

## Tesis de Posgrado

# Análisis genético y bioquímico del metabolismo del poli(3-hidroxibutirato) (PHB) en *Bacillus megaterium*

Vazquez, Gustavo

1999

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

**Cita tipo APA:**

Vazquez, Gustavo. (1999). Análisis genético y bioquímico del metabolismo del poli(3-hidroxibutirato) (PHB) en *Bacillus megaterium*. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3219\\_Vazquez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3219_Vazquez.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Vazquez, Gustavo. "Análisis genético y bioquímico del metabolismo del poli(3-hidroxibutirato) (PHB) en *Bacillus megaterium*". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1999.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_3219\\_Vazquez.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3219_Vazquez.pdf)

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**  
**FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**TITULO DE LA TESIS:**

**ANALISIS GENETICO Y BIOQUIMICO DEL  
METABOLISMO DEL  
POLI(3-HIDROXIBUTIRATO) (PHB)  
EN *Bacillus megaterium***

**AUTOR: Gustavo Vazquez**  
**DIRECTORA: Beatriz Méndez**  
**LUGAR DE TRABAJO: Lab. Genética Bacteriana**  
**Dpto de Química Biológica**

**TRABAJO DE INVESTIGACION PARA OPTAR  
PARA EL TITULO DE DOCTOR DE LA U.B.A.**

3210



## Abreviaturas

acetoacetilcoenzima A= acetoacetil-S-CoA

acetilcoenzima A= acetil-S-CoA

acetoacetil-S-CoA transferasa = AA-S-CoA transferasa

ac= ácido

ácido 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzoico)= DTNB

adenosín trifosfato= ATP

ampicilina= Amp

base trizma= Tris

coenzima A= CoA-SH

eritromicina= Er

figura= fig

hélice-vuelta-hélice= H-T-H

isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido= IPTG

kanamicina= Kn

kilodalton=kDa

marcos de lectura abierta= ORF

peso molecular= PM

polihidroxicanoatos= PHAs.

poli(3-hidroxi butirato)= PHB

secuencias activadoras ubicadas río arriba= UASs

sodio dodecil sulfato= SDS

tetraciclina= Tet

tiempo de retención = TR

5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil- $\beta$ -D-Galactopiranosido= X-Gal

## Agradecimientos

Es difícil decir por quien comienza uno a agradecer, por suerte son más las manos que me ayudaron, que las piedras que me pusieron en el camino.....

Ante todo quiero agradecer a mi directora de beca y mentora de esta tesis y de mi carrera de investigación, la doctora Beatriz Méndez, el agradecimiento va más allá de haberme guiado con sapiencia y con muchísimas horas de discusión, va un enorme GRACIAS POR SOPORTARME!!

También quiero agradecer a mis compañeros y amigos de laboratorio, por compartir tantas horas de desorden, discusión, éxitos y fracasos, MUCHISIMAS GRACIAS JULIA, NANCY, MIRTHA, JIMENA, MONICA, DANIEL Y EN LOS ULTIMOS TIEMPOS LUCIANO.

MUCHISIMAS GRACIAS FRANCISCA, por toda la dedicación y empeño en el lavado día a día del material de nuestro laboratorio, también muchísimas gracias Sandra por los litros y litros de medio que preparaste.

No me voy a olvidar de los integrantes de los laboratorios de Virología, Inmunoquímica y Microbiología, muchas gracias a todos, por compartir momentos, opiniones y materiales.

Muchas gracias Laura y Luis, por facilitarme las cosas.

También estoy muy agradecido al Dr. Alexander Steinbüchel y todo su grupo de investigación por hacer de mis pasantías en Alemania uno de los hechos más positivos de mi vida.

Que puedo decir de mis amigos, MUCHISIMAS GRACIAS POR COMPARTIR TODA UNA VIDA DE ESFUERZOS, ALEGRIAS, CAIDAS Y AYUDAS. GRACIAS (por orden absolutamente azaroso) Tincho y Romari, Colo, Alejandra, Fabi, Damián, Fernando, Willy, Lorena, Cristian (x2), Juan, Pepe, Beto, Marcelo (x2), Pablo (x2), Sergio, Philipe y Mónica, Diego, Paco, Gerardo, Karina, Fernanda, Laura, Claudio.

También una gratitud infinita para mis padres, que sin la ayuda de ellos no podría haber llegado hasta aquí

Finalmente, a mi esposa Alicia, gracias por ayudarme y aguantarme en todo el proceso final de mi tesis, PERO SOBRE TODO MUCHISIMAS GRACIAS POR COMPARTIR EL RESTO DE NUESTRAS VIDAS JUNTOS.

*Murió el poeta lejos del hogar  
Que cubre el polvo de un país vecino  
Al alejarse le vieron llorar  
CAMINANTE NO HAY CAMINO  
SE HACE CAMINO AL ANDAR*

*Dedicado a la memoria de mi abuelo Rafael,  
mi abuela Cuchi, mi abuela Aurora y la señora Carmen Castro....todos ellos siempre están  
conmigo.*

## Indice

<b>Resumen.....</b>	<b>6</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>8</b>
<i>Bacillus megaterium</i> .....	8
Los polihidroxicarboxilatos.....	10
Activadores dependientes del factor $\sigma^{54}$ .....	23
<b>Objetivo.....</b>	<b>31</b>
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>32</b>
Tablas de cepas.....	32
Tablas de plásmidos.....	34
Medios de cultivo.....	35
Tabla de antibióticos.....	36
Otros agregados a los medios de cultivo.....	37
Buffers utilizados.....	37
Preparación de los cultivos de <i>B. megaterium</i> .....	42
Análisis de las proteínas asociadas a gránulo.....	43
Cuantificación de PHB.....	45
Coloración para determinar la presencia de inclusiones PHB.....	46
Medición de las diferentes actividades enzimáticas.....	47
Determinación de la concentración de proteínas.....	51
Detección de los ácidos grasos de cadena corta en el sobrenadante de los cultivos.....	52
Manipulación del ADN.....	53
Conjugación.....	60
Mutagénesis con N-metil N'-nitro N-nitrosoguanidina.....	61
<b>Resultados.....</b>	<b>62</b>
Análisis de las proteínas asociadas a gránulos.....	62
Secuenciación del plásmido pBM3.....	69
-Marco de Lectura Nro 2 (ORF2): Posible prot. sensora.....	72
-Marco de Lectura Nro 1 (ORF1): Activador ActBm.....	75
-Marco de Lectura Nro 3 (ORF3): Pbt.....	81
Relación entre el ActBm-Pbt.....	103
<b>Discusión.....</b>	<b>112</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>119</b>

## **RESUMEN DEL TRABAJO REALIZADO**

Las estrategias para poder clonar los genes involucrados en la síntesis, movilización o metabolismo del PHB en otras especies bacterianas abarcan 3 tipos:

- I) Complementación de cepas que no poseen actividad de alguna de las enzimas que intervienen en el camino biosintético del polímero.
- II) Hibridación de ácidos nucleicos utilizando sondas heterólogas de la zona conservada .
- III) Secuenciación directa de las proteínas de gránulo y construcción de sondas homólogas.

Durante el desarrollo de mi tesis de investigación utilicé la estrategia de la secuenciación directa de las proteínas de gránulos. Para lograr esto era necesario saber que tipo de proteínas están asociadas al gránulo y comparar su patrón de corrida en PAGE con los patrones de corrida de otras especies y establecer cual era la probable PHB sintasa. El patrón de proteínas mostró 3 bandas intensas en el gel: una proteína de 22 kDa que cuyo extremo aminoterminal ya había sido secuenciado (Steinbüchel, dato no publicado). Esta sería la proteína estructural de gránulo (fasina); las otras dos bandas son de proteínas de 40 kDa y 43 kDa. En cambio la proteína de 40 kDa, sería la PHB sintasa, debido a que se encuentra en gran cantidad el momento de recolección de las bacterias para analizar su patrón de proteínas, fue el de mayor acumulación de PHB. Por lo tanto procedí y logré el secuenciamiento del extremo aminoterminal de dicha proteína.

Con las secuencias de las proteínas de 22 kDa y 40 kDa, diseñé dos sondas y con ellas realicé estudios de Southern tanto sobre ADN genómico como sobre plásmidos que contienen genes clonados de *B. megaterium* que intervienen en el metabolismo del PHB. Con estos experimentos se detectó un segmento de ADN cromosómico de *B. megaterium* que hibridaba con la sonda de fasina. Cuando se secuenció este fragmento se descubrió que contiene 3 genes que estuvieron involucrados en la transactivación de la Tiolasa II de *E. coli*.

Dos de dichos genes mostraron, por comparación con secuencias proteínas y secuencias de ADN de los bancos de datos, que tenían una gran homología con un par de proteínas sensor-activador involucradas en la regulación del operón *ato* de *E. coli* mediada por

el complejo  $\sigma^{54}$  holoenzima RNA polimerasa. También mostraron una gran homología con otro activador de *B. subtilis* dependiente de  $\sigma^{54}$ . El tercer gen mostraba homología con el gen *pbt* que codifica para la enzima Fosfobutiril transferasa (Pbt) en *C. acetobutylicum*. Los análisis de la actividad enzimática de esta posible enzima Pbt de *B. megaterium* mostraron un patrón de expresión complejo:

- 1) Sufre represión catabólica
- 2) Su pico de expresión se encuentra en el principio de la fase estacionaria
- 3) Se aumenta la expresión de este gen por la presencia de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina.

Finalmente, mediante experimentos de expresión en *E. coli*, tanto de la enzima Pbt como del activador dependiente de  $\sigma^{54}$  clonados de *B. megaterium*, corroboré que dicho activador está involucrado en la transcripción del gen *pbt*



# INTRODUCCION

## ❖ *Bacillus megaterium*

*Bacillus megaterium* es una de las especies de *Bacillus* de mayor tamaño (su nombre deriva del griego megatherium que significa “gran bestia”), alcanza entre 1,5 y 3  $\mu\text{m}$  de diámetro y hasta 5  $\mu\text{m}$  de longitud (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology). Fue descrita por primera vez por DeBary (1884) y se puede encontrar esta especie en los suelos, agua de mar y sus sedimentos, cáscaras de arroz, alimentos secos y leche, a lo largo de todas las latitudes del planeta.

Esta bacteria es muy versátil debido a que, sumado a su arsenal de enzimas usuales para todos los microorganismos Gram positivos, posee otros tipos de enzimas infrecuentes para su género; esto le brinda una gran plasticidad metabólica, que se traduce en una notable facultad de supervivencia en diversos medios y nichos ecológicos. Su capacidad para metabolizar diferentes compuestos rivaliza con el género *Pseudomonas*. (Vary, 1992).

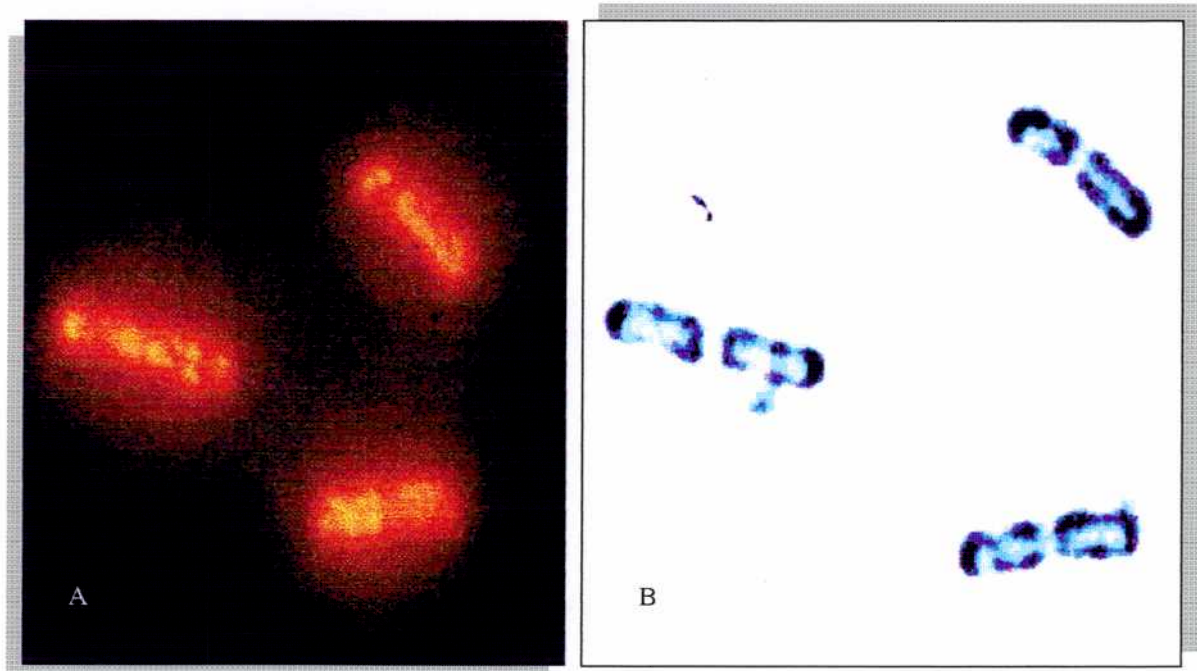
Ha sido clasificada como una bacteria esporulante aeróbica estricta, ubicada filogenéticamente a la misma distancia tanto de *Bacillus subtilis* como de *Bacillus cereus*. (Priest *et al* 1988).

Desde hace largo tiempo se viene utilizando *B. megaterium* en varios procesos industriales porque crece en medios muy simples y económicos, puede ser fácilmente mutageneizado para incrementar su producción, no es patógeno y tiene sistemas de excreción muy eficientes. Este microorganismo es utilizado para la producción de varias enzimas y productos químicos, como amilasas, penicilina amidasa y glucosa dehidrogenasa, vitamina B<sub>12</sub>.

El compuesto de reserva más importante en esta especie es el poli(3-hidroxi-butarato) (PHB), que se acumula en condiciones limitantes de nitrógeno, fosfatos, azufre o potasio. (Slepecky, 1961).

En los últimos años se han desarrollado mucho los métodos genéticos que permiten realizar manipulaciones en este microorganismo; aunque si bien *B. megaterium* no posee un estado de competencia natural, se le puede introducir una gran variedad de plásmidos mediante transformación de protoplastos o por conjugación. Una vez introducidos los plásmidos son muy estables, a lo que se agrega el hecho de que las proteínas foráneas no son degradadas, porque este microorganismo no posee proteasas alcalinas extracelulares y las proteasas neutras intracelulares no son capaces de reconocerlas (Chopra *et al*, 1986). Se ha aislado el fago MP13 capaz de infectar a *B. megaterium* en forma específica, por esto se lo utiliza para realizar transducciones generalizadas y también se lo ha empleado en el mapeo del genoma de este microorganismo. (Vary *et al*, 1982). Finalmente, existe el transposón Tn917, originario de *Streptococcus faecalis*, que se transpone al azar en el genoma de *B. megaterium*, sin presentar ningún sitio preferencial, como es el caso de *Bacillus subtilis* para el locus *glt* (Bohall, 1986).

**Figura A:** vista del microorganismo *B. megaterium* al microscopio óptico 1000x



a) tinción con Azul de Nilo vista a  $\lambda$  460nm b) vista a la luz visible



## ❖ **LOS POLIHIDROXIALCANOATOS**

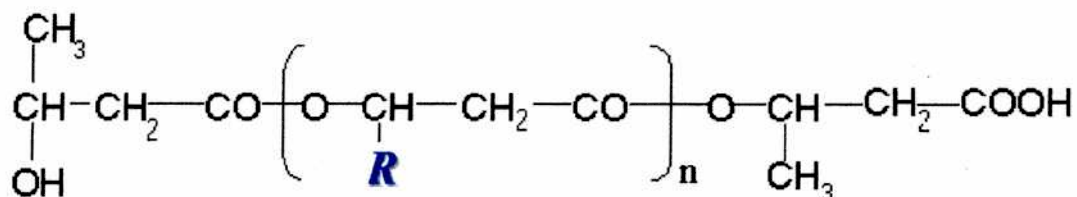
### ❖ *Características generales*

Los animales y plantas poseen sustancias de reserva de distinta naturaleza química que los proveen de materia y energía para la realización de numerosas funciones, este tipo de reservas también existen en los microorganismos y los proveen endógenamente de energía y carbono para procesos específicos como el mantenimiento del pH interno, regulación osmótica y esporulación (Dawes y Senior, 1973, Anderson y Dawes, 1990). Una forma de acumulación intracelular de sustancias de reserva entre muchos géneros bacterianos de los más diversos tipos, es la formación de polímeros compuesto de unidades de hidroxiacidos: los **POLIHIDROXIALCANOATOS** (PHAs) (**Figura B**). En la mayoría de las especies bacterianas los PHAs están localizados en gránulos intracelulares que se pueden visualizar al microscopio óptico por tinción con los colorantes específicos Negro Sudán (Smibert y Krieg, 1981) y Azul del Nilo (Ostle y Holt, 1982).

Hasta el presente se han descrito como constituyentes de los PHA a casi 91 diferentes tipos de hidroxiacidos (HA) provenientes de los diversos microorganismos productores de PHAs. Estos constituyentes incluyen los siguientes tipos de compuestos:

- ✓ El rango completo de 3-hidroxiacidos (3-HA) desde el que contiene un esqueleto de 3 carbonos hasta el de 16 carbonos.
- ✓ 3-HA con una o dos insaturaciones en variadas posiciones de la cadena R.
- ✓ 3-HA con grupos metilo en variadas posiciones de la cadena R
- ✓ Compuestos que no son 3-HA, sino que el grupo oxidrilo esta en otra posición.
- ✓ 3-HA con varios grupos funcionales distintos (incluyendo otros grupos carboxilos) en su cadena R
- ✓ HA con modificaciones no solo en su cadena R, sino también en lo que se considera el esqueleto del compuesto. (Steinbüchel y Valentin, 1995)

**Figura B:** Fórmula general de los PHA



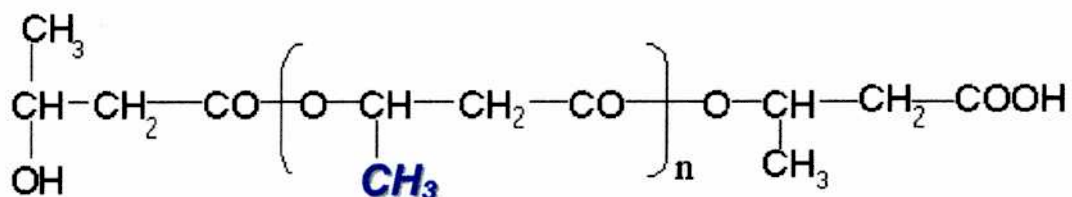
Esta enorme diversidad de componentes del biopolímero, refleja dos aspectos de las especies bacterianas productoras de PHAs:

- ✓ la fuente de carbono del tipo de nicho ecológico de donde se aisló
- ✓ el tipo de metabolismo que predomina en el microorganismo.

Además, en cualquier habitat con alta concentración de fuente de carbono siempre va a haber una proporción de flora microbiana que acumule algún tipo de PHA.

El más estudiado y extendido de los PHAs es el **POLI-3-HIDROXIBUTIRATO**, que se encuentra en diversos microorganismos como un homopolímero lineal de D(-)-3-hidroxitirato, cuya fórmula se muestra a continuación (**Figura C**)

**Figura C:** Fórmula del PHB





El PHB fue detectado y caracterizado por primera vez en *Bacillus megaterium* por Lemoigne en 1925. Desde entonces se lo ha encontrado en distintas especies de varios géneros bacterianos, entre los que se encuentran *Azotobacter*, *Bacillus*, *Alcaligenes*, *Rhodococcus* y *Pseudomonas* (Steinbüchel, 1991).

#### ❖ *Propiedades Termoplásticas de los PHAs*

En occidente, el 7% de las reservas de carbono fósiles son utilizadas por la industria química. Una fracción importante de dichas reservas es utilizada para la fabricación de plásticos y polímeros. En la actualidad, han surgido serios problemas por el uso indiscriminado de estos productos sintéticos, ya que una vez descartados luego de su uso intensivo o no, persisten en el ambiente por largos períodos de tiempo, con el consiguiente impacto negativo en el tratamiento de basura que esto implica. Además, los materiales plásticos desechados en forma impropia son una fuente muy grande de contaminación ambiental y destrucción de vida silvestre.

Por estas razones es tan importante el reemplazo de estos polímeros no degradables, por algún tipo de "plástico biodegradable", sobre todo para aquéllos que se usan una sola vez y luego se descartan o los que son utilizados para el empaquetamiento de productos.

Las propiedades, termoplásticas de los PHA son conocidas desde principio de los años 60. Dependiendo de la composición del polímero, estas propiedades pueden variar desde ser un plástico duro y quebradizo hasta ser uno totalmente elástico. La ventaja que tienen estos materiales con respecto de los plásticos derivados del petróleo, es que se pueden producir a partir de sustratos renovables y *por ende pueden ser completamente degradado por bacterias, hongos y algas*, o sea se pueden utilizar como plástico **BIODEGRADABLE**. Entonces, son estos polímeros bacterianos uno de los materiales que podrían ser utilizados en el futuro para la fabricación de envases y membranas para reemplazar a los plásticos utilizados hasta ahora.

El PHB tiene algunas características físicas (como el punto de fusión y su cristalinidad) similares al polipropileno. Pero a pesar de que puede ser moldeable por calor, la fragilidad y durabilidad de este material hace que se limite su empleo a la fabricación de algunas mercancías.

En cambio, el copolímero poli[(3-hidroxi-butirato)-co-(3-hidroxi-valerato)] tiene un punto de fusión menor y además es más flexible que el homopolímero de PHB. De hecho, este copolímero fue producido por proceso fermentativo a escala industrial bajo el nombre comercial Biopol y se utilizó para la fabricación de películas y envases de plástico biodegradable. Pero el alto costo del proceso fermentativo implicado en su producción, hace que todavía no pueda utilizarse en gran escala. La relación de precios entre ambos tipos de polímeros, en este momento, oscila entre 5 y 15 veces más caro el plástico biodegradable que el derivado del petróleo. (Somerville *et al*, 1995).

Sin embargo la alternativa más próxima, por ahora, es utilizar estos polímeros en la medicina, para la fabricación de cápsulas para la liberación controlada de drogas, suturas quirúrgicas, vendajes, lubricantes para guantes de cirugía y hasta piel artificial o también podrían utilizarse en la agricultura para la liberación lenta de fertilizantes o agroquímicos. O sea, se podría utilizar este plástico en la aplicación de productos de alto valor agregado, en donde su precio no influya tanto en el costo final. (Malm *et al* 1992)

#### ❖ *Condiciones en las que se produce la acumulación del polímero*

El PHB, así como la mayoría de los PHAs, se sintetiza y acumula en las células cuando el crecimiento del microorganismo se ve restringido por la limitación de algún/os nutriente/s esencial/es como nitrógeno, sulfato, fósforo, hierro, magnesio o potasio pero a su vez están en un medio con exceso de fuente de carbono. En muchas bacterias, la síntesis de PHB también se inicia debido a una limitada disponibilidad de oxígeno.

Si las condiciones ambientales cambian, permitiendo nuevamente el crecimiento bacteriano, o si la fuente de carbono externa se agota, los poliésteres se movilizan, proveyendo a la célula de carbono y energía. Con esto se aumenta la sobrevivencia en condiciones extremas para numerosas especies bacterianas (López *et al*, 1995), pero además, el biopolímero provee energía para el proceso de esporulación en *Bacillus* (Slepecky, 1961) y para la formación de cistos en *Azotobacter* (Lemoigne y Girard, 1943).

### ❖ *Caminos biosintéticos de PHAs en diferentes microorganismos*

La síntesis y degradación de PHB han sido estudiadas bioquímicamente en varios microorganismos, siendo primero y más profundamente analizado en *Ralstonia eutropha*. En esta especie bacteriana, la biosíntesis de PHB consta de tres pasos:

- ✓ En el primero, una  $\beta$ -cetotiolasa biosintética produce la condensación de 2 moléculas de acetil-CoA formando acetoacetil-CoA (gen *phaA*).
- ✓ Luego una acetoacetil-CoA reductasa (gen *phaB*) NADPH dependiente reduce de manera estereoespecífica al compuesto anterior, produciendo D(-)-3-hidroxiacetil-CoA.
- ✓ El último paso es la polimerización producida por una PHB sintasa (gen *phaC*), que transfiere el grupo acilo a un “primer” del polímero (Oeding y Schlegel, 1973).

Esta ruta metabólica también se encontró en *Azotobacter beijerinckii* y *Zooglea ramigera*, y es la más extendida entre los microorganismos estudiados.

En *Rhodospirillum rubrum* el camino biosintético tiene cinco pasos (Moskowitz y Merrick, 1969). El acetoacetil-CoA formado por acción de la  $\beta$ -cetotiolasa es reducido por una reductasa NADH dependiente a L(+)-3-hidroxiacetil-CoA, que se transforma en su enantiómero, sustrato de la polimerasa, por acción de dos enoil-CoA hidratasas.

Otro camino biosintético es el que realiza *Pseudomonas oleovorans* y otras *Pseudomonas* que pertenecen al grupo I de homología de rRNA. Estas especies producen PHAs de cadena media y larga cuando se las cultiva en un medio con alcanos, alcoholes o ácidos alcanóicos como fuente de carbono. (Brand *et al*, 1988). Es probable que en estas especies bacterianas, los productos intermedios de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos se deriven hacia la biosíntesis de PHA.

*Pseudomonas aeruginosa* y otras *Pseudomonas* del grupo I, pero no *P. oleovorans* sintetizan PHAs de cadena media a partir de sustratos simples como glucosa o gluconato (Timm y Steinbüchel, 1990). En este caso, los sustratos (3-hidroxiacil-CoA de cadena media) los obtiene, de una ruta diferente que la de *P. oleovorans*. El proceso de acumulación de PHA fue estudiado en la bacteria *Pseudomonas putida*, y se demostró que creciendo a este microorganismo en medio mínimo con gluconato como fuente de carbono,

los 3-hidroxiacanoatos-S-CoA provienen, preferentemente, de los intermediarios 3-hidroxiacil-ACP que se generan en la síntesis de novo de los ácidos grasos. Se vio que una enzima cataliza la transferencia de un grupo CoASH a los 3 hidroxiacil-ACP de cadena media, convirtiéndolos en 3-Hidroxiacil-S-CoA. Esta proteína fue clonada por Rehm *et al*, (1998) y es codificada por el gen *phaG*.

#### ❖ **Organización genética de los genes PHA en varias especies bacterianas**

Si bien las características principales de los caminos biosintéticos de los polihidroxiacanoatos en distintas especies bacterianas son conocidos desde 1960, las primeras publicaciones sobre la organización genética de los mismos se iniciaron a finales de la década de los 80. (Schubert *et al*, 1988; Slater *et al*, 1988; Peoples y Sinskey, 1989a).

En *R. eutropha*, los genes estructurales que codifican para las tres enzimas intervinientes en el camino biosintético de PHB están ubicadas en un operón, con un promotor dependiente de  $\sigma^{70}$ , y en donde el orden de los genes es *phbC*, *phbA* y *phbB*, respectivamente. (Schubert *et al*, 1991)

Estos genes se transfirieron a *E. coli* y a varias especies de *Pseudomonas*, donde se obtuvo la expresión de los mismos y la síntesis de PHB. (Janes *et al* 1990, Timm y Steinbüchel, 1990, Steinbüchel y Schubert 1989).

En *P. oleovorans* y *P. aeruginosa*, se clonaron tres marcos de lectura abierta (ORF) en un fragmento de ADN que complementaba una mutante de *P. putida* defectiva en la síntesis de PHA. Dos de ellos presentan un alto porcentaje de identidad en sus secuencias aminoacídicas con la PHA sintasa de *R. eutropha*. En ambas especies se encontró otro marco de lectura abierta, intercalado entre los anteriores, que probablemente codifique para una PHB depolimerasa (Huisman *et al*, 1991; Timm y Steinbüchel, 1990).

En *Chromatium vinosum* se han identificado genes que codifican para las distintas enzimas involucradas en el metabolismo de PHA. En esta especie se ha descrito un nuevo gen involucrado en la biosíntesis de PHB, el gen *phbE*, cuyo producto se requiere para la actividad enzimática de la PHA sintasa. (Liebergesell *et al*, 1993a). También en *Thiocystis violacea* se ha clonado la región PHA, donde se encontraron cinco ORFs, entre los cuales se



encuentran los genes que codifican para una  $\beta$ -cetotiolasa y una sintasa, y un gen que presenta gran homología con el gen *phbE* de *Chromatium vinosum* (Liebergesell *et al*, 1993b). Para estos dos casos, las sintasas de estos microorganismos tienen un peso molecular un 35 a 40% menor, con respecto a las de otras especies estudiadas.

Hasta el momento, se llevan clonadas unas 30 regiones involucradas en la síntesis de PHAs pertenecientes a la más variada diversidad de microorganismos. Cada caso muestra siempre alguna particularidad, ya que la secuenciación de todos estos clusters de genes PHA mostró, junto a los genes estructurales de la sintasa, diversos marcos de lectura abierta, siendo desconocidas las funciones que codifican (Steinbüchel y Valentin, 1995).

Lo señalado anteriormente en cuanto al número de genes codificantes de la actividad sintasa y su organización da evidencias de un sistema complejo y de interacciones múltiples entre las distintas proteínas, los sustratos y los gránulos.

#### ❖ *Proteínas asociadas a los gránulos*

Como ya fue mencionado anteriormente, los PHAs se acumulan en gránulos intracelulares que poseen una morfología particular debido a los componentes que lo forman, uno de estos componentes son las proteínas, que se pueden clasificar del siguiente modo, de acuerdo a su función en la estructura del gránulo:

- **PHA Sintasas:** esta proteína se la ve asociada al gránulo desde el momento en que comienza la síntesis del polímero y está demostrado por técnicas de microscopia inmunoelectrónica (empleando el marcado de proteínas por anticuerpos específicos cargados con partículas de oro) que continúan asociadas a los mismos durante todo el proceso de acumulación del PHB. (Gerngross *et al*, 1993).

La comparación de las estructuras primarias de todas las diferentes sintasas clonadas, mostró un alto grado de homología sólo en la parte central de la proteína.

El mecanismo de reacción propuesto para la acción de la polimerasa asume la existencia de grupos tiol activos y una reacción de polimerización que ocurre en dos pasos con un intermediario acil-S-enzima que transfiere el grupo acilo a un primer del

polímero (Griebel y Merrick, 1971). Pero de la comparación de las secuencias proteicas, surge que hay solo un residuo de cisteína que esta conservado entre las sintasas. En el caso de la enzima de *R. eutropha* este aminoácido se encuentra en la posición 319 y fue confirmado que era importante en la actividad de polimerización por mutaciones dirigidas sobre el codón correspondiente a esta cisteína. (Steinbüchel *et al*, 1992). El otro grupo -SH podría estar provisto por una pantoteína, que se agrega a la proteína por una posible modificación post-traducciona. (Gerngross *et al*, 1994). Como ya fue visto, hay diferentes tipos de PHAs de acuerdo a la longitud de cadena del monómero del hidroxialcanoato constituyente, que puede variar entre 3 y 16 C. Por lo tanto, la especificidad de sustrato de la enzima PHB sintasa varía con el tamaño de la cadena carbonada del hidroxiaácido. En general, aquellas enzimas que polimerizan compuestos de pocos carbonos, no son capaces de usar sustratos más grandes y viceversa. También se pueden encontrar proteínas sintasas de dos diferentes tamaños, por ej. la PHA sintasa de *R. eutropha* tiene un peso molecular (PM) cercano a los 66 kDa, mientras que la PHA sintasa de *Chromatium vinosum* tiene un PM cercano a los 40 kDa. Por esto se clasificaron a las sintasas de acuerdo al tamaño del 3-Hidroxiaácido con el que puede reaccionar y el tamaño de la proteína:

- ♣ **PHA-sintasas de clase I:** utilizan como sustratos hidroxialcanoatos de cadena corta entre 3 y 5 C de longitud y son proteínas de PM cercano a los 66 kDa Ej. PhaC *R. eutropha*
- ♣ **PHA-sintasas de clase II:** utilizan como sustratos hidroxialcanoatos de cadena media y larga entre 6 y 16 C de longitud y son proteínas de PM cercano a los 66 kDa Ej. PhaC género *Pseudomonas*
- ♣ **PHA-sintasas de clase III:** utilizan como sustratos hidroxialcanoatos de cadena corta y son proteínas de PM cercano a los 40 kDa. En general requieren de otro factor necesario para su actividad biológica. Ej. PhaC de *C. vinosum*. (Steinbüchel y Fuchtenbrusch, 1998)

- **PHA depolimerasas:** estas enzimas están encargadas de la reutilización o movilización del poliéster acumulado dentro de las células, cuando las condiciones ambientales así lo requieran.

