Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis Doctoral

Análisis funcional y estructural de la phasina PhaP de Azotobacter sp. FA-8 y su rol en Escherichia coli recombinante

Mezzina, Mariela Paula

2014-12-04

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Mezzina, Mariela Paula. (2014-12-04). Análisis funcional y estructural de la phasina PhaP de Azotobacter sp. FA-8 y su rol en Escherichia coli recombinante. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:
Mezzina, Mariela Paula. "Análisis funcional y estructural de la phasina PhaP de Azotobacter sp. FA-8 y su rol en Escherichia coli recombinante". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2014-12-04.

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar

Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Análisis funcional y estructural de la phasina PhaP de *Azotobacter* sp. FA-8 y su rol en *Escherichia coli* recombinante.

TESIS PRESENTADA PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE DOCTOR DE LA UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES EN EL ÁREA QUÍMICA BIOLÓGICA

Lic. Mariela Paula Mezzina

Directoras de Tesis: ***Dra. M. Julia Pettinari***

Dra. Diana E. Wetzler

Consejero de estudios: Dra. Nancy I. López

Lugar de trabajo: Laboratorio de Genética y Ecología Microbianas. Departamento de Química Biológica, IQUIBICEN, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.

Buenos Aires, 2014.

“He llegado a creer que el mundo es un enigma, pero un inocente enigma hecho terrible por nuestro loco intento de interpretar todo como si existiese una verdad subyacente”

Umberto Eco

Agradecimientos

A la Dra Julia Pettinari, a quien le debo gran parte de mi formación académica y profesional, por permitirme ser parte de su laboratorio y por estar conmigo durante todos estos años enseñándome y dirigiéndome. Gracias por escuchar y valorar mis opiniones y darme el espacio para poder desarrollar mis ideas y proyectos. Gracias por estar siempre dispuesta a responder cualquier duda o consulta, por darme ideas para superar dificultades y por ser siempre optimista y calmar los ánimos en los momentos de desesperación, esos cuando no sale nada. Gracias por valorar mi trabajo y por enseñarme a comunicarlo a los demás de la mejor forma posible. Gracias Julia por el excelente trato personal y por generar un ambiente de laboratorio tan ameno para trabajar.

A la Dra. Diana Wetzler, por introducirme en el mágico mundo de la estructura de proteínas y por adoptar con tanto cariño a la phasina. Gracias por enseñarme con tantas ganas, paciencia y buena predisposición muchos de los conceptos y técnicas que aplicamos en esta tesis y que tanto aportaron a mi formación. Gracias Diana por estar conmigo haciendo experimentos a la par y realizando mediciones durante horas, cafecito, mate, chocolate y charla mediante.

A la Dra. Auxi Prieto por aceptarme de muy buen gusto en su laboratorio en Madrid, por el entusiasmo que mostró por el trabajo y la constante dirección durante los meses que duró la estadía. A todos los integrantes de los laboratorios de Microbiología del CIB, que me trataron como una más del grupo y que me que ayudaron durante la estadía dándome ideas, plásmidos, cepas, protocolos, asesoramiento en el manejo de los equipos y haciéndome compañía fuera del laboratorio. Un especial agradecimiento al Dr. Eduardo Díaz y a Zaira por proporcionarme los plásmidos para expresar PD y GroELS, a Nina por enseñarme a usar los microscopios de fluorescencia y a Cristina por ayudarme con la purificación de gránulos. Gracias también a los técnicos del servicio de microscopía del CIB por las hermosas fotos que tomaron de los experimentos y que se presentan en esta tesis. ¡Gracias a todos por hacer de mi estadía en Madrid una hermosa experiencia!

A CONICET, EMBO y Cyted por las becas otorgadas que hicieron posible el financiamiento de esta tesis y la estadía en el exterior.

A la Dra. Beatriz Méndez, por mostrar siempre tanto interés en mi tema de trabajo y en los avances que fuimos haciendo, siempre dispuesta a escuchar y a aportar ideas. A la Dra. Nancy López por las palabras de aliento, por ayudarme a encontrar la solución cuando las cosas no salían y por ayudarme a resolver dudas académicas y burocráticas.

Al Dr. de Prat Gay y su grupo de trabajo por recibirnos en su laboratorio y permitirnos utilizar sus equipos e instalaciones para realizar muchas de las mediciones que figuran en esta tesis.

Este párrafo se lo dedico a tres personas que me guiaron muchísimo en mis primeros pasos en el laboratorio y que son muy importantes para mí. Gracias a la química que surgió entre nosotros, no sólo encontré unos magníficos colegas, sino que también encontré unos hermosos amigos. A la Dra. Alejandra de Almeida, quien empezó con esta línea de investigación y cuyos resultados son la línea de partida de esta tesis, por confiarme a su queridísima amiga la "fasina" y por seguir siendo parte de este trabajo a la distancia. Gracías Alelí por todas las charlas, los viajes, los inolvidables momentos "*sugar rush*" en el laboratorio, por ubicarme siempre en el mapa, y por todos los buenos momentos compartidos. A la Dra Jimena Ruiz, la voz de la experiencia, por enseñarme un montón de técnicas de laboratorio, por mandarme a leer "el Maniatis" para que aprenda a valerme por mi misma, por todos los consejos profesionales que me dio a lo largo del doctorado y también por sus valiosos consejos personales que siempre me hacen ver las cosas desde otra perspectiva. Jime: *Danke*, *prost* y *butterbreztel*! Sos un *flash* de persona! Por último (*last but not least*), al Dr. Pablo Nikel (o simplemente PIN), por la cálida sonrisa de bienvenida y el nuevo nombre que me dio el día que entré al laboratorio, por su actitud siempre alegre y por ayudarme tanto durante mi estadía en Madrid, no sólo desde el punto de vista académico, sino también por llevarme a conocer los mejores lugares, por compartir *powerpoints*, por abrirme de par en par las puertas de su casa y por mandarme todo su "*Azotoamor*" cuando lo necesitaba.

A mis compañeros del laboratorio de ayer, hoy y siempre, además de un doctorado me llevo todos estos pequeños y grandes momentos compartidos con ustedes. Gracias por los almuerzos en las mesitas, por las meriendas en el comedor (con el poster de los animalitos de Xcaret y demás curiosidades), por todas las tortas traídas para festejar múltiples acontecimientos y por levantarme el ánimo en momentos difíciles ¡este grupo le saca una sonrisa a cualquiera! A Manu, mi compañero de aventuras durante todos estos años de tesis. Gracias por ser tan especial y por "estar siempre al pie de mi cañón". Gracias por aguantar tantos días de mal humor y por compartir cantidades de risas y complicidades, por acordarte siempre de sacar mis tubos de la centrífuga, por tus máximas, latiguillos y melodías a pedido (y no tanto) y por poder pelearnos en el medio del laboratorio con todo el dramatismo de Pimpinela y después estar como si nada hubiese ocurrido. En fin, ¡gracias Manu por tanto material! A Carla, mi compañera de cursada (cuando todavía eramos jóvenes e inexpertas) con la que luego transité este largo camino del doctorado, que aunque lleno de lindos momentos, no faltaron tampoco los momentos difíciles que logramos superar con el mutuo apoyo. Gracias por tener tanta buena onda y por preocuparte siempre por mí y por el bienestar de todos en el laboratorio. ¡Vamos Carlita que nos doctoramos! A Marie C, a quién mi llegada al laboratorio le revolucionó todos los rótulos, gracias por enseñarme tanto de las phasinas, por guiarme en mis primeros pasos con los clonados y ligados, por ayudarme con los experimentos desde acá cuando yo estaba en Madrid, por los riquísimos budines de banana que levantan cualquier merienda y por acordarte siempre de mí. A Pau por poder recurrir a vos por cualquier duda en el laboratorio, por ayudarme en mi proceso de formación docente y por recibirme siempre en QB34 con chistes y mates de por medio ¡Ahora estamos en el mismo corral Paulita! A José por los millones de mates compartidos y por ayudarme con la técnica milenaria del armado de geles de poliacrilamida en los vidriecitos y la del "*blot blot western baby*". A Gon por ser como es y por no usar colorantes. A Lau por ser la "tía copada" que nos compra todo lo le pedimos, por los *tips* sobre geles de proteínas y por estar siempre dispuesta a dar consejos y abrazos. A Mati, por ayudarme durante los primeros pasos del proceso de expresión y purificación de la phasina (gota…gota…gota), y por bancarme cuando estaba en un momento de transición, y por último, a las nuevas generaciones del laboratorio: Esme, Anto, Rocío y Diego por

transitar esta última etapa conmigo y por mantener viva la tradición de las mesitas y la merienda.

A las Ruzalitas/Piuri: Marianita, Mer, Estefi, Euge, Lili y Joaqui por seguir manteniendo abiertas las fronteras entre nuestros laboratorios. Por todos los almuerzos, meriendas y salidas compartidas. Gracias además por el intercambio de equipos, reactivos y material durante todos estos años.

A Eva por preparar amablemente y con mucha eficiencia todos los medios de cultivo y material estéril usado durante esta tesis, por su buena onda y por dejar escapar buena música desde su cuartito hasta el laboratorio. A Cybele por sus alegres "*bom dia*" por el pasillo, por sus buenos consejos y por prestarme todos los plásmidos, *primers* y demás cosas que le fui pidiendo a lo largo de estos años.

A los chicos del QB 6 y QB 9 por recibirme en el laboratorio y por su amena compañía durante los experimentos realizados ahí. Un especial agradecimiento a Hernán por ayudarme con el proceso de purificación de la phasina y por enseñarme amablemente a usar algunos equipos.

