 231–295.
45. Pötter, M. and Steinbüchel, A. 2006. *Biogenesis and Structure of Polyhydroxyalkanoate Granules*. J.M. Shively: Inclusions in Prokaryotes. Springer.
46. Pötter, M., Madkour, M. H., Mayer, F. and Steinbüchel, A. 2002. *Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in Ralstonia eutropha H16*. Microbiology. 148: 2413.
47. Ratledge, C. and Kristiansen, B. 2001. *Basic Biotechnology*. Cambridge: Cambridge University Press.
48. Reusch, R. 1995. *Low molecular weight complexed poly(3-hydroxybutyrate): a dynamic and versatile molecule in vivo*. Can J Microbiol. 41(1):50-4.
49. Rodríguez-Valera, F. and Lillo, J.A.G. 1992. *Halobacteria as producers of polyhydroxyalkanoates*. FEMS Microbiol. Rev. 103:181–186.

50. Salinas, A., 2013. *Dinámica de los gránulos de polihidroxitirato durante el ciclo celular de Caulobacter crescentus* (Tesis de Licenciatura). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
51. Shah, A. Hasan, F., Hameed, A. and Ahmed, S. 2008. *Biological degradation of plastics: A comprehensive review*. Biotechnol. Adv. 26: 246–265.
52. Sliusarenko, O., Heinritz, J., Emonet, T. and Jacobs-Wagner, C. 2011. *High- throughput, subpixel-precision analysis of bacterial morphogenesis and intracellular spatio-temporal dynamics*. Mol. Micro; 80(3): 612:627
53. Spyros, A. and Kimmich, R. 1997. *NMR Imaging study of enzymatic degradation in poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3hydroxyvalerate). Evidence for Preferential degradation of the amorphous phase by P3HB depolymerase B from Pseudomonas lemoignei*. Macromolecules 30: 8218-8225.
54. Steinbüchel, A. and Hofrichter, M. 2001. *Perspectives for Biotechnological Production and Utilization of Biopolymers: Metabolic Engineering of Polyhydroxyalkanoate Biosynthesis Pathways as a Successful Example*. Biopolymers. Wiley-VCH, Weinheim, Germany
55. Steinbüchel, A. and Lütke-Eversloh, T. 2003. *Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms*. Biochem Eng J 16: 81–96.
56. Steinbüchel, A., Hustede, E., Liebergesell, M., Pieper, U., Tim, A. and Valentin, H. 1992. *Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria*. FEMS Microbio. Rev. 9:217-230.
57. Steinbüchel, A., Aerts, K., Liebergesell, M., Wiczorek, M., Babel, W., Föllner, C., Hussein, M., Mayer, F., Pieper-Fürst, U., Pries, A. and Valentin, H. 1995. *Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions*. Can. J. Microbiol. 41(1):94-105.
58. Stubbe, J. and Tian, J. 2003. *Polyhydroxyalkanoate (PHA) homeostasis: the role of PHA synthase*. Nat Prod Rep 20:445-457.
59. Stubbe, J., Tian, J., He, A., Sinskey, A., Lawrence, A., and Liu, P. 2005. *Nontemplate-dependent polymerization processes: polyhydroxyalkanoate synthases as a paradigm*. Annu Rev Biochem 74: 433–480.

60. Thanbichler, M., Iniesta, A., and Shapiro, L. 2007. *A comprehensive set of plasmids for vanillate- and xylose-inducible gene expression in Caulobacter crescentus*. Nucleic Acids Res. Nov; 35(20): e137.
61. Tian, J., Sinskey, J. and Stubbe, J. 2005. *Kinetic Studies of Polyhydroxybutyrate Granule Formation in Wautersia eutropha H16 by Transmission Electron Microscopy*. Journal of Bacteriology 187 (11):3814-3824.
62. Travers, A. 1993. *DNA-Protein Interactions*. Springer, Science+Business Media Dordrecht.
63. Verlinden, R.A., Hill, D.J. Kenward, M.A. Williams, C.D. and Radecka, I. 2007. *Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates*. J. Appl. Microbiol. 102: 1437-1449.
64. Volova, T.G., Zhila, N.O., Shishatskaya, E.I., Mironov, P.V., Vasil'ev, A.D., Sukovatyi, A.G., and Sinskey, A.J. 2013. *The physicochemical properties of polyhydroxyalkanoates with different chemical structures*. Polym Science Ser A 55: 427–437.
65. Wagner, J.K., Setayeshgar, S., Sharon, L.A., Reilly, J. P. and Brun, Y.V. 2006. *A nutrient uptake role for bacterial cell envelope extensions*. Proc. Natl Acad. Sci. USA 103, 11772–11777.
66. Wahl, A., Schuth, N., Pfeiffer, D., Nussberger, S. and Jendrossek, D. 2012. *PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in Ralstonia eutropha*. BMC Microbiology 12:262.
67. York, G., Junker, R., Stubbe, J. and Sinskey, A. 2001. *Accumulation of the PhaP phasin of Ralstonia eutropha is dependent on production of polyhydroxybutyrate in cells*. J Bacteriol. Jul;183(14):4217-26.
68. Zinn, M. and Hany, R. 2005. *Tailored material properties of polyhydroxyalkanoates through biosynthesis and chemical modification*. Adv. Eng. Mater. 7: 408–411.