Las depolimerasas y otras proteínas requeridas para la depolimerización del PHA fueron encontradas asociadas a gránulos en *R. eutropha*, *R. rubrum* y *Zooglea ramigera* cuando estos microorganismos fueron crecidos en condiciones de movilización de PHA. Pero hasta el momento solo se pudo clonar la enzima depolimerasa de *P. aeruginosa* y (Timm y Steinbüchel, 1992) y *P. oleovorans* (Huisman *et al*, 1991).

Se conoce mucho más sobre las depolimerasas extracelulares o sea las que hidrolizan PHAs de otras bacterias, porque hay más genes clonados de esta clase de proteínas. La comparación entre estas depolimerasas extracelulares y las clonadas del género *Pseudomonas*, no mostró ningún tipo de homología, excepto por la presencia en ambos tipos de la lipasa-Box característico de todas las esterasas y lipasas. (Steinbüchel *et al*, 1992)

- **Fasinas:** son las proteínas mayoritarias asociadas al gránulo y se especula que cumplen, junto con una monocapa de fosfolípidos que rodean al gránulo, una función estructural para el mismo. Esta estructura serviría para que los gránulos puedan separarse dentro de las células de forma que evitan la coalescencia de todos ellos debido a su alta hidrofobicidad y por ende la formación de una gran inclusión de PHA. El nombre de fasina deriva de otra familia de proteínas, **las oleosinas**, que cumplen funciones similares de ordenación estructural en las inclusiones de triacil glicerol dentro de las semillas y polen de las plantas.

Pero las fasinas no solo cumplen un rol estructural similar a las oleosinas sino que además tienen una estructura primaria muy similar con respecto a ellas. En el caso de las oleosinas, tienen un dominio central altamente hidrofóbico rodeado por dominios carboxilo y amino terminales anfipáticos. Para las fasinas, este dominio altamente hidrofóbico, en general, se encuentra en el extremo carboxilo-terminal, mientras que el dominio anfipático se encuentra en el extremo amino-terminal.

Otra característica similar entre ambas familias de proteínas, es que en general contribuyen en una alta proporción a la cantidad total de proteína celular al momento de acumulación máxima del compuesto de reserva.

Más allá del dominio hidrofóbico, las diferentes fasinas clonadas no poseen homología similar entre sí, pero en general, a los genes de estas proteínas se los puede encontrar en la misma región genética que a la PHB sintasa. (Steinbüchel *et al*, 1995)

#### ❖ **Regulación metabólica de la síntesis de PHA**

En condiciones de crecimiento bacteriano no restringido, con oxígeno en exceso, la concentración de CoA-SH es alta y la de acetil-CoA baja debido a la actividad de la Citrato sintetasa, que libera CoA-SH y utiliza los grupos acetilo para formar citrato. Por ende, en este contexto metabólico, la actividad de la  $\beta$ -cetotiolasa (primera enzima en la síntesis del PHB) es inhibida por CoA-SH, y por lo tanto no comienza la acumulación del biopolímero. Por esto, en la mayoría de los microorganismos, la regulación metabólica del PHB se produce a nivel de disponibilidad de sustrato (acetil CoA-SH) y a nivel enzimático ( $\beta$ -cetotiolasa). (Senior y Dawes, 1973)

En *Azotobacter beijerinckii* se demostró que el factor iniciador de la acumulación de PHB, en células crecidas en exceso de glucosa fijando nitrógeno atmosférico, es la limitación de oxígeno. Se observó que era común la inhibición por NAD(P)H<sub>2</sub> en varias enzimas involucradas en reacciones de oxido-reducción del metabolismo de la glucosa, en particular dos enzimas intervinientes en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, citrato sintetasa, inhibida por NADH<sub>2</sub>, e isocitrato dehidrogenasa, inhibida por NADH<sub>2</sub> y NADPH<sub>2</sub>.

Cuando la bacteria se halla en condiciones de oxígeno limitante, disminuye la velocidad de oxidación de NADPH<sub>2</sub>, produciéndose entonces, la acumulación de este compuesto. Esto inhibe las enzimas del ciclo de Krebs, por lo que el acetil-CoA se acumula, pudiendo entonces ser utilizado en la biosíntesis de PHB.

De esta manera las células se adaptan a las condiciones ambientales, reoxidando el exceso de poder reductor en el proceso de síntesis de PHB. En este caso, el PHB se comportaría como un "reservorio de electrones". (Senior *et al*, 1972)



### ❖ *Otros tipos de regulación del metabolismo del PHB*

Si bien se ha demostrado que las tres enzimas involucradas en la biosíntesis de PHB en *R. eutropha* se expresan en forma constitutiva (Haywood *et al*, 1988 a y b), se realizaron estudios sobre la regulación genética de factores que pueden estar involucrados en el metabolismo del PHB en este microorganismo, los estudios más exhaustivos provienen de los trabajos de Pries *et al* (1991, 1992), sobre mutantes PHB de *R. eutropha* por inserción del transposón Tn5, que se denominan "leaky", porque acumulan PHB en menor proporción que la bacteria salvaje.

El análisis de estas mutantes mostró 3 clases diferentes:

- ✓ **1ra clase:** la inserción del transposón afectó a dos genes con homología significativa con genes del sistema de transporte de fosfoenolpiruvato de las enterobacterias. Probablemente fuesen responsables de este fenotipo "leaky" debido a un efecto regulador sobre la concentración extracelular de carbono.
- ✓ **2da clase:** la inserción del transposón afectó al gen estructural de la dihidropoliámida dehidrogenasa, que se encuentra río abajo de los otros genes que forman el complejo multienzimático de la piruvato dehidrogenasa. Esto probablemente provoque que estas mutantes tengan una menor disponibilidad de acetil-Coenzima A, necesaria para la síntesis del biopolímero.
- ✓ **3ra clase:** la inserción del transposón afectó a la proteína estructural de gránulo (fasina), la presencia de esta proteína hace que los gránulos estén más compactados porque estabiliza a la inclusión de PHA en el contexto hidrofílico del medio intracelular, evitando así la fusión de todos los gránulos entre sí. El hecho de que acumule menor cantidad de PHA este tipo de mutantes puede ser por que la PHB-sintasa requiera de la interacción con la fasina para que logre la máxima actividad o por el hecho de tener estas mutantes una menor superficie de gránulo, ya que en lugar de tener varios gránulos dispersos por el

citoplasma, posee un solo gran cuerpo de inclusión donde se acumula el PHA. (Wieczoreck *et al*, 1995).

En nuestro laboratorio se aisló una mutante leaky de *B. megaterium* para la acumulación de PHB. Esta mutante se obtuvo por inserción del transposón Tn917. (Pettinari y Méndez, 1990) Esta mutante, no acumula PHB en la misma proporción que la cepa salvaje.

En la cianobacteria *Synechococcus* sp, se estableció que la actividad de la PHB sintasa está controlada a nivel postranscripcional por la concentración de acetil-P. Este es un compuesto de alta energía, que se ha descrito como posible molécula de señal intracelular cuando cede su fosfato a proteínas que intervienen en varias cadenas de fosforilación. Actuaría como una quinasa y se cree que posiblemente cause algunos tipos de cross talk en varios procesos de transducción de señales, vía los pares de proteínas sensor-regulador. En el caso de *Synechococcus*, la actividad de la PHB sintasa depende del equilibrio C/N, si la relación está desbalanceada hacia el exceso de carbono, entonces se activan los genes encargados de formar el acetil fosfato (a partir de acetil-S-CoA) y cuando este compuesto llega a una determinada concentración umbral, es capaz de fosforilar a la PHB sintasa activándola. (Myake *et al*, 1997).

Finalmente, también se han encontrado regulaciones genéticas de la síntesis de PHAs. En *Acinetobacter* sp se vio que la expresión de los genes PHA era regulada a nivel transcripcional por la concentración de fosfatos (Schembri *et al*, 1995). En *Pseudomonas oleovorans* se encontró que el gen *phaF* regula genéticamente la expresión del gen *phaC1* de acuerdo al sustrato carbonado, además de ser una posible fosfina. Se demostró por medio de fusiones *lac* que la expresión del gen *phaC1* depende de la fuente de carbono, siendo más eficiente cuando la bacteria crece en ácido octanoico que cuando se la crece en glucosa o ácido cítrico, sustancias con las cuales se reprime la expresión de dicho gen. (Prieto *et al*, 1999).

Por otra parte también se demostró que en *Pseudomonas aeruginosa* la producción de PHA a partir de octanoato depende de que el gen correspondiente al factor de transcripción  $\sigma^{54}$  este intacto. (Huisman *et al*, 1992)

En *Bacillus megaterium*, si bien los genes *phb* están bajo control de un promotor  $\sigma^{70}$ , por medio proteínas de fusión tanto entre la Green Fluorescent Protein (GFP) y la PHB sintasa o

entre la GFP y la Fasina, se estableció que la expresión de dichos genes sigue un patrón particular y no resultan ser constitutivas. (McCool y Cannon, 1999)

Todos estos estudios nos demuestran que puede haber variaciones con respecto al modelo común establecido sobre la regulación del metabolismo de los PHA. Estas variaciones dependen del tipo de microorganismo en estudio y el nicho ecológico que ocupan.

❖ ***Bacillus megaterium* y los PHAs:**

En *B. megaterium*, el PHB es el principal reservorio de energía y fuente de carbono para el proceso de esporulación (Vary 1992 y nuestro laboratorio, resultados no publicados) y también de sobrevivencia en condiciones ambientales desfavorables (López *et al*, 1995; 1998; Ruiz, 1999). Se acumula en condiciones de crecimiento limitadas en nitrógeno, con exceso de fuente de carbono (Macrae y Wilkinson, 1958). Está almacenado en gránulos intracelulares cuya composición es 97.7% PHB, 1.84% proteínas y 0.46% lípidos (Griebel *et al*, 1968), siendo el componente proteico mayoritario una proteína de 22 kDa la cual, se especula, cumple funciones estructurales (fasina). Los primeros trabajos de Griebel y Merrick (1971) mostraron que, sujetos a extracción alcalina suave, los gránulos de PHB perdían su capacidad de sintetizar el polímero, sin embargo, con el agregado del extracto alcalino se recuperaba esa actividad de síntesis. En ese extracto, se detectó un componente proteico mayoritario cuyo peso molecular se estimó en 43,8k Da. Además, *B. megaterium* produce polímeros que contienen 3-hidroxiheptanoato y 3-hidroxivalerato así como PHAs ramificados de sustratos no relacionados. (Findlay y White, 1983).

Este microorganismo produce enzimas degradativas extracelulares, lo que permitiría la síntesis de PHAs a partir de sustratos baratos. (Vary, 1992)

## ❖ **ACTIVADORES DEPENDIENTES DEL FACTOR $\sigma^{54}$**

### ❖ *Características generales de la transcripción.*

Durante la búsqueda de los genes PHB de *B. megaterium* en nuestro laboratorio, se clonó una región del genoma de este microorganismo, que contenía un gen que codifica para un regulador de la transcripción de genes que están involucrados en el metabolismo del PHB.

Todo este conjunto de genes resultó ser el objeto de estudio de esta tesis doctoral, ya que la investigación de los factores que afectan la expresión de cualquier tipo de gen, resulta muy importante para intentar mejorar el rendimiento en la producción industrial de un determinado compuesto, elaborado por medio de procesos biotecnológicos.

En los organismos procariotas, la transcripción es llevada a cabo por una compleja maquinaria proteica, que contiene los siguientes componentes:

- ✓ una proteína denominada **RNA polimerasa**, que representa el núcleo central del proceso de transcripción y es la encargada de generar los diferentes tipos de ARNs. Es una proteína compleja formada por distintas subunidades.
- ✓ un **factor sigma ( $\sigma$ )**, que es una proteína capaz de conferir la especificidad de reconocimiento a los promotores. Este factor interacciona en forma estrecha con la RNA polimerasa.

A estas dos proteínas, a veces se le agregan otros factores proteicos encargados de activar o reprimir la transcripción.

Entonces el esquema de la maquinaria de transcripcional se puede resumir en el siguiente esquema.

**Núcleo central + factor  $\sigma$  = Holoenzima  
(RNA polimerasa)**



El modelo bioquímico de la iniciación de la transcripción en procariotas propone que la holoenzima se une específicamente a los promotores formando un complejo cerrado. Luego este complejo se isomeriza, en una serie de complejas reacciones secuenciales, formando un complejo abierto en donde la doble hélice del ADN se desnaturaliza parcialmente en alrededor de 11 pares de bases. Una vez ocurrido este paso, comienza la síntesis de ARN con la primera unión fosfodiéster de 2 ribonucleósidos trifosfatos complementarios a la secuencia de ADN molde.

Este modelo se complica *in vivo* por la influencia de factores proteicos que modulan la transcripción de acuerdo a las necesidades del microorganismo o en respuesta a factores externos que lo afectan, haciendo que sea la expresión de los genes el primer paso de cualquier regulación metabólica. El mecanismo de sensado de estos cambios ambientales intra o extracelulares que modulan la transcripción está mediada por lo que se denominan moléculas transmisoras.

Por todo esto, es de fundamental importancia arrojar luz sobre estos mecanismos de regulación de la expresión de genes para poder controlar y en determinados casos amplificar diferentes rutas metabólicas de interés. (Streips y Yazbin, 1991)

#### ❖ **Factores Sigma ( $\sigma$ ) - Sigma 54 ( $\sigma^{54}$ )**

El factor  $\sigma$ , como ya fue mencionado, reconoce a los diferentes tipos de promotores, como parte de la holoenzima y permite la iniciación de la transcripción en determinadas secuencias específicas.

El núcleo central de la holoenzima es capaz por si misma, a partir de cualquier tipo de ADN y en cualquier secuencia del mismo, de formar uniones fosfodiéster y por ende generar polímeros de ARN. Se propuso al factor  $\sigma$  como el encargado de "dirigir" al núcleo central de la holoenzima hacia el sitio promotor porque puede unirse específicamente *in vitro* a ADN superenrollado, además mutaciones en el factor  $\sigma$  genera efectos pleiotrópicos.

No hay un único  $\sigma$ , se han detectado varios de este tipo de factores en *B. subtilis* y en *E. coli* de acuerdo también a los diferentes promotores que se pueden encontrar en estos microorganismos. Pero todos estos diversos factores  $\sigma$  interaccionan con el mismo núcleo central formando varias familias de holoenzimas.

El factor  $\sigma$  mayoritario es el que forma la principal familia de holoenzimas, que tiene cerca del 90% de la actividad de RNA-polimerasa y es la encargada de la expresión de la mayoría de los genes de la célula. En *E. coli* se denomina  $\sigma^{70}$  y en *B. subtilis*  $\sigma^A$ .

Además existen otros factores  $\sigma$  minoritarios, que constituyen las otras familias de holoenzimas y se encargan de la transcripción pequeños sets de genes que cumplen funciones específicas, por ejemplo el factor  $\sigma^{32}$  de *E. coli* controla a los genes involucrados en la respuesta al choque térmico o en *B. subtilis* los  $\sigma^{E-F-G-H-K}$  que controlan el proceso de esporulación en sus diferentes etapas.

A pesar de las grandes diferencias en tamaño que existen entre los factores  $\sigma$ , existen características estructurales en común entre ellos. Se los puede dividir en cuatro dominios bien definidos:

- ✓ El dominio 1 cuya función es desconocida.
- ✓ Los dominios 2 y 4, son los más conservados y de mayor homología entre sí dentro estos factores. Se especula que estarían involucrados en la interacción con el núcleo central de la holoenzima.
- ✓ El dominio 3 y ciertas zonas del dominio 4 son los que forman el motivo de unión al ADN hélice-vuelta-hélice (H-T-H), que se postula como el sitio de reconocimiento de los promotores específicos.

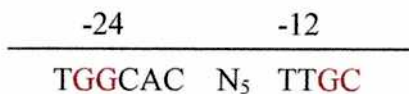
Se pueden encontrar 2 clases de funciones que surgieron del análisis de los genes que controlan los  $\sigma$  minoritarios:

**1ra Clase** corresponde a los  $\sigma$  que controlan los genes involucrados en funciones de crecimiento, como por ej. replicación de fagos y desarrollo flagelar en *E. coli* y proceso de esporulación en *B. subtilis*.

**2da Clase** corresponde a los  $\sigma$  que controlan los genes involucrados en funciones de respuestas a diferentes tipos de stress o cambios ambientales, tales como shocks térmicos y químicos, pero sobre todo, aquellos involucrados en las respuestas a los diferentes tipos de hambreado nutricional.

Dentro de estos últimos se encuentra el factor  $\sigma^{54}$ . (Streips y Yazbin, 1991). Las características principales de este factor son:

- ✓ Reconocen un promotor estructuralmente diferente a los que son reconocidos por los otros factores  $\sigma$ . Este promotor está altamente conservado entre los genes dependientes de este factor. Tiene el siguiente patrón (Shingler 1996):



Donde los nucleótidos marcados en rojo son absolutamente invariables entre todos los promotores clonados dependientes de  $\sigma^{54}$  y el número de nucleótidos de timina (T) entre las regiones -12 y -24 pueden modular la estabilidad del complejo holoenzima-promotor.

- ✓ Además, este factor difiere de los otros  $\sigma$  en su composición aminoacídica, indicando que evolucionó de forma diferente a los otros factores  $\sigma$ .
- ✓ Finalmente, y como característica más sobresaliente, la holoenzima derivada de este factor, necesita de otros factores proteicos (factores de transcripción) para comenzar la síntesis de ARNm, los denominados **ACTIVADORES DEPENDIENTES DE  $\sigma^{54}$**

#### ❖ *Activadores dependientes de $\sigma^{54}$*

Las bacterias son organismos altamente adaptables que responden rápida y eficientemente a cambios del medio físico y químico que los rodea. La primera de esas respuestas se da a nivel transcripcional, por lo ya mencionado anteriormente, determinándose qué genes y en qué nivel se expresan. En la mayoría de los casos la naturaleza de los cambios ambientales determina que se dispare una señal que es mediada (transducida) por proteínas auxiliares que ayudan a generar respuestas intracelulares que direccionan eventos transcripcionales, pero en otros casos estos cambios ambientales directamente influyen sobre la actividad de factores de transcripción específicos. Los factores de transcripción denominados **activadores o reguladores dependientes de  $\sigma^{54}$**  están involucrados en cualquiera de estos dos tipos de respuestas.

Se han aislado unos 30 activadores pertenecientes a 20 especies bacterianas diferentes. Todos regulan una gran variedad de respuestas fisiológicas relacionadas con el hambreado nutricional. Pero a pesar de regular este tipo de respuestas, no son estrictamente esenciales para la supervivencia celular.

Una de las características principales de estos factores de transcripción es que ejercen su función regulatoria a distancia, debido a que se unen a secuencias específicas ubicadas alrededor de 100-200 pb de la secuencia promotora. Estas se denominan *secuencias activadoras ubicadas río arriba (UASs)* o también *elementos parecidos a enhancers (ELEs)*. Llevan esos nombres debidos a que son secuencias invertidas repetidas que cumplen funciones muy parecidas a los enhancers eucariotas, entre ellas la de ser secuencias activadoras a distancias que pueden ser localizadas a ya sea río arriba o río abajo del gen sobre el que actúan.

Debido a que los UASs están lejos del promotor específico, los activadores dependientes de  $\sigma^{54}$  para ejercer su función regulatoria deben acercarse a la secuencia promotora de modo de lograr una adecuada interacción proteína-proteína con la holoenzima y así poder activar la transcripción. Esto se logra gracias a un plegamiento del ADN, la mayoría de las veces con la cooperación de proteínas denominadas *factores de integración al huésped (IHF)*. Pero también se puede lograr por un plegado intrínseco del ADN, facilitado porque en la región comprendida entre el promotor y los UASs, se encuentra una zona rica en adeninas (A) y timinas (T). Este plegamiento cumple dos funciones, primero da especificidad por incremento local de la concentración del regulador cerca de su promotor específico; segundo facilita la oligomerización de los factores de transcripción.

Desde el punto de vista funcional, estos reguladores, pueden ser clasificados en 2 grandes grupos:

- ✓ El primero corresponde a aquellos activadores que pertenecen al sistema de transducción de señales, vía fosforilaciones de dos componentes proteicos. Como ejemplo, que a su vez es el paradigma de todos los tipos de activadores dependientes de  $\sigma^{54}$ , es el NtrC que esta encargado de activar genes relacionados con la asimilación de nitrógeno. En este grupo de reguladores existe, además del activador, una proteína denominada sensora, en general ubicada a nivel de la membrana, (NtrB para los genes de asimilación de nitrógeno) que capta señales específicas y se autofosforila en un residuo de histidina (por esto se llama histidin quinasa). Esta proteína sensora activa al factor de transcripción mediante la transmisión de este grupo fosfato a un residuo de asparragina conservado del mismo y es la forma fosforilada de los activadores la que es capaz de promover la transcripción. Lo

que determina la fuerza de la respuesta transcripcional es la proporción de reguladores fosforilados.

- ✓ El segundo corresponde a aquellos activadores que responden al estímulo directo de una señal. Como ejemplo está el regulador XylR, que está encargado de estimular la transcripción de los genes involucrados en la degradación de compuestos aromáticos. En este caso, la unión del compuesto específico (por ej. tolueno para XylR) a un dominio regulatorio de la proteína ubicado en el extremo aminoterminal, hace que ella sufra un cambio conformacional de modo tal que otro dominio denominado de activación, ubicado en el extremo carboxilo terminal, ahora sea capaz de estimular la transcripción. O sea que para este tipo de factores de transcripción el dominio regulatorio bloquea o reprime al dominio activador, hasta el que compuesto efector suprime esta represión.

El análisis de las secuencias de aminoácidos de esta familia de activadores, nos muestra que poseen una estructura modular característica, que consiste en tres dominios funcionales distintos e independientes, clasificados según la función que cumplen.

- ✓ Dominio Aminoterminal: es el encargado de recibir las señales regulatorias, ya sea captándolas directamente (como lo ya mencionado con el XylR) o por medio de fosforilaciones (como el NtrC). Debido a las señales específicas que deben captar, este dominio es el menos conservado entre todos los reguladores estudiados y puede variar en tamaño en forma drástica de una proteína a otra.
- ✓ Dominio Central: es el encargado de la activación transcripcional ya que uno de los roles que cumple es el de interactuar con la holoenzima, por esta razón es el más conservado entre todos los reguladores. Además es el sitio de unión e hidrólisis de ATP, requerida para que el complejo holoenzima-promotor pase del estado cerrado al estado abierto (ya que la holoenzima por sí sola no es capaz de proceder a esa isomerización) y de esta forma poder comenzar la transcripción. La longitud de este dominio es de aproximadamente 240 aminoácidos y se lo puede dividir en 7 regiones denominadas C1-C7.

- ◆ La región C1 se especula que es sitio de unión al ATP, ya que es una región rica en glicinas que forman un motivo en forma de rulo. Este motivo es muy

común en el sitio de unión a nucleótidos que se encuentran entre otras proteínas capaces de unir ATP.

- ◆ La región C2 es hidrofóbica y posee la única cisteína conservada entre estas proteínas.
  - ◆ La región C3 tiene dos alfa hélices precedidas por una vuelta y se especula que es la zona por donde interactúa con la holoenzima.
  - ◆ La región C4 es rica en glicinas y está cargada negativamente. No se conoce que función podría cumplir.
  - ◆ La región C5 posee el carboxilato del centro de reacción, o sea que entre las regiones C1 y C5 forman todo el bolsillo de reacción de hidrólisis de ATP.
  - ◆ La región C6 es una zona cargada positivamente y rica en aminoácidos aromáticos y prolina. No se conoce que función podría cumplir.
  - ◆ La región C7 tiene un núcleo de 7 aminoácidos altamente conservados. No se conoce que función podría cumplir.
- ✓ Dominio Carboxiloterminale: este dominio es el más corto de los tres, su tamaño puede variar entre 70 y 130 aminoácidos, y tiene una homología buena entre los activadores. Su función es la de unirse al ADN en las secuencias específicas UASs y de oligomerización de estos reguladores. Para la primera función, este dominio posee un motivo de unión al ADN hélice-vuelta-hélice (H-T-H), para la segunda función se postula la presencia de sitios de dimerización parecidos a los de las proteínas diméricas FIS.
- ✓ Algunos autores incluyen un cuarto dominio que sirve de bisagra entre las regiones central y aminoterminale.

El hecho de ver que los dominios central y carboxilo terminal sean tan parecidos entre todos los reguladores, nos indica que estas proteínas poseen un único origen ancestral y que fueron divergiendo a lo largo de la evolución. Además al encontrar estos reguladores entre las firmibacterias y proteobacterias nos indica que muy antiguo es este sistema de regulación. (Morett y Segovia, 1993; Shingler, 1996; North *et al*, 1993, Pérez-Martín y De Lorenzo, 1995)

## **OBJETIVO**

Teniendo como marco el contexto mundial sobre el conocimiento y las estrategias necesarias para optimizar la producción del plástico biodegradable, es que se planteó como **OBJETIVO PRINCIPAL** el análisis de aquellos factores involucrados en el metabolismo del PHB en *Bacillus megaterium*, para ello se encaró el estudio de genes ya clonados en nuestro laboratorio que afectan la síntesis y degradación del biopolímero..

El estudio de la regulación metabólica en la movilización del PHB en *B. megaterium* puede servir como modelo para estudiar que factores alteran la síntesis de este compuesto y aplicar los conocimientos adquiridos para optimizar los procesos productivos de los microorganismos utilizados como productores del plástico.

Las tareas realizadas fueron:

- Aislamiento de los gránulos de PHB, análisis de su patrón de proteínas asociadas y secuenciación de los extremos aminoterminales de las mismas (Vazquez *et al*, 1996).
- Secuenciación de un fragmento de ADN aislado de una biblioteca genómica de *B. megaterium* y que está involucrada en el metabolismo del PHB. (Pettinari *et al*, 1998, Vazquez *et al*, 1998).
- Clonado de un gen complementario en este fragmento
- Análisis de las relaciones entre los diferentes genes que se encuentran en este fragmento.
- Análisis de la relación entre la expresión estos genes y la acumulación de PHB.



# MATERIALES Y MÉTODOS

20 TABLA DE CEPAS

Cepas Bacterianas	Genotipo	Origen
<i>B. megaterium</i> PV447	<i>lac-3 lac-6</i>	Vary y Tao, 1988
<i>B. megaterium</i> UBA30-20	PHB <sup>-</sup>	Floccari <i>et al</i> , 1991
<i>B. megaterium</i> UBA30-21	PHB leaky <i>zef1::Tn917</i>	Pettinari y Méndez, 1991
<i>B. megaterium</i> UBA 31-4	PV447/ pS14	Este trabajo
<i>B. subtilis</i> GSY 11-04	<i>purR34 ura-1</i>	Cepa de colección
<i>E. coli</i> HB101	<i>hsdS20 (r<sub>B</sub>m<sub>B</sub>-) recA1supE44 lacY1 proA2 ara14galK2 xyl5 mtl1 rpsL20</i>	Boyer y Rouilly-Dussoix (1969)
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>recA1 endA1 thi1 gyrA96 hsdR17(rk- mk-) supE44 relA1 λ-lac- (F' proAB1, lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10(tet))</i>	Bullock <i>et al</i> (1987)
<i>E. coli</i> UBA 1-36	HB101 / pBMe3	Pettinari Tesis Doctoral, 1994

<i>E. coli</i> LJ111	<i>glnV44(AS), galK2, tyrT58(AS), Δ54(atoC-atoB), metB1, hsdR514, trpR55, lacY1</i> o $\Delta(\text{codB-lac})3$	Jenkins y Nunn, 1987A
<i>E. coli</i> LJ61	<i>fadR601, atoC512(const)</i> ,	Jenkins y Nunn, 1987A
<i>E. coli</i> UBA 6-19	XL1-Blue/ pF14	Pettinari <i>et al</i> , 1997
<i>E. coli</i> UBA 6-24	XL1-Blue/ pPBT 1M	Este trabajo
<i>E. coli</i> UBA 6-25	XL1-Blue/ pPBT 2M	Este trabajo
<i>E. coli</i> UBA 6-26	XL1-Blue/ pPBT 1S	Este trabajo
<i>E. coli</i> UBA 6-27	XL1-Blue/ pS14	Este trabajo
<i>E. coli</i> UBA 6-28	XL1-Blue/ pPBT 1M/ pS14	Este trabajo
<i>E. coli</i> UBA 6-29	XL1-Blue/ pPBT 2M/ pS14	Este trabajo
<i>E. coli</i> UBA 6-30	XL1-Blue/ pPBT 1S/ pS14	Este trabajo

♣ TABLA DE PLÁSMIDOS

Plásmidos	Características	Origen
pBluescript SK- (pBS)	<i>Amp<sup>r</sup></i> , MCS, <i>lacPOZ'</i> , promotores T7 y T3	Stratagene
pGEM T Easy	<i>Amp<sup>r</sup></i> , MCS, <i>lacPOZ'</i> , promotores T7 y T3	Promega
pCRII	MCS, <i>lacPOZ'</i> , <i>Kn<sup>r</sup></i> , <i>Amp<sup>r</sup></i> , promotores T7 y Sp6	Invitrogen
pBMe3	pHV33Ω fragmento <i>Pst</i> I de 2.5kb de <i>B. megaterium</i>	Pettinari <i>et al</i> , 1998
pAT 18	MCS, <i>lacPOZ'</i> , <i>Er<sup>r</sup></i> , <i>Mob<sup>+</sup></i> <i>Tra<sup>r</sup></i> , <i>oriR</i> pUC, <i>oriR</i> pAMβ1	Trieu-Cuot <i>et al</i> , 1991
pBM142	pVK101Ω fragmento <i>Xho</i> II de 20 kb de <i>B. megaterium</i>	Pettinari tesis doctoral, 1994
pF14	pBS conteniendo un fragmento de amplificación de 1600 bp del pBMe3 que abarca el ORF1 ( <i>ActBm</i> )	Pettinari <i>et al</i> , 1998
pBMS6	pUC19 con un inserto de 6 kb proveniente de pBM142	Pettinari tesis doctoral, 1994
pPBT-1M	pGEM T Easy conteniendo un fragmento de amplificación de 1200 bp que abarca el gen <i>pbtBm</i> con promotor	Este trabajo
pPBT-2M	pCRII conteniendo un fragmento de amplificación de 900 bp que abarca el gen <i>pbtBm</i> sin promotor	Este trabajo
pS14	pAT18 conteniendo el gen <i>ActBm</i> proveniente del pF14	Este trabajo
pPBT-1S	pGEM T Easy conteniendo un fragmento de amplificación de 1200 bp que abarca el gen <i>pbtBs</i> con promotor	Este trabajo

## ♣ MEDIOS DE CULTIVO

Para preparar los medios de cultivo se utilizó reactivos Merck y de la compañía Sigma Aldrich

### LB

Triptona .....10gr  
ClNa.....10gr  
Extracto de levadura.....5gr  
Agua destilada c.s.p.....1 lt

### LBG

LB conteniendo gluconato de sodio 1% concentración final

### SNB (Vary y Tao, 1988)

#### Solución A

Caldo nutritivo.....8 gr  
Sales SNB\* .....8 ml  
Agua destilada c.s.p.....900 ml

#### Solución B

glucosa.....1 gr  
Cl<sub>2</sub> Ca.....10 mM  
Agua destilada c.s.p.....100 ml

Las soluciones A y B se autoclavaron por separado y combinaron

#### \*Sales SNB

ClK.....2,500 %  
SO<sub>4</sub> Fe.....0,125 mM  
SO<sub>4</sub> Mg..... 0,125 M  
Cl<sub>2</sub>Mn.....2,500 mM

Se autoclavó y mantuvo a 4°C

### SNA

Es medio SNB con el agregado de 15 g/lt de agar.