Al "*Team A*", cuyos miembros conocí en el laboratorio y que a pesar de que durante el transcurso del doctorado fueron migrando para otros lugares, seguimos estando tan unidos y conectados como siempre a pesar de las distancias. A los anteriormente mencionados Alelí y PIN, a Flor, por "*bichibichearme"* durante un almuerzo para que curse Micro del Suelo con ella, lo que resultó en largas tardes de estudio, kilos de helado de por medio y el comienzo de una linda amistad. Gracias Flor por ser siempre tan optimista, por vivir con una sonrisa y por mostrarme el "*buen"* camino. A Guada, por las reuniones en el búnker, las charlas, los días de spa, las caminatas por NY y por presentarme los GT. A Marian, por ser tan carismático, alegre y musical y por compartir los últimos momentos de tensión del doctorado conmigo, tecito verde de jazmín mediante. Gracias a todos por todos los consejos que me dieron desde que empecé hasta ahora, hoy me encuentro dándoselos yo a los chicos nuevos.

A mis compañeros de cursada Cons, Aili, Romi, Fran, Eve, Juli, Artu, Manu y Leo por haber sido una parte muy importante del camino que tuve que transitar para llegar hasta acá y por el apoyo moral durante el transcurso de esta tesis. Un especial

agradecimiento a Cons por prestarme en múltiples ocasiones reactivos y equipos y por compartir conmigo los últimos puntitos del doctorado, con presentación oral y todo (con Toto moviéndose para todos lados en la panza).

A Leo, a quién conocí durante nuestro paso por el CBC y a partir de ese momento no nos separamos más. Gracias por transitar esta carrera a mi lado, con todas sus alegrías y frustraciones, y por seguir caminando a mi lado durante el doctorado, dándome ánimo en los momentos difíciles y alegrándote con mis logros. Gracias por ser mi fan número 1, por confiar siempre en mí, por ayudarme a tomar decisiones difíciles y por apoyarme en todo lo que me propongo (aunque eso signifique irme lejos de casa por unos meses). Gracias por ser mi apoyo emocional y mi compañero de vida.

A mi familia, Mamá Marce, Papá Roberto, Agus, los abuelos Juan y Tota y los abuelos Luis y Nina que ya no están. A todos ellos les debo mi formación como persona, que no es menos importante que mi formación profesional. Gracias por darme los medios y el apoyo para poder llevar adelante esta linda y difícil carrera, por mostrar interés en lo que hago (aunque sea difícil de comprender) y por estar siempre orgullosos de mis logros. Sin su contribución esta tesis no hubiese sido posible.

"Disfruta de las pequeñas cosas de la vida porque algún día mirarás para atrás y te darás cuenta de que eran las grandes cosas" Kurt Vonnegut

¡Muchas gracias a todos por ser parte de esas pequeñas grandes cosas!

Parte de los resultados que se describen en esta Tesis han sido publicados en los siguientes artículos científicos:

"A phasin with many faces: structural insights on PhaP from *Azotobacter* sp. FA8". Mezzina MP, Wetzler DE, Catone MV, Bucci H, Di Paola M, Pettinari MJ. *PLoS One*. 2014 Jul 31;9(7):e103012. doi: 10.1371/journal.pone.0103012. eCollection 2014.

"A phasin with extra talents: A polyhydroxyalkanoate granule associated protein has chaperone activity" Mezzina MP, Wetzler DE, de Almeida A, Dinjaski N, Prieto MA, Pettinari MJ. *Environ Microbiol.* 2014 Oct 8. doi: 10.1111/1462-2920.12636.

Índice

Abreviaturas 1

Resumen 3

Abstract 5

Introducción 7

***Primera Parte*: Los Polihidroxialcanoatos** 8

1.1. Generalidades 8

1.2. Estructura y propiedades de los polihidroxialcanoatos 9

1.3. El poli(3-hidroxibutirato) 10

1.4. Síntesis de los PHA 10

1.5. Síntesis de PHB en *Azotobacter* sp. FA8 13

1.6. Estructura de los gránulos de PHA 14

1.7. Proteínas asociadas a los gránulos de PHA 16

***Segunda Parte*: Phasinas** 18

2.1. Generalidades 18

2.2. Funciones asociadas a las phasinas 19

2.3. Interacciones entre phasinas y otras proteínas asociadas a gránulo 20

2.4. Localización celular de las phasinas 21

2.5. Aplicaciones biotecnológicas de las phasinas 22

2.6. Estudios estructurales de las phasinas 23

2.6.1. Phasinas de *R. eutropha* (PhaP1-4_{Re}) 24

2.6.2. PhaP de *Aeromonas hydrophila* ($PhaP_{Ah}$) 25

2.6.3. PhaF de *Pseudomonas putida* KT2440 ($PhaF_{Pp}$) 25

2.6.4. Regiones desordenadas presentes en las phasinas 26

2.6.5. Motivos *coiled coil* descriptos en phasinas 27

2.6.6. Perfiles de hidrofobicidad 28

Tercera Parte:* La respuesta a estrés térmico en *E. coli 29

3.1. Generalidades 29

3.2. Chaperonas 31

3.2.1. Factor de Inicio o *Trigger Factor* 33

3.2.2. DnaK 33

3.2.3. Chaperoninas: GroELS 34

3.2.4. Pequeñas proteínas de choque térmico: IbpA e IbpB 34

Cuarta Parte:* Estrés inducido por la producción de proteínas heterólogas en *E. coli 36

4.1. Generalidades 36

4.2. Cuerpos de inclusión 37

4.2.1. Localización, morfología y organización interna de los IB 38

4.2.2. Rol de las chaperonas en el proceso de construcción-deconstrucción de cuerpos de inclusión 38

4.3. Producción de proteínas heterólogas en *E. coli* : Aplicaciones biotecnológicas de las chaperonas 41

Quinta Parte: Resultados Previos e hipótesis de trabajo 42

5.1. Producción de poli(3-hidroxibutirato) en *E. coli* recombinante y estrés 42

5.2. Efectos de la phasina PhaP de *Azotobacter* sp. FA8 en *E. coli* recombinante 43

5.2.1. Efecto de $PhaP_{Az}$ sobre la producción de poli(3-hidroxibutirato) 43

5.2.2. Efecto de $PhaP_{Az}$ en cepas no productoras de PHB 46

Objetivos 49

Objetivo general 50

Objetivos específicos 50

Materiales y Métodos 52

1. Microorganismos y plásmidos utilizados 53

2. Medios de cultivo 54

3. Técnicas de biología molecular 55

3.1. Construcción de los plásmidos pQP2 y pACP 55

3.2. Construcción del plásmido pACP-GFP que produce la proteína de fusión $PhaP_{Az}$-GFP ... 56

3.3. Aislamiento de DNA plasmídico 58

3.4. Digestión con enzimas de restricción 58

3.5. Reacciones de ligado 58

3.6. Electroforesis en geles de agarosa 59

3.7. Purificación y cuantificación de DNA 59

3.8. Preparación de células competentes 60

3.9. Transformación de células competentes 60

4. Técnicas para el estudio y manipulación de proteínas 61

4.1. Determinación de la concentración de proteínas 61

4.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) 61

4.3. Purificación de la proteína PhaP de *Azotobacter* sp. FA8 63

4.3.1. Condiciones de cultivo para la producción de $PhaP_{Az}$ fusionada a un *tag* de histidinas en *E. coli* 64

4.3.2. Determinación de la solubilidad de la proteína 64

4.3.3. Primer paso de purificación: Cromatografía de afinidad a metales 65

4.3.4. Segundo paso de purificación: Cromatografía de Exclusión por Tamaño (SEC) 66
4.4. Técnica de Western Blot 66
4.4.1. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF 66
4.4.2. Revelado utilizando el antisuero anti-$PhaP_{Az}$ 67
4.4.3. Obtención del antisuero 68
4.4.5. Titulación de la concentración de antisuero anti-$PhaP_{Az}$ 68
4.5. Preparación de muestras para MALDI TOF TOF 69
4.5.1. Tinción con Azul de *Coomassie Blue* Coloidal 69
4.5.2. Digestión en gel 69
4.6. Extracción de gránulos de PHB y sus proteínas asociadas 70
5. Herramientas bioinformáticas para el análisis *in silico* de proteínas 71
5.1. Predicción de estructura secundaria 71
5.2. Predicción de perfil de hidrofobicidad 71
5.3. Predicción de regiones desordenadas o desestructuradas 71
5.4. Predicción de regiones *coiled-coil* 72
6. Técnicas para determinar la estructura de proteínas 72
6.1. Dicroismo Circular (CD) 72
6.2. Cromatografía de Exclusión por tamaño (SEC): 73
6.3. Dispersión Dinámica de la luz (DLS) 73
6.4. Dispersión Estática de la Luz (SLS) 73
6.5. Desplegado Térmico 74
6.6. Desplegado Químico 74
6.7. Espectroscopía de Fluorescencia 74
7. Determinación de la Actividad Chaperona *in vitro* 75
7.1. Ensayo de agregación de la enzima CS 75
7.2. Ensayo de replegado de CS desnaturalizada por métodos químicos 75
8. Técnicas de Microscopía 76
8.1. Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM) 76
8.2. Microscopía de fluorescencia 76
8.3. Análisis de Imágenes: 77
Resultados 78
Capítulo I: Análisis Estructural de $PhaP_{Az}$ 79
1.1. Búsqueda *in silico* de las familias de phasinas descriptas 80
1.2. Estructura primaria de $PhaP_{Az}$ 81
1.2.1. Perfil de hidrofobicidad 82