**Medio Mínimo para *B. megaterium* (Vary y Tao, 1988)**

PO<sub>4</sub>H Na<sub>2</sub>.....6,0 gr  
 PO<sub>4</sub>H<sub>2</sub> K.....3,0 gr  
 Citrato trisódico dihidratado.....1,0 gr  
 Cl<sub>2</sub> Fe .....3.6 μM  
 Cl<sub>2</sub> Mn.....2,0 gr  
 SO<sub>4</sub> (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> .....2,0 gr  
 agua destilada c.s.p.....1,0 lt

pH 7.2

Luego de autoclavar se agregaron

SO<sub>4</sub> Mg.....0,2 gr  
 Cl<sub>2</sub> Ca.....0,1 mM  
 Glucosa.....15,0 gr

**PSIB**

Triptona.....5 gr  
 Extracto de Levadura.....20 gr  
 SO<sub>4</sub>Mg.....5 gr  
 agua destilada c.s.p.....1 lt

**♣ TABLA DE ANTIBIÓTICOS**

<b>Antibióticos</b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b><i>B. megaterium</i></b>
Ampicilina(Amp)	50 μg/ml	-----
Kanamicina(Kn)	50 μg/ml	-----
Eritromicina(Er)	150 μg/ml	5 μg/ml
Tetraciclina(Tet)	10 μg/ml	-----

Todos estos valores representan la concentración final de antibiótico en el medio de cultivo.

## ♣ OTROS AGREGADOS A LOS MEDIOS DE CULTIVO

- ✓ 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil- $\beta$ -D-Galactopiranosido ( X-Gal).

Solución madre: 20 mg/ml en N-N-dimetilformamida, se conservó -20°C y se utilizaron 2  $\mu$ l de solución madre por ml de medio.

- ✓ Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG).

Solución madre: 0.01 M en agua destilada, se conservó -20°C, y se utilizaron 10  $\mu$ l de solución madre por ml de medio.

- ✓ Solución de Acido Bromobutírico.

Solución madre: 0.3 M en agua destilada, se conservó a -20°C, y se llevó a 3 mM de concentración final en los medios de cultivo.

## ♣ BUFFERS UTILIZADOS

Para preparar los buffers se utilizaron reactivos de la compañía Sigma Aldrich grado Biología Molecular. Se utilizaron solventes orgánicos y ácidos de grado analítico o cromatográfico Merck.

### ◆ *Buffers para el análisis de proteínas (Laemmli U., 1970)*

#### **Solución de Acrilamida 30% p/p**

Acrilamida.....146 gr  
N, N'-metilen-bisacrilamida.....4 gr  
Agua destilada c.s.p.....500 ml

#### **Buffer gel separador solución concentrada 4x**

Base Trizma (Tris).....90,75 gr  
Dodecilsulfato de sodio (SDS) .....2,0 gr  
Agua destilada c.s.p.....500 ml  
Se llevó a pH 8,9 con HCl

### **Buffer gel concentrador solución concentrada 4x**

Base Trizma.....30,23 gr  
SDS.....2,0 gr  
Agua destilada c.s.p.....500 ml  
Se llevó a pH 6,8 con HCl

### **Buffer de corrida de proteínas**

Base Trizma .....3,0 gr  
SDS.....1,0 gr  
Glicina.....14,4 gr  
Agua destilada c.s.p.....1000 ml  
pH 8,5

### **Cracking Buffer**

Tris-HCl 100mM pH 6,8.....50,0 ml  
Sodio dodecil sulfato (SDS) .....2,5 gr  
EDTA.....37,2 mg  
 $\beta$ -Mercaptoetanol.....5,0 ml  
Glicerina 86% v/v.....40,0 ml  
Azul de Bromofenol.....4,0 mg  
Agua destilada c.s.p.....100,0 ml

### **Buffer de Transferencia de Proteínas**

Base Trizma .....3,0 gr  
Glicina.....14,4 gr  
Metanol.....50 ml  
Agua destilada c.s.p.....1000 ml  
pH 8,4

### **Solución de tinción para geles de poliacrilamida y membranas de Inmovilon**

Metanol.....450 ml  
Acido acético.....90 ml  
Coomasie Brilliant Blue R250.....2 gr  
Agua destilada c.s.p.....460 ml



### **Solución de destinción para geles de poliacrilamida**

1)

Metanol.....360 ml  
Acido acético.....200 ml  
Agua destilada c.s.p.....1440 ml

2)

Acido acético 10%

### **Solución de destinción para membranas de Inmovilon**

Metanol.....900 ml  
Acido acético.....20 ml  
Agua destilada c.s.p.....80 ml

◆ *Buffers para el manipuleo del ADN (Sambrook J. et al, 1989).*

#### **Buffer TAE Solución concentrada 50x**

Base Trizma .....242,0 gr  
Acido acético glacial .....57,1 ml  
EDTA 0.5 M (pH 8) ..... 100,0 ml  
Agua destilada c.s.p.....1,0 lt

#### **Buffer TBE Solución concentrada (10x)**

Base Trizma .....108,0 gr  
Acido Bórico.....55,0 gr  
EDTA 0.5 M (pH 8) ..... 40,0 ml  
Agua destilada c.s.p.....1,0 lt

#### **Buffer de siembra (6x)**

0,25% (p/v) azul de bromofenol  
40% (p/v) sacarosa en agua.

### **SSC (20x)**

ClNa .....175,3 gr  
Citrato de sodio dihidratado.....88,2 gr  
Agua destilada c.s.p.....1,0 lt  
pH 7.

### **TE**

Tris-HCl .....10 mM  
EDTA .....1 mM  
pH 8

### **Solución de prehibridización**

PO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub>H.....0,26 M  
SDS.....7,00 %  
EDTA.....1,00 mM  
BSA.....1,00 %  
pH 7

### **Buffer de transformación TFB I**

Acetato de Potasio.....30 mM  
ClK.....100 mM  
Cl<sub>2</sub>Ca.....10 mM  
Cl<sub>2</sub>Mn.....50 mM  
Glicerol.....15%  
pH 5,8

### **Buffer de transformación TFB II**

Mops.....10 mM  
Cl<sub>2</sub>Ca.....75 mM  
ClK.....10 mM  
Glicerol.....15 %  
pH 6,5

### **Buffers de reacción para las diferentes mediciones enzimáticas**

Para la medición de PHB sintasa: ácido 5,5'-Ditiobis-(2-nitrobenzoico)(DTNB) 1 mM en Tris-HCl 25 mM pH 7,5.

Para la medición de la actividad Pbt: DTNB 1mM en Buffer Fosfato 100 mM pH 7,2.

Para la medición de  $\beta$ -cetotilasa: Tris-HCl 10 mM,  $MgCl_2$  40mM, DTT 1mM, pH 7,8

Para la medición de Tiolasa II: Tris-HCl 111 mM,  $MgCl_2$  25mM, DTT 0,223 mM, pH 8,1

Para la medición de la actividad AA-S-CoA transferasa: Tris-HCl 67mM,  $MgCl_2$  5mM, pH 8,1

### **Buffer Fosfato**

Para la formación de los diferentes tipos de Buffer Fosfato se utilizaron las siguientes soluciones:

$PO_4K H_2$  1M pH 4,5

$PO_4K_2 H$  1M pH 9,6

### **Sustratos para la medición de las actividades enzimáticas**

Las soluciones madre del hidroxibutiril-S-CoA, butiril-S-CoA y el isobutiril-S-CoA que se utilizaron para las mediciones enzimáticas fueron de 60 $\mu$ M en solución  $H_2PO_4K$  10 mM pH 4,5.

El acetoacetyl-S-CoA, CoA-SH, acetyl-S-CoA y acetoacetato fueron resuspendidos a las concentraciones indicadas para cada reacción en buffer Tris-HCl 100 mM pH 7,8.

## ♣ PREPARACION DE CULTIVOS DE *B. megaterium*

### ◆ *Cultivos exponenciales en medio líquido*

Por el siguiente procedimiento se prepararon los cultivos para:

- los ensayos enzimáticos y las cuantificaciones de PHB
- las cinéticas de actividades enzimáticas
- estudio de los cambios en el pH del medio extracelular
- detección de ácidos en el sobrenadante

- ✓ A partir de un glicerolado se sembró una placa de LB o SNB haciendo estrías cruzadas con una ansa, de manera de tener crecimiento uniforme, luego se incubó a 32°C durante toda la noche. En los casos de cepas con genes de resistencia a antibióticos, se utilizó placas suplementadas con los antibióticos correspondientes.
- ✓ Al día siguiente se inundó la placa con aproximadamente 3 ml de medio líquido que se utilizó para el cultivo del microorganismo y se resuspendieron con rastrillo las estrías crecidas. Esta suspensión se homogeneizó con vortex y se utilizó como inóculo del cultivo en el medio líquido correspondiente, de manera tal que la  $DO_{600nm}$  inicial fuese  $\leq 0.1$ . La relación volumen de medio de cultivo a volumen de Erlenmeyer utilizado fue de 1 a 10.
- ✓ Como último paso, se incubaron a 32° los cultivos con agitación adecuada (entre 150 y 200 r.p.m.) hasta obtener el crecimiento deseado para los diferentes ensayos que se realizaron.

#### ◆ *Conservación de los cultivos*

Las cepas de *B. megaterium* se conservaron congeladas con glicerol. Para obtener el glicerolado, a un cultivo crecido en medio líquido que creció hasta llegar a fase exponencial tardía, se le agregó glicerol hasta a una concentración de 15% a 20% final y se guardaron a -20 o -70°C en tubos de vidrio con tapa a rosca o en tubos Eppendorf.

### ♣ **ANALISIS DE LAS PROTEINAS ASOCIADAS A GRANULOS**

#### ◆ *Crecimiento del microorganismo*

Unos 500 ml de la cepa *B. megaterium* PV447 fueron crecidos, para la extracción de gránulos, en medio LBG hasta el final de la fase exponencial. Las células se recolectaron por centrifugación y se les realizó un lavado con una solución de Tris-HCl 100mM pH 7,5

#### ◆ *Extracción de gránulos*

- ✓ Al pellet de células lavadas, se lo resuspendió en una solución Tris-HCl 50mM pH 7,5, concentrando unas 100 a 200 veces con respecto al volumen de cultivo original. Luego, se le agregó unos 5 a 10 µg de DNAsa I y se rompieron las células por doble pasaje en french press a 10000 psi. El homogenato fue sembrado en un gradiente discontinuo formado por bloques 88%; 44% y 22% de Glicerol en Tris-HCl 50 mM pH 7, y luego los tubos fueron ultracentrifugados a 100.000 g por 30 min.
- ✓ Se retiró la banda que conforman los gránulos, la cual sedimenta en la interfase entre los bloques de glicerol de 44 y 88%. Se lavaron los gránulos con una solución de Tris-HCl 50mM pH 7,5 en una proporción de 10-50 ml de solución de lavado por cada 1ml de banda de gránulos extraída

- ✓ La preparación obtenida, se centrifugó a 100.000g por 30 min. para sedimentar los gránulos. Estos se resuspendieron en 10ml-20ml solución Tris-HCl 25 mM pH 7,5 NaCl 2.5 M, y se incubaron 30 min. en hielo (esto es para eliminar la unión de proteínas inespecíficas) y posteriormente se realizó una diálisis contra Tris-HCl 10 mM pH 7,5 durante toda la noche.
- ✓ Finalmente, se sedimentaron los gránulos a 100.000g por 30 min., se resuspendieron en 5ml de Tris-HCl 25 mM pH 7,5 y se guardaron a -20 °C.

◆ ***Geles SDS-PAGE para el análisis el patrón de proteínas asociadas a gránulos***

- ✓ Se tomaron 0.4-0.5 ml de los gránulos y se centrifugaron en microcentrífuga a 13000 r.p.m. durante 15 min. Luego se descartó la fase líquida y se resuspendieron en 10 a 50 µl de cracking buffer para la corrida en PAGE, se incubaron 1-3 min. a 95°C, se volvieron a centrifugar y se sembró el sobrenadante acuoso en un PAGE de la siguiente composición: 11% gel de resolución, 4% gel de concentración

◆ ***Secuenciación de las proteínas asociadas a gránulos***

- ✓ Para la secuenciación de las proteínas de interés se siguió un procedimiento modificado con respecto al anterior, (Wieczoreck *et al*, 1995). Se partieron de 2 lt de cultivo de *B. megaterium* crecidos en LBG, se realizaron los lavados y el rompimiento de las bacterias según el procedimiento ya descrito anteriormente. Pero también se agregó un paso de concentración, antes de sembrar en los geles, que consistió en resuspender el pellet de gránulos en 5 ml de una solución de Tris-HCl 50 mM, NaCl 2.5M, SDS 0.5% pH 7,5, y se los incubó 60 min. en hielo. Este tratamiento solubiliza todas las proteínas asociadas. Luego se centrifugó la solución a 100.000g se tomo el sobrenadante acuoso y se lo dializó toda la noche contra una solución de 10 mM Tris-HCl pH 7,5.
- ✓ Posteriormente se concentraron las proteínas liofilizando toda la noche. Se resuspendió el liofilizado con 50 µl de una solución de Tris-HCl 25 mM pH 7,5 y luego se agregaron 15 µl de cracking buffer, esto fue sembrado en un PAGE de la siguiente composición: 8% gel de resolución, 4% gel concentrador. En este gel fueron separadas las proteínas y posteriormente

fueron transferidas a una membrana de Inmovilon-PVDF Milipore 45 micrómetros, utilizando un sistema de transferencia semi-seco, aplicando 5 mA por cm<sup>2</sup> de membrana durante 60 min.

- ✓ Luego de la transferencia la membrana fue teñida por 30 seg. En el siguiente paso, se la lavó con la solución especial descrita en la parte de materiales y que no interfiere con la técnica de secuenciación, finalmente las bandas correspondientes a las proteínas de interés fueron cortadas de la membrana y se enviaron a secuenciar al Institut für Physiologische, Chemie und Pathobiochemie de la Universidad Wesfälische Wilhems de la ciudad de Münster, en Alemania.

## ♣ CUANTIFICACION DE PHB

A dos series de cultivos independientes, se les determinó la concentración del biopolímero por duplicado. Esta determinación se realizó mediante el método cromatográfico, que se basa en la descomposición por metanólisis, de la muestra acidificada, para formar el éster metílico del β-hidroxibutirato, que luego se cuantificó por cromatografía gaseosa.

### ◆ *Preparación y metanólisis de las muestras*

- ✓ Se prepararon pellets de cultivos en las diferentes condiciones en las que se cuantificó el PHB. Los pellets fueron luego liofilizados.
- ✓ A las muestras preparadas de esta forma se les agregó 1 ml de una solución de 15% de SO<sub>4</sub> H<sub>2</sub> en metanol y luego 1 ml de cloroformo. Las mezclas se las incubó durante 140 minutos a 100°C, se les agregó 0.5 ml de agua destilada y se las homogeneizaron bien, agitándose vigorosamente durante 20 segundos.
- ✓ Finalmente, se dejó en reposo las muestras hasta que se separaron las fases y se pasó la fase orgánica a otro tubo, se le agregó SO<sub>4</sub>Na<sub>2</sub> para eliminar los restos de agua que quedaron en la fase orgánica, que se guardó a -20°C hasta el momento de la corrida cromatográfica. (Braunegg *et al*; 1978).



♦ *Análisis por cromatografía gaseosa*

- ✓ Los productos de la metanólisis fueron analizados por separación isotérmica en columna de vidrio de 1.80 m rellena con 10% Carbowax 20M-TPA en Chromosorb W-AW de malla 80/100.
- ✓ Se utilizó un cromatógrafo Gow-Mac serie 580, equipado con ionizador de llama. Como gas transportador se empleó nitrógeno a un flujo de 20 ml/min., siendo las temperaturas del inyector, columna y detector 180°C, 150°C y 210°C respectivamente. Los datos fueron analizados mediante un integrador Spectraphysics. La cuantificación se realizó por comparación entre las áreas de los picos obtenidos por parte de las muestras con respecto a las áreas obtenidas por las diferentes de concentraciones conocidas de la solución patrón.

♣ **COLORACION PARA DETERMINAR LA PRESENCIA DE INCLUSIONES DE PHB**

♦ *Coloración fluorescente con Azul del Nilo A*

El colorante Azul del Nilo A es una oxazina básica soluble en agua y en alcohol etílico. La forma oxazona (Nile pink) se forma por la espontánea oxidación del Azul del Nilo A en solución acuosa, y es soluble en lípidos neutros que se encuentran en estado líquido a la temperatura de coloración. (Ostle y Holt, 1982).

El procedimiento de esta coloración fue el siguiente:

- ✓ Un extendido de células en portaobjeto fue coloreado con una solución acuosa al 1% de Azul del Nilo A (Sigma), sumergiéndolo en jarritos copleen y se incubó con el colorante a 55°C durante 10 min.
- ✓ Luego de eliminar con agua corriente el exceso de colorante, se lavó el extendido con solución acuosa de ácido acético al 8 % durante 1 minuto y se dejó secar.

- ✓ Se observó el preparado rehidratado y cubierto con cubreobjeto al microscopio bajo una longitud de onda de 460 nm.
- ✓ Los gránulos de PHB se observaron como partículas fluorescentes de color naranja brillante dentro de las células.

## ♣ MEDICION DE LAS DIFERENTES ACTIVIDADES ENZIMATICAS

Todos los valores obtenidos de las diferentes actividades enzimáticas son el promedio de mediciones por duplicado de al menos dos cultivos independientes.

### ♦ *Medición de la actividad PHB sintasa*

La actividad de PHB sintasa se midió por la liberación de Coenzima A, cuando se utiliza el sustrato hidroxibutiril-S-CoA en la reacción de síntesis de PHB. La coenzima reacciona con el cromógeno DTNB ( $\epsilon = 13.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) dando un compuesto de color amarillo.

- ✓ Se utilizaron los extractos celulares y la banda de PHB provenientes de la purificación de gránulos PHB
- ✓ Para la medición de la actividad enzimática se colocaron en cubetas de cuarzo de 1 ml las siguientes soluciones:

	MUESTRA	BLANCO
Buffer de reacción.....	1 ml.....	1ml
Hidroxibutiril-S-CoA.....	10 $\mu\text{l}$ .....	10 $\mu\text{l}$
Extracto crudo o gránulos PHB.....	10 $\mu\text{l}$ .....	-----

- ✓ Inmediatamente se midió el aumento de absorbancia a 412 nm provocada por el complejo CoA-DTNB y se continuo midiendo de a intervalos de 15 a 30 segundos durante 5 min. o hasta que se estabilizó la absorbancia a 412.
- ✓ Se definió como 1 Unidad (U) enzimática, a la cantidad de proteína requerida para catalizar la liberación de 1  $\mu\text{mol}$  de Coenzima A por minuto. (Valentin y Steinbüchel, 1994).

◆ **Medición de la actividad fosfobutiriltransferasa (Pbt)**

La actividad de Pbt se midió, al igual que en el caso de la medición de la PHB sintasa, por la liberación de coenzima A, cuando esta enzima utiliza el butiril-S-CoA como sustrato de la reacción, ya que, la coenzima A liberada puede reaccionar con el cromógeno DTNB.

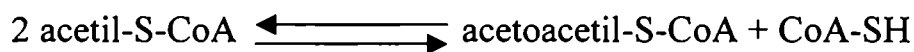
- ✓ Para la medición de esta enzima, se utilizaron de 3 a 5 ml de los cultivos de las diferentes cepas. Estos fueron centrifugados y lavados 2 veces con 5 ml de buffer Fosfato 15 mM pH 7,2. Luego las células se resuspendieron en Buffer Fosfato 100 mM pH 7,2
- ✓ Las células se rompieron por ultrasonido utilizando un desintegrador ultrasónico (Cole and Palmer, serie 4710, 600 W), con una punta de 6 mm. Para ello se sometieron las muestras sumergidas en hielo a 2 o 3 pulsos de 10 o 15 segundos cada uno (amplitud aproximada: 10 micrones). Luego, los extractos celulares se centrifugaron en frío a 10.000 r.p.m., transfiriéndose el sobrenadante a un tubo limpio que se conservó en hielo hasta el momento de la determinación .
- ✓ Para la medición se colocaron en cubetas de cuarzo:

	MUESTRA	BLANCO
Buffer de reacción.....	1 ml.....	1 ml
Butiril, isobutiril o hidroxibutiril-S-CoA.....	10 µl .....	10µl
Muestra.....	3-10 µl.....	-----

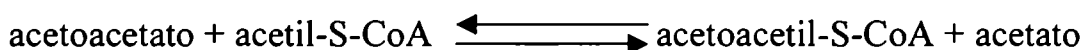
- ✓ Se midió el aumento de absorbancia a 412 nm provocada por el complejo CoA-DTNB, durante 5 min. .
- ✓ Se definió como 1 U enzimática a la cantidad de proteína requerida para catalizar la liberación de 1 mM de coenzima A por minuto. (Cary *et al*, 1988).

♦ **Medición de la actividad de las enzimas  $\beta$ -cetotiolasa, tiolasa II y acetoacetil-transferasa.**

Las enzimas  $\beta$ -cetotiolasa y tiolasa II catalizan en forma reversible la reacción de condensación de dos moléculas de acetilcoenzima A (acetil-S-CoA) para formar acetoacetilcoenzima A (acetoacetil-S-CoA) y coenzima A (CoA-SH).



En cambio, la enzima acetoacetil-S-CoA transferasa (AA-S-CoA transferasa), lo que realiza es la transferencia de la Coenzima A desde una molécula de acetil-S-CoA a una molécula de Acetoacetato.



Los ensayos enzimáticos para cada una de estas enzimas se basan en la propiedad de los acetoacetil tioésteres, como el acetoacetil-S-CoA, de exhibir una absorbancia característica en el rango de 280 a 320 nm a pH alcalino, debido a la formación de un enolato, favorecida en presencia de iones  $\text{Mg}^{++}$ . Al clivarse el acetoacetil-S-CoA por acción de las enzimas tiolasas, disminuye la absorbancia de la muestra en forma proporcional, en cambio para la AA-S-CoA transferasa, lo que se mide es el aumento de la absorbancia por el aumento del acetoacetil-S-CoA.

- ✓ Para las mediciones de las 3 enzimas, se sedimentaron 10 ml de cultivos de las diferentes cepas de *E. coli*, crecidas hasta fase exponencial tardía en LB. Los pellets se lavaron con solución fisiológica estéril y luego se resuspendieron en 1 ml de buffer de reacción.
- ✓ Luego, las células se rompieron por ultrasonido utilizando un desintegrador ultrasónico (Cole and Palmer, serie 4710, 600 W), con una punta de 6 mm. Para ello se sometió a las muestras sumergidas en hielo a dos pulsos de 15 seg. cada uno (amplitud aproximada: 10 micrones).

- ✓ A posteriori, se centrifugaron las muestras en frío a 10.000 r.p.m., transfirióse el sobrenadante a un tubo limpio que se conservó en hielo hasta el momento de las determinaciones.
- ✓ Para la medición de las diferentes actividades enzimáticas, se colocaron en tubos de vidrio las siguientes soluciones.

### β-CETOTIOLASA

	MUESTRA	BLANCO
Buffer de reacción.....	1.5 ml.....	1.5 ml
Acetoacetil-S-CoA 8 mM .....	10 µl.....	-----
Extracto crudo.....	10 µl.....	-----
Agua destilada.....	1.43 ml.....	1.44 ml
Se incubaron los tubos dos minutos a 30°C y se midió la absorbancia inicial a 303 nm. Luego se agregó para largar la reacción.		
CoA-SH 3.44 mM.....	50 µl.....	50 µl

### TIOLASA II

	MUESTRA	BLANCO
Buffer de reacción.....	0,6 ml.....	0,6 ml
Acetoacetil-S-CoA 2 mM.....	6,0 µl.....	-----
Extracto crudo.....	10 µl.....	-----
Se incubó la mezcla dos minutos a 30°C y se midió la absorbancia inicial a 303 nm. Luego se agregó para largar la reacción:		
CoA-SH 9,66 mM.....	6,0µl.....	6,0 µl

### AA-S-CoA TRANSFERASA

	MUESTRA	BLANCO
Buffer de reacción.....	0,6ml.....	0,6 ml
Acetil-S-CoA 20 mM.....	6,0 µl.....	-----
Extracto crudo.....	10 µl.....	-----
Se incubó la mezcla dos minutos a 30°C y se midió la absorbancia inicial a 303 nm. Luego se agregó para largar la reacción:		
Acetoacetato 1M.....	6,0 µl.....	6,0µl



- ✓ Inmediatamente que se agregó el sustrato para comenzar cualquiera de las reacciones, se comenzó a medir en intervalos de 15 segundos la absorbancia a 303 nm durante un total de 5 minutos o hasta observar estabilización de la absorbancia.
- ✓ En el caso de las tiolasas lo que ocurría era una disminución en la absorbancia a 303 nm, en cambio, para la AA-S-CoA transferasa lo que se detectaba era el incremento de la absorbancia esa longitud de onda.
- ✓ Se definió como 1 U enzimática a la cantidad de proteína requerida para detectar disminución o aumento de 0.01 unidades de absorbancia a 303 nm por minuto a 25°C.
- ✓ Los coeficientes de extinción molecular para las diferentes reacciones fueron:  
 Para  $\beta$ -cetotiolasa  $\epsilon = 1,268 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Feingebaum y Schultz, 1975).  
 Para Tiolasa II  $\epsilon = 1,69 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Feingebaum y Schultz, 1975).  
 Para AA-S-CoA transferasa  $\epsilon = 1,19 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (Feingebaum y Sramek, 1975) .

## ♣ DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS

### ◆ Método de Lowry

- ✓ Se utilizaron entre 10 y 100  $\mu\text{l}$  de extracto crudo, a los que se agregó agua destilada hasta completar 0.5 ml.
- ✓ Las soluciones empleadas para este ensayo fueron:
  - A)  $\text{CO}_3 \text{ Na}_2$  2% en NaOH 0,1 M
  - B)  $\text{SO}_4\text{Cu} \times 5\text{H}_2\text{O}$  1%
  - C) Tartrato de Sodio y Potasio 2%
- ✓ Con las reactivos anteriores se preparó una solución conteniendo 100 partes de A + una parte de B + una parte de C (solución D)
- ✓ Para la medición se preparó la siguiente mezcla en un tubo de ensayo
  - 0,5 ml de muestra
  - 2,5 ml de Sol D
  - Se mezcló bien y se dejó 10 min.
- ✓ Luego se agregó 0,25 ml de Reactivo de Folin-Ciocalteu 1M, se agitó bien y se dejó 30 min. Finalmente se midió la absorbancia a 620 nm

- ✓ La cantidad de proteínas se estimó de acuerdo a una curva de calibración hecha con BSA (Sigma fracción V). (Lowry, 1951).

## ♣ **DETECCION DE LOS ACIDOS GRASOS DE CADENA CORTA EN EL SOBRENADANTE DE LOS CULTIVOS**

Para el análisis de la producción de ácidos en el sobrenadante de los cultivos, se utilizó un método de detección de ácidos grasos volátiles.

- ✓ El sobrenadante extracelular de los cultivos crecidos en las condiciones descritas para cada experimento, fueron liofilizados para concentrar las muestras.
- ✓ A 1 ml de sobrenadante concentrado, se lo mezcló en tubo con 0,2 ml de una sol.de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,4 gr de NaCl y 1 ml de ditetiléter.
- ✓ La mezcla se agitó bien por inversión del tubo 20 veces.
- ✓ Se centrifugó para romper la emulsión y dividir en dos fases la mezcla.
- ✓ Se separó la fase orgánica (ditetiléter) de la acuosa con mucho cuidado, y se le agregó 0,3 gramos de Cl<sub>2</sub>Ca para remover el agua restante.
- ✓ Los productos disueltos en la fase orgánica, se determinaron por cromatografía gaseosa en un cromatógrafo Gow Mac serie 580, equipado con detector de llama y una columna de vidrio de 1,80 mts. rellena con una matriz 10% Sp 1000-1% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> en Chromosorb WAW (malla 100/120)
- ✓ Las temperaturas de la columna, detector e inyector fueron: 120°C, 170°C y 150°C° respectivamente

## ♣ **MANIPULACION DEL ADN**

Todos los reactivos utilizados en las diferentes técnicas de Biología fueron proveídos por las siguientes compañías: Sigma Aldrich (grado biología molecular), Gibco-BRL, Promega, New England Biolabs.

### ◆ *Extracción de ADN plasmídico*

A partir de cultivos de *E. coli* crecidos toda la noche se aislaron los diferentes tipos de plásmidos. El protocolo utilizado tiene las cantidades de reactivos para un pellet proveniente de 5 ml de cultivo. Para obtener mayores cantidades de ADN se utilizaron pellets provenientes de 50 hasta 500 ml de cultivo, aumentando las cantidades de reactivos proporcionalmente.

- ✓ El pellet de cultivo bacteriano se resuspendió en 200 µl de solución I (sacarosa 20%, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 7,5)
- ✓ Luego se agregó 400 µl de solución II (OHNa 0.2 N, SDS 1% ), se incubó 5 minutos en hielo.
- ✓ En el siguiente paso se agregó 300 µl de solución III (acetato de potasio 3M pH 4,5-4,8 ) , se incubó nuevamente en hielo 5 minutos, y se centrifugó a 11000-12000 g durante 30 minutos.
- ✓ Se pasó el sobrenadante a un tubo limpio, se agregó 600 µl de isopropanol y se incubó a -20 °C durante 2 horas.
- ✓ Se centrifugó a 11000 g, descartando el sobrenadante. El pellet bien seco se resuspendió entre 20 µl - 50 µl de buffer TE o agua bidestilada estéril.
- ✓ Alternativamente se hizo un tratamiento para eliminar el ARN agregando RNAsa A 10 µg/ml en la Solución I.

- ✓ Para eliminar la RNAsa y las demás proteínas presentes en la preparación se hizo una doble extracción con un volumen de fenol saturado con Tris-HCl pH 8 y luego otra doble extracción con cloroformo:isoamílico 24:1.
- ✓ Finalmente se precipitó la fase acuosa agregando acetato de sodio 3M pH 5,2 1/10 del volumen de muestra y 0,6 volúmenes de Isopropanol, luego se incubó a -20°C y se centrifugó a 11000 g para sedimentar el ADN (Sambrook J. *et al*, 1989)

◆ ***Aislamiento de ADN genómico de B. megaterium***

Con el objetivo de obtener suficiente cantidad de ADN cromosómico para utilizar en la técnica de Southern o PCR, se partió de 200 ml de LB de un cultivo exponencial de *B. megaterium*.

- ✓ El cultivo se centrifugó y el pellet se lavó con 50 ml TE.
- ✓ Se resuspendió en 10 ml de solución I (sacarosa 25%, Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 1 mM) en hielo.
- ✓ Se agregaron 0.25 ml de lisozima a una concentración de 40 mg/ml en solución I, y luego de 5 minutos se adicionó secuencialmente: 50 µl de proteinasa K 20 mg/ml, 2 ml de EDTA 0.5 M y 1.25 ml de Sarkosyl 10%.
- ✓ Se dejó la mezcla en hielo hasta completar la lisis (unas 2 hs), se cubrió el tubo con papel de aluminio y se incubó a 50°C durante toda la noche.
- ✓ se precipitó el ADN agregando acetato de sodio 3M pH 5,2 usando 1/10 del volumen de muestra y 0,6 volúmenes de isopropanol, luego se incubó a -20°C y se centrifugó a 11000 g para sedimentar el ADN (Hull *et al*, 1981).

◆ ***Técnicas generales de Biología Molecular.***

- ✓ Las cepas de *E. coli* fueron crecidas, para las diferentes técnicas de biología molecular, en medio LB suplementado con los antibióticos adecuados para cada circunstancia de acuerdo a lo descrito en la tabla de antibióticos.
- ✓ Para el corte específico de la molécula de ADN, se utilizaron enzimas de restricción de varios fabricantes, principalmente Gibco BRL, Promega, New England Biolabs. Se digirió el ADN con la/s enzima/s de restricción adecuada/s según las indicaciones del fabricante.
- ✓ El ADN digerido se corrió en geles de agarosa sumergidos en buffer TAE o TBE. Para la separación de fragmentos y plásmidos la concentración de agarosa utilizada en los geles fue de entre 0.8 y 1%, y las condiciones de corrida utilizadas fueron de 75 a 100 volts durante 3 a 4 hs.
- ✓ Una vez finalizada la corrida electroforética, los geles se tiñeron por inmersión en una solución de bromuro de etidio 50 µg/ml durante 20 a 30 minutos a temperatura ambiente. El ADN se observó en un transiluminador de luz ultravioleta de 320 nm (Photodyne), y los geles se fotografiaron utilizando una cámara polaroid con filtro rojo y película blanco y negro (Polaroid 667).
- ✓ Para las ligaciones se utilizó la enzima T4 DNA-ligasa (Gibco-BRL) y para las reacciones de PCR se utilizó la Taq Polimerasa (Gibco-BRL, Promega), siguiendo las especificaciones del fabricante.
- ✓ Los fragmentos de PCR se clonaron en el vector pCRII (Invitrogen) y pGEM T Easy (Promega) de acuerdo a lo especificado por los fabricantes.

#### ◆ **Transformación de *E. coli***

Se utilizó un método de transformación de alta eficiencia descrito por Hannahan *et al* (1991) que consiste en primero formar las células competentes por el siguiente método:

- ✓ El cultivo de la cepa adecuada de *E. coli* fue crecido durante toda la noche en medio LB o PSIB se utilizó como inóculo (50-200 µl) de un nuevo cultivo que se creció en 50 ml de medio PSIB durante 3-4 hs.
- ✓ Luego de centrifugar (en frío), se resuspendió el pellet en 16 ml solución fría de TFB1, se dejó 5-10 min. en hielo.
- ✓ A posteriori se centrifugó y resuspendió en 2 ml de solución fría de TFB2, se dejó en hielo 15 min. y luego de alicuotar en varios tubos eppendorf, se guardaron las células competentes a -70°C.

Para transformar se utilizó el método de shock térmico:

- ✓ Se tomaron 50 µl de células competentes, y se las mezcló con 5 µl de ADN (1-300 ng), dejando la mezcla 30-40 min. en hielo.
- ✓ Luego se les dio un shock térmico de 42-45°C durante 120 seg., se colocaron en hielo 3-5 min. y se las diluyó en 0.5 ml de caldo LB, incubándose 1hs a 37°C.
- ✓ Finalmente se plaquearon a las transformantes en medio LB suplementado con los antibióticos correspondientes, X-gal e IPTG.

#### ◆ **Aislamiento de los diferentes tipos de fragmentos de ADN.**

Se aplicó el sistema GeneClean para la purificación de diversos fragmentos de ADN (productos de PCR, productos de digestión con enzimas de restricción), que luego se utilizaron para los diferentes clonados y subclonados. Este sistema consiste en la adsorción del ADN a vidrio molido o pulverizado resuspendidos en una Solución de INa 6 M.

- ✓ Primero se corrieron los fragmentos de ADN en geles de agarosa, luego de la electroforesis, se localizaron las bandas a eluir, se cortaron trozos pequeños del gel conteniendo los fragmentos de ADN deseados, y se colocaron dentro de tubos eppendorf

- ✓ A cada eppendorf con su trozo de agarosa y se le agregó 1ml de solución INa (45% p/v INa, 1% p/v Na<sub>2</sub> S<sub>2</sub> O<sub>3</sub>), y se lo incubó a 50°C durante 5-10 min., luego se agregó 5 µl de glass-milk (es una matriz a base de silica) y se dejó en hielo durante 30 min.
- ✓ Posteriormente se centrifugó 30 seg. a máxima velocidad y se lavó el pellet en 1 ml de solución NEW (50% v/v etanol, 0.1M NaCl, 10 mM Tris, pH 7,5, 1 mM EDTA), este paso se repitió 3 veces.
- ✓ Después del último lavado, el pellet se secó en vacío, y se resuspendió en 10 µl de agua bidestilada, se incubó a 37°C durante 1 hora para desprender el ADN del vidrio, luego se volvió a centrifugar y se tomó el sobrenadante.

#### ◆ *Experimento de Southern*

- ✓ Las muestras de ADN se cortaron con las enzimas de restricción adecuadas y se sometieron a electrofóresis en un gel de agarosa de 11 x 14 cm. Una vez finalizada la corrida, se desnaturalizó el ADN en el gel, sumergiéndolo en 400 ml de una solución de ClNa 1.5 M, OHNa 0.5 M, durante 40 minutos y agitándolo muy suavemente. Luego se renaturalizó repitiendo el tratamiento con una solución de ClNa 1.5 M, Tris-HCl 1M pH 8.
- ✓ Se transfirió el ADN del gel a una membrana de Nylon 1 por capilaridad durante toda la noche. Se utilizó como buffer de transferencia SSC 20X
- ✓ Una vez finalizada la transferencia, sin despegar la membrana del gel, se marcó con un lápiz la ubicación de los pocillos de siembra sobre la membrana, se desprendió el gel y se lavó la membrana durante 10 minutos en 200 ml de SSC 2X con agitación lenta. Por último se fijó el ADN a la membrana homeándola entre papeles de filtro a 80°C durante 2 hs.
- ✓ El siguiente paso fue la prehibridización de la membrana en bolsita de plástico gruesa. Para ello se agregó aproximadamente 0.1 ml de solución de prehibridización por cm<sup>2</sup> de membrana
- ✓ La bolsita se selló por calor y se incubó a 45°C con agitación suave durante la noche.
- ✓ Al finalizar la prehibridización se cambió la membrana a una bolsita nueva, a la que se agregó aproximadamente la misma cantidad de solución de prehibridización que en el



paso anterior pero suplementado con ADN de espermatozoos de salmón (100 µg/ml), y luego 15 picomoles de sonda marcada radiactivamente por membrana.

- ✓ Ambos ADN fueron previamente desnaturalizados calentándolos 5 minutos a 100°C y poniéndolos rápidamente en hielo.
- ✓ La sonda consistió en un oligonucleótido marcado radiactivamente con ATP $\gamma$ 32 en su extremo 5' terminal. Para este marcado se utilizó la enzima Polinucleótido Kinasa (Gibco-BRL) de acuerdo a las especificaciones del fabricante.
- ✓ Se utilizaron las siguientes sondas:

Oligonucleótido de la proteína asociada a gránulo de 40 kDa:

5'gCAATTCATATgTACAAgAA3'

Oligonucleótido de la proteína asociada a gránulo de 22 kDa

5'gT(g/T)AA(g/A)TATgATAC(g/A/T/C)gT(g/T)ATTgATgCAATg3'

- ✓ Ambos surgieron de la secuenciación de los extremos aminoterminales de las respectivas proteínas asociadas a gránulos y se utilizó el uso de codones de *B. megaterium*
- ✓ Finalmente se realizó la hibridización sellando la bolsita por calor una vez que se eliminaron las burbujas y se incubó a 45°C con agitación lenta durante la noche.
- ✓ Luego de la hibridización se lavó la membrana para eliminar la sonda unida inespecíficamente. Para ello se realizó los siguientes lavados, utilizando aproximadamente 10 ml de solución por cm<sup>2</sup> de membrana:

- 1) SSC 2x SDS 0,1% 3 minutos a temperatura ambiente, 2 veces
- 2) SSC 0,2x SDS 0,1% 3 minutos a temperatura ambiente, 2 veces
- 3) SSC 0,2x SDS 0,1% 15 minutos a 50°C, 2 veces

- ✓ Por último se enjuagó la membrana con SSC 2X, y se procedió a la exposición de la misma, sobre films de Rayos X Kodak X OMAT durante 3 a 7 días de acuerdo al nivel de radioactividad detectado en la membrana. Luego se procedió a la visualización por revelado fotográfico de dichas autoradiografías.

◆ ***Secuenciación del ADN***

- ✓ El secuenciamiento de los clones fue realizado en ambas direcciones por métodos manual y automáticos.
- ✓ Para el método manual fue utilizado el fmol ADN Sequencing System (Promega) según lo especificado por el fabricante.
- ✓ El secuenciamiento automático se realizó a través de servicios de secuenciación para ello se proveyó el ADN de acuerdo a las condiciones especificadas por el prestador del servicio y se utilizó el sistema ABI 373 A (Perkin Elmer).
- ✓ Las secuencias fueron procesadas usando el programa DNASIS y se enviaron para la búsqueda de homologías a las bases de datos Swissprot y Genebank. El programa utilizado para analizar estas homologías fue el BLAST.

◆ ***Protocolo de PCR***

- ✓ Para las reacciones de PCR se utilizó el siguiente programa:  
T<sub>0</sub>: 95°C 3 minutos (desnaturalización inicial).
- ✓ Luego se realizaron 35 ciclos en las siguientes condiciones:  
T<sub>1</sub>: 92°C 30 seg.  
T<sub>2</sub>: 45°C 45 seg.  
T<sub>3</sub>: 72°C 60 seg.
- ✓ Finalmente se realizó una extensión de los productos de PCR  
T<sub>5</sub>: 72°C 10 min.

- ✓ Se utilizaron los siguientes primers para las reacciones de amplificación:

P1 (*YqiT*): 5' CKYCGTTCCGCCWAgYgCC 3'

P2 (*PbtIBm*): 5' CggAgCAAACgAAAgAATgA 3'

P3 (*PbtBS*): 5' TCTCggTgTCAgCATTCg 3'

P4 (*PbtCBm*): 5' CATggTgTgCAATTTgTTg 3'

## ♣ CONJUGACION

Se utilizó el clon de *E. coli*, con la construcción pAT18-*ActBm* (plásmido denominado pS14), para realizar las diferentes conjugaciones forzadas a través de membrana de filtración. Fueron conjugadas con la cepa de *E. coli* UBA 6-27 las cepas *B. megaterium* PV447 y *E. coli* UBA 6-24, 6-25, 6-26.

- ✓ La cepa dadora (UBA 6-27) fue crecida durante toda la noche en medio LB suplementado con Er 100 µg/ml, las cepas receptoras fueron crecidas hasta fase exponencial tardía en LB o LB Amp 100 µg/ml de acuerdo a las resistencias que portaba cada una ellas.
- ✓ Luego, se mezclaron 1 ml de la cepa dadora y receptora en una jeringa estéril de 5 ml, esta mezcla se filtró sobre membranas Milipore de 2,5 cm de diámetro y 0.45 µm de tamaño de poro.
- ✓ El filtro con la mezcla de las dos cepas se colocó en una placa de LB y se la incubó a 32°C durante 4 Hs (para que se pueda realizar la conjugación).
- ✓ A posteriori se pusieron cada uno de los filtros en donde procedía la conjugación en los diferentes medios de selección, en el caso de *B. megaterium* se utilizó una placa con medio mínimo de este microorganismo suplementada con Er 5 µg/ml, para las conjugaciones con las cepas de *E. coli* portadoras de los plásmidos con los diferentes fragmentos de genes *pbt*, las placas de selección fueron de medio LB Er 150 µg/ml Amp 100 µg/ml. Finalmente se pusieron todas las placas a 32°C.
- ✓ Las colonias crecidas sobre los filtros fueron repurificadas en los mismos medios de selección y luego se verificó la presencia de los plásmidos.

## ♣ MUTAGENESIS CON N-METIL N'-NITRO N-NITROSOGUANIDINA

- ✓ Se cultivo a la cepa de *B. megaterium* en 10 ml de medio LB hasta que creció a una  $D.O_{.600} = 1$ .
- ✓ El cultivo se centrifugó, y luego se resuspendió en una solución de N-metil N'-nitro N-nitrosoguanidina 100  $\mu\text{g/ml}$  en Citrato de Na 100 mM pH 5,5.
- ✓ Se incubaron las células en esta solución durante 30 minutos a 30°C.
- ✓ A posteriori se lavaron dos veces las células con una solución de buffer Fosfato 100 mM pH 7 y una vez con medio LB.
- ✓ Finalmente, se volvieron a crecer las bacterias en medio rico según el esquema mostrado en los resultados sobre la obtención de mutantes Pbt.

# RESULTADO

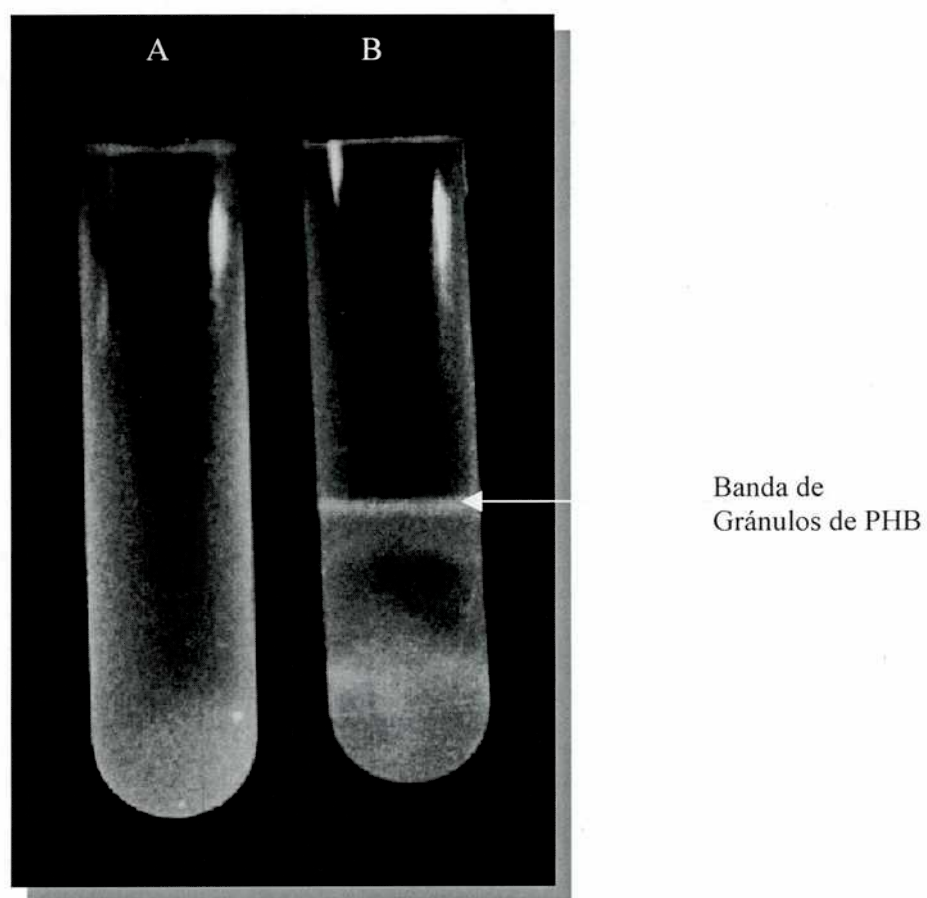
## **ANÁLISIS DE LAS PROTEÍNAS ASOCIADAS A GRANULOS**

Dado que el objetivo principal de la tesis fue el análisis de los factores involucrados en el metabolismo del PHB en *B. megaterium* PV447, el primer paso que se realizó fue purificar gránulos donde se acumula el biopolímero a fin de obtener un patrón de proteínas unidas a los mismos, para luego clonar los genes que codifican para dichas proteínas mediante genética reversa o por medio de primers apropiados utilizando la técnica de PCR.

Para lograr este objetivo se cultivó este microorganismo en caldo LB suplementado con 1% gluconato que es un medio donde acumula hasta un 20% de PHB (G. Vazquez seminario de licenciatura, 1993), luego se rompieron las células por French Press y finalmente se purificaron los gránulos por el método de centrifugación a través de gradiente de glicerol discontinuo.

Por esta metodología se visualizó una banda en el tubo después de la ultracentrifugación, que se supuso correspondía a los gránulos de PHB. Esta banda no se observa en preparaciones similares de la cepa *B. megaterium* UBA 30-20 que no acumula PHB (Figura 1).

*Figura 1: Preparación de gránulos PHB provenientes de dos diferentes cepas de B. megaterium*



- A) Preparación de gránulos cepa *B. megaterium* UBA 30-20 PHB-
- B) Preparación de gránulos cepa *B. megaterium* PV447 PHB+

Para comprobar que dicha banda fuera de gránulos de PHB, luego de su aislamiento, se procedió a su análisis para determinar su composición, por metanólisis y posterior cromatografía gaseosa, detectándose un único pico correspondiente a PHB (dato no mostrado).

También se midió la actividad de la enzima PHB-sintasa, en la suspensión de gránulos ya que ésta es una de las proteínas mayoritarias del gránulo y se la encuentra únicamente asociada a los mismos una vez que comienza el proceso de acumulación, por ende se lo utilizó como un indicador de purificación de gránulos (**Tabla 1**)

**Tabla 1:** Medición de la actividad enzimática de la enzima PHB-sintasa

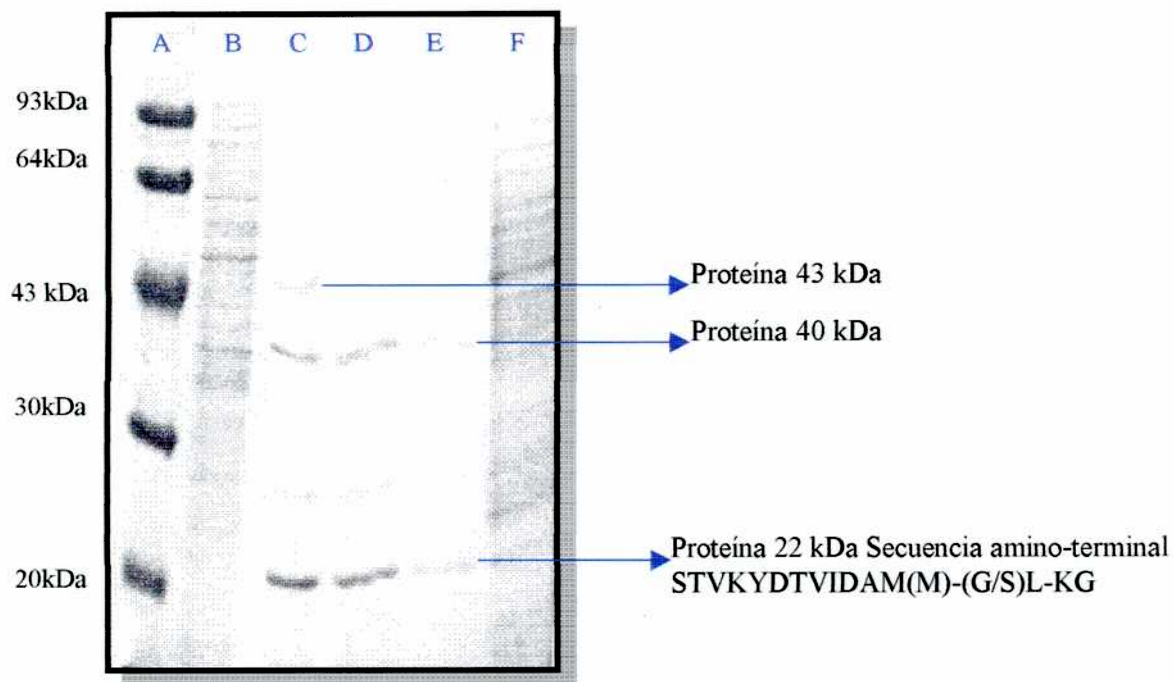
	<b>Proteínas mg/ml</b>	<b>Act. Específica U/mg prot.</b>
<b>Extracto crudo</b>	10	0,13
<b>Gránulos</b>	0,1	28

Como se ve de la tabla el factor de purificación de la PHB sintasa fue de 215 veces.

Una vez establecido que la banda obtenida era de gránulos de PHB, el siguiente objetivo fue establecer que tipo de proteínas estaban asociadas a los mismos.

Como se observa en la **Figura 2**, el patrón de proteínas en una corrida en SDS-PAGE 11% gel separador, muestra 3 bandas intensas: una proteína de 22 kDa cuyo extremo amino-terminal ya había sido secuenciado en otra cepa de *B. megaterium* (Steinbüchel, dato no publicado **Fig. 2**) y dos bandas correspondientes a proteínas de tamaño cercano a 40 kDa y 43 kDa respectivamente.

**Figura 2:** SDS-PAGE para visualizar el patrón de proteínas asociadas a los gránulos de PHB



**Figura 2:** Calle A) Marcadores de Peso Molecular  
Calle B-F) Extracto Crudo  
Calle C) Preparación Gránulos PHB 10  $\mu$ l  
Calle D) Preparación Gránulos PHB 5  $\mu$ l  
Calle E) Preparación Gránulos PHB 1  $\mu$ l



Con esta información, se encaró la metodología directa de obtener la secuencia del extremo aminoterminal de estas proteínas y así poder generar una sonda adecuada para la búsqueda de los genes por medio de la genética reversa.

Se sabía por experimentos anteriores, que en el caso de *B. megaterium* existe un factor lábil asociado a los gránulos. Este factor de tamaño estimado en 43 kDa, que es fácilmente extraíble de los mismos utilizando soluciones alcalinas suaves. También se demostró que interviene en la síntesis de PHB. (Merrick *et al*, 1965).

Por ende, la proteína de 43 kDa que se observó en el gel de la figura 2, muy probablemente haya sido este factor lábil, que como se dissociaba más fácilmente del gránulo se lo vio en menor cantidad en el gel. La proteína de 40 kDa no se sabía que función podría cumplir.

La secuenciación se encaró haciendo la transferencia de las proteínas desde el gel a membranas de Inmovilon, se cortaron las membranas en la zonas donde se habían fijado las proteínas y luego se enviaron secuenciar al Institut für Physiologische, Chemie und Pathobiochemie de la Universidad Wesfälische Wilhems de la ciudad de Münster, en Alemania.

Con este procedimiento sólo se logró secuenciar la proteína de 40 kDa, no la de 43 kDa probablemente debido a un problema de que esta proteína estuviera bloqueada.

La secuencia de la proteína de 40 kDa que se obtuvo fue la siguiente:

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

A-I-P-Y-V-Q-E-()-()-K)

(K) aminoácido más probable. (G. Vazquez , 1996)

Cuando se comparó las secuencias de los extremos aminoterminales de ambas proteínas (22 kDa y 40 kDa), con las proteínas presentes en los diferentes bancos de datos (se utilizó el programa BLASTP), no se encontró homóloga con alguna de ellas.

Entonces, con los datos de las secuencias de las dos proteínas (la de 22 kDa y 40 kDa), se sintetizaron sendos oligonucleótidos para buscar estos dos genes por hibridización en colonias, de diferentes bibliotecas genómicas en construcción. Pero primero se realizó un southern, con estas dos sondas, para determinar cuales eran las bandas de hibridización en el ADN genómico de *B. megaterium* cortado con la enzima de restricción *Pst*I y también se

hibridizó con otros plásmidos obtenidos anteriormente en nuestro laboratorio, en donde se supuso que había genes involucrados en el metabolismo del PHB.

Como se ve en la **Figura 3**, el southern muestra señales positivas con la sonda de la proteína de 22 kDa en las calles del ADN genómico cortado con diferentes enzimas de restricción, pero también muestra una señal muy fuerte en la calle con el plásmido denominado pBMe3 cortado con la enzima de restricción *Pst*I. Estas señales no se repitieron en los plásmidos, cuando se hibridizó con la sonda de la proteína de 40 kDa.



## ♣ SECUENCIACIÓN DEL PLASMIDO pBMe3

Este plásmido surgió de la búsqueda de los genes *phb* por “rastreo enzimático”, esta estrategia de clonado se basa en la identificación de clones, dentro de diferentes bibliotecas genómicas, que expresen la actividad de la enzima que se desea buscar. Para ello, generalmente se realizan determinaciones enzimáticas de grupos de clones, que en el caso de la búsqueda de los genes PHB la enzima de elección es habitualmente la  $\beta$ -cetotilasa, ya que la actividad de esta enzima se determina de manera relativamente sencilla y sensible. Además, en *E. coli* existen dos genes de este tipo pero ambos son inducibles por ácidos grasos de cadena corta o larga. De esta manera se detectaron los genes biosintéticos del PHB en *R. eutropha*. (Slater *et al*, 1988)

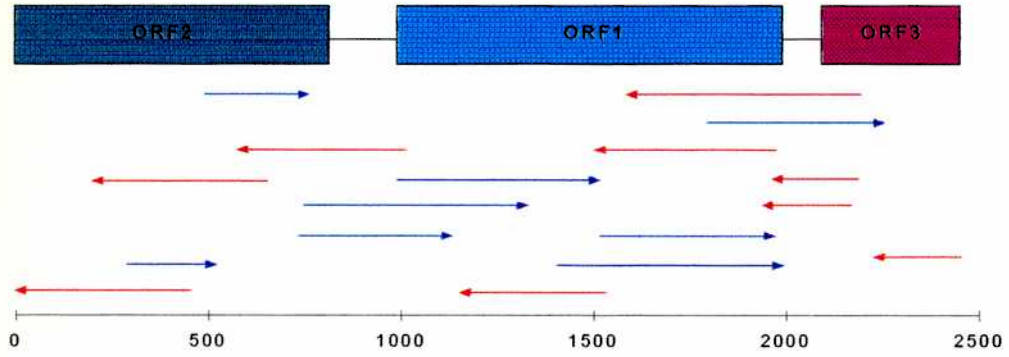
Del análisis por rastreo enzimático de una biblioteca genómica de *B. megaterium* en *E. coli*, se detectó un clon que tenía actividad de  $\beta$ -cetotilasa constitutiva, el plásmido que portaba se lo denominó pBMe3 (Tesis doctoral de Julia Pettinari, 1994). En principio, se supuso que se había clonado la primera enzima de la ruta metabólica de la síntesis de PHB, y con la señal positiva en el Southern de la **figura 3** sobre este plásmido con la sonda de la proteína de 22 kDa, se pensó que había un conjunto de proteínas capaz de movilizar PHB en *B. megaterium*, con sus genes organizados en un posible operón y ya clonadas en este plásmido. Es por toda esta información que se decidió secuenciar este plásmido.

Al secuenciar la mayor parte del inserto contenido en el plásmido pBMe3, se encontraron 3 posibles marcos de lectura abierto (ORFs) (**Figura 4**). El contenido en G+C de los mismos tomados en conjunto es del 40%. *B. megaterium* tiene un contenido en G+C de entre el 36.5%-47.4%, por lo tanto el valor obtenido está comprendido dentro del rango esperado para esta especie bacteriana.

La comparación de las secuencias proteicas derivadas de los 3 ORFs clonados en el plásmido pBMe3 contra las secuencias de proteínas de los diferentes bancos de datos mostró los siguientes resultados:

- ✦ El producto del primer marco de lectura, presentaba una alta homología con reguladores-activadores dependientes de  $\sigma^{54}$ , en particular con AtoC. (ORF1).
- ✦ un segundo ORF río arriba del activador codificaba para una proteína que presentaba una alta homología con la proteína sensora AtoS de *E. coli*.(ORF2)
- ✦ por último se encontró río abajo del ORF1, un marco de lectura truncado cuyo producto posee homología con la fosfobutiltransferasa de *Clostridium acetobutylicum*, denominada Pbt. Este ORF esta precedido por un promotor del tipo  $\sigma^{54}$  (ORF3) **(Figura 4)**.

*Figura 4: Esquema de la secuenciación del inserto en el plásmido pBMe3*



## ☛ MARCO DE LECTURA 2 (ORF2): POSIBLE PROTEINA SENSORA

La secuencia del ORF2 se puede ver en la **Figura 5**

**Figura 5:** secuencia del ORF2

```
CTATTAAGTTGAAAAGGGTAAAAAATATGCCAAATGTGTTGATTGTTGGAGGAGGAAAAG
      M P N V L I V G G G K G
GCGGATTACCTATTCTGAAAATCCTGTTGGAAACCGAATTTATGAAAGTGATTGGTGTAG
  G L P I L K I L L E T E F M K V I G V V
TAGACGTACGAGCTAACGCACCGGCTGTTTTGCATGCGCAAGAACAAGATATTTCAACCG
  D V R A N A P A V L H A Q E Q D I S T G
GAATGAATTGGGAGCCTTATATGACAAAGCAGCTCGATGTCATTGTTGAAACAACAGGTA
  M N W E P Y M T K Q L D V I V E T T G K
AACAAGGCGTCTTCAACAATTGCAAAGAAGCAAACCCGCTGATGCACTGGTAGTACCGG
  Q G V F Q Q L Q R S K P A D A L V V P G
GATTGGTTGCTGAAATTATGGCCAATCTGATGGAGGAAAAGAAGAGTTAATTCAGCGGT
  L V A E I M A N L M E E K E E L I Q R L
TAAAGCAAGAATCGTATAAATATGATCTTATTTTTAACGCGGCTCATGATGCGATGGTTCG
  K Q E S Y K Y D L I F N A A H D A M V V
TGATTGATAGGAATGGATATATTACGCTATTTAATCAAAGTGCTGAGCGTTTGACGAACT
  I D R N G Y I T L F N Q S A E R L T N F
TTTCACACAGAGATGTAATTGGTAAGCATCTTCATAAAGTCATTCCAAATAGTAAACTTG
  S H R D V I G K H L H K V I P N S K L V
TTGATGTTCTTCATACAAAACGATTGATCAAATAGTGAATTTGTGTTAGATAGCGGAC
  D V L H T K T I D Q N S E F V L D S G R
GCAAGGTAATTACGACTAGAATACCAATACTCGACGAGAATGGAGAGCTGTTTGGGGCCT
  K V I T T R I P I L D E N G E L F G A F
TTTCGATTTTTAAAGATATTACGGACGTTGTCGGATTGGCAGAAGAAGTTACGGAACTTA
  S I F K D I T D V V G L A E E V T E L K
AAAGAAGTACAACTATGCTTCAAGCTATTATTCAATCTTCTGAAGAAGCTATTTCCGTT
  R S T N Y A S S Y Y S I F *
```

El análisis de la secuencia de aminoácidos deducida para el ORF2 indicó que la proteína codificada en este marco de lectura posee una homología alta con el producto del gen *atoS* que es una proteína sensora perteneciente a la familia de las histidín-kinasas. También posee una homología con otras proteínas sensoras (**Tabla 2**).