1.3. Caracterización de la Estructura Secundaria: 83
1.3.1. Predicciones in silico de la estructura secundaria 83
1.3.2. Determinación experimental de la estructura secundaria 86
1.3.2.1. Clonado y sobreexpresión de *phaP* 86
1.3.2.2. Solubilidad de $PhaP_{Az}$ 88
1.3.2.3. Purificación de $PhaP_{Az}$ 89
1.3.2.4. Determinación experimental de la estructura secundaria por Dicroismo Circular 90
1.3.2.5. Análisis de la presencia de regiones desordenadas 92
1.3.2.6. Influencia del entorno en la estructura secundaria de $PhaP_{Az}$ 93
1.3.2.7. Análisis de la capacidad de $PhaP_{Az}$ de unirse a DNA 96
1.4. Caracterización de la Estructura Terciaria y Cuaternaria 97
1.4.1. Cromatografía de Exclusión por Tamaño y Dispersión de la Luz Dinámica 97
1.4.2. Determinación de la molecularidad por Dispersión de la Luz Estática 100
1.4.3. Análisis de la presencia de motivos *coiled coil* 101
1.4.4. Desplegado térmico y químico 104
1.4.5. Cromatografía de Exclusión por Tamaño (SEC) de la proteína desnaturalizada químicamente 108
Capítulo II: Efectos fisiológicos de $PhaP_{Az}$ en *E. coli* recombinante 109
2.1. Localización subcelular de PhaPAz en *E. coli* recombinante 110
2.1.1. Localización de $PhaP_{Az}$ en presencia de PHB 111
2.1.1.1. Estudio de la localización intracelular de $PhaP_{Az}$-GFP por microscopía de fluorescencia 111
2.1.1.2. Estudio de la localización de $PhaP_{Az}$ por Microscopía de Transmisión Electrónica 112
2.1.2. Localización de $PhaP_{Az}$ en ausencia de PHB 114
2.2. Rol de $PhaP_{Az}$ en el plegado de proteínas y la formación de cuerpos de inclusión 116
2.2.1. Determinación de la actividad chaperona de $PhaP_{Az}$ *in vitro* 116
2.2.2. Determinación de la actividad chaperona *in vivo* 120
2.3.2.1. Rol de $PhaP_{Az}$ en la formación de IB 120
2.3.2.2. Interacción de $PhaP_{Az}$ con IB 122
Discusión 124
Sobre la estructura de $PhaP_{Az}$ 126
Sobre las características estructurales comunes a todas las phasinas descriptas hasta el momento 130
Sobre su unión a gránulos de PHB 131
Sobre su localización subcelular en ausencia de PHB 133

Sobre el rol de PhaP$_{Az}$ como chaperona 133
Sobre las similitudes entre PhaP$_{Az}$ *y las chaperonas* 138
Sobre los posibles sitios de unión a PHB y proteínas mal plegadas 138
Sobre el rol de la actividad chaperona de las phasinas en productores naturales 141
Conclusiones y Perspectivas 143
Conclusiones 144
Perspectivas 145
Bibliografía 147

Abreviaturas

% p/v	% peso en volumen
%m/v	% masa en volumen
$[\Theta]_{MRW\lambda}$	elipticidad promedio por residuo
AFM	microscopía de fuerza atómica
ANS	8- anilinonaftaleno-1- ácido sulfónico (*8-Anilinonaphthalene-1-sulfonic acid)*
Ap/Ap^R	ampicilina/ampicilina resistente
ATP	adenosina trifosfato
BSA	albúmina cristalina de suero bovino (*Bovine Serum Albumin*)
CD	dicroísmo Circular (*Circular Dichroism*)
cm	centímetros
Cm/Cm^R	cloranfenicol/cloranfenicol resistente
CS	citrato Sintasa
DLS	dispersión dinámica de la luz (*Dynamic Light Scattering*)
DNA	ácido desoxiribonucléico
DO	densidad óptica (*Optical Density*)
DTT	ditiotreitol
EDTA	ácido etildiaminotetraacético
eYFP	proteína fluorescente amarilla mejorada (*enhanced Yellow Fluorescent Protein*)
GdmCl	cloruro de guanidinio
GFP	proteína verde fluorescente (*Green Fluorescent Protein*)
h	horas
HPLC	cromatografía líquida de alta resolución (*High Performance Liquid Chromatography*)
Hsp	proteínas de choque térmico (*heat shock proteins*)
IB	cuerpos de inclusión (*Inclusion Bodies*)
IMAC	cromatografía de afinidad sobre iones metálicos (*Immobilized Metal ion Affinity Chromatography*)
IPTG	isopropil β-D-tiogalactopiranósido
kb	kilobases
kDa	kilodalton
Km/Km^R	Kanamicina/ kanamicina resistente
l	litros
M	molar
MCS	Sitio de clonado múltiple (*Multiple Cloning Site*)
MDa	megadalton
min	minutos
ml	mililitros
mm	milimetros
MoRFs	patrones moleculares de reconocimiento (*Molecular Recognition Features*)
MRW	peso promedio por residuo (*Mean Residue Weight*)

MWCO	peso molecular de corte (*Molecular Weight Cut-Off*)
NADH	nicotinamida adenina dinucleótido
NADPH	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ng	nanogramos
ON	toda la noche (*Over night*)
ORF	marco de lectura abierto (*Open Reading Frame*)
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa (*Polimerase Chain Reaction*)
PD	dominio insoluble de la proteína TolR de *Azoarcus* sp. CIB
PGAPs	proteínas asociadas a gránulo
PHA	polihidroxialcanoatos
PHA_{CL}	polihidroxialcanoatos de cadena corta (*Medium Chain Lenght*)
$PhaP_{Az}$	phasina de *Azotobacter* sp. FA8
$PhaP_{Ac}$	phasina de *Aeromonas caviae*
$PhaP_{Re}$	phasina PhaP1 de *Ralstonia eutropha* (o *Cupriavidus necator*)
$PhaP_{Ah}$	phasina de *Aeromonas hydrophila*
$PhaP_{Pp}$	phasina de *Pseudomonas putida*
PHA_{SCL}	polihidroxialcanoatos de cadena corta (*Short Chain Lenght*)
PHB	polihidroxibutirato
PHBV	poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato)
PHV	poli(3-hidroxivalerato)
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	polifluoruro de vinilideno (*Polyvinylidene fluoride*)
RMN	resonancia Magnética Nuclear
RNA	ácido ribonucleico
rpm	revoluciones por minuto
SAXS	dispersión de rayos X en ángulo pequeño (*Small-Angle X-ray Scattering*)
SDS	dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS
SEC	cromatografía de Exclusión por tamaño (*Size Exclusion Chromatography*)
sHsp	pequeñas proteínas de choque térmico (*small heat shock proteins*)
SLS	dispersión estática de la luz (*Static Light Scattering*)
TBS	buffer Tris Salino (*Tris Buffered Saline*)
TEM	microscopía de transmisión electrónica (*Transmision Electron Microscopy*)
TEMED	tetrametiletilendiamina
TF	factor de inicio (*Trigger Factor)*
TFE	2, 2, 2-trifluoroethanol
T_m	temperatura de fusión
UV	ultravioleta
V_0	volumen de vacío
V_t	volumen total
µl	microlitros

Resumen

Las phasinas son un grupo de proteínas que se encuentran asociadas a gránulos de polihidroxialcanoatos (PHA). Además de su rol estructural como parte de la cubierta del gránulo, se han encontrado diferentes funciones estructurales y regulatorias asociadas a varias de estas proteínas, y se han desarrollado aplicaciones biotecnológicas utilizando proteínas fusionadas a phasinas. A pesar de su diversidad funcional, la estructura de estas proteínas ha sido analizada en detalle en muy pocos estudios.

PhaP de *Azotobacter* sp. FA8 ($PhaP_{Az}$) pertenece al grupo más representado de la multifuncional familia de las phasinas. Esta proteína ha sido clonada y expresada en *Escherichia coli*. Las cepas recombinantes de *E. coli* que sobreexpresan $phaP_{Az}$ crecen más y acumulan más polímero, lo que sugiere que $PhaP_{Az}$ ejerce un efecto promotor del crecimiento. Se observó también que la expresión de $PhaP_{Az}$ tiene un inesperado efecto protector en *E. coli* no productora de PHA, tanto en condiciones normales como en condiciones de estrés, resultando en un mayor crecimiento y mayor resistencia a estrés oxidativo y estrés térmico. El objetivo de este trabajo doctoral es realizar una caracterización funcional y estructural de esta phasina para estudiar sus diversas propiedades y dilucidar el mecanismo por el cual ejerce su efecto protector. Su estructura primaria reveló que no posee claros dominios hidrofóbicos, característica que parece ser común a la mayoría de las phasinas, a pesar de su capacidad de unión a gránulos lipídicos. La estructura secundaria de esta proteína consiste en α-hélices, combinadas con regiones desestructuradas que le confieren una notable flexibilidad dependiente del entorno. Los datos experimentales obtenidos revelaron que $PhaP_{Az}$ es un tetrámero formado por interacciones de tipo *coiled coil* entre los monómeros. Estas características estructurales tambén fueron encontradas en otras phasinas y podrían estar relacionadas con su diversidad funcional. Se realizaron experimentos de actividad chaperona *in vitro* para dilucidar el mecanismo por el cual $PhaP_{Az}$ ejerce su efecto protector. $PhaP_{Az}$ demostró evitar la agregación térmica de la proteína Citrato Sintasa (CS) y facilitar el proceso de replegado de la enzima luego de la