**Tabla 2:** Homología del dominio carboxilo terminal del ORF2 con respecto a otros sensores

PROTEINAS SENSORAS	HOMOLOGIAS EN LA REGION CARBOXILO TERMINAL	
	Identities	Similitudes
AtoS <i>E. coli</i>	26%	46%
DcuS <i>E. coli</i>	24%	44%
FixL <i>Bra. ja</i>	22%	40%
FixL <i>Azo. ca.</i>	22%	35%
NtrY <i>Azo. ca</i>	20%	35%

AtoS *E. coli*: probable proteína sensora del sistema de regulación del operón *ato* constituido por 2 componentes AtoS / AtoC (Canellakis *et al*, 1993).

DcuS *E. coli*: probable proteína sensora del sistema de regulación involucrado en la regulación del metabolismo de los compuestos C4; constituido por 2 componentes DcuS/DcuR (Zientz *et al*, 1993).

FixL: posible proteína sensora de oxígeno *Bra.ja. Bradyrhizobium japonicum* (Anthamatten y Hennecke, 1991); *Azo. Ca. Azorhizobium caulinodans* (Kaminski y Elmerich, 1991)

NtrY *Azo ca*: probable proteína sensora involucrada en el control del nivel de nitrógeno intracelular; constituido por dos componentes NtrY/NtrX (Pawlowski *et al*, 1991).

Dentro de las proteínas sensoras se pueden observar dos familias, la primera corresponde a los sensores pertenecientes a los pares de proteínas transductoras de señales sensor-regulador, la segunda familia son los sensores involucrados en las diferentes cascadas de fosforilación. Ambos tipos se diferencian en los residuos de fosforilación, para los primeros es una histidina, para los segundos pueden ser varios tipos de aminoácidos siendo el principal el ácido aspártico.

Estas dos clases de sensores están estructurados en 2 dominios característicos:

- ◆ El *dominio aminoterminal* que es el encargado de sensar las diferentes variaciones de las condiciones intra o extracelulares. Esta región no esta conservada entre los diversos sensores, justamente por los diferentes tipos de señales que se pueden sensar.



- ◆ El *dominio carboxiloterminial* es el encargado de la interacción proteína-proteína y también es la región donde se encuentran los sitios de fosforilación, esta región está bastante conservada entre los diferentes tipos de sensores.

Las principales características de este posible sensor deducidas de su secuencia son:

- ✓ Posible sitio de autofosforilación en la histidina 127, deducido por comparación con otros sensores histidina-quinasa. (Albright *et al*, 1989)
- ✓ Es una proteína soluble, sin regiones transmembrana.
- ✓ Con varios posibles sitios para diferentes tipos de fosforilación.
- ✓ En su extremo amino terminal presenta una región (del aminoácido 9 al 49) con homología con un bloque de aminoácidos característicos de las Acyl-S-CoA dehidrogenasas.
- ✓ También presenta una posible región de miristoilización.

Todo esto fue determinado utilizando el programa MOTIF al que se accedió a través de Internet debido a que se encuentra en la base de datos y programas de biología molecular de Genome Net de la Universidad de Kyoto, Japón.

Estos resultados nos muestran que el producto ORF2 podría ser una proteína sensora perteneciente a la familia de las histidina-quinasas. Si bien no se ha determinado la función de este gen en *B. megaterium*, es poco probable que esta proteína con homología al Ato S cumpla el mismo tipo de función en *B. megaterium*, principalmente porque no posee las regiones transmembrana que sí posee la proteína de *E. coli*.

☛ **MARCO DE LECTURA 1 (ORF 1): ACTIVADOR ActBm**

Dentro del inserto clonado en el plásmido pBMe3, el primer marco de lectura detectado es el que se denominó ORF1, precediendo a la secuencia codificante del mismo, hay un posible RBS y una posible secuencia promotora, ambas determinadas por comparación con otras secuencias obtenidas de *B. megaterium* (Figura 6).

**Figura 6:** Secuencia del ORF1: en colores están las posibles secuencias promotoras y el posible RBS

```

ATACGAGAATTACGGGTTTAAAAAAGACGGATATTATTGGTC-35AGCCCGCGACTGCCGATA
TCTC-10TAAAGGAGACAGTATGCACATGAAGGTGCTGCAAACAAGGCGTCCTGTTTCGAGGTG
      (RBS)      M H M K V L Q T R R P V R G V
TAAGGATGAGGCTCGGTCCGAGTAAAAGAGACGTAGTTGTGAATGTTGCACCCGTTATTG
  R M R L G P S K R D V V V N V A P V I V
TTGATGGAAAATTTAAAGGCAGCGTTGGCGTTATTCATGATATGTCTGAAATTCAAGAGC
  D G K L K G S V G V I H D M S E I Q E L
TTACAAATGAACTCAAAGAGCGCGTCAAATTATCCGAACGCTTGAAGCGAAATATTCAT
  T N E L K R A R Q I I R T L E A K Y S F
TTGCTGATATCATTGGTCAATCTGAAGAGTTTCAGTTAGCAATTGAGCAGGCTAGACTTG
  A D I I G Q S E E F Q L A I E Q A R L A
CTGCTAAAACACCAGCTACTGTTTTGCTTAGAGGTGAATCTGGGACGGGTAAAGAGTTGT
  A K T P A T V L L R G E S G T G K E L F
TTGCACATGCTATTCATAATGCGAGCAGCCGAAAGTTTAATAAATTTGTCCGGATTA ACT
  A H A I H N A S S R K F N K F V R I N C
GTGCTGCGCTTTCTGAGTCTTTGCTTGAAAGTGAAC TTTTGGGTACGAAGAAGGAGCTT
  A A L S E S L L E S E L F G Y E E G A F
TTTCCGGGGCAAAGAGGGCGGGAAACGCGGCTTTTGAAGAAGCCAATAACGGTAGCA
  S G A K R G G K R G V F E E A N N G S I
TCTTTTATAGATGAAATCGGGGAGCTCTCAGCTTATATGCAGGCTAAGCTGCTTCGGGTTTC
  F L D E I G E L S A Y M Q A K L L R V L
TTCAAGGAAAAGAGCTTATTCGCGTTGGAGGAACGGACCCTATTCCGGTGAATGTTTCGCG
  Q X K E L I R V G G T D P I P V N V R V
TTATTGCAGCTACGAATGTGAATTTAGAAAAAGGAATGGCTGATGGGAGCATCAGACAGG
  I A A T N V N L E K G M A D G S I R Q D
ACTTGTATTATCGGCTAAACAAAATTCCGATTCACATACCTCCACTTCGGAAGAGAAAAG
  L Y Y R L N K I P I H I P P L R K R K E
AGGATATTGGTGCCTTGTACACACTTAATTACAAAATTAATCAAGATTACGGCCGAC
  D I G A L V T H L I T K I N Q D Y G R H

```

```

ATGTTGAAGGAGTAACAGAGCGGGCTTTACAGTCATTAAGATCATACGACTGGCCAGGAA
V E G V T E R A L Q S L R S Y D W P G N
ATGTCAGAGAGCTTGAAAACCTATTAGGTAGAGCGATTATTTATATGCACTATACAGAAA
V R E L E N L L G R A I I Y M H Y T E T
CAATGATTGATTCTGTTTCATCTCCCTTCACTTGAAGGCAAGGGCAATAAAGAAAAAATC
M I D S V H L P S L E G K G N K E K N Q
AGGTGAATGAAGAGGTAATGTTCTGAAGGGAAGACTTTAGCGCACATGATGGAAAATTACG
V N E E V M F E G K T L A H M M E N Y E
AAGCGGAACCTTATTCAAAAAGTGCTGCTTGCAAACGAGTATAACCGAACGAAAACAGCAA
A E L I Q K V L L A N E Y N R T K T A K
AACAGCTTAATATTTCCCTGCGTTCTTTGTATTATAAGTTGGAAAAATACAATCTTGCAA
Q L N I S L R S L Y Y K L E K Y N L A N
ATAACAGCATGCAATAAAATGCATGGTGTGCAATTTGTTGCATATAAATAA
N S M Q *

```

El polipéptido de 398 aa deducido de esta secuencia fue comparado en las diferentes bases de datos de proteínas, utilizando el programa BLASTP y los resultados mostraron una similitud no esperada con los miembros de la familia de activadores que actúan sobre promotores dependientes de  $\sigma^{54}$ .

Este ORF1, al igual que todos los miembros de esta familia de reguladores están estructurados de la siguiente forma:

- ✎ Tienen un extremo aminoterminal (*dominio A*) que puede ser sensor o interactuar con algún sensor.
- ✎ Un dominio central (*dominio C*) que está altamente conservado entre este tipo de reguladores, ya que es la zona responsable de la interacción con el complejo la holoenzima (RNA polimera- $\sigma^{54}$ ) y, además, en este dominio se encuentra el sitio de unión e hidrólisis de ATP, requerida en la apertura de la doble hélice de ADN.
- ✎ Un dominio bisagra entre los dominios A y C, que es una especie de brazo flexible (*dominio B*). Algunos autores lo incluyen dentro del dominio C, otros lo muestran como separado de este.
- ✎ Finalmente, en el extremo carboxi-terminal existe un dominio de unión al ADN hélice-vuelta-hélice (H-T-H) (*dominio D*), que esta involucrado en la interacción con secuencias específicas en el genoma del microorganismo. (Morett, E. y Segovia, L., 1993).

Se encontraron diferentes grados de homologías de acuerdo a los dominios proteicos analizados, (Tabla 3), de entre todos, la homología con el gen de *Bacillus subtilis*, YqiR, es muy extensa.

**Tabla 3.** Homología del producto del gen ORF1 con otros reguladores  $\sigma^{54}$

PROTEÍNA	% HOMOLOGÍA*		
	Central	Dominio Carboxilo Motivo HTH	Proteína Completa
YqiR <sub>Bsu</sub>	74,7	63,9	67,7
AtoC <sub>Eco</sub>	49,0	61,9	40,3
NifA <sub>Azbr</sub>	55,6	NR	51,3
NifA <sub>Herse</sub>	54,4	NR	40,8

NR: homología no reportada por el análisis del banco de proteínas

YqiR<sub>Bsu</sub>: YqiR de *B. subtilis*, AtoC<sub>Eco</sub>: AtoC de *E. coli*, NifA<sub>Azbr</sub>: proteína reguladora A de la fijación de nitrógeno de *Azospirillum brasilense*, (Liang *et al*, 1991) NifA<sub>Herse</sub>: proteína reguladora A de la fijación de nitrógeno de *Herbaspirillum seropedicae* (Souza *et al*, 1991)

Debido a la homología que presentaba nuestro ORF1 con el activador del operón de degradación de ácidos grasos de cadena corta (sistema *ato*) de *E. coli* se descartó la posibilidad de haber clonado el gen de la enzima  $\beta$ -cetotilasa de *B. megaterium* y se comenzó a pensar en que se clonó un regulador capaz de transactivar el operón *ato* de *E. coli*.

En *E. coli* la degradación de los ácidos grasos de cadena corta se logra mediante 2 enzimas: la  $\beta$ -cetotilasa II y la acetilCoA-acetoacetyl-CoA transferasa (AA-CoA transferasa), codificadas por los genes *atoB* y *atoAD* respectivamente, organizados un operón continuo. Los ácidos orgánicos de cadena corta o sus derivados activados por la molécula CoASH son las sustancias que activan estos genes *ato*. (Jenkins, L.S. y Nunn, W.D., 1987; Pauli, G., y Overath P, 1972). Este operón esta regulado positivamente por el gen regulador *atoC* que posee una muy fuerte homología con otros activadores  $\sigma^{54}$ .

Por lo tanto, la nueva hipótesis que se planteó es que, posiblemente, la proteína codificada por el ORF1 este ejerciendo una transactivación de todo el operón *ato*, por ser el activador codificado por el ORF1 tan parecido al AtoC de *E. coli*, de tal forma que la actividad de tiolasa que siempre se midió correspondía a la enzima  $\beta$ -cetotiolasa II codificada por el gen *atoB* de *E. coli*.

Para verificar esta hipótesis se diseñó un ensayo de complementación con diferentes cepas mutantes en el operón *ato* de *E. coli*. (Tabla 4)

**Tabla 4:** Expresión de las enzimas  $\beta$ -cetotiolasa, tiolasa II y AA-CoA transferasa

Cepas/Plásmido	Actividad específica U/mg de proteína		
	Tiolasa II	AA-CoA transferasa	$\beta$ -cetotiolasa
HB101/pHV33	7	0,1	6
UBA6-6/pBMe3	303	30	521
LJ111/pBMe3	13,5	0,1	nd
LJ61/-	21	0,1	nd
LJ61/pBMe3	565	44	nd
UBA6-19/ pF14	1000	nd	nd
LJ61/pF14	1650	nd	nd

nd: no determinado

Los resultados mostraron que:

- ✎ no se encontró actividad de las enzimas del operón *ato* en la cepa LJ111 que contiene al pBMe3 ya que esta cepa posee una delección que abarca a los genes estructurales.
- ✎ en cambio para la cepa LJ61 (*atoC*), se detectó la actividad de ambas enzimas cuando fue transformada con pBMe3 o pF14 (este es un plásmido que contiene sólo al activador ORF1 clonado en pBS ). Esta cepa LJ 61 es mutante en el activador y por lo tanto carece de actividad de las enzimas tiolasa II y AA-CoA transferasa en condiciones de inducción.

Lo que se vio de estos experimentos, es que se expresaron las enzimas del operón *ato* por la presencia del producto del ORF1 de *B. megaterium*, presente en los plásmidos pBMe3 y pF14. De acuerdo a estos resultados obtenidos, al producto codificado por el ORF1 lo referimos como activador de *B. megaterium* (*actBm*).

La posible explicación de porque se activan los genes *ato* de *E. coli* en presencia del producto del gen *actBm*, podría ser la gran homología que presentan los respectivos dominios H-T-H de las proteínas ActBm y el AtoC en el extremo carboxiterminal. (**Figura 7**).

Cabe aclarar que el posible dominio H-T-H de la proteína ActBm fue determinado por el método de Dodd y Egan (1990), que se basa en la valorización de todos los segmentos de mayor probabilidad de ser un dominio H-T-H. Este valor surge de sumar los valores individuales de cada aminoácido integrante de este segmento. El valor asignado a cada aminoácido no es arbitrario sino que surgió del análisis de todos los motivos H-T-H que se conocen. Entonces, cada aminoácido tiene un valor ponderado de acuerdo a la mayor posibilidad de que integre o no un posible dominio H-T-H.

En este método, un conjunto de 200 proteínas que no poseen dominio H-T-H fueron seleccionadas al azar de un banco de datos, y de todo este conjunto, se obtuvo un valor promedio de las puntuaciones más altas para todos los segmentos posibles de 20 aminoácidos ( $X_{no\ HTH}$ ) y también se calculó el desvío standard (SD) de este valor promedio. Tomando en cuenta estos parámetros, se compara el valor más alto ( $X_{test}$ ) de la proteína que se está analizando contra el  $X_{no\ HTH}$  y si resulta que el  $X_{test}$  tiene un valor más alto en 2,5 SD, entonces este segmento de la proteína en estudio tiene una probabilidad de 25% de ser un dominio H-T-H. Este es el valor de corte que permite este método.

En el caso de ActBm, el segmento de mayor score va desde el aminoácido de la posición 367 hasta el ubicado en posición 388, tiene un valor de 4.4 SD y que según la tabla confeccionada por Dodd y Egan, este segmento tiene casi un 100% de posibilidades de ser un dominio H-T-H.

**Figura 7:** Comparación de los dominios H-T-H entre las diferentes activadores

AtoCEc	GNRTRTALMLG ISRRALMYKIQ	452
ActBm	YNRTKTAKQLN ISLR S LYYKLE	388
YqiRBs	FNRTKTAKALGVSI R NLYYKMD	682
	* * * * * * * * * * * * * *	

AA : Aminoácido idéntico; AA : Aminoácido similar

El estudio de estos genes activadores puede resultar de fundamental importancia, porque a través de ellos cepas recombinantes de *E. coli* productoras de PHB podrían llegar a utilizar otras fuentes de carbono más complejas, que únicamente son metabolizadas a través de los sistemas de degradación de ácidos grasos de cadena larga y corta. Con esto se podrían incorporar otros esqueletos carbonados a la estructura del PHB, formando copolímeros con mejores propiedades plásticas. Por esto se decidió seguir la secuenciación de este inserto río arriba del gen *actBm*.

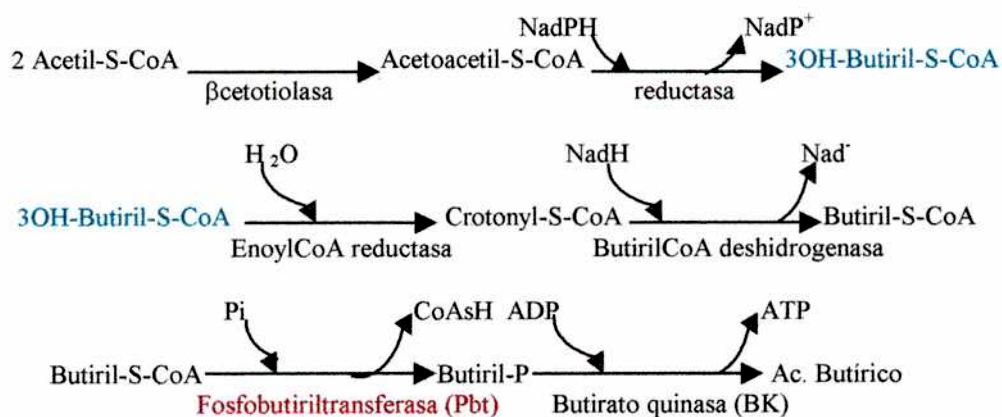
## ☞ MARCO DE LECTURA 3 (ORF 3): *PbtBm*

### 1) Clonado, secuenciación y análisis del gen *pbt* de *B. megaterium*

El último marco de lectura encontrado en el plásmido pBMe3, se encuentra río abajo del gen *actBm* y se lo denominó ORF3, está truncado y estaría bajo el control de un posible promotor del tipo  $\sigma^{54}$  encontrado en la secuencia. La posible proteína codificada en este marco de lectura mostró una gran homología con la **fosfobutiriltransferasa (Pbt)** de *Clostridium acetobutylicum* y también con el posible producto del gen *yqiS* de *Bacillus subtilis* que se describe como una hipotética **fosfobutiriltransferasa**.

Esta enzima Pbt se encuentra en organismos anaeróbicos y está involucrada en la síntesis de ácido butírico en el género *Clostridium*. Mediante el proceso de síntesis de ácidos estos microorganismos obtienen energía por la formación de ATP a nivel de sustrato. Cabe acotar que esta ruta metabólica es reversible o sea que puede servir tanto para la síntesis como para la metabolización del ácido butírico. (Figura 8)

**Figura 8:** Ruta de síntesis de ácido butírico en *C. acetobutylicum*





Tanto en *B. megaterium* como en *B. subtilis* no cabría esperar este tipo de enzima debido a que en la bibliografía se los encuentra denominados como microorganismos aeróbicos estrictos. Por lo tanto, se postuló que esta enzima podría cumplir un rol similar en estos microorganismos. O sea, que bajo determinadas condiciones podrían ser capaces de obtener ATP por fosforilaciones a nivel de sustrato, con lo cual como producto final se produciría ácido butírico o ácidos grasos de cadena corta.

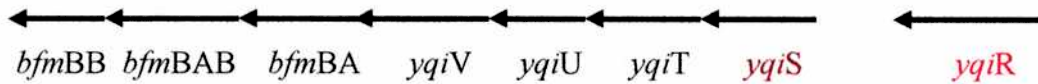
Por otra parte, como se ve en la **figura 8**, un intermediario de esta ruta metabólica es el 3OH-Butiril-S-CoA, que como ya se sabe, es el monómero a partir del cual se forma el PHB en *B. megaterium*. Por ende, si esta ruta metabólica estuviera presente en esta especie bacteriana, podría modificar el metabolismo del biopolímero, ya sea quitándole sustrato en el caso de síntesis del ácido butírico o agregándole en el caso de que el ácido fuera metabolizado.

Son de fundamental importancia el estudio de las diferentes rutas y regulaciones metabólicas que podrían estar involucradas en forma directa o indirecta en la síntesis del PHB en los diferentes microorganismos, para lograr la optimización de la producción del polímero (tanto en *B. megaterium* como en otras especies bacterianas). Teniendo en cuenta esto, se decidió completar la secuencia nucleotídica del ORF3, para corroborar si correspondía a la enzima Pbt, además se pensó en estudiar su rol en el metabolismo del PHB en *B. megaterium*.

Para lograr los objetivos antes mencionados, contamos con la enorme ventaja de que este microorganismo tiene un gran parecido tanto genético como metabólico con *B. subtilis*, del cual se conoce mucho acerca de su metabolismo y además ya se tiene secuenciado todo su genoma.

Estos genes clonados de *B. megaterium* (ORF2, ORF3 y ActBm), tienen una alta homología con los genes que están organizados en la siguiente región de *B. subtilis* (**Figura 9**).

**Figura 9:** Región del genoma de *B. subtilis* donde se encuentran los genes *yqiR* e *yqiS*



*bfmBB*: gen que codifica para la subunidad E2 de la deshidrogenasa de los  $\alpha$ -cetoácidos ramificados (lipoamida aciltransferasa)

*bfmBAB*: gen que codifica para la subunidad E1 de la deshidrogenasa de los  $\alpha$ -cetoácidos ramificados (2 oxoisovalerato deshidrogenasa Subunidad  $\alpha$ )

*bfmBA*: gen que codifica para la subunidad E1 de la deshidrogenasa de los  $\alpha$ -cetoácidos ramificados (2 oxoisovalerato deshidrogenasa Subunidad  $\beta$ )

\* *yqiV*: gen que codificaría para la dihidrolipoamida deshidrogenasa

\* *yqiU*: gen que codificaría la enzima butirato quinasa (BK)

\* *yqiT*: gen que codificaría para la enzima leucina deshidrogenasa (LDH)

\* *yqiS*: gen que codificaría para la enzima fosfobutiriltransferasa (Pbt)

\* *yqiR*: gen que codificaría para un activador transcripcional dependiente de  $\sigma^{54}$

\* genes cuyos productos son deducidos por homología, comparando sus secuencias con las presentes en los diferentes bancos de datos.

Con esta información sobre la región de *B. subtilis* donde se encuentran los genes *yqiS* e *yqiR*, se trabajó bajo la hipótesis de que en *B. megaterium* se conserva en forma similar esta organización de genes.

Entonces, como uno de los objetivos era completar el ORF3 truncado para terminar de clonar el gen *pbt* de *B. megaterium*. Para lograrlo se utilizó la técnica de PCR y se diseñaron los siguientes primers:

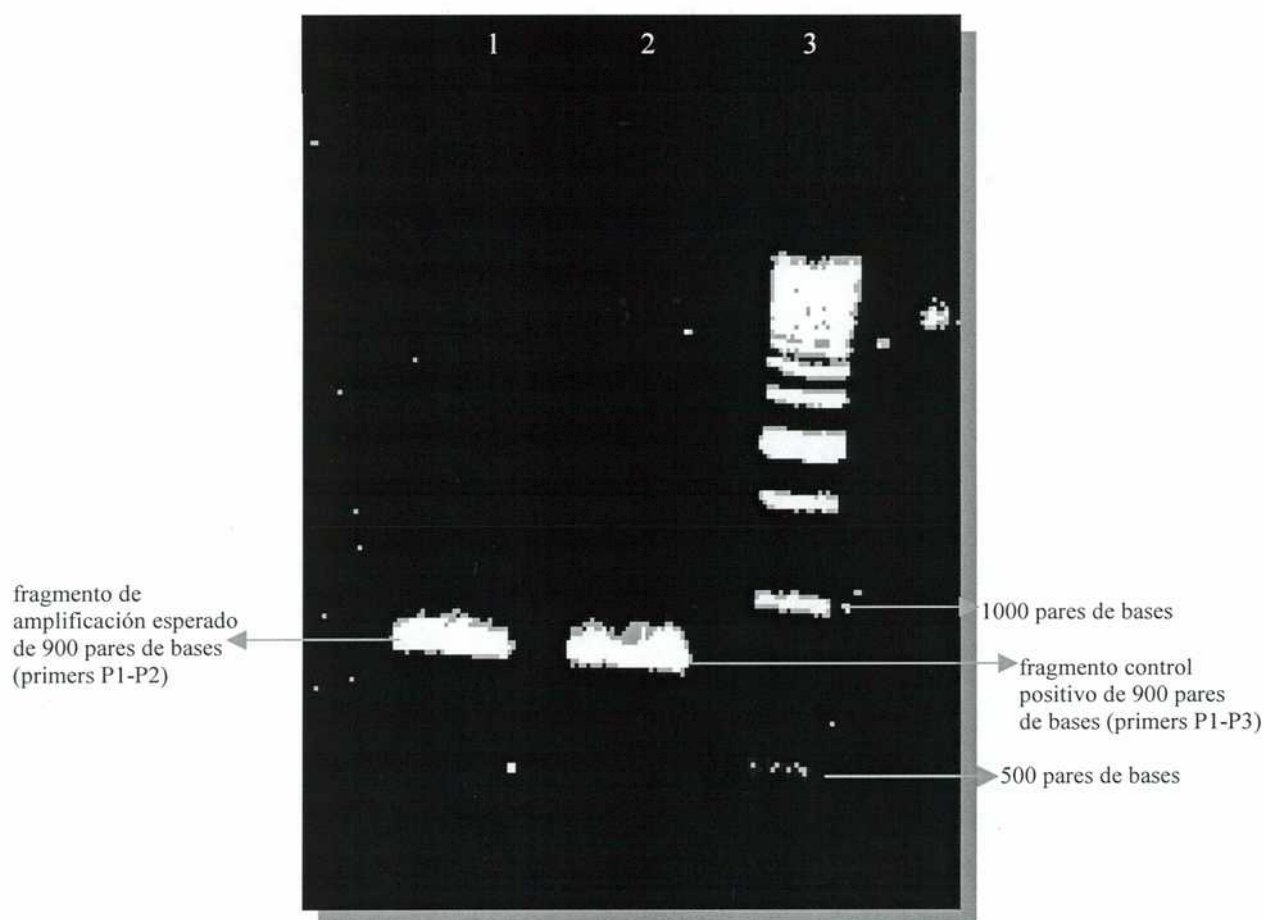
**-P1**: primer degenerado de acuerdo al uso de codones de *B. megaterium*, que abarcaba el principio del gen *yqiT* de *B. subtilis* que es el contiguo río abajo del *yqiS* (PBT *Bacillus subtilis*), ya que bajo la hipótesis de trabajo planteada se tendría que encontrar un gen similar río abajo del ORF3 en el genoma de *B. megaterium* para que se pueda "pegar" este primer y así obtener un fragmento de amplificación.

-P2: primer específico que abarcaba el principio del ORF3 (PbtBm) ya clonado, pero no incluyendo en el fragmento amplificado el posible promotor  $\sigma^{54}$ .

-P3: primer específico que abarcaba el principio del gen *yqiT* de *B. subtilis* (para utilizar como control positivo de amplificación)

Utilizando el par de primers P1-P2 se obtuvo por PCR un fragmento de amplificación a partir del ADN genómico de *B. megaterium* (Figura 10).

**Figura 10:** PCR con la amplificación esperada de 900 bases



**Calle 1: Genoma *B. megaterium* PV447**

**Calle 2: Genoma *B. subtilis* GSY11-04 control positivo**

**Calle 3: Marcador Peso Molecular de 1000 pares de bases**

Este fragmento era del tamaño esperado ya que fue comparado con el control positivo que corresponde a un fragmento de amplificación del genoma de *B. subtilis*, utilizando el par de primers P1-P3.

El fragmento de PCR de *B. megaterium* fue clonado en el vector pCRII (Stratagene). El nuevo clon de *B. megaterium* con el fragmento de PCR deseado se secuenció y se obtuvo la secuencia que se puede ver en la **Figura 11**.

**Figura 11: Secuencia del ORF3**

```

AGCAGCTATA TTATGTAATA TATGCAGAGG ATGGCACAAA TCTTGCA'TGT ATTTAGGTG
ACTGCATAAA CGCGCAGTAT GCTCTTAAA ACGGAGCAAA CGAAAGAATG AAAAAGGAGA
GGTCGAACAT TCCATGACTC TTGCTACCATCTTATCTCGGGTTGCTAAGCAGTCTTCTTT
      M T L A T I L S R V A K Q S S L

GACTGTTGCT GTTGCTGCAG CTGAAGACTT AGAAACAATT GAGGCAGTGT ATGAAGCTGT
T V A V A A A E D L E T I E A V Y E A V

GTCAAGGGAAGTTTCTGAAT TTATTTTGTTTGGCAACGAA ACGA2CAATTA ATGAATTATT
S R E V S E F I L F G N E T T I N E L F

CAGGCAGTAC CGCCCATCCT TACTCACTCA TAAGGCTGTG ACGGTCGTAC ATACGGAGTC
R Q Y R P S L L T H K A V T V V H T E S

CGTTTTAGAA GCGGCTCAAT TGGCTGTGCG TTCAGTTCAG CAAGGTCAAG CTCATATCGT
V L E A A Q L A V R S V Q Q G Q A H I V

AATGAAAGGG GATTTATCCA CATCGCTTAT CTTAAAAGCT GTGTAAATA AAGAGCATGG
M K G D L S T S L I L K A V L N K E H G

TTTGCGTACGGGAAATGTTT TATCACGTGTGGCTGTGTTTGACNTTCCTCANTATGACCG
L R T G N V L S R V A V F D X P X Y D R

TCCGANTCTTGTAACAGACG AGCTATGAATATTACGCCN TCTCTGGAAG GAAAAGTTCA
P X L V T D A A M N I T P S L E G K V Q

AATCATTCANAATGCGGTGAACGTTGCCNCTCTNTTGGG GTNGAGATGCCCCAGGTAGC
I I X N A V N V A X S X G V E M P Q V A

TCCTATTGCAGCGGT TGAAGT TGTGAACCCCTTGATGCCCGCNANANTTTATGTGGCGCT
P I A A V E V V N P L M P A X X Y V A L

TCCCACCCCGAATCAACCAGAGGACAAAT AAAGGCTGC GTTATTGATG GACCTTTAGC
P T P E S T R G Q I K G C V I D G P L A

ACTCGACAATGCCATTAACATAGAAGCAGCCAAGCAAAAAGGCATTCAA GTGAAGTTGC
L D N A I N I E A A K Q K G I Q S E V A

```

CGGTCAAGCA GATATATTAC TNGTTCCAGC AATTGAAACAGGGAACGTNTTATATAAATC  
 G Q A D I L L V P A I E T G N V L Y K S  
 CCTCATTAT TTTGCTAAAGCAAAGTTGGAGCTATTNTAGCAGGAGCAAAGCTCCGGT  
 L I Y F A K A K V G A I X A G A K A P V  
 NGTCTTAACATCCAGAGCAGATTCATCAG AAGTAAATTATACTCACTGG CACTAGGCGG  
 V L T S R A D S S E S K L Y S L A L G G  
 AACGGTGA  
 T A \*

- 1) Promotor  $\sigma^{54}$  (Shingler, 1996)
- 2) Posible Secuencia CRE de represión catabólica (Hueck *et al*, 1994)

Esta secuencia posee las siguientes homologías deducidas por comparación con proteínas de los bancos de datos del Swissprot y del GeneBank y analizadas a través del programa BLAST (**tabla 5**).