desnaturalización por métodos químicos *in vitro*. Estos experimentos mostraron que $PhaP_{Az}$ tiene actividad chaperona *in vitro*. Se utilizaron técnicas de microscopía de fluorescencia y de transmisión electrónica para analizar la localización intracelular de $PhaP_{Az}$ en cepas de *E. coli* productoras y no productoras de PHB con el objetivo de estudiar el rol de $PhaP_{Az}$ en el plegado de proteínas *in vivo*, el agregado de proteínas y la dinámica de formación de cuerpos de inclusión. $PhaP_{Az}$ colocalizó con los cuerpos de inclusión de PD, proteína que forma grandes y visibles agregados cuando es sobreexpresada en *E. coli*. Se observó una reducción en el número de cuerpos de inclusión cuando PD fue coproducida con $PhaP_{Az}$ o con la chaperona GroELS. Estos resultados demuestran que $PhaP_{Az}$ presenta actividad chaperona tanto *in vitro* como *in vivo* en *E. coli* recombinante, y sugieren que las phasinas podrían tener un rol protector general en los productores naturales de PHA. Estas observaciones hacen posible el uso de esta proteína en el desarrollo de nuevas aplicaciones biotecnológicas, como por ejemplo la producción de proteínas recombinantes y otros productos heterólogos en *E. coli*.

Functional and structural analysis of the phasin PhaP from *Azotobacter* sp. FA8 and its role in recombinant *Escherichia coli*

Abstract

Phasins are a group of proteins associated to granules of polyhydroxyalkanoates (PHAs). Apart from their structural role as part of the PHA granule cover, different structural and regulatory functions have been found associated to many of them, and several biotechnological applications have been developed using phasin protein fusions. Despite their remarkable functional diversity, the structure of these proteins has not been analyzed except in very few studies. PhaP from *Azotobacter* sp. FA8 ($PhaP_{Az}$) is a representative of the prevailing type in the multifunctional phasin protein family. This protein has been cloned and expressed in *Escherichia coli*. Recombinant *E. coli* strains overexpressing $phaP_{Az}$ grow more, and accumulate more polymer, suggesting that $PhaP_{Az}$ exerts a growth promoting effect. Expression of $PhaP_{Az}$ was also observed to have an unexpected protective effect in *E. coli* strains that do not synthesize PHAs, under both normal and stress conditions, resulting in increased growth and higher resistance to both superoxide stress and heat shock. The aim of this work was to perform a physiological and structural characterization of this protein, to shed light on its properties. Its secondary structure revealed that it lacks clear hydrophobic domains, a characteristic that appears to be common to most phasins, despite their lipid granule binding capacity. The secondary structure of this protein, consisting of α-helices and disordered regions, has a remarkable capacity to change according to its environment. Several experimental data support that is a tetramer, probably due to interactions between coiled-coil regions. These structural features have also been detected in other phasins, and may be related to their functional diversity. *In vitro* chaperone activity experiments were performed in order to shed light on the mechanisms by which $PhaP_{Az}$ exerts its protective effect. $PhaP_{Az}$ was shown to prevent *in vitro* thermal aggregation of the model protein citrate sinthase (CS) and to facilitate the refolding process of the enzyme after chemical denaturation. These experiments showed that $PhaP_{Az}$ presents *in vitro* chaperone activity. Fluorescence microscopy and electron transmission microscopy were used to analyze the

subcellular localization of $PhaP_{Az}$ in PHB producing and non PHB producing *E. coli* strains and to study the role of $PhaP_{Az}$ in *in vivo* protein folding, protein aggregation and inclusion body dynamics. $PhaP_{Az}$ was shown to colocalize with inclusion bodies of PD, a protein that forms large inclusion bodies when overexpressed. A reduction in the number of inclusion bodies of PD was observed when the insoluble protein PD was coexpressed with $PhaP_{Az}$ or with the known chaperone GroELS. These results demonstrate that $PhaP_{Az}$ has chaperone like functions both *in vitro* and *in vivo* in *E. coli* recombinants, and suggests that phasins could have a general protective role in natural PHA producers, that in these microorganisms is masked by the fitness enhancing properties of the polymer. These observations open the door for novel biotechnological applications of this protein, for example, in the production of recombinant proteins and other heterologous products in *E. coli*.

Introducción

Primera Parte: Los Polihidroxialcanoatos

1.1. Generalidades

Los polihidroxialcanoatos son sintetizados por las bacterias bajo condiciones limitantes de nutrientes (como nitrógeno, fósforo u oxígeno) y/o bajo condiciones de estrés ambiental, y utilizados como fuente de carbono y energía. En particular, su producción se ve favorecida cuando hay un exceso de fuente de carbono y una deficiencia en nitrógeno (es decir cuando la relación carbono/nitrógeno es alta) (Madison & Huisman 1999). Cuando la fuente de carbono es limitante, el PHA es degradado por depolimerasas intracelulares, y subsecuentemente los monómeros se metabolizan proveyendo carbono y energía (Sudesh et al. 2000; Steinbüchel & Hein 2001), que son utilizados en diferentes procesos, como la esporulación (Anderson & Dawes 1990) y la degradación de compuestos tóxicos (Godoy et al. 2003). Además, los PHA pueden ser utilizados como fuente de poder reductor (Henryssont & Mccarty 1993; Ruiz et al. 2006).

Se ha descripto la acumulación de PHA en una gran variedad de géneros bacterianos, incluyendo bacterias Gram positivas y negativas, y en algunas especies del dominio *Archaea*. En total se conocen más de 75 géneros bacterianos capaces de acumular PHA (Anderson & Dawes 1990; Kuchta et al. 2007; Steinbüchel & Lütke-Eversloh 2003). Los PHA son acumulados como gránulos intracitoplasmáticos y pueden representar hasta un 90 % del peso seco de la célula (Madison & Huisman 1999).

La producción de PHA es considerada una estrategia utilizada por varios géneros bacterianos para aumentar su supervivencia bajo distintas condiciones de estrés (Dawes & Senior 1973). Se observó que en bacterias de varios géneros, como *Ralstonia* y *Pseudomonas*, la capacidad de acumular y utilizar PHA otorga a las células una mayor capacidad de supervivencia a estrés oxidativo, térmico, frío y a congelación (Anderson & Dawes 1990; López et al. 1995; Ruiz et al. 1999; Ruiz et al. 2001; Ayub et al. 2004; Ayub et al. 2009).

1.2. Estructura y propiedades de los polihidroxialcanoatos

Los PHA son polímeros lineales de (R)-3-hidroxiácidos en los cuales el grupo carboxilo de un monómero forma un enlace tipo éster con el grupo hidroxilo del monómero siguiente (Figura 1). Pueden clasificarse en 3 grupos, dependiendo de la cantidad de átomos de carbono presente en sus monómeros. Los PHA de cadena corta (PHA_{CL}, por sus siglas en inglés) consisten en monómeros de 3 a 5 carbonos, los de cadena media (PHA_{MCL}) contienen de 6 a 14 carbonos (Anderson & Dawes 1990) y los de cadena larga poseen más de 14 átomos de carbono en su porción monomérica. El tipo de PHA que acumula cada microorganismo depende principalmente de la especificidad de sustrato de su PHA sintasa, de las fuentes de carbono utilizadas y de la manera en que éstas son metabolizadas.

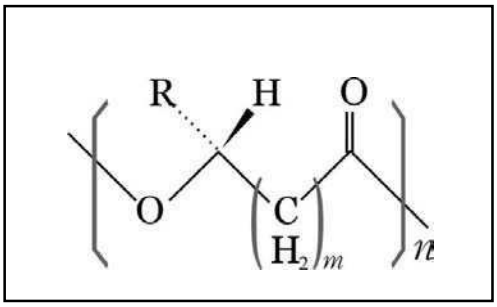


Figura 1: Estructura general de los polihidroxialcanoatos. El subíndice *m* indica la extensión del monómero. *n* puede variar en la mayoría de los casos entre 100 y 30.000. R representa la cadena alquílica lateral., En el caso del PHB, *m*=1, y R=CH_3. Tomado de http://mbel.kaist.ac.kr/lab/research/PHA.htm.

Los PHA de cadena media se sintetizan a partir de los ácidos grasos y carbohidratos que las células utilizan como fuente de carbono, por lo que la composición del PHA resultante dependerá del sustrato utilizado para el crecimiento (Brandl et al. 1988; Lageveen et al. 1988; Madison & Huisman 1999). La composición de los PHA de cadena corta no está relacionada con la fuente de carbono utilizada (Haywood et al. 1990; Timm & Steinbüchel 1990; Huijberts et al. 1992). Ejemplos de PHA de cadena corta son el poli(3-hidroxibutirato) (PHB), donde el grupo R es un metilo, y el poli(3-hidroxivalerato) (PHV), en el cual el grupo R es un etilo (Verlinden et al. 2007). Existen natural y artificialmente varios copolímeros

de diferentes PHA. El más utilizado a nivel industrial es el copolímero entre polihidroxibutirato y polihidoxivalerato, poli(3-hidroxibutirato-co-3-hidroxivalerato), PHBV.