**Tabla 5:** *Tabla de homología del ORF3*

HOMOLOGIA		
GEN	Identities	
<i>yqiS B. subtilis</i>	62%	
<i>pbt C. acetobutylicum</i>	60%	
PROTEÍNA	Identities	Similitudes
YquiS <i>B. subtilis</i>	54,8%	70,1%
Pbt <i>C. acetobutylicum</i>	46,8%	65,4%

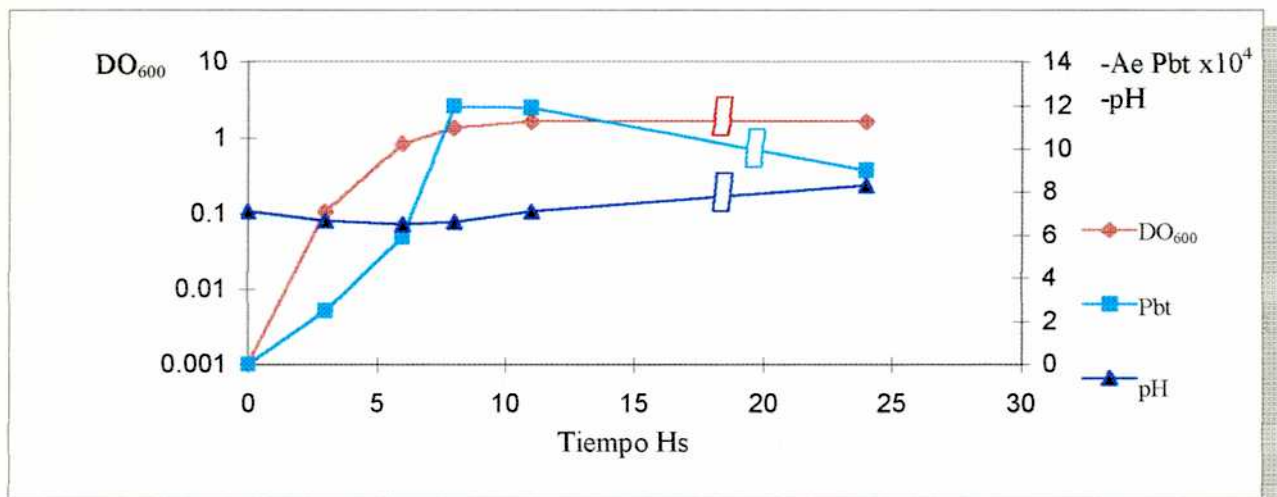


Teniendo en cuenta esta información con respecto a la homología, al ORF3, se lo decidió denominar a este gen *pbtBm*

## 2) Análisis de la actividad enzimática Pbt en *B. megaterium*.

Teniendo en cuenta que el otro objetivo importante era establecer el rol de esta enzima en el metabolismo del PHB, lo primero que se realizó fue una cinética enzimática para analizar la expresión del mismo en un medio rico como el LB (**figura 12**) y además ver si la actividad de esta enzima puede estar correlacionada con la posible excreción de productos ácidos (como el ácido butírico). Esto se evidencia, en primera instancia, como una disminución del pH extracelular a medida que el microorganismo crece.

**Figura 12:** Cinética de la actividad PBT, pH extracelular y crecimiento bacteriano en medio LB



Se vio en los resultados representados en la **figura 12** que se produjo un salto en la expresión del gen *PbtBm* hacia el final de la fase exponencial, siendo máximo al principio de la fase estacionaria. Esto es coincidente con el período de máxima acumulación de PHB de este microorganismo en medio LB (G. Vazquez, Tesis de Licenciatura, 1993).

En cambio, no se detectó ningún cambio significativo en el pH del medio extracelular, esto indicaría que la enzima PbtBm no estaría siendo utilizada para la producción de ácido butírico o, alternativamente, este compuesto se está reutilizando en forma inmediata. Por lo tanto se realizó un ensayo para ver qué compuestos pueden modificar la expresión del gen *pbtBm* (**Tabla 6**), bajo la hipótesis de que esta enzima estaría involucrada en la utilización del ácido butírico o en su degradación para detoxificar a la célula, ya que este es un compuesto que en altas concentraciones puede desacoplar la cadena respiratoria.

Entonces, se diseñó un experimento de inducción de expresión de la actividad enzimática Pbt, con diferentes compuestos. Para ello se creció a la cepa *B. megaterium* PV447 en medio LB durante 6 hs, luego se le agregó 50 mM de los compuestos carbonados detallados en la **tabla 6** y 2hs horas después del agregado de estas sustancias (o sea a las 8 hs de cultivo total) se midió la actividad Pbt.

**Tabla 6:** Análisis de la expresión de la enzima PbtBm, con el agregado de varios compuestos.

Tiempo	Rel. AE Pbt (1)	Rel. AE Pbt(2)
6 Hs	100	
8 Hs ----	179	100
8 Hs AA	76	42
8 Hs But	74	42
8 Hs Glu	32	18

(1) Relación de la actividad específica de *PbtBm* con respecto a la medición de las 6 Hs

(2) Relación de la actividad específica de *PbtBm* con respecto a la medición de las 8 Hs

AA= Acetoacetato But= Butirato Glu= Glucosa

Se vieron los siguientes resultados de la Tabla 6:

- ✓ La glucosa ejerce una muy fuerte represión que se podría denominar catabólica, (llegó a reprimir hasta el 70% tomando como base las 6 horas y hasta el 80% con respecto a la medición de las 8 horas).
- ✓ Luego, un resultado no esperado, fue la represión producida cuando se le agregó butirato o acetoacetato. Dado que la ruta metabólica descrita en la **figura 8** puede ser utilizada tanto para la biosíntesis como para la degradación del butirato, era de esperar que se produjera una posible activación con el agregado tanto de butirato como de acetoacetato.

Por ende, los resultados obtenidos en la tabla 6 parecen indicar que esta enzima Pbt*Bm* no estaría siendo utilizada para reutilización del ácido butírico, así como por los resultados vistos en la figura 12 tampoco estaría involucrada en la producción de ácido butírico, por lo menos en el medio de cultivo LB.

Para descartar que esto no hubiera sido una cuestión de las condiciones de cultivo, se cambió el medio de crecimiento, pasando de LB al SNB, porque en este medio *B. megaterium* baja significativamente el pH del medio extracelular durante su crecimiento. El inicio de la acumulación de PHB se da en el momento en que el pH extracelular está en su punto más bajo (Lach *et al*, 1990). La diferencia entre ambos es que SNB es un medio de esporulación para este microorganismo, ya que posee todas las sales necesarias para completar este proceso y está suplementado con una fuente de carbono, que es glucosa.

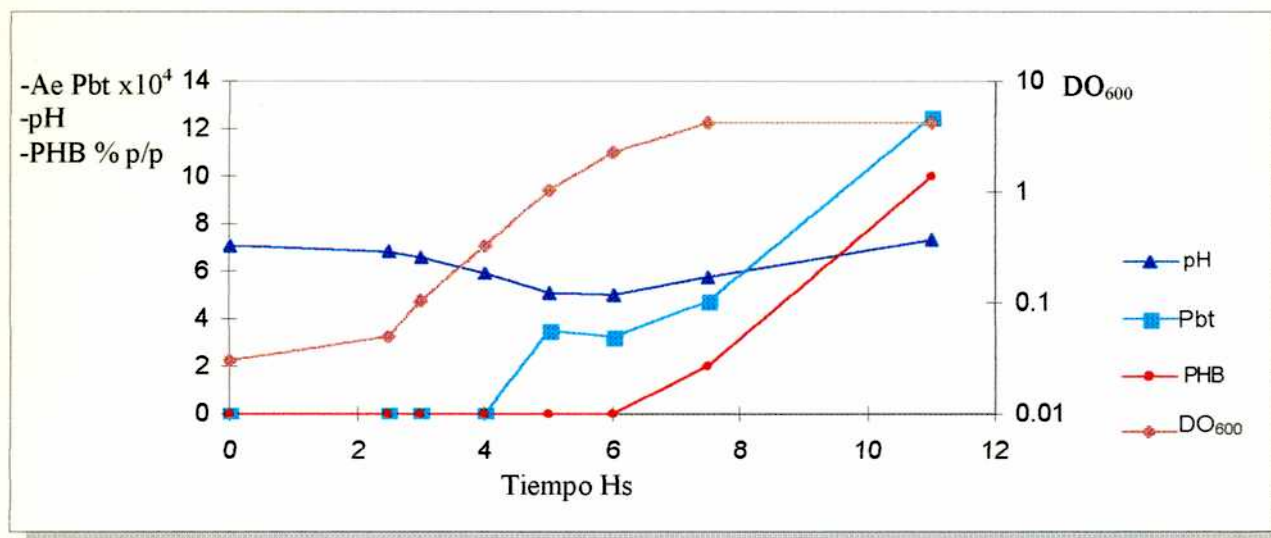
Por otro lado, los estudios realizados por Shulgovskaya *et al* (1981) mostraron que *B. megaterium* secreta ácidos al medio extracelular (siendo el principal componente el ácido acético y en menor medida pirúvico), pero nunca detectó, en sus condiciones de crecimiento, ácido butírico.

Entonces, para poder establecer una relación entre el patrón de expresión de la actividad de la enzima PBT, la acumulación de PHB, la disminución del pH del medio extracelular y la identificación de los ácidos que provocan esta disminución, se realizó un



estudio de cinética de todos estos factores en función del tiempo de cultivo de *B. megaterium* en SNB. (Figura 13)

**Figura 13:** Cinética de la actividad PBT, pH del medio extracelular, acumulación del PHB y  $DO_{600}$  en Medio SNB



La **Figura 13** nos mostró los siguientes resultados:

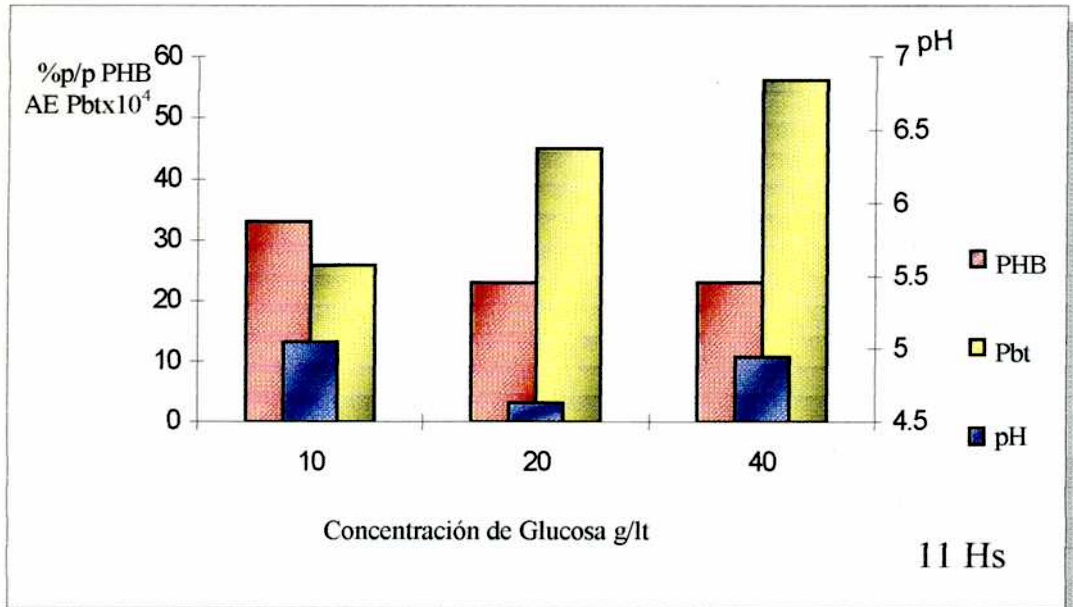
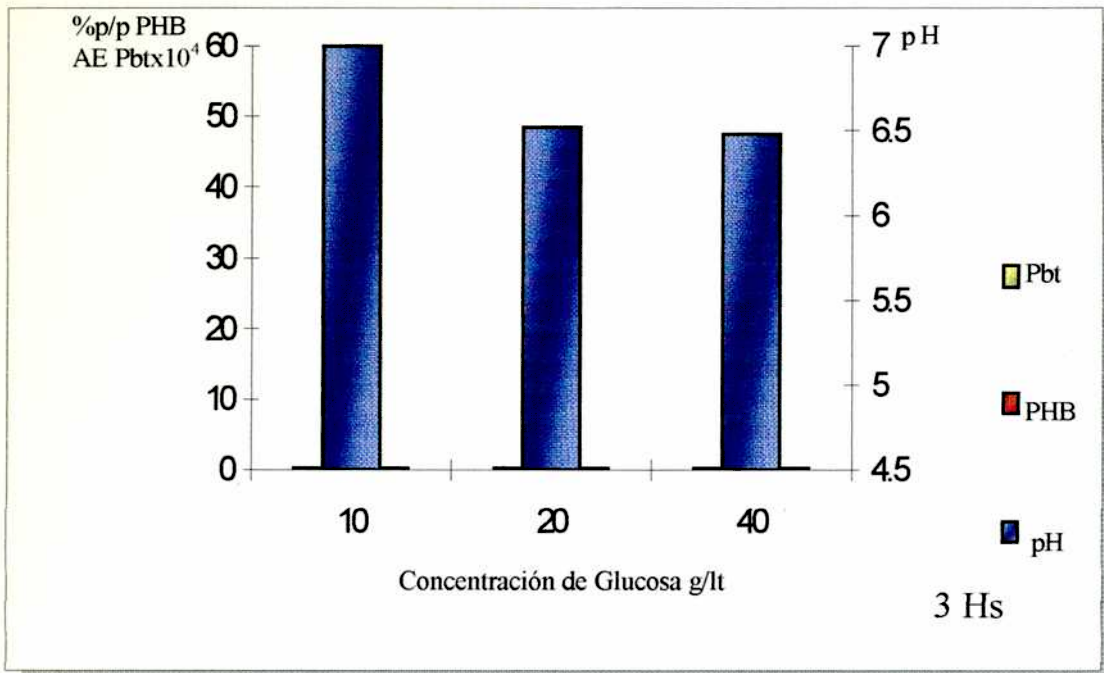
- ✦ tanto la acumulación de PHB como la actividad de la enzima PbtBm comenzaron cuando el pH del medio extracelular llegó a su punto más bajo.
- ✦ El único ácido que se detectó por cromatografía gaseosa fue el ácido acético (dato no mostrado).
- ✦ No se registró actividad enzimática PbtBm durante el principio de la fase exponencial de crecimiento de *B. megaterium* en caldo SNB, si en cambio se pudo detectar una actividad muy baja de esta enzima en medio LB al principio de la fase exponencial.
- ✦ La máxima actividad Pbt se observó al momento de entrada a la fase estacionaria que es también el de máxima acumulación de PHB (tal como ocurrió en medio LB).

- ✎ A pesar de que ocurrió una baja abrupta del pH, esta disminución provino solo del ácido acético que se secretó, ya que en ningún momento se detectó la presencia del ácido butírico o de otros ácidos grasos de cadena corta.
- ✎ Además, la actividad de la enzima *PbtBm* estuvo desfasada con respecto a esta disminución del pH (se observó el comienzo de la actividad Pbt cuando el pH extracelular estaba en su punto más bajo).

Debido a que en estas condiciones de medio SNB no se detectó el ácido butírico, se decidió aumentar la fuente de carbono (el SNB tiene una concentración de 1g/lit de glucosa) porque se sabe que en *C. acetobutylicum* a medida que aumenta la concentración de glucosa, mayor es la cantidad de ácidos producidos y menor es el pH al cual llega el medio extracelular.

Entonces, se realizaron experimentos con tres condiciones diferentes de concentración de glucosa, con los cuales se intentó ver si este microorganismo era capaz de producir ácido butírico, así como se vio en que medida se afectó la expresión del gen *pbtBm* (midiendo la actividad Pbt) y esto también se relacionó con la producción de PHB y el pH extracelular. Los resultados se observan en la **figura 14**.

**Figura 14:** Relación entre la actividad Pbt, acumulación de PHB y pH extracelular en función de la concentración de glucosa en el medio SNB



Los resultados de la **Figura 14** mostraron que con el aumento de la concentración de glucosa en el medio SNB baja el pH del medio extracelular indicando la excreción de mayor cantidad de ácidos al mismo, también disminuye notoriamente la actividad de Pbt (siendo indetectable a las 3 hs y con niveles muy bajos a las 11 hs).

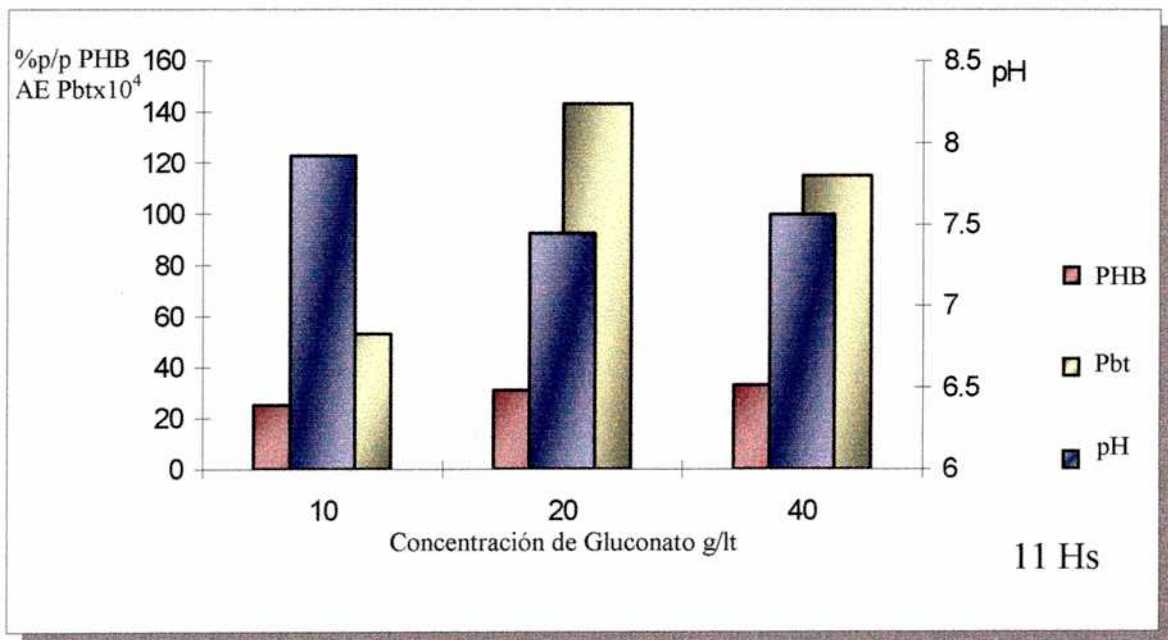
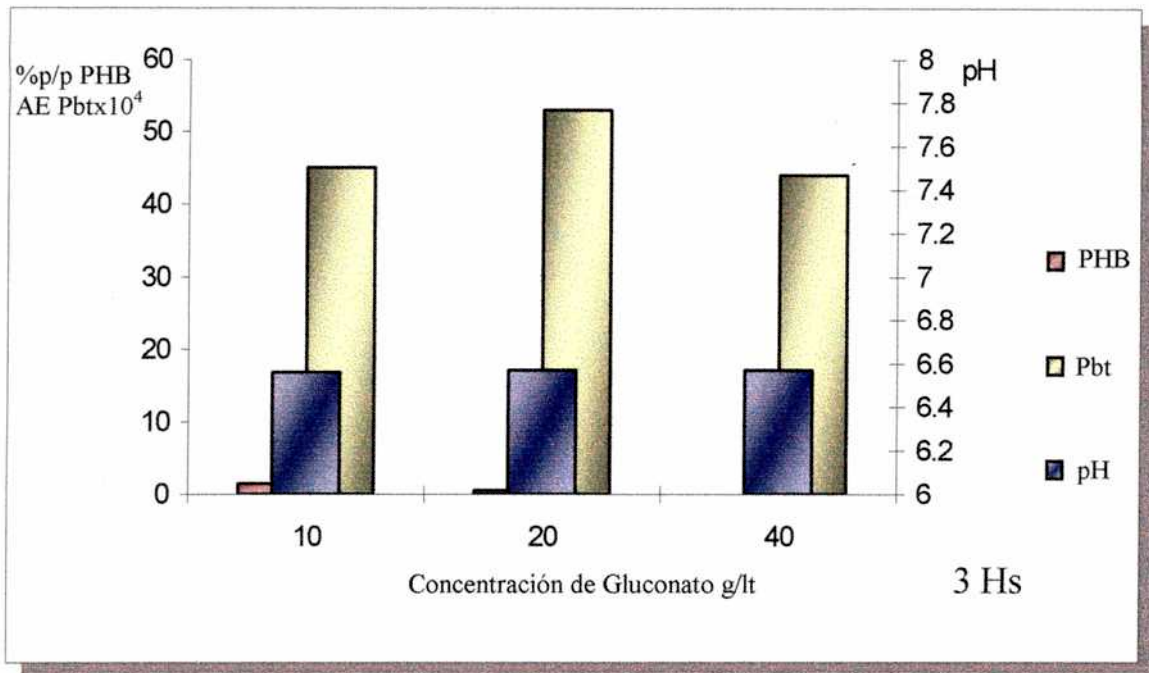
El hecho de que la actividad enzimática de *PbtBm* sea tan baja con respecto a los valores que se pueden observar en la **Figura 13**, podría deberse a que se ejerce un efecto de represión catabólica por parte de la glucosa ya visto también en el medio LB cuando se le agrega glucosa a las 6 hs de crecimiento (tabla 7) o por lo observado en la **Figura 13**, en donde no se detectó actividad al principio del crecimiento en medio SNB.

La acumulación de PHB fue decreciendo un poco a medida que baja el pH externo por el aumento de la concentración de glucosa. Además hay una correlación entre la máxima acumulación de PHB y la máxima actividad de Pbt

Los sobrenadantes de los cultivos fueron analizados para la detección de ácidos grasos de cadena corta. No se detectó ácido butírico en ninguna condición, pero si se detectó acético, cuya máxima producción fue de 1.3 g/lit a una concentración de glucosa de 20 g/lit.

Para determinar la correlación entre estas variables, se hicieron las mismas mediciones en presencia de una fuente de carbono diferente que en este caso fue el gluconato. Se trabajó bajo la hipótesis de que no bajaría el pH del medio y además ejercería menos represión catabólica. Los resultados se muestran en la **Figura 15**.

**Figura 15:** Relación entre la actividad Pbt, acumulación de PHB y pH extracelular en función de la concentración de gluconato en el medio SNB



Los cultivos que fueron crecidos en gluconato no bajaron el pH del medio extracelular y tampoco se detectaron ácidos grasos de cadena corta. En tanto que la actividad Pbt y la acumulación de PHB aumentan con respecto a las mismas condiciones que con glucosa (esto corroboró que con glucosa la expresión del gen sufre una fuerte represión catabólica). También se volvió a ver que la máxima actividad enzimática se da al momento de máxima acumulación de PHB.

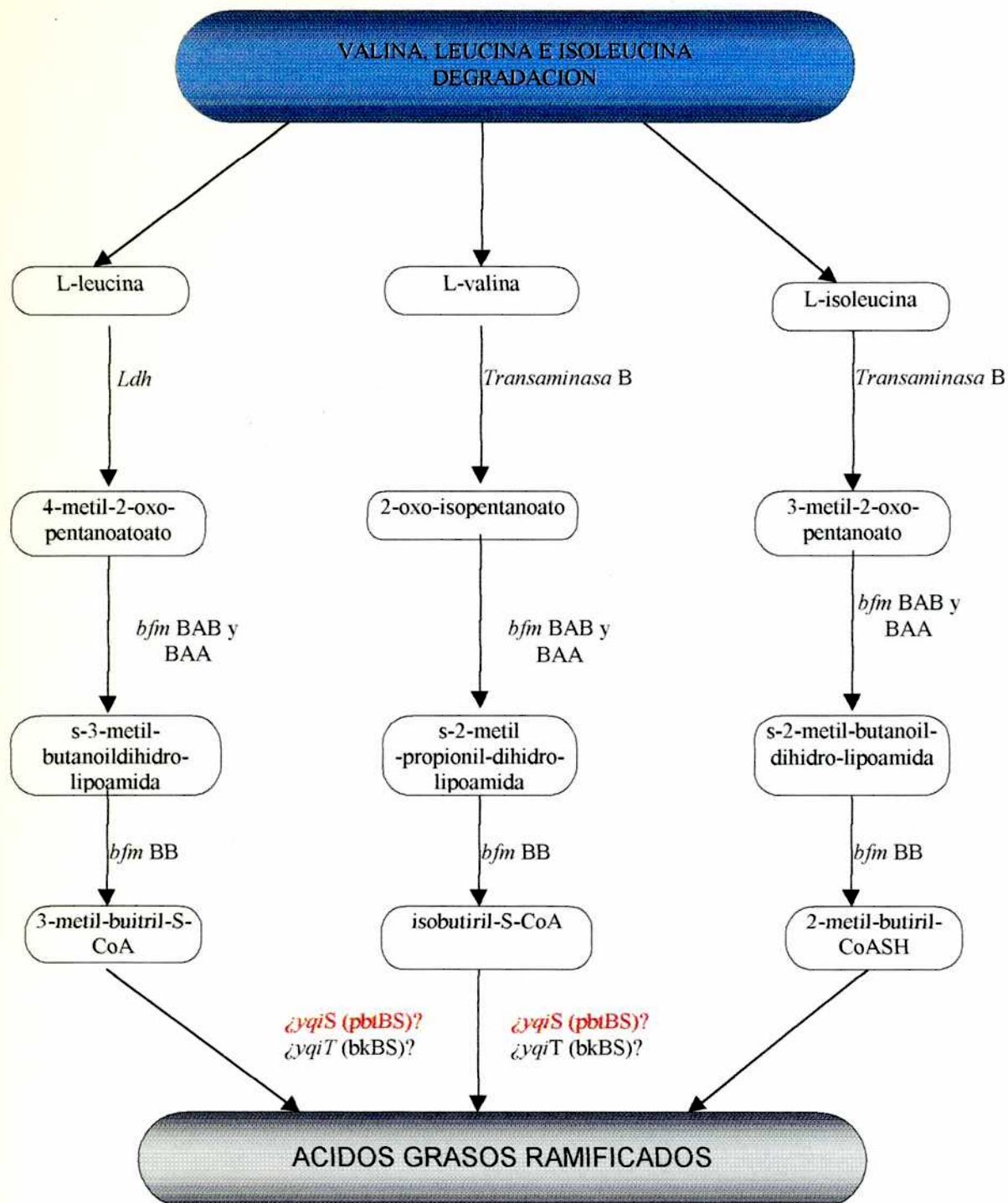
Con todos estos resultados, quedó establecido que esta enzima Pbt $Bm$  no estaría involucrada ni en la metabolización, ni en la síntesis de ácido butírico. Dado estos resultados, la pregunta que surgió inmediatamente fue: qué rol cumple en estos microorganismos aeróbicos (*B. megaterium* y *B. subtilis*) este tipo de gen. Algún tipo de función debería cumplir ya que como se vio en los resultados expuestos, tiene un patrón muy definido de expresión y regulación.

Si observamos la región en la que están los genes *yqiR* (posible activador de *B. subtilis*) e *yqiS* (posible Pbt), vemos que muy cercanos a ellos, se encuentran genes involucrados en la ruta de degradación de los aminoácidos valina (val), leucina (leu) e isoleucina (ile), estando todos orientados en la misma dirección. En consecuencia, parecerían estar organizados en un mismo operón.

Por lo tanto, en *B. subtilis*, la enzima Pbt aparentaría estar involucrada en la degradación de los estos aminoácidos, interviniendo hipotéticamente, en la formación de ácidos grasos ramificados (de la valina, el ácido isobutírico; de la leucina, el ácido 3 metil-butírico y de la isoleucina, el ácido isovalérico) (**Figura 16**). Todos estos genes estarían aparentemente organizados en un operón.



**Figura 16:** Posible Ruta metabólica de degradación de aminoácidos val, leu e ile en *B. subtilis*



Por otra parte, se sabe que *B. subtilis* es un microorganismo que no acumula PHB pero si se ha detectado ácido isobutírico en el medio extracelular y bajo determinadas condiciones de crecimiento (Speck y Freese, 1973), en cambio *B. megaterium* produce PHB pero no se reportó hasta ahora en la literatura, que se hubiera detectado ácido isobutírico bajo alguna condición de crecimiento

Tomando en consideración que la región de *B. megaterium* secuenciada en el plásmido pBMe3 parecería estar inmersa en una organización genética similar descrita en *B. subtilis*, se planteó la hipótesis de que en *B. megaterium* también podría estar involucrada la enzima PbtBm en la degradación los aminoácidos valina, leucina, e isoleucina, siendo utilizada la misma en la formación de ácidos grasos ramificados. Además, se postuló que estaría(n) esta(s) enzimas involucradas en el metabolismo del PHB.

Para corroborar esta hipótesis se realizaron dos tipos de experimentos:

- ◆ En el primero se vio si la actividad PbtBm podría ser inducida por la presencia de los aminoácidos val, leu e ile.
- ◆ En el segundo experimento se trató de detectar la excreción al medio extracelular de ácidos grasos ramificados por parte de una cepa de *B. megaterium*.

Para el primer experimento se cultivó al microorganismo en medios mínimos suplementados con diferentes fuentes de carbono, con el agregado o no de una solución de valina-isoleucina y luego se midió la actividad enzimática Pbt en diferentes estados fisiológicos de *B. megaterium*. Los resultados se muestran en la **Tabla 7**.



**Tabla 7:** Actividad de la Enzima Pbt y la acumulación de PHB en diferentes medios mínimos

Medio Mínimo	FASE EXPONENCIAL MEDIA		PRINCIPIO FASE ESTACIONARIA	
	Act. Esp. Pbt U/mg prot	%p/p PHB	Act. Esp. Pbt U/mg prot	%p/p PHB
Glu 0.5%	nd	nd	791	8.83
Glu 0.5% Val-Ile0.5%	2,286	trazas	6,616	19.05
Gln 0.5%	nd	nd	5,183	11.58
Gln 0.5% Val-Ile 0.5%	5,468	trazas	43,555	31.05
Val-Ile 0.5%	1,942	nd	31,005	nd

Glu: Glucosa Gln: Gluconato Val-Ile: Solución 5% de Valina 30-Isoleucina 70 nd: no detectado.

Como se vio en los resultados:

- ✓ existió una clara activación debida a la presencia los aminoácidos valina e isoleucina, inclusive sobrepasó la represión catabólica ejercida por la glucosa. Esta activación debida, probablemente, a los aminoácidos y fue de, aproximadamente, 8 veces más de acuerdo a los comparando los resultados vistos en la fase estacionaria tanto para glucosa como para gluconato.
- ✓ También se pudo observar un segundo tipo de activación, cuando se comparó las actividades de la fase exponencial contra la fase estacionaria. Esta activación varió desde 3 veces en el medio con glucosa hasta 19 veces en el medio con los aminoácidos. Esto probablemente sea

consecuencia de que al haber entrado el cultivo en la fase estacionaria haya algún otro factor que ejerció algún tipo de control regulatorio sobre este gen. Este mismo efecto, se observó cuando se cultivó *B. megaterium* en los medios complejos LB y SNB, ya que como se reportó en las **Figuras 12 y 13**, ocurrió un salto en actividad Pbt al principio de la fase estacionaria.