Una de las características más importantes de los PHA es el hecho de que su producción se basa principalmente en recursos renovables (Braunegg et al. 2004). La producción de PHA utiliza varios azúcares y otros compuestos como fuente de carbono. Entre ellos se encuentran subproductos o efluentes industriales como lactosuero (Koller et al. 2005; Nikel et al. 2005); glicerol, un desecho de la creciente industria del biodiesel; ácidos grasos y otros compuestos complejos. Como consecuencia, la síntesis y degradación de los PHA es totalmente compatible con el ciclo del carbono, ya que su producción utiliza compuestos renovables, y no combustibles fósiles, como en el caso de los plásticos tradicionales.

1.3. El poli(3-hidroxibutirato)

El PHA más estudiado es el poli(3-hidroxibutirato) (PHB), un homopolímero de cadena corta constituido por monómeros de β-3-hidroxibutirato unidos por enlaces éster (Madison & Huisman 1999). El PHB es el PHA más común, ya que es producido por una gran diversidad de especies bacterianas pertenecientes a diferentes géneros. El PHB ha sido utilizado principalmente en la fabricación de productos de uso medicinal, tales como cápsulas para la liberación controlada de drogas, suturas quirúrgicas, vendajes y lubricantes para guantes de cirugía (Malm et al. 1992), y en la producción de películas y envases (Anderson & Dawes 1990).

1.4. Síntesis de los PHA

Existen numerosos genes relacionados con el metabolismo de los PHA. El grupo de investigación de A. Steinbüchel de la Universidad de Münster, Alemania, propuso un sistema de nomenclatura para los genes involucrados en la síntesis, degradación, regulación y proteínas asociadas a gránulos de PHA (Steinbüchel et al. 1992). Los genes relacionados con el metabolismo de los PHA se denominan en general *pha.* En

el caso de los genes que intervienen en la síntesis de PHB, se suele utilizar *phb* en lugar de *pha,* para algunas especies*.* En el caso de bacterias capaces de sintetizar PHB y PHA de cadena media, se utilizan ambos nombres para denominar a los dos tipos de genes, ya que la síntesis de ambos tipos de polímero involucra diferentes grupos de genes. Los genes que codifican proteínas involucradas en la síntesis del polímero se denominan en orden alfabético, por ejemplo, *phaA* (β-cetotiolasa), *phaB* (acetoacetil-CoA reductasa), *phaC* (PHA sintasa). Los genes necesarios para la degradación del polímero fueron designados en orden alfabético inverso, como el caso de *phaZ* y *phaY*, los cuales codifican PHA depolimerasas. Los genes de phasinas (*PHAsins* en inglés, proteínas de unión a gránulos de PHA), se denominan *phaP*, y los genes regulatorios, *phaR*.

Existen cuatro tipos de PHA sintasas, las cuales a su vez están asociadas a diferentes vías para la síntesis de los PHA (Steinbüchel y Schlegel, 1991; Mergaert et al., 1992; Pötter y Steinbüchel, 2005). La biosíntesis de PHB ha sido estudiada en detalle en *Ralstonia eutropha* (este microorganismo fue reclasificado como *Cupriavidus necator*, y en la actualidad se utilizan ambas denominaciones). En *R. eutropha*, *Azotobacter* sp. y en la mayoría de los microorganismos productores de PHB, una β-cetotiolasa condensa dos moléculas de acetil-coenzima A (acetil-CoA) formando una molécula de acetoacetil-CoA. En el segundo paso el acetoacetil-CoA se reduce a (R)-3-hidroxibutiril-CoA por la acción de una acetoacetil-CoA reductasa NADPH dependiente. Finalmente, el PHB es sintetizado gracias a la polimerización del (R)-3-hidroxibutiril-CoA, catalizado por la PHB sintasa. Estas enzimas son codificadas por los genes *phbA, phbB y phbC* respectivamente (Madison y Huisman, 1999) (también denominados *phaA*, *phaB* y *phaC*) (Figura 2). Las bacterias productoras de PHA de cadena corta, como el PHB, expresan PHA sintasas de tipo I. Existen también otras vías de síntesis de PHA, las cuales varían no sólo en el tipo de PHA sintasa que utilizan, sino tambien en el tipo de monómero que sintetizan (Madison y Huisman, 1999).

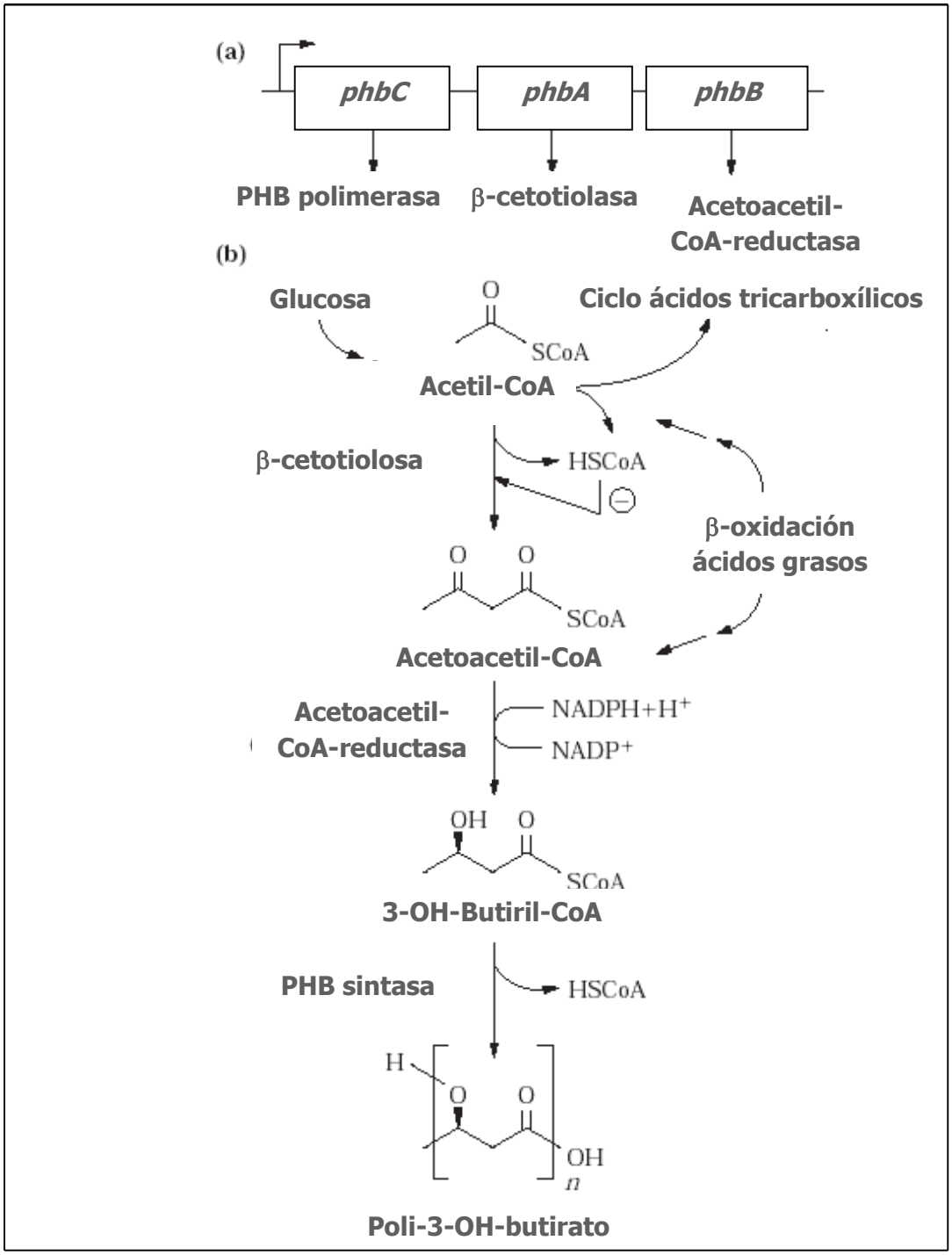


Figura 2: Síntesis de PHB en *R. eutropha.* (a) Los genes *phbA, phbB, y phbC* forman parte de un operón, y codifican una β-cetotiolasa, acetoacetil-CoA-reductasa, y PHB sintasa respectivamente. (b) Reacciones involucradas en la síntesis de PHB.(Kessler & Witholt 1999)

1.5. Síntesis de PHB en *Azotobacter* sp. FA8

Las bacterias del género *Azotobacter* son organismos aerobios fijadores de nitrógeno de vida libre. En general se los puede encontrar en el suelo, en la rizosfera y en ambientes acuáticos. Muchas especies del género tienen la capacidad de producir PHB (Robson et al. 1984).

Azotobacter sp. FA8 es una cepa aislada del suelo. Este organismo es capaz de acumular PHB hasta en un 70% de su peso seco con diversas fuentes de carbono como glucosa, gluconato y sacarosa (Quagliano et al. 1994).

Los genes responsables de la síntesis de PHB en *Azotobacter* sp. FA8 han sido clonados y caracterizados (Pettinari et al. 2001). Se encontraron tres genes implicados en la síntesis del polímero: *phaB*, *phaA* y *phaC*, los cuales codifican respectivamente una aceto-acetil-CoA reductasa, una β-cetotiolasa y una PHB sintasa (Figura 3).

También se hallaron 3 genes con posible función regulatoria, río arriba de los genes estructurales: los genes *phaR*, *phaP* y *phaF* (Pettinari et al. 2003). Los mismos se encuentran flanqueados por dos secuencias de inserción, una perteneciente a la familia IS*3*, y otra que presenta una alta homología con la familia de las IS*630* (Figura 3).

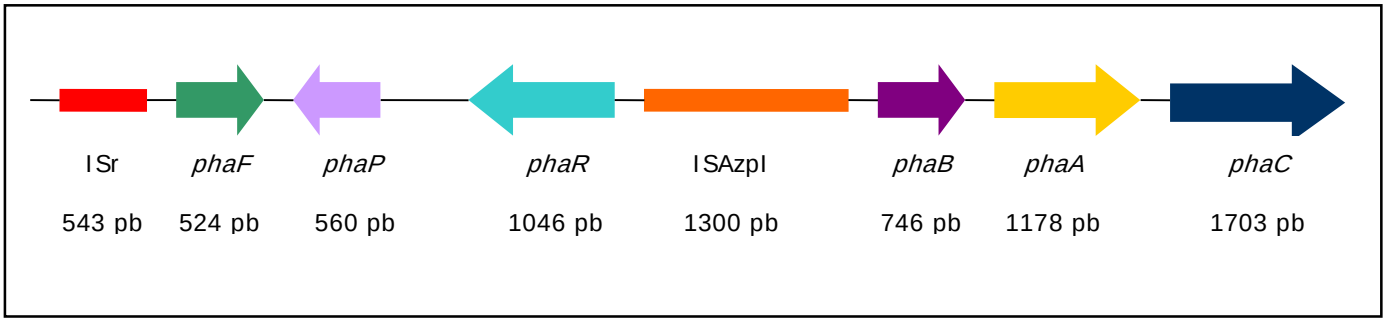


Figura 3: Organización de la región del genoma de *Azotobacter* sp. FA8 conteniendo los genes *pha*. El gen *phaB* codifica una acetoacetil-coenzima A reductasa; *phaA* codifica una β-cetotiolasa; y PhaC, una PHA sintasa. Los genes *phaF* y *phaR* codifican probables reguladores de la síntesis de PHB. *phaP* codifica una proteína de unión a granulos de PHB.

El producto del gen *phaF* de *Azotobacter* sp. FA8 tiene una longitud de 174 aminoácidos, y presenta un 93% de identidad con el producto del gen *phbF* de *Azotobacter vinelandii* (Segura et al. 2003), cuya función aun no ha sido determinada experimentalmente. También se encontró un 53% de identidad con el producto del gen *phbF* de *R. eutropha* (Wieczorek et al. 1995). En ambos casos los productos de estos genes actuarían como reguladores negativos del gen *phaP*.

El producto del gen *phaP* de *Azotobacter* sp. FA8, en el cual se centra esta tesis, presenta una longitud de 187 aminoácidos. El análisis de su secuencia aminoacídica indica que se trata de una proteína de 20.5 kDa de peso molecular, que se encuentra asociada a los gránulos de PHB en *Azotobacter* sp. FA8 (Pettinari et al. 2003). Esta proteína presenta un 91% de identidad con la proteína de *A. vinelandii,* y un 37% con la correspondiente a *R. eutropha.* Estas proteínas pertenecen al grupo de las phasinas, las cuales se encuentran unidas a la superficie de los gránulos intracitoplasmáticos de PHB (Pötter et al. 2005).

El producto del gen *phaR* de *Azotobacter* sp. FA8 tiene una longitud de 369 aminoácidos, y presenta un 83% de identidad con el producto del gen *phbR* de *A. vinelandii,* cuyo producto actúa como un activador de la transcripción, regulando positivamente la expresión del gen *phbB* (Segura et al. 2003). También se encontró homología con el producto del gen *phbR* de *Pseudomonas* sp. 61-3, que fue caracterizado como un regulador positivo de los genes *phb* (Matsusaki et al. 1998).

1.6. Estructura de los gránulos de PHA

Los gránulos de PHA se encuentran presentes como inclusiones insolubles en el citoplasma bacteriano y pueden contribuir en gran medida al peso seco celular (en condiciones extremas puede constituir el 90% del peso seco). El diámetro de los gránulos depende de la especie y de las condiciones de cultivo, pero generalmente se encuentran en el rango de 200-500 nm en cepas salvajes. Estudios de microscopía electrónica sugieren que los gránulos de PHA *in vivo*, están recubiertos de una capa superficial que es de distinta composición que el núcleo del gránulo, donde se encuentra sólo polímero.

Merrick y colaboradores fueron los primeros en determinar la composición química de gránulos de PHB purificados (Griebel et al. 1968). Dichos gránulos consistían en un ≈97.7% de PHB, 1.87% de proteínas y cantidades traza de lípidos (en particular ácido fosfatídico y un compuesto no identificado soluble en acetona). En base a esta observación, se propuso que los gránulos de PHB *in vivo* están rodeados de una capa de fosfolípidos en la cual se encuentran embebidas proteínas.

De Koning y Maxwell (de Koning & Maxwell 1993) propusieron un modelo en el cual una monocapa lipídica recubre los gránulos de PHA. Estudios de microscopía de fuerza atómica (AFM, por sus siglas en inglés) en *Comamonas acidovorans* (Sudesh 2004) y en *R. eutropha* (Dennis et al. 2003) sugieren la existencia de una capa recubriendo los gránulos de PHB. Se estudiaron inclusiones de PHB de células sonicadas de *R. eutropha*, y se encontraron estructuras globulares conectadas por una red de estructuras lineales de 4 nm de ancho. También se encontraron fisuras y quiebres en la superficie de los gránulos, los cuales tenían un grosor de 4 nm. Estos estudios muestran que la capa observada es una monocapa lipídica y no una bicapa, la cual presenta un grosor de 8 nm aproximadamente (Mayer y Hoppert, 2007). Sin embargo, trabajos más recientes en los que se utilizó la técnica de criotomografía para comparar la composición de vesículas recubiertas de membrana plásmatica y la superficie de los gránulos en *R. eutropha* demuestran que las mismas no son similares, ya que las vesículas presentaron un contorno más definido y fueron más susceptibles a la tinción utilizada, lo que sugiere distinta composición.

Dado que los fosfolípidos pueden ser liberados desde la membrana celular luego de la ruptura celular que ocurre durante el proceso de purificación del polímero, los mismos podrían unirse a la superficie hidrofóbica de los gránulos y ser detectados en los gránulos purificados como un artefacto (Jendrossek y Pfeiffer, 2013).

Si bien no hay evidencias suficientes para afirmar que los gránulos están recubiertos por una monocapa de fosfolípidos, existen múltiples evidencias *in vitro* e *in vivo* que demuestran la presencia de un número considerable de distintas proteínas en la superficie del gránulo.

La presencia de proteínas estructurales, biosintéticas, catabólicas y regulatorias sobre la superficie de los gránulos de PHA indica que los mismos son estructuras subcelulares organizadas y complejas, que fueron designadas como "carbonosomas" para indicar la multifuncionalidad de los mismos (Jendrossek 2009).

1.7. Proteínas asociadas a los gránulos de PHA

Estudios realizados por Merrick y Doudoroff en el año 1961 (Merrick & Doudoroff 1961), mostraron que la PHA sintasa y la PHA depolimerasa se encuentran en la superficie de los gránulos. En 1994 Pieper-Fürst y Steinbüchel, identificaron otra proteína pequeña (GA14) asociada a gránulos en *Rhodococcus ruber*. Este nuevo tipo de proteínas fueron llamadas phasinas (PhaP) en analogía con las oleosinas, que son proteínas que se encuentran en la superficie de glóbulos oleosos encontrados en células vegetales. Este tipo de proteínas también fueron encontradas en *R. eutropha* por el grupo de Steinbüchel. La cantidad de phasinas encontrada en las células de *R. eutropha* productoras de PHB era muy alta, sugiriendo que la mayor parte de la superficie del gránulo está cubierta por PhaP. Se propuso que PhaP evita la coalescencia de los gránulos mediante la formación de una capa proteica entre la fase hidrofóbica del polímero y el citoplasma hidrofílico. El estudio de otras bacterias productoras de PHA reveló que todas presentan phasinas unidas a la superficie de los gránulos (Wieczorek et al. 1995).

En *R. eutropha* se han descripto varias phasinas, designadas PhaP1 a PhaP7, entre las cuales la mayoritaria y más estudiada es la PhaP1 (Pötter et al. 2004; Pfeiffer & Jendrossek 2012). En este microorganismo, además de la PHA sintasa (PhaC), las PHA depolimerasas (PhaZ) y las phasinas (PhaPn) se encontró a la proteína PhaR unida a gránulo. PhaR es un represor que regula la expresión de PhaP (Pötter et al. 2002).

Se han realizado estudios sobre los tipos y cantidad de proteínas presentes durante la formación de gránulos en *R. eutropha* (Tian et al. 2005). En este organismo se observó que tanto la PHA sintasa como la depolimerasa se

encontraban presentes durante todo el crecimiento bacteriano. La proteína PhaP1 se encontró principalmente durante las primeras horas de la formación del gránulo, mientras que el regulador de la phasina, la proteína PhaR, se encontraba en mayor cantidad en las horas tardías del crecimiento. La presencia de PHB en el citoplasma estimula la producción de más moléculas de phasina, las cuales presentan una gran afinidad por el polímero, formando una monocapa que cubre la mayor parte de la superficie del gránulo, impidiendo que se fusionen los gránulos entre sí en las etapas tardías de acumulación. La acumulación de PHB se frena cuando la fuente de carbono se termina, o bien cuando los gránulos se empaquetan muy estrechamente en la célula limitando el acceso de nuevas moléculas de PHB.