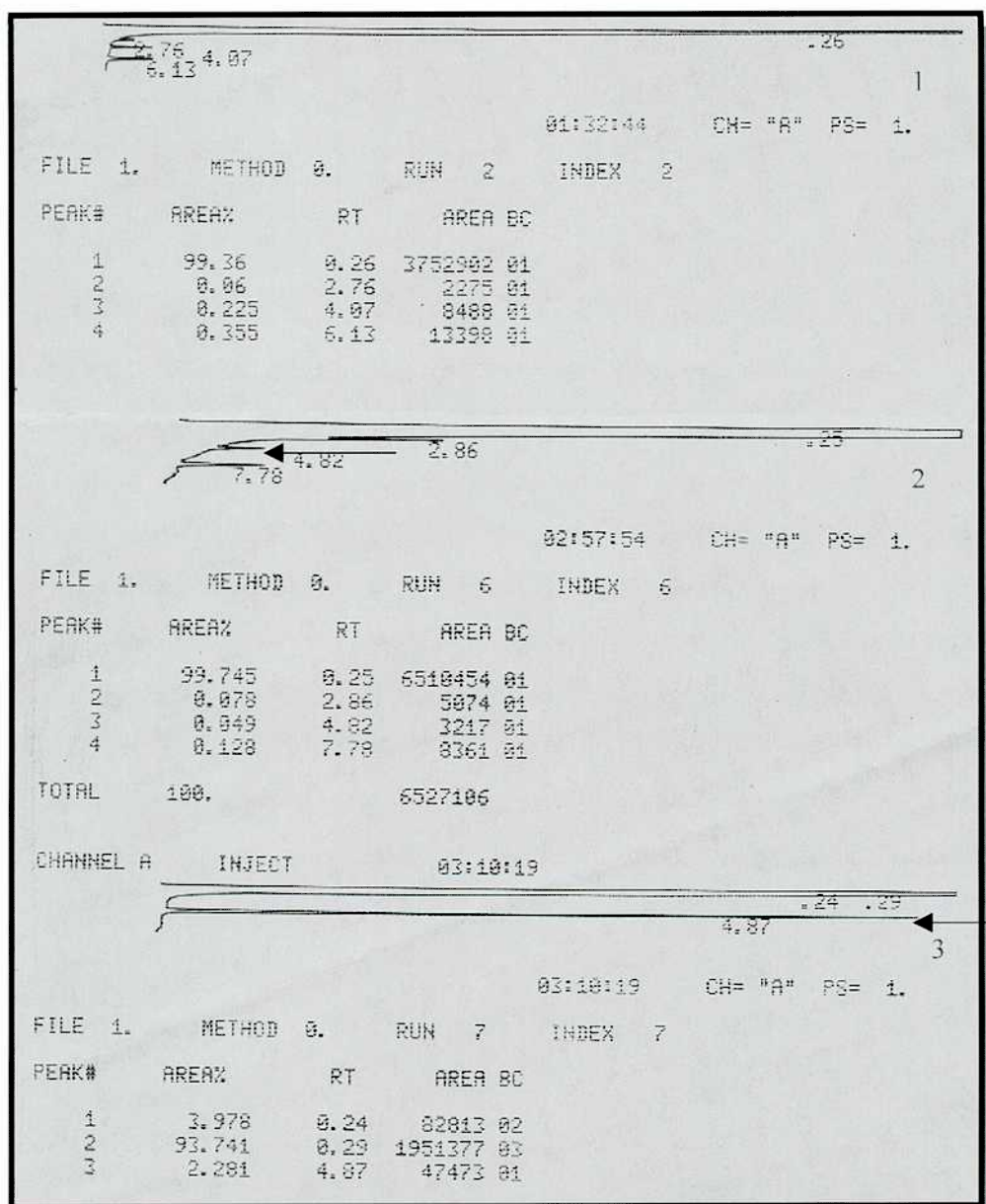
- ✓ Por último, también se observó que hubo un aumento en la acumulación de PHB en los cultivos suplementados con los aminoácidos (concordante con el aumento de la actividad Pbt).

Para terminar de corroborar que esta podría ser una ruta de producción de ácidos de grasos ramificados debido a la degradación de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina, en el segundo experimento se intentó detectar la presencia de estos ácidos en el sobrenadante extracelular. Para ello se utilizó una cepa mutante (por la inserción de un transposón) de *B. megaterium* PV447 denominada UBA 30-21 (Pettinari tesis doctoral, 1994).

Lo que se sabía de esta mutante por datos previos, era que bajaba en forma más pronunciada el pH del medio extracelular que la cepa control PV447 debido a que probablemente esta cepa sea incapaz de reutilizar los ácidos que excreta, como si lo hace *B. subtilis*. (Grundy *et al*, 1993)

Por ende, se creció esta cepa en el medio mínimo suplementado con glu 0.5% y la solución Ile-Val 0.5% y se analizó la presencia de ácidos en el sobrenadante extracelular, detectándolos por cromatografía gaseosa (**Figura 17**).

Figura 17: Detección de ácidos grasos de cadena corta, en el sobrenadante extracelular de la cepa *B. megaterium* UBA 30-21



← Indicación de Ac. Isobutírico

- 1) Patrones de Ac. acético, Ac. propiónico, Ac. butírico
- 2) Sobrenadante del medio extracelular: cepa *B. megaterium* UBA 30-21
- 3) Patrón de Ac. isobutírico

Por lo visto en los resultados de la **Figura 17**, se detectó en el sobrenadante extracelular la presencia del ácido isobutírico (derivado de la degradación del aminoácido Val), indicado por el pico cuyo tiempo de retención (TR) fue de 4.82 (**fig.17.2**). El patrón del ác. isobutírico tiene un TR de 4.87 (**fig. 17.3**). También se vio la presencia de otros dos ácidos representados por sendos picos detectados en este ensayo, el de TR 2.86 probablemente haya sido ácido acético (el patrón de este ácido tiene un TR de 2.76 (**fig.17.1**)) y el de TR de 7.78, que probablemente haya sido el ácido isovalérico que derivó de la degradación de la isoleucina. Este último pico detectado no es ni ác. butírico ni ác. propiónico, debido a que sus TR son 6.13 y 4.07 respectivamente (**fig.17.1**). La actividad enzimática Pbt de esta cepa UBA 30-21 es sólo ligeramente menor cuando se la comparó con la cepa control PV447 (dato no mostrado).

Por lo tanto, todos estos resultados mostraron lo siguiente:

- ✎ *B. megaterium* no excretó ácido butírico en cantidades detectables, a pesar de la actividad que se detectó de la enzima PbtBm. Esto es debido a que no se ha detectado el ácido, ni en esta cepa UBA 30-21 que aparenta no reutilizar los ácidos que excreta, ni en la cepa control PV 447 cuando se la creció con exceso de glucosa en medio SNB (**Figura 14**).
- ✎ *B. megaterium* aparentemente tendría la ruta de degradación de aminoácidos, valina, isoleucina y leucina, similar a la que es probable que exista en *B. subtilis*. Además en este microorganismo también estarían organizados los genes involucrados en esta ruta metabólica, de la misma forma que en *B. subtilis*.
- ✎ Por último, el producto del gen *pbtBm* (y probablemente su contraparte *yqiS* (*pbtBs*) de *B. subtilis*), estaría involucrado en esta ruta de degradación, involucrado en la formación de los ácidos grasos ramificados.

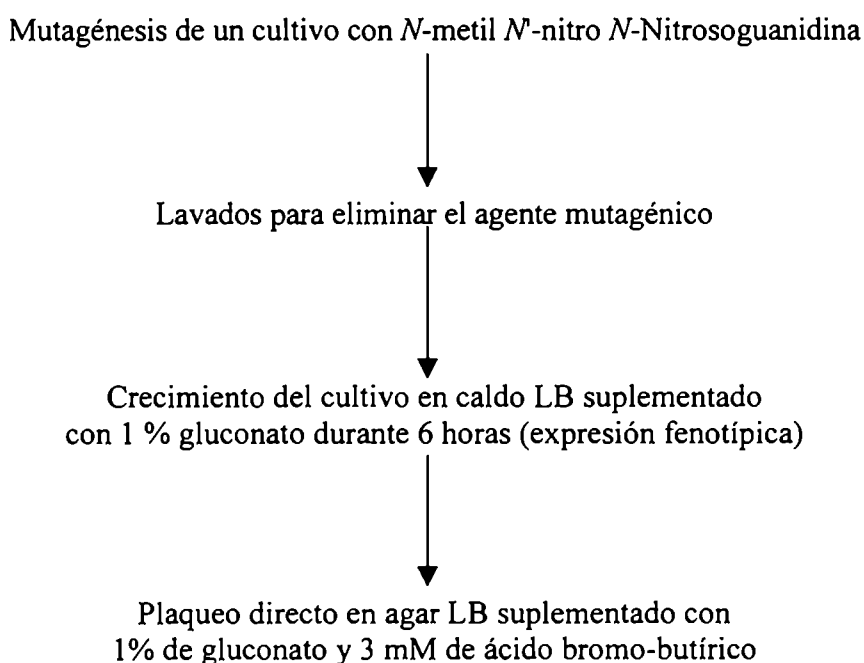
### **3) Obtención de mutantes Pbt-**

Con el objeto de obtener mayor información sobre el gen *pbtBm*, se encaró la estrategia de tratar de obtener mutantes para esta enzima seleccionando por el método de suicidio metabólico, muy utilizado para obtener mutantes de enzimas en este tipo de caminos metabólicos en *C. acetobutylicum*. En este caso, el compuesto utilizado fue el ácido bromo-

butírico. Este reactivo, al ser metabolizado, forma bromoacetil-S-CoA, éste resulta ser muy tóxico porque bloquea todas las rutas metabólicas involucradas en la utilización de las fuentes de carbono.

Para este experimento, se determinó la mínima concentración del compuesto para que no sobrevivan las cepas salvajes, pero que se supuso era la adecuada para seleccionar las mutantes que eventualmente sobrevivirían debido a que la mutación afectaría a alguna de las enzimas involucradas en la metabolización de este análogo. Este ensayo se realizó debido a que el ác. bromo-butírico, en altas concentraciones, podría haber resultado muy tóxico inclusive para las mutantes.

El esquema de selección de mutantes que se siguió fue el siguiente:



Por esta metodología se obtuvieron de 10 mutantes resistentes al ác. bromobutírico, a todas se les midió la actividad de la enzima Pbt. Encontróse que 9 tenían una actividad normal para esta enzima y sólo una tuvo alrededor del 20% de actividad Pbt. Esta mutante, por análisis con tinción de rojo de nilo, resultó que no acumulaba PHB, por ende aparenta ser una mutante regulatoria y las otras 9 seleccionadas posiblemente hayan sido mutantes del transporte de este compuesto.

De estos resultados se pudo concluir que, en nuestras condiciones experimentales, las mutantes nulas Pbt<sup>-</sup> resultan ser inviables o como alternativa puede ser que exista otra ruta más de utilización del ácido butírico. En este posible camino metabólico, lo que podría estar ocurriendo es la activación del ácido por el agregado directo de la Coenzima A, por medio de una enzima denominada Acil-CoASH sintetasa.

Este resultado no sorprende, porque cuando se intentó seleccionar mutaciones en el gen *pta* (fosfoacetato transferasa) en *Bacillus subtilis*, utilizando fluoroacetato, tampoco se pudieron seleccionar mutantes Pta<sup>-</sup>. El producto del gen *pta* de *B. subtilis* está involucrado tanto en la síntesis como en la utilización del ácido acético, en una serie de reacciones similares a la que realiza la enzima Pbt.

#### ♣ RELACIÓN ActBm y Pbt Bm

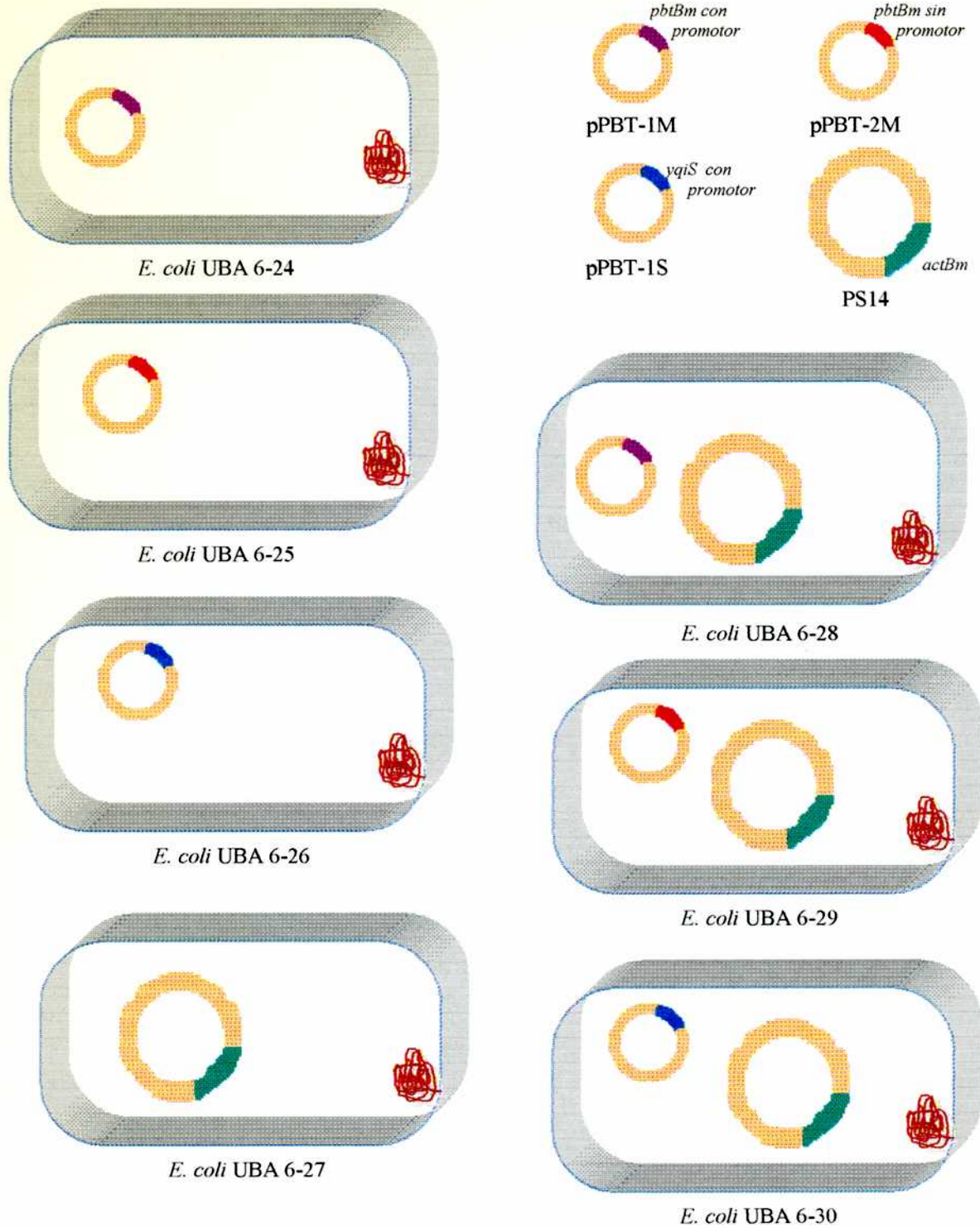
Finalmente se estudio la relación entre los genes *actBm* y *pbtBm*. En muchos operones dependientes de  $\sigma^{54}$ , los genes que lo integran se encuentran bajo control de un gen activador que se puede encontrar inmediatamente río abajo de los genes estructurales del operón. En general, estos activadores tienen una expresión constitutiva.

Teniendo en cuenta esta información, se planteó la hipótesis de que ActBm es la proteína encargada de activar al gen *pbtBm* (y a los posibles genes que estarían involucrados en la degradación de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina, que se encuentran río abajo del gen *pbtBm*).

Para corroborar dicha hipótesis se realizaron los siguientes experimentos, en el primero se analizó la expresión del gen *pbtBm* en presencia o no del posible activador ActBm en otro contexto genético, que en este caso fue el de la bacteria *E. coli*. Como se recordará, el gen *pbtBm* había sido clonado en el plásmido pCR11, pero este clon no tenía la secuencia completa del promotor (pPBT-1M, **Figura 18**), por lo cual se clonó el gen completo (con promotor incluido) *pbtBm* por medio de la técnica de PCR, utilizando los primers P4-P1 (pPBT-2M, **Figura 18**) y también se clonó por la misma técnica el gen *yqiS* (*pbtBs*)(pPBT-1S, **Figura 18**). Ambos se clonaron en el plásmido pGEM T Easy de la compañía Promega.

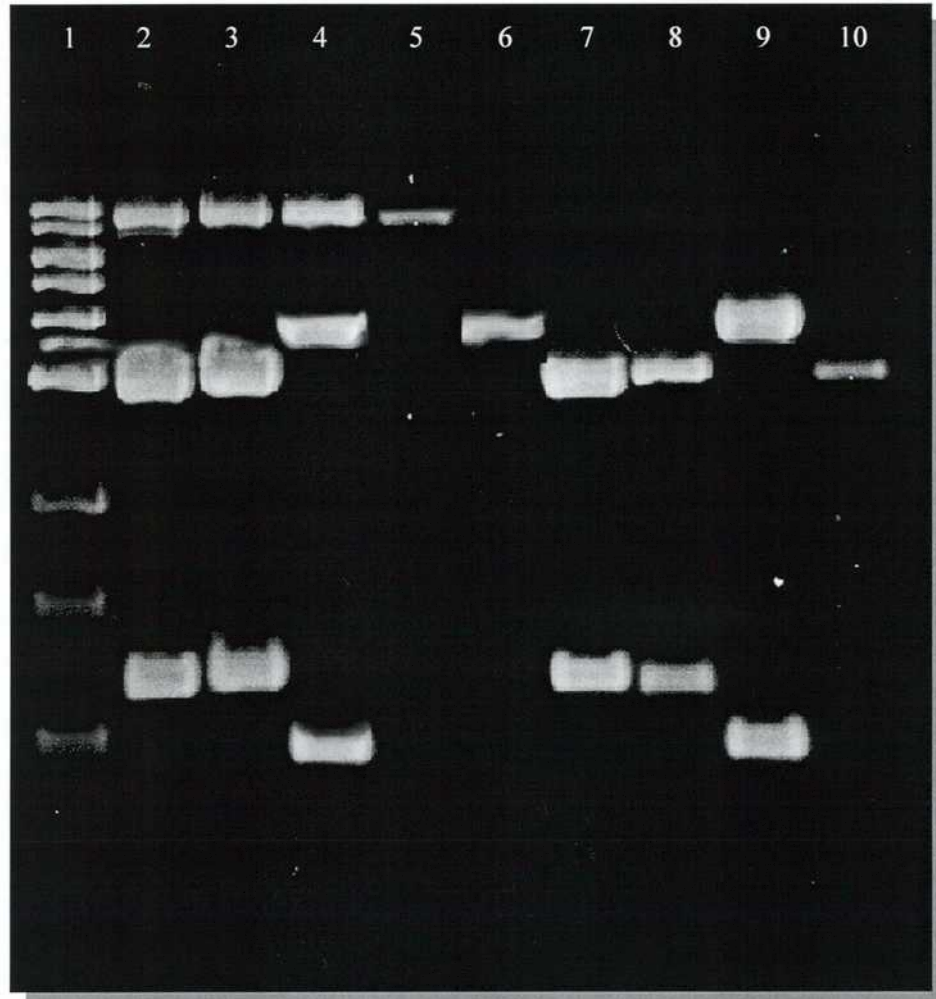
También se subclonó el gen *actBm* de pF14 en el plásmido movilizable pAT 18 (pS14, **Figura 18**), con el objetivo de poder construir por conjugación, merodiploides de este activador con los genes *pbtBm* y *pbtBs*. El esquema de las cepas se puede observar en la **Figura 18**. Las construcciones de clonado se observan en la **Figura 19**.

**Figura 18:** Esquema de las diferentes cepas y plásmidos utilizados para estudiar la relación ActBm-PbtBm





**Figura 19:** Extracción de ADN plasmídico de las diferentes cepas que se construyeron con el clonado por PCR de los diferentes genes *pbt* y las respectivas combinaciones con el gen *actBm*



- Calle 1: Marcador de Peso Molecular (1000 pares de bases)
- Calle2: ADN plasmídico cepa *E. coli* UBA 6-28 cortado con *EcoRI*
- Calle3: ADN plasmídico cepa *E. coli* UBA 6-30 cortado con *EcoRI*
- Calle4: ADN plasmídico cepa *E. coli* UBA 6-29 cortado con *EcoRI*
- Calle5: ADN plasmídico cepa *E. coli* UBA 6-27 cortado con *EcoRI*
- Calle6: pCRII cortado con *EcoRI*
- Calle7: ADN plasmídico cepa *E. coli* UBA 6-26 cortado con *EcoRI*
- Calle8: ADN plasmídico cepa *E. coli* UBA 6-24 cortado con *EcoRI*
- Calle9: ADN plasmídico cepa *E. coli* UBA 6-25 cortado con *EcoRI*
- Calle8: pGEM T Easy cortado con *EcoRI*

Una vez que se obtuvieron las construcciones y los clones, se procedió a medir la actividad de Pbt para ver si se producía la activación cuando estaba presente ActBm

Además como todas estas construcciones estaban en el contexto genético de *E. coli*, que es una bacteria que no posee estos genes *pbt*, se procedió también a ver cual era la especificidad de sustrato las diferentes enzimas Pbt, utilizando como sustrato de reacción no solo butiril-S-CoA, sino también isobutiril-S-CoA (ya que probablemente este sea el verdadero sustrato de la enzima Pbt) y 3-hidroxi-butiril-S-CoA (para determinar si se podría obtener ATP a partir de este sustrato derivado de la degradación del PHB, utilizando esta ruta metabólica).

Los resultados son expuestos en la **tabla 8**.

**Tabla 8:** Medición de la actividad enzimática de los productos de los genes *pbtBm* e *yquiS* (en presencia o en ausencia del *ActBm*), utilizando diferentes sustratos

Clones <i>E. coli</i>	Act Esp. U/mg prot But	Act Esp. U/mg prot IsoBut	Act Esp. U/mg prot HidroxiBut	Act Esp. U/mg prot Tiolasa II
<i>E. coli</i> XL-Blue pGEM o pCRII	nd	nd	nd	nd
<i>E. coli</i> UBA 6-25/ pPBT-2M	nd	nd	nd	nd
<i>E. coli</i> UBA 6-24/ pPBT-1M	299.4	369.4	147.6	nd
<i>E. coli</i> UBA 6-26/ pPBT-1S	1,223.4	1,999.2	38.1	nd
<i>E. coli</i> UBA 6-29/ pPBT-2M/pS14	nd	nd	nd	535
<i>E. coli</i> UBA 6-28/ pPBT-1M/pS14	915.6	1,233.2	348.5	nd
<i>E. coli</i> UBA 6-30/ pPBT-1S/pS14	762.3	1,225.2	35.5	nd
<i>E. coli</i> UBA 6-27/ pS14	nd	nd	nd	620

nd: no detectada. Sustratos But=butiril-S-CoA, IsoBut=isobutiril-S-CoA, HidroxiBut=3-hidroxiButiril-S-CoA.

Se observaron los siguientes resultados de la **tabla 8**:

- ✎ En el clon donde se encuentra el plásmido con el gen *pbtBm*, sin el posible promotor, no se detectó actividad enzimática. (*E. coli* UBA 6-25/pPBT-2M).
- ✎ En los clones donde se encuentran los plásmidos con los genes *pbtBm* e *yqiS*, con los posibles promotores, se detectó actividad enzimática, probablemente debido a la activación de estos genes por parte de algún factor de *E. coli*. (*E. coli* UBA 6-24/pPBT-1M y *E. coli* UBA 6-26/pPBT-1S).
- ✎ Con respecto a la especificidad de sustrato, se vio que los productos de estos genes *pbt* (tanto de *B. megaterium* como de *B. subtilis*) fueron capaces de utilizar variados tipos de ácidos grasos activados con CoASH, ramificados o no (se vio que también es son capaces de reaccionar hasta con el acetoacetil-S-CoA, dato no mostrado). La mayor actividad enzimática, entre los sustratos analizados, se detectó (para ambas enzimas) con isobutiril-S-CoA. Este resultado corroboró que las enzimas están involucradas en la formación de los ácidos grasos ramificados durante degradación de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina, ya que el isobutiril-S-CoA es un sustrato derivado de la degradación del aminoácido valina (**Figura 18**).
- ✎ También se observó que la enzima *PbtBm* tuvo como sustrato 3-hidroxi-butiril-S-CoA. Esto es importante de remarcar debido a que durante el proceso de degradación de PHB en *B. megaterium* se produce 3-hidroxi-butiril-S-CoA. Por otro lado, *B. subtilis* no produce PHB y como se puede observar en la tabla 8, la actividad enzimática cuando utilizó a este sustrato es menor en relación a la actividad de isobutiril-S-CoA, cuando fue comparada con respecto a la misma relación de actividades en *B. megaterium*.
- ✎ Como resultado directo más importante que se derivó del análisis de la **tabla 8**, SE VIO QUE *ActBm* ES CAPAZ DE ACTIVAR AL GEN *pbtBm* EN *E. coli*, ya que aumento tres veces la actividad enzimática del clon *E. coli* UBA 6-28/pPBT-1M/pS14 con respecto

a la cepa *E. coli* UBA 6-24/pPBT-1M. Por otra parte, el clon *E. coli* UBA 6-29/pPBT-2M/pS14, no se detectó actividad alguna aún con la presencia del activador.

- ✎ Otro resultado indirecto de esta activación fue que en el clon que tiene el plásmido con el gen *pbtBm* completo junto con el ActBm NO SE DETECTO ACTIVIDAD DE TIOLASA II, cosa que si ocurrió con el clon *E. coli* UBA 6-29/pPBT-2M/pS14 (acá el gen *pbtBm* esta sin el promotor). Este resultado indicó una posible titulación del activador ActBm por parte del promotor específico, que está en el gen *pbtBm* del plásmido pPBT-1M, de tal forma que el ActBm ya no transactivó los genes del operón *ato* de *E. coli*.

Finalmente, para ver cual puede ser el efecto del activador sobre el gen *pbtBm* dentro del propio contexto genético de *B. megaterium*, se realizó una conjugación utilizando el clon *E. coli* UBA 6-27/pS14 (que tiene el gen *actBm*). Este plásmido es derivado del pAT18 que además de ser movilizable, tiene un origen de replicación de alto número de copias en bacterias Gram positivas, además es muy estable en *B. megaterium*.

Entonces, luego de la introducción del pS14 a *B. megaterium* por conjugación, se midió la actividad enzimática Pbt en la transconjugante (*B. megaterium* UBA 30-24) y se la comparó con respecto a la cepa control PV447. Para este experimento ambas cepas fueron crecidas en un medio mínimo con Glu 0.5% e Ile-Val 0.5%. Los resultados se pueden observar en la **tabla 9**

**Tabla 9:** Medición de la actividad enzimática PbtBM

Cepas <i>B. megaterium</i>	Rel. Act. But.	Rel. Act. IsoBut.	Rel. PHB
PV 447	100	100	100
UBA 30-24	131	131	290

**Rel. Act. But:** relación de la actividad específica de la enzima PbtBm utilizando como sustrato de reacción el butiril-S-CoA.

**Rel. Act. IsoBut:** relación de la actividad específica de la enzima PbtBm utilizando como sustrato de reacción el isoButiril-S-CoA.

**Rel. PHB:** relación de la acumulación de PHB % p/p

Se observó en los resultados de la **tabla 9**, que la sobreexpresión del ActBm, generó un 30% de aumento en la actividad Pbt. Esto es muy significativo debido a que las condiciones de crecimiento de ambas cepas implicaban una alta expresión de este gen por la presencia en el medio de los aminoácidos Ile-Val. También ocurrió un aumento en la acumulación del PHB de cerca de tres veces, lo que corroboró que el aumento de la actividad Pbt implica también un aumento de la producción de PHB en *B. megaterium*

## DISCUSION

El grave problema de contaminación que causa la acumulación de los plásticos derivados del petróleo ha hecho que se comiencen buscar polímeros alternativos menos contaminantes. En los últimos años una de las alternativas que tomó impulso fue la utilización de los PHAs, que en algún momento se explotaron comercialmente pero que todavía resultan muy caros para utilizarlos como plásticos a gran escala. Por esto se están realizando dos tipos de estrategias para lograr abaratar el precio de este biopolímero, por un lado se están clonando los genes *pha* en las plantas, para que se pueda obtener el plástico biodegradable a partir del CO<sub>2</sub> mediante el proceso de fotosíntesis. La segunda estrategia se basa en el diseño metabólico y la mutagénesis dirigidas de las PHA sintasas clonadas (Steinbüchel y Valentin, 1995), para poder abaratar los costos del proceso fermentativo y obtener nuevos tipos de poliésteres.

Para la cristalización de esta segunda estrategia, el primer paso realizado exitosamente a escala mundial, fue el rastreo de microorganismos productores de diferentes tipos de PHAs y además la búsqueda de especies bacterianas que producen estos biopoliésteres a partir de fuentes de carbono menos costosas. Dentro de este rastreo se clonaron una gran variedad de PHA sintasas (Steinbüchel y Valentin, 1995). En el momento actual, se está dando el segundo paso que consiste en el análisis de los factores que influyen el metabolismo de acumulación de PHA en los diferentes microorganismos, con el objetivo de mejorar la proporción del poliéster almacenado en los gránulos intracelulares.

Es entonces en este marco, que se enfocó el trabajo de tesis en el estudio de un fragmento del genoma de *B. megaterium* aislado en nuestro laboratorio, con genes que podrían estar involucrados en el metabolismo del PHB y que están clonados en un plásmido que se denominó pBMe3.

El estudio de este fragmento, determinó que se encontraban presentes 3 ORFs, dos que estaban completos y uno truncado. El primer marco de lectura deducido de este fragmento



(ORF1) fue corroborado en este trabajo, que puede transactivar el operón *ato* de *E. coli*, ya que puede complementar mutantes *atoC*. La secuencia de aminoácidos codificada, tomada la proteína en su conjunto, presenta homología con otros activadores dependientes de  $\sigma^{54}$ , siendo una de las más fuertes la que muestra con el regulador AtoC de *E. coli*; que es justamente la proteína encargada de activar el operón *ato* en esta enterobacteria (Jenkins y Nunn, 1987). Es por estos resultados que al ORF1 se lo denominó *actBm*

Un análisis meticuloso de esta secuencia de aminoácidos nos revela que este activador, presenta los 3 dominios funcionales distintos que identifican a esta familia de reguladores:

- ✓ el dominio aminoterminal posee homología solo con la proteína YqiS
- ✓ el dominio central del *ActBm* es la zona donde se encuentra una gran homología con los dominios homónimos de los otros activadores  $\sigma^{54}$ , pero entre ellos, una de las más altas es con la región central de la proteína AtoC
- ✓ el dominio carboxi-terminal posee un motivo H-T-H de unión al ADN y también en este caso la homología con el dominio H-T-H del regulador AtoC, es muy grande.

Entonces para poder activar la expresión del operón *ato* de *E. coli* desde su promotor, el motivo H-T-H presente en el *ActBm* debe unirse a los UASs específicos que son reconocidos por AtoC. Trabajos previos de Jenkins y Nunn (1987) en *E. coli* demostraron que algunas mutantes puntuales constitutivas para AtoC mapean en la región carboxi-terminal de esta proteína. Por ende las diferencias en el motivo H-T-H entre ambas especies podrían ser la causa del efecto derepresivo causado por *ActBm*. Sin embargo, también se mostró un efecto de derepresión similar en los activadores NifA de *Rizobium meliloti* y al DctD de *R. leguminosarum* (Huala y Ausubel, 1989, Huala *et al*, 1992) en donde la transcripción de los genes bajo sus respectivas regulaciones, pueden ser activados por la sola presencia del dominio carboxiterminal, cuando se lo expresa en altos niveles.

Dentro del estudio del metabolismo del PHB en general, uno de los puntos importantes es el análisis de aquellos factores que puedan alterar la estructura del PHB de tal forma de mejorar su calidad como plástico al hacerlo menos rígido. Teniendo en cuenta este punto, el descubrimiento del activador *ActBm* puede resultar de fundamental importancia ya que a través de él se podría controlar la expresión de los genes *ato* de las diferentes cepas recombinantes de *E. coli* productoras de PHB y con ello poder utilizar fuentes de carbono



alternativas que son metabolizadas a través de los sistemas Ato y Fad (sistema de degradación de ácidos grasos de cadena larga). Un ejemplo de este tipo de compuestos metabolizados por ambas vías de degradación de ácidos grasos es el ácido propiónico. De esta forma, se podrían incorporar otros esqueletos carbonados además del PHB (por ej. El hidroxivalerato) formando copolímeros con mejores propiedades plásticas.