Segunda Parte: Phasinas

2.1. Generalidades

En todos los géneros productores de PHA estudiados se encontraron proteínas de bajo peso molecular denominadas phasinas, las cuales se unen a los gránulos citoplasmáticos de PHA y regulan positivamente la síntesis del polímero (Pieper-Fürst et al. 1995; Wieczorek et al. 1995; Pötter et al. 2005). Las phasinas son las proteínas mayoritarias presentes en los gránulos de PHA.

Se han identificado varias phasinas en productores naturales de PHA, tales como PhaP1, PhaP2, PhaP3, PhaP4, PhaP5, PhaP6 y PhaP7 de *R. eutropha* (Wieczorek et al. 1995; Pötter et al. 2004; Pfeiffer & Jendrossek 2012), GA14 de *Rhodococcus ruber* (Pieper-Fürst et al. 1994), PhaP *de Bacillus megaterium* (Mccool & Cannon 1999), PhaF y PhaI de *Pseudomonas putida* (Prieto et al. 1999), y PhbP de *Azotobacter vinelandii* (Peralta-gil, Segura, Guzmán, & Servín, 2002), entre otras.

Los primeros estudios con phasinas fueron realizados por Steinbüchel y colaboradores en *R. eutropha* en el año 1995 (Wieczorek et al. 1995). Se aislaron 35 mutantes "*leaky"* en la producción de PHB (generadas por Tn5), las cuales producían menores cantidades de PHB que la cepa salvaje. Se encontró un fragmento genómico de 5 kb que complementaba estas mutantes. Dentro de este fragmento se encontró un marco de lectura abierto (ORF) de 687 pb, el cual se denominó *phaP*, que codifica una proteína de 24 kDa. Esta proteína fue solubilizada a partir de gránulos de PHB, purificada, y utilizada para la producción de anticuerpos específicos. Se confirmó la presencia de esta proteína en los gránulos de PHB mediante ensayos de inmunomicroscopía electrónica. PhaP puede representar hasta un 5% de las proteínas celulares totales, y es la proteína predominante en los gránulos. En experimentos realizados en *R. eutropha* se observaron solamente uno o dos gránulos de gran tamaño en células con el gen *phaP* delecionado, mientras que en células salvajes se forman varios gránulos de PHB de menor tamaño (Wieczorek et al. 1995), indicando que estas proteínas afectan el número y el tamaño de los gránulos.

2.2. Funciones asociadas a las phasinas

Se ha reportado en muchos trabajos que las phasinas promueven el crecimiento y la acumulación de PHA en productores naturales, fenómeno que también ha sido observado en *Escherichia coli* recombinante (Junker et al. 2001; de Almeida et al. 2007).

Se han propuesto tres mecanismos para explicar la función regulatoria de las phasinas. En el primero, las phasinas incrementarían la producción de PHA uniéndose a los gránulos, aumentando de esta manera su relación superficie/volumen, estabilizándolos y evitando que se unan entre sí (Pieper-Fürst et al. 1995; Wieczorek et al. 1995). En segundo lugar, las phasinas podrían interactuar directamente con la PHA sintasa, activando la síntesis de PHA (Wieczorek et al. 1995). El tercer mecanismo propone que las phasinas promueven la producción del polímero indirectamente, evitando que otras proteínas se unan a los gránulos (Wieczorek et al. 1995; Maehara et al. 1999).

Con el fin de analizar el rol de PhaP en la síntesis de PHB bajo distintas condiciones de cultivo se analizaron mutantes de *R. eutropha* con el gen *phaP* delecionado (York et al. 2001). Se observó una disminución del 50% en la producción de PHB, al comparar los valores con la cepa salvaje, bajo condiciones de baja, media y alta acumulación del polímero. Además, se observó que los niveles de PhaP aumentan de manera lineal con los niveles de PHB. Estos resultados son consistentes con los primeros dos modelos acerca de cómo sería el mecanismo de acción de las phasinas. PhaP promovería la síntesis de PHB regulando la relación superficie/volumen de los gránulos de PHB, e interactuando con la PHA sintasa.

Estudios posteriores realizados también en *R. eutropha* demostraron que la acumulación de PhaP es dependiente de la producción de PHB de la célula (Junker et al., 2001a). Se realizaron ensayos de acumulación de PHB y PhaP en células con el gen de la PHA sintasa delecionado (es decir, bacterias incapaces de producir PHB). Estas células fueron incapaces de producir PhaP. También se realizaron ensayos de Western blot contra PhaP en distintas etapas en la acumulación de PHB, de manera de estudiar la regulación de la síntesis de PhaP. Se realizaron cultivos celulares mixtos, donde la mitad de las células tenían el gen *phaP* delecionado y los genes

estructurales *pha* intactos, y la otra mitad tenían el gen de la PHA sintasa delecionado, pero el *phaP* salvaje. En estos cultivos no se detectó la presencia de PhaP, lo que sugeriría que la producción de PhaP se ve regulada por la presencia de PHB en la misma célula y no por otros factores, como podrían ser metabolitos extracelulares presentes en el sobrenadante de los cultivos (Junker et al. 2001).

Además de su rol estructural como parte de la cubierta de los gránulos de PHA, generando una interfase anfipática entre el gránulo hidrofóbico de polímero y el contenido hidrofílico del citoplasma, se han encontrado otras funciones asociadas a las phasinas. Se observó que algunas de estas proteínas presentan actividades regulatorias, como es el caso de ApdA de *Rhodospirillum rubrum*, que activa la depolimerización de PHB, y PhaP1 de *R. eutropha* (Qi et al. 2000) que aumenta la actividad específica de la PHA sintasa *in vivo* (Kuchta et al. 2007). Además, estudios de complementación demostraron que PhaF de *P. putida* ($PhaF_{Pp}$) presenta un rol esencial en la localización celular y en la segregación de los gránulos durante la división celular, asegurando una distribución equitativa de los gránulos en las células hijas. Estudios *in vitro* demostraron que $PhaF_{Pp}$ se une al DNA inespecíficamente a través de su dominio C terminal, que presenta repeticiones en tandem de la secuencia de aminoácidos AAKP, característica de la familia de histonas H1, lo que sugiere que esta phasina también presenta funciones regulatorias. Por otro lado, se observó que la expresión de PhaP de *R. eutropha* aumenta la actividad de la PHA sintasa de clase II de *Pseudomonas aeruginosa* (Qi et al. 2000). Los gránulos de PHA también pueden ser generados *in vitro* incubando la PHA sintasa y un sustrato adecuado. Se observó que la adición de PhaP acelera la producción del polímero *in vitro* (Jossek & Steinbüchel 1998).

2.3. Interacciones entre phasinas y otras proteínas asociadas a gránulo

Pfeiffer y Jendrossek estudiaron las interacciones entre las proteínas asociadas a gránulo (PGAPs por sus siglas en inglés) de *R. eutropha in vitro* mediante la técnica de doble híbrido utilizando la adenilato ciclasa (Pfeiffer & Jendrossek 2011). En particular analizaron las interacciones entre pares de las siguientes proteínas: las phasinas PhaP1, PhaP2, PhaP3, PhaP4 y PhaP5, la depolimeraza PhaZ, la tiolasa

PhaA, la reductasa PhaB1, la sintasa PhaC1 y el regulador PhaR. Mientras que no se detectaron interacciones significativas entre PhaC1 y el resto de las PGAPs analizadas, se encontraron interacciones fuertes entre todas las phasinas estudiadas, en particular entre PhaP2 y PhaP4. Adicionalmente se observó que PhaP5, además de interactuar con las otras phasinas (principalmente con PhaP2), también fue capaz de interactuar con PhaR y PhaZ1.

En un estudio realizado por Ushimaru y Tsuge se investigó el rol de las phasinas de *Aeromonas caviae* ($PhaP_{Ac}$) y *R. eutropha* ($PhaP_{Re}$) en la modulación de la actividad de las sintasas de *A. caviae* ($PhaC_{Ac}$), *R. eutropha* ($PhaC_{Re}$) y *Delftia acidovorans* ($PhaC_{Da}$) mediante ensayos de polimerización *in vitro*. Los autores observaron que ambas phasinas aumentan la actividad de $PhaC_{Ac}$ pero inhiben la actividad de $PhaC_{Re}$ y $PhaC_{Da}$ *in vitro.* Estos resultados indicarían que existe una activación a nivel molecular de $PhaC_{Ac}$ mediada por las phasinas. A pesar de la inhibición observada *in vitro* para $PhaC_{Re}$ y $PhaC_{Da}$ en presencia de las phasinas, se observó que la producción del polímero *in vivo* aumenta en todos los casos analizados en presencia de las phasinas. Además, mediante western blot, se observó un aumento en la solubilidad de $PhaC_{Re}$ en presencia de $PhaP_{Ac}$. Estas observaciones sugieren que $PhaP_{Ac}$ podría afectar el plegado de $PhaC_{Re}$ (Ushimaru et al. 2014).

Estos resultados sugieren interacciones complejas entre las diferentes proteínas asociadas a los gránulos, indicando que la organización espacial de estas proteínas en la superficie del gránulo está controlada, formándose una ordenada y compleja capa proteica como la estructura observada por Dennis et al. (2008) y que apoya la idea de Jendrossek de que los gránulos son como organelas o carbonosomas donde las PGAPs ordenadas en una sofisticada estructura 3D cumplen distintas funciones en el metabolismo de PHB (Jendrossek 2009).