El segundo ORF encontrado en el fragmento dentro de pBMe3 (denominado ORF2), mostró una alta homología con los sensores histidina-quinasa, pertenecientes a los pares de regulación sensor-activador. Este tipo de proteínas tienen capacidad de autofosforilarse en respuesta a diferentes tipos de estímulos y transmitir este grupo fosfato a un residuo del aminoácido ácido aspártico de otra proteína efectora cuya función puede ser la activación de otros genes o la estimulación de otras proteínas, en ambos casos como respuesta a esta señal. Todo este proceso se denomina transducción de señales.

Para el ORF2, la más alta homología entre los diferentes sensores encontrados, fue con el AtoS (posible proteína sensora del operón *ato*). Sin embargo hay varias características de la probable proteína sensora de *B. megaterium* que determinarían un rol diferente con respecto al AtoS. El análisis de la secuencia aminoacídica del ORF2, no mostró ninguna región transmembrana, aunque si un posible sitio de miristoilización, lo que potencialmente le permitiría anclarse a membrana cuando se le agrega este grupo miristoil a la proteína. Por otra parte, además del sitio de autofosforilación (que se encuentra en una zona conservada alrededor del aminoácido histidina, entre los diferentes sensores estudiados), se detectaron otros diferentes sitios de fosforilaciones mediados por otro tipos de quinasa, lo cual abre la posibilidad de que, además de captar una determinada señal específica para lograr la autofosforilación, también reciba señales de fosforilación vía otro tipo de protein quinasa. Finalmente, en la secuencia del extremo aminoterminal, se encuentra un bloque de aminoácidos que posee una alta homología con otra región conservada de las proteínas acil-S-CoA dehidrogenasas. Especulativamente, se podría decir que esta proteína es capaz de sensar la presencia de moléculas acil-S-CoA.

Como conclusión, todos estos resultados estarían indicando que se trataría de una proteína sensora encargada de monitorear señales intracelulares (probablemente la presencia de moléculas de acil-S-CoA) y no de un sensor del tipo AtoS, capaz de transducir una señal extracelular.

El último ORF encontrado en el pBMe3 estaba truncado, pero la homología de esta secuencia parcial mostraba alta semejanza con la enzima fosfobutiltransferasa (Pbt) de *C. acetobutylicum*. Estos genes no son esperados dentro del género *Bacillus* debido a que codifican para enzimas que se encuentran, generalmente, en organismos anaerobios.

Cuando se midió la actividad Pbt, esta fue detectada en *B. megaterium* PV447 (Es por esto que se denominó a este gen *pbtBm*) y mostraba un complejo patrón de expresión.. Sin embargo esta actividad no puede ser asociada con la excreción de ácidos ya que los resultados de los cultivos de esta cepa en diferentes condiciones favorables para la producción de ácidos, mostraron que la actividad Pbt no está relacionada con la bajada del pH del medio extracelular. Los valores máximos de actividad de esta enzima fueron detectados siempre en la fase temprana del estado estacionario, cuando el pH extracelular ya era bajo. En cambio, esta máxima actividad si es coincidente con el momento de máxima acumulación de PHB, o sea que la expresión de la enzima parecería ser un fenómeno asociado al estadio o estado interno de la bacteria.

En *C. acetobutylicum* la enzima Pbt está involucrada en la síntesis de ácido butírico debido a que estos microorganismos utilizan el proceso de síntesis del ácido para la formación de ATP a nivel de sustrato, a fin de obtener la energía necesaria que utilizarán en sus procesos celulares. En el caso de *B. megaterium*, debido a la existencia del gen y la expresión detectada de esta enzima, se podría especular que parecería existir un mecanismo esencialmente similar para la producción de ATP a nivel de sustrato, probablemente bajo determinadas condiciones fisiológicas. Esto le aseguraría al microorganismo la energía necesaria para continuar todos sus procesos celulares durante todo el período correspondiente a la fase estacionaria, previo a la esporulación, en donde muchas veces el ciclo de Krebs se encuentra detenido por un posible estado de anaerobiosis debido a la densidad de bacterias. El problema metabólico que surge es que podría existir una especie de "competencia" entre esta ruta de formación de ácidos con la ruta biosintética de PHB, por los sustratos que compartirían en común tal como el acetyl-S-CoA o el acetoacetyl-S-CoA. Si esto realmente ocurriera es de esperar que baje la eficiencia de producción de PHB por parte de este microorganismo.

Pero el hecho es que en *B. megaterium* no se detectó ácido butírico en ninguna de las condiciones de crecimiento analizadas. Esto podría ser, porque este compuesto se reutiliza

muy rápidamente (vía una acil-S-CoA transferasa) de modo que no resulte tóxico para la bacteria; o como alternativa, podría ser que en realidad esta enzima Pbt utilice diferente(s) tipo(s) de sustrato(s), parecido(s) al butiril-S-CoA.

Cuando se analizó la secuencia del fragmento clonado en el pBMe3 en su conjunto (y además disponiendo, en ese momento, de toda la secuencia del ADN genómico de *B. subtilis*), se vio que este fragmento tenía una altísima homología con una región de *B. subtilis* que aparenta estar involucrada en la degradación de los aminoácidos leucina, valina e isoleucina. En esta región, el primer gen es el *yqiR* que tiene una alta homología con el gen *actBm* y el segundo es el gen *yqiS* que a su vez tiene una alta homología con el gen *pbtBm*. El resto de los genes de esta región, como ya fue mencionado, estarían involucrados en la degradación de los aminoácidos.

Estos datos estarían indicando, entonces, que en *B. subtilis* esta enzima YqiS, esté involucrada en la formación de ácidos grasos de cadena corta ramificados que se derivan de intermediarios de la degradación de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina. En el proceso de metabolización de estos aminoácidos se producen diferentes tipos de ácidos grasos ramificados activados con el grupo CoASH, que podrían ser los sustratos del YqiS. Por otra parte se sabe que *B. subtilis*, dependiendo de las condiciones de cultivo, excreta varios tipos diferentes de ácidos grasos de cadena corta. Entre ellos, excreta ácidos grasos ramificados, como el isobutírico, (Speck y Freese, 1973). En *B. subtilis*, estos ácidos son rápidamente reutilizados para no bajar muy drásticamente el pH, además que los productos de la remetabolización de estos ácidos extracelulares, sirven como fuente de carbono extracelular que se utiliza en el período final de la fase estacionaria, cuando se acerca a la liberación de las esporas. (Grundy *et al*, 1993)

Con respecto a la enzima Pbt de *B. megaterium* (y teniendo en cuenta lo antes mencionado sobre *B. subtilis*) en este trabajo, se demostró:

- ✓ que la expresión de enzima *PbtBm* sufre represión catabólica, lo que implica que ella es importante para metabolización de fuentes de carbono, ya que la represión catabólica se da, en general, para sistemas involucrados en la utilización de fuentes secundarias de carbono (Grundy *et al*, 1994).
- ✓ que los aminoácidos valina, leucina e isoleucina activan la expresión de esta enzima. Este tipo de control regulatorio de la expresión genética por parte de estos aminoácidos, no es

algo nuevo en *B. megaterium* ya que estos mismos aminoácidos pueden reprimir entre un 12 y 32% la producción de la proteasa neutra extracelular. (Millet y Aubert, 1969). Lo que nos está indicando que ellos pueden ser fuente para algún tipo de señal intracelular

- ✓ que el ActBm es una de las proteínas (sino la principal y única) encargada de la activación del gen *pbtBm*
- ✓ uno de los sustratos que es capaz de utilizar esta enzima PbtBm es el isobutiril-S-CoA, que también es el derivado de la degradación de la valina, esto implica que la PbtBm está involucrada en la ruta de degradación de los aminoácidos valina, leucina e isoleucina. Además se demostró que es el sustrato, de entre todos los probados, con el que logra la mayor actividad específica
- ✓ en la cepa control de *B. megaterium*, bajo ninguna condición de crecimiento se detectaron ácidos grasos ramificados en el sobrenadante del cultivo, inclusive en medios con los aminoácidos involucrados, esto podría llegar a deberse por lo ya descrito para *B. subtilis* sobre la posible reutilización rápida de los ácidos secretados (Grundy *et al*, 1993). Pero sí se descubrieron los ácidos grasos ramificados analizando el sobrenadante del cultivo de la cepa PHB leaky que se aisló en nuestro laboratorio (*B. megaterium* UBA 30-21). Esta cepa aparenta ser incapaz de reutilizar los ácidos excretados. Este último resultado, o sea el hecho de encontrar el producto final de esta posible ruta metabólica, es una prueba mas sobre lo anteriormente descrito con respecto a cual podría ser la función de esta enzima PbtBm en *B. megaterium*
- ✓ Se sabe que la acumulación de PHB es un proceso dinámico en donde ocurren al mismo tiempo la síntesis y la degradación del biopolímero( Merrick *et al*, 1965). Además, uno de los sustratos de la PbtBm es el 3-hidroxi-butiril-S-CoA, que se produce tanto en la biosíntesis como en la degradación del PHB, en este microorganismo. Pero si tomamos en cuenta el proceso de degradación, se podría especular que con el hidroxibutiril-S-CoA producido durante la metabolización del PHB, podría ser uno de los sustratos para producir energía, utilizando la enzima PbtBm, mediante la fosforilación a nivel de sustrato. Un resultado importante, que aporta más información al respecto, fue reportado en un estudio sobre los eventos que tiene lugar en un cultivo de *B. megaterium*, una vez llegado a su fase de máxima acumulación de PHB. En dichos experimentos, llegado a este punto de almacenamiento de PHB, se cambia la atmósfera de crecimiento del

microorganismo y se lo somete durante un determinado período de tiempo, a condiciones de utilización de PHB en estados anaeróbicos o aeróbicos fuertes. Al final de el experimento se mide, en ambas condiciones los productos ácidos que se excretan y la proporción de PHB que se degradó. En condiciones aeróbicas, casi todo el PHB degradado se convirtió en CO<sub>2</sub> y una parte se transformó en ácido pirúvico y ácido acético. En cambio en condiciones anaeróbicas el proceso de degradación del polímero fue importante, y además, se detectó la excreción de **ácido 3-hidroxibutírico** y **acetoacetato** al medio extracelular. (McRae y Wilkinson, 1958)

Por último, los resultados de la expresión de la enzima en los diferentes medios de cultivo en el que fue crecido *B. megaterium* mostraron:

- ♦ una correlación entre el aumento en la actividad de PbtBm y el aumento en la acumulación de PHB, como ya fue mencionado anteriormente
- ♦ que el momento de máxima actividad de la enzima se correspondía con el de máxima acumulación de PHB
- ♦ que la expresión del gen PbtBm sigue el mismo patrón que el de la acumulación de PHB, en los medios complejos en los cuales fue estudiado.

Todos estos hechos llevan a especular que podría haber una relación entre estos dos fenómenos estudiados, que podría darse en el contexto de una regulación global que implique a ambos. Se sabe que en *B. megaterium* la expresión de los genes PHB sintasa y fasina se comienza a dar cerca del final de la fase exponencial y el principio de la fase estacionaria, mientras que en la fase exponencial apenas son detectables ambas proteínas. Resultados similares se dan con la actividad de la enzima PbtBm (sobre todo en medio SNB).

Como alternativa, otra explicación podría ser que la enzima PbtBm este aportando sustrato activado (que podría ser el hidroxibutiril fosfato) a la enzima PHB sintasa para el inicio de la síntesis de PHB, etapa de la biosíntesis del polímero sobre la cual no existe información. Entonces, bajo esta hipótesis, cabría esperar una coexpresión del gen *pbtBm* y las enzimas de la ruta de síntesis de PHB, además es probable que a mayor actividad PbtBm, mayor cantidad de PHB sintasas "activadas" por el 3-hidroxibutiril fosfato y con esto también mayor cantidad de PHB producido.

## **BIBLIOGRAFIA**

- \* Anderson A. y Dawes E. (1990) Occurrence, metabolism, metabolic role and industrial uses of Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54:451-472.
- \* Anthmatten D. y Hennecke H. (1991). The regulatory status of the fixL- and fixJ-like genes in *Bradyrhizobium japonicum* may be different from that in *Rhizobium meliloti* *Mol. Gen. Genet.* 225:38-48
- \* Ausubel F. (1984) Regulation of nitrogen fixation genes. *Cell* 37:5-6.
- \* Albright, L., Huala, E. y Ausubel, F. (1989) Prokariotic Signal Transduction mediated by sensor and regulator proteins pairs. *Ann Rev Genet* 23:311-336
- \* Bohall N., y Vary P. (1986) Transposition of Tn917 in *Bacillus megaterium*. *J. of Bacteriol.* 167: 716-718.
- \* Brand H., Gross A., Lenz R. y Fuller R. (1988) *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Appl. Env. Microbiol.* 54:1977-1982.
- \* Braunegg G., Sonnleitner y Lafferty R. (1978) A rapid gas Chromatographic method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutiric acid in microbial biomass. *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*; 6:29-37.

- \* Bullock, W., Fernández, J.M. y Short, J.. (1987). XL1-Blue: a high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with  $\beta$ -galactosidase selection. *Bio Techniques* 5, 376- 379
- \* Burland D., Plunkett G. III, Sofia J., Daniels D. y Blattner F. (1995) Analysis of the *Escherichia coli* genome VI: DNA sequence of the region from 92.8 through 100 minutes.;*RL Nucleic Acids Res.* 23:2105-2119
- \* Canellakis E, Paterakis A., Huang S.-C., Panagiotidis C. y Kyriakidis D (1993). Identification, cloning, and nucleotide sequencing of the ornithine decarboxylase antizyme gene of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90:7129-7133
- \* Cary J, Petersen D., Papoutaskis E., y Bennett G. (1988) *J. Bacteriol.* 170:4613-4618
- \* Chen, C., Hogarth, L. y Shanley, M.. (1991). Regulatory sequences controlling short chain fatty acid metabolism in *Escherichia coli*. *SAAS Bull. Biochem.Biotechnol.* 4: 22-26.
- \* Dawes E. and Senior P. (1973). The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. *Adv.Microbiol. Physiol.* 14:135-266.
- \* Dodd, Y. y Egan, J. (1990). Improved detection of helix-turn-helix DNA-binding motifs in protein sequences. *Nucleic Acids Res.* 18:5019-5026.
- \* Feigenbaum, J. y Schultz, H. (1975). Thiolases of *Escherichia coli*: Purification and chain length specificities. *J Bacteriol* 122, 407-411
- \* Findlay R. y White D. (1983). Polymeric  $\beta$ -hydroxyalcanoates from enviromental samples and *Bacillus megaterium*. *Appl. Envirom. Microbiol.* 45:71-78.

- \* Floccari M., Tiscornia G., Palmada F. y Méndez B.(1991). Enriquecimiento en mutantes de *Bacillus megaterium* deficientes en la síntesis de poli-(3-hidroxi-butirato). Rev. Arg. Microbiol. 23:14-25.
  
- \* Folin I. y Ciocalteu V.(1927). J. Biol. Chem. 73:637-642
  
- \* Gerngross T., Snell K., Peoples O., Sinskey A, Cshai E., Masamune S. y Stubbe J. (1994) Overexpression and purification of the soluble polyhydroxyalcanoate synthase from *Alcaligenes eutrophus*: Evidence for a required postranslational modification for catalytic activity. Biochem 33:9311-9320.
  
- \* Gerngross T., Reilly P., Stubbe J., Peoples O. y Sinskey A. (1993): Immunocytochemical analysis of polyhydroxybutyrate (PHB) synthase in *Alcaligenes eutrophus* H16: Localization of the synthase enzyme at the surface of PHB-granules. J. Bacteriol 175:5289-5293.
  
- \* Griebel R. y Merrick J. (1971). Metabolism of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate: effect of mild alkaline extraction on native poly- $\beta$ -hydroxybutyrate granules. J. Bacteriol.108:782-789.
  
- \* Griebel R., Smith Z. y Merrick J. (1968). Metabolism of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. I Purification, composition, and properties of native poly- $\beta$ -hydroxybutyrate granules from *Bacillus megaterium*. Biochemistry 7:3676-3681.
  
- \* Grundy F., Turinsky A. y Henkin T. (1994) Catabolite regulation of *Bacillus subtilis* acetate and acetoin utilization genes by CcpA. J. Bacteriol.176: 4527-4533.
  
- \*Grundy, F, Waters D., Tsetska Y. y Henkin T. (1993) Identification of genes involved in utilization of acetate and acetoin in *B. subtilis*. Mol. Microbiol 10(2): 259-271.
  
- \* Hannahan D, Jessee J. y Bloom F. (1991) Methods in Enzymology: Bacterial Genetics Systems; 204:73-75



- \* Haywood G., Anderson A., Chu L. y Dawes E. (1988a). Characterization of two  $\beta$ -ketothiolases possessing differing substrate specificities in the polyhydroxyalkanoate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. FEMS Microbiol.Lett. 52: 91-96
- \* Haywood G., Anderson A., Chu L. y Dawes E. (1988b). The role of NADH and NAD(P)H linked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. FEMS Microbiol.Lett. 52: 259-264
- \* Huala E. y Ausubel, F. (1992) The central domain of *Rhizobium leguminosarum* DctD functions independently to activate transcription. J Bacteriol 174, 1428-1431
- \* Huala E. y Ausubel F.M. (1989) The central domain of *Rhizobium meliloti* NifA is sufficient to activate transcription from the *R. meliloti nifH* promoter J Bacteriol. 171, 3354-3365
- \* Hueck C., Kraus A., Schmiedel D. y Hillen W. (1995) Cloning, expression and functional analyses of the catabolite control protein CcpA from *Bacillus megaterium*. Mol. Microbiol. 16(5): 855-864
- \* Huisman G., Wonink E., Koning G., Preusting H. y Witholt B. (1992). Synthesis of Poly(3-hydroxyalkanoates) by mutant and recombinant *Pseudomonas* strains. Appl. Microbiol. Biotechnol: 38:1-5
- \* Huisman G., Wonink E., Meima R., Kazemier B., Tepstra P. y Witholt B. (1991). Metabolism of Poly(3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas oleovorans*: identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA. J. Biol. Chem. 266:2191-2198
- \* Hustede E., Steinbüchel A. y Schlegel H. (1992). Cloning of poly(3-hydroxybutiric acid) synthase genes of *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodospirillum rubrum* and heterologous expression in *Alcaligenes eutrophus*. FEMS Microbiol. Lett. 93: 285-290

- \* Janes B., Hollar J. y Dennis D. (1990). Molecular Characterization of the poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthetic pathway of *A. eutrophus* H16. In Novel Biodegradable Microbial Polymers (ed. Dawes, E.A.) pp 175-190 Kluwer, Dordrecht
- \* Jenkins L. y Nunn W. (1987a). Genetic and molecular characterization of the genes involved in short-chain fatty acid degradation in *Escherichia coli*: The *ato* system. J Bacteriol 169, 42-52
- \* Jenkins L. y Nunn W. (1987b). Regulation of the *ato* operon by the *atoC* gene in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 169, 2096-2102.
- \* Kaminski P. y Elmerich C. (1991) Involvement of *fixLJ* in the regulation of nitrogen fixation in RT *Azorhizobium caulinodans*. Mol. Microbiol. 5:665-673.
- \* Laemmli U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature (London) 227:680-685.
- \* Lemoigne M. y Girard H. (1943). Reserves lipidiques  $\beta$ -hydroxybutyriques chez *Azotobacter chroococum*. C. r. hebd Séanc. Acad. Sci 217:557-558
- \* Liebergesell M., Schmidt B. y Steinbüchel A. (1993a). Isolation and identification of granule-associated proteins relevant for poly(3-hydroxyalkanoic acid) biosynthesis in *Chromatium vinosum* D. FEMS Microbiol.Lett. 99:227-232
- \* Liebergesell M. y Steinbüchel A. (1993b). Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxybutyric acid) biosynthetic genes of *Thiocystis violacea*. Appl.Microbiol.Biotechnol. 38: 493-501
- \* López N., Ruiz J. y Méndez B (1998). Survival of polyhydroxyalkanoates producing bacteria in soil microcosms World J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 14: 681-684.

- \* López, N, Floccari M, Steinbüchel A., García A. y Méndez B. (1995). Effect of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) content on the starvation-survival of bacteria in natural waters. FEMS Microbiol.Lett.16:95-102
- \* Lowry O., Rosebrough N., Farr L.y Randall R. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193:265-275
- \* Macare R. y Wilkinson, J. (1958). Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. J. Gen. Microbiol. 66:210-222
- \* Malm T., Bowald S., Bylock A.y Busch C. (1992). Prevention of postoperative pericardial adhesions by closure of the pericardium with absorbable polymer patches. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. 104: 600-607
- \* McCool G. y Cannon M. (1999). Polyhydroxyalkanoate inclusion body-associated proteins and coding region in *Bacillus megaterium*. J. Bacteriol.181:585-592.
- \* Millet J. y Aubert J. (1969). Ann.Inst Pasteur 117:461-473
- \* Merrick J., Lundgren D. y Pfister R. (1965) Morphological Changes in Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate granules associated with decreased susceptibility to enzymatic hydrolysis. J. Bacteriol 50:234-239
- \* Morett, E. y Segovia, L. (1993) The  $\sigma^{54}$  bacterial enhancer-binding protein family: mechanism of action and phylogenetic relationship of their functional domains. J Bacteriol 175, 6067-6074
- \* Moskowitz G. y Merrick J. (1969). Metabolism of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. II Enzymatic synthesis of D(-)- $\beta$ -hydroxybutyryl coenzyme A by enoyl hydratase from *Rhodospirillum rubrum*. Biochemistry, N. Y. 8:2748-2755.

- \* Myake M, Kataoka K., Shirai, M y Asada Y. (1997). Control of Poly- $\beta$ -(hydroxybutyrate) Synthase mediated by acetyl phosphate in Cyanobacteria. *J. Bacteriol.* 179:5009-5013.
- \* North, A., Kolse, K., Stedman, K. y Kustu, S. (1993) Prokaryotic enhancer-binding proteins reflect eukaryotic-like modularity: the puzzle of nitrogen regulatory protein C. *J. Bacteriol* 175, 4267-4273.
- \* Oeding V. y Schlegel H. (1973).  $\beta$ -Ketothiolase from *Hydrogenomonas eutropha* H16 and its significance in the regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism. *Biochem. J.* 134:239-249
- \* Ostle A. y Holt J. (1982). Nile Blue as a fluorescent stain for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. *Appl. Env. Microbiol.*44:238-241.
- \* Pauli G., y Overath P. (1972) *ato* operon: a highly inducible system for acetoacetate and butyrate degradation in *Escherichia coli*. *Eur J Biochem* 29, 553-562
- \* Pawlowski K., Klosse U., De Bruijn F. (1991). Characterization of a novel *Azorhizobium caulinodans* ORS571 two component regulatory system, NtrY/NtrX, involved in nitrogen fixation and metabolism. *Mol. Gen. Genet.* 231:124-138
- \* Peoples O. y Sinskey, A. (1989). Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes eutrophus* H16. Characterization of the genes encoding  $\beta$ -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase. *J. Biol. Chem.* 264:15293-15297
- \* Pérez-Martín, J y De Lorenzo V. (1995) Integration host factor suppresses promiscuous activation of the  $\sigma^{54}$  dependent promoter *Pu* of *Pseudomonas putida* *Proc. Nat. Acad. Sci USA.* 92:7277-7281.

- \* Pettinari M., Vazquez G., Kruger N., Vary P., Steinbüchel A. y Méndez B. (1998) Trans activation of the *Escherichia coli* *ato* structural genes by a regulatory protein from *Bacillus megaterium*: potential use in polyhydroxyalkanoates production. *Applied Microbiology Biotechnology* 49:737-742
- \* Pettinari M (1994) Tesis Doctoral: Estudios genéticos de la biosíntesis de Poli(3-Hidroxialcanoatos) en *B. megaterium*: Clonado del gen de la  $\beta$ -cetotiolasa
- \* Pettinari M. y Méndez B. (1990). Detección de genes que codifican para la síntesis de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) en *Bacillus megaterium* mediante Tn917 lac. Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica. Mar del Plata 25-27 de noviembre 1990
- \* Pries A., Hein S., y Steinbüchel A.(1992). Identification lipoamide dehydrogenase gene as second locus affected in poly(3-hydroxybutyric acid) leaky mutants of *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS microbiol. Lett* 97:227-234
- \* Pries A., Priefert H., Krüger N. y Steinbüchel A.(1991). Identification and characterization of two gene loci relevant for the phenotype "PHB leaky" in *Alcaligenes eutrophus* which exhibit homologies to *ptsH* and *ptsI* of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 173:5843-5853
- \* Priest F., Goodfellow M. y Todd C. (1988) A numerical classification of the genus *Bacillus*. *J. Gen. Microbiol.* 134:1847-1882
- \* Prieto M., Büchler B., Jung. K. Witholt B. y Kessler B. (1999). PhaF, a Polyhydroxyalkanoate-Granule-Associated protein of *Pseudomonas oleovorans* Gp1 involved in the regulatory expression for *pha* genes *J. Bacteriol.* 181:858-868
- \* Rehm B., Krüger N. y Steinbüchel A. (1998): A new metabolic link between Fatty acid de novo Synthesis and polyhydroxyalkanoic acid synthesis. *JBC* 273:24044-24051.

- \* Ruiz, J., López N. y Méndez B. (1999) Polyhydroxyalkanoates degradation affects survival of *Pseudomonas oleovorans* in river water microcosms.(aceptado para publicación en la Revista Argentina de Microbiología).
- \* Sambrook J., Fritsch, y Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. 2da edición. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.
- \* Schembri, M., Bayly R. y Davies J. (1995). Phosphate concentration regulates transcription of the *Acinetobacter* polyhydroxyalcanoic acid biosynthetic genes. J. Bacteriol. 177:4501-4507
- \* Schubert, P., Steinbüchel A. y Schlegel H. (1988). Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* Genes for the synthesis of poly- $\beta$ -Hydroxybutyric acid (PHB) and Synthesis of PHB in *Escherichia coli* . J. Bacteriol. 170:5837-5847
- \* Schubert P., Krüger N. y Steinbüchel A. (1991) Molecular analysis of the *Alcaligenes eutrophus* poly(3-hydroxybutyrate)-PHB biosynthetic operon: identification of the N-terminus of PHB synthase and identification of the promoter. J. Bacteriol. 173: 168-174
- \* Senior P. y Dawes E. (1973). The Regulation of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate Metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. Biochem.J. 134:225-238
- \* Shingler V (1996). Signal sensing by  $\sigma^{54}$  dependent regulators: derepression as a control mechanism. Mol. Microbiol. 19(3):409-416
- \*Shulgovskaya E., Pozmogova E., Rabotnova I. (1981) Effect of protein synthesis inhibitor chloramphenicol: Basic growth parameters of continuous and batch culture of *Bacillus megaterium*. Mikrobiologiya 49:893-901

- \* Slater S., Voige W., y Dennis D. (1988). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthetic pathway. J. Bacteriol. 170:4431-4436
- \* Slepecky R. y Law J. (1961). Synthesis and degradation of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in connection with sporulation of *Bacillus megaterium*. J. Bacteriol. 82:37-42
- \* Smibert R. y Krieg N. (1981). Manual of methods for general microbiology p 409-443. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- \* Somerville C., Nawarh C. y Poirier Y. (1995) Plant polymers for biodegradable plastics: cellulose, starch y polyhydroxyalcanoates. Mol. Breeding. 1:105-122
- \* Speck E., y Freese E (1973). Control of metabolite secretion in *Bacillus subtilis*. J. gen. Microbiol. 78:261-275
- \* Sramek S. y Freeman F. (1975). Purification and properties of *Escherichia coli* Coenzyme A - Transferase. Arch Biochem Biophys 171, 14-26.
- \* Steinbüchel A. y Fuchtenbusch B. (1998) Bacterial and other biological systems for polyester production. TIBTECH. Vol 16:419-427.
- \* Steinbüchel A. y Valentin H (1995) Diversiy of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. FEMS Microbiol. Lett. 128:219-228.
- \* Steinbüchel A., Hustede E., Liebergesell M., Pieper U., Timm A. y Valentin H. (1992). Molecular Basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalcanoic acids in bacteria. International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalcanoates. FEMS Microbiology Reviews; p217-231

- \* Steinbüchel A, Aerts K, Babel W, Follner C, Liebergesell M, Madkour M., Mayer F, Pieper-Fürst U, Pries A., Valentin HE y Wieczoreck R (1995) Considerations on the structure and biochemistry of bacterial polyhydroxyalkanoic acid inclusions. *Can. J. Microbiol* 41 (Supl.1): 94-105.
- \* Steinbüchel A. (1991). Polyhydroxyalkanoic acids. *Biomaterials: Novel Materials from Biological Sources* p123-213; Macmillan Press, London.
- \* Steinbüchel A.y Schubert P. (1989). Expression of the *Alcaligenes eutrophus* poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid)- synthetic pathway in *Pseudomonas* sp. *Arch. Microbiol.*153:101-104
- \*Streips U. y Yasbin R. (1991). Regulation of gene expression en *Modern Microbial Genetics* Cap. 2:15-41 Ed. Wiley-Liss New York, USA
- \* Timm A. y Steinbüchel A. (1990). Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *App.Enviro. Microbiol.* 56:3360-3367
- \* Trieu-Cuot P., Carlier C., Poyart-Salmeron C. y Courvalin P. (1991) Shuttle vectors containing a multiple cloning site and a *lacZ $\alpha$*  gene for conjugal transfer of DNA from *Escherichia coli*. to Gram-positive bacteria *Gene* 102: 99-104
- \* Valentin H. y Steinbüchel,A. (1994). Application of enzymatically synthesized short-chain-length hydroxy fatty acid coenzyme A thioesters for assay of polyhydroxyalkanoic acid synthases. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 40: 699-709
- \* Vary P., Garbe J., Franzen M. y Frampton E. (1982). MP13, a Generalized Transducing Bacteriophage for *Bacillus megaterium*. *J. Bacteriol.* 149:1112-1119
- \* Vary P.y Y.P.Tao (1988). Development of genetic methods in *Bacillus megaterium*. *Genetics and Biotechnology of Bacilli*, vol 2. Ganesan and Hoch. Academic Press



\* Vary, P. (1992). Development of genetic engineering in *Bacillus megaterium*. En *Biology of Bacilli Applications to Industry*, pp.251-308. Editado por R.H.Doí y M. McGloughin. Boston, Ma: Butterworth –Heinemann.

\* Vazquez, G., Pettinari, M. and Méndez, B. EMBL nucleotide accession number Y14588. 1997.

\* Vazquez G., Wieczoreck R., Steinbüchel A y Méndez B. (1996). Gránulos de poli(3-hidroxibutirato) en *Bacillus megaterium*. Aislamiento y análisis de las proteínas asociadas. *Revista Argentina de Microbiología* 28:118-122

\* Vazquez G. (1992) Seminario de licenciatura: Caracterización Bioquímica y Genética de una mutante de *Bacillus megaterium* que produce bajos niveles de poli(3-hidroxibutirato). Lab. de Genética Bacteriana. dpto de Química Biológica. FCEyN UBA.

\* Wieczoreck R., Pries A., Steinbüchel A. y Mayor F.(1995) Analysis of a 24-kDa protein associated with the Polyhydroxyalcanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *J. Bacteriol.* 177:2425-2435.

\* Wilkinson J. (1959). The problem of energy-storage compounds in bacteria. *Exp. Cell. Res Suppl* 7:114-132