2.4. Localización celular de las phasinas

En un trabajo posterior, Pfeiffer y Jendrossek estudiaron la localización subcelular de las phasinas de *R. eutropha* en presencia y en ausencia de PHB por microscopía de fluorescencia. Con este objetivo construyeron fusiones de las phasinas PhaP1 a PhaP7 a la proteína fluorescente amarilla (YFP, por sus siglas en

inglés) en el extremo C terminal. En cepas productoras de PHB las fusiones de las phasinas PhaP1-5 a YFP colocalizaron con los gránulos de PHB en todos los tiempos analizados, mientras que las phasinas PhaP6 y PhaP7 se encontraron unidas a gránulos a partir de las 5 horas de cultivo. Notablemente, los gránulos de PHB de las cepas que expresan las fusiones a PhaP5, PhaP6, o PhaP7 se localizaron predominantemente cerca de los polos celulares y en el septo formado entre células en división. Este fenómeno no fue observado para otras PGAPs (PhaP1 a PhaP4, PhaC1 y PhaC2) lo que indica que algunas de las phasinas podrían tener funciones adicionales.

En cepas mutantes de *R. eutropha* no productoras de PHB la fluorescencia amarilla se distribuyó homogéneamente en las células a tiempo cero. Las fusiones PhaP2-YFP y PhaP4- YFP dieron una fluorescencia intensa y las células que expresaban dichas fusiones contenían *foci* fluorescentes cerca de los polos celulares y en los septos formados entre las células en división. Este comportamiento se atribuyó al alto potencial de oligomerización entre moléculas de PhaP2 y entre moléculas de PhaP4 observado en los experimentos de doble híbrido (Pfeiffer & Jendrossek 2012), dado que la formación de agregados proteicos conduciría a su ubicación en los polos.

2.5. Aplicaciones biotecnológicas de las phasinas

Se han descripto varias aplicaciones biotecnológicas aprovechando la afinidad de PhaP a los gránulos de PHB, para mejorar los rendimientos obtenidos en la purificación de proteínas recombinantes.

La utilización de PhaP de *R. eutropha* para la purificación de proteínas recombinantes se analizó utilizando GFP (*green fluorescent protein* de *Aequorea victoria*) fusionada a PhaP y a una inteína (Barnard et al. 2005). Las inteínas son proteínas auto-clivables, las cuales son ampliamente utilizadas en la producción y purificación de proteínas recombinantes (Derbyshire et al. 1997; Wood et al. 1999). Al purificar los gránulos de PHB mediante lisis celular y centrifugación diferencial, se obtiene la proteína GFP fusionada a PhaP. La misma es luego separada de la phasina mediante la adición de tioles que activan a la inteína, liberando de esta

manera a la GFP. Estudios similares fueron realizados en *E. coli* recombinante productora de PHB y PhaP para la producción de distintos tipos de proteínas recombinantes (Banki et al. 2005; Yao et al. 2008).

También se analizó el uso del dominio N terminal de PhaF de *Pseudomonas putida* GPo1 (BioF) como un *tag* polipeptídico para anclar proteínas de fusión a gránulos de PHA. Esta fusión provee una nueva forma de inmovilizar proteínas *in vivo* utilizando bioplásticos como soporte. Se observó que las enzimas inmovilizadas de esta forma mantienen su actividad. Los gránulos que portan las proteínas de fusión a BioF pueden ser purificados por un simple paso de centrifugación y utilizados para aplicaciones biotecnológicas. Las proteínas de fusión pueden ser separadas del polímero a través de un tratamiento con detergentes suaves (Moldes et al. 2004). Esta técnica ha sido propuesta para la liberación de proteínas al ambiente, en particular, para la liberación de la toxina Cry1Ab como tratamiento insecticida (Moldes et al. 2006).

Adicionalmente, se ha reportado que algunas phasinas presentan actividad biosurfactante, atribuida a su naturaleza anfipática. En particular se observó que PhaP de *Aeromonas hydrophila* es capaz de emulsificar *in vitro* aceites de origen petroquímico, aceites vegetales y diesel (Wei et al. 2011).

2.6. Estudios estructurales de las phasinas

Los estudios estructurales de las phasinas descriptos en la literatura son muy pocos y, si bien se ha reportado la obtención de cristales de PhaP de *A. hydrophila* (Zhao et al. 2006), hasta el momento no han sido publicados trabajos en los cuales se haya logrado resolver por completo la estructura de alguna de las phasinas por métodos de alta resolución como Resonancia Magnética Nuclear (RMN) o cristalografía de rayos X. Sin embargo, algunas características estructurales de phasinas pertenecientes a distintos microorganismos fueron estudiadas por distintos grupos utilizando programas de predicción y métodos biofísicos de baja resolución.

2.6.1. Phasinas de *R. eutropha* (PhaP1-4$_{Re}$)

Predicciones *in silico* de la estructura secundaria de las 4 phasinas de *R. eutropha* H16, PhaP1 de *Ralstonia solanacearum* y PhaP de *Ralstonia metallidurans* mostraron que estas phasinas comparten un porcentaje muy alto (cercano al 90%) de aminoácidos en conformación α- hélice (Neumann et al. 2008). En base a estas predicciones los autores postularon que esta alta proporción de α- hélice podría ser una característica distintiva de las phasinas.

Predicciones estructurales de PhaP1-4$_{Re}$ revelaron que las mismas no presentan un dominio altamente conservado entre las 4, ni un dominio hidrofóbico claro, aunque comparten regiones hidrofóbicas homólogas (Figura 4). Sin embargo, el análisis de mutantes de PhaP1 revelaron que toda la proteína está involucrada en la interacción con los gránulos de polímero (Neumann et al. 2008).

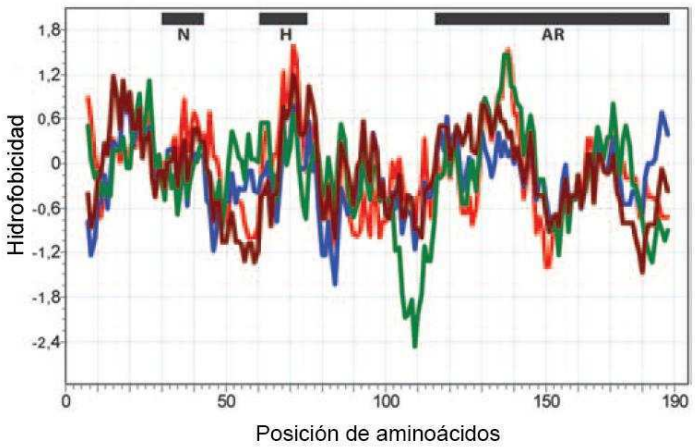


Figura 4: Gráficos de hidrofobicidad de las phasinas PhaP1-4 de *R. eutropha*. Rojo: PhaP1, azul: PhaP2, verde: PhaP3, marrón: PhaP4. Las regiones de interés son las siguientes: Extremo N-terminal conservado (N), zona más hidrofóbica (H) y extremo C-terminal rico en alaninas (AR). Tomado de Neumann 2008.

Resultados obtenidos mediante la técnica de SAXS (Small-Angle X-ray Scattering, por sus siglas en inglés) de PhaP1 de *R.eutropha* (PhaP1$_{Re}$) de 24 kDa, sugirieron que dicha phasina es una proteína triangular plana que ocurre como trímero (Neumann et al. 2008).

2.6.2. PhaP de *Aeromonas hydrophila* ($PhaP_{Ah}$)

La phasina de *Aeromonas hydrophila* ($PhaP_{Ah}$) fue estudiada por Zhao y colaboradores con el objeto de resolver su estructura. Si bien los autores lograron obtener cristales de la proteína y realizar un análisis preliminar del patrón de difracción de rayos X obtenido a partir de los mismos, la estructura de esta phasina no pudo ser resuelta por completo. En base a resultados obtenidos utilizando técnicas de baja resolución, los autores postularon que esta phasina tiene un peso molecular de 13 KDa y es tetramérica (Zhao et al. 2006).

2.6.3. PhaF de *Pseudomonas putida* KT2440 ($PhaF_{Pp}$)

Uno de los estudios estructurales más detallados descriptos en la literatura, es el de la phasina $PhaF_{Pp}$ realizado por el grupo de M.A Prieto. Esta phasina ha sido caracterizada estructuralmente utilizando programas de predicción y métodos biofísicos de baja resolución, tales como dicroismo circular (*Circular Dicroism* o CD por sus siglas en inglés), espectroscopía de fluorescencia y técnicas de filtración y de sedimentación, entre otras (Maestro et al. 2013).

$PhaF_{Pp}$ es un tetrámero en solución y contiene dos dominios distintivos: un dominio N- terminal anfipático con capacidad de unión a gránulos de PHA, donde se encuentra el motivo de oligomerización, y un dominio C- terminal de tipo histona, compuesto de 7 repeticiones en tandem de la secuencia AAKP, que permite la interacción con el DNA, seguido de una cola con residuos en conformación *random coil* o sin estructura secundaria determinada (Figura 5). Según predicciones bioinformáticas, el dominio N-terminal contiene una α- hélice larga de carácter anfipático, que se predice como inestable al no intervenir en una interacción proteína-ligando o proteína-proteína, seguida de una hélice más corta que presenta el dominio de oligomerización. El resto de los residuos del dominio N-terminal fueron asignados como *random coil.*

El dominio C-terminal forma una superhélice que puede insertarse en el surco mayor del DNA. Los residuos de lisina repetidos en el motivo AAKP se encuentran dispuestos de manera tal de poder interactuar con los grupos fosfato cargados

negativamente del DNA. Dado que este dominio está cargado positivamente, se sugiere que en ausencia del ácido nucleico, el mismo estaría desordenado debido a la repulsión de sus cargas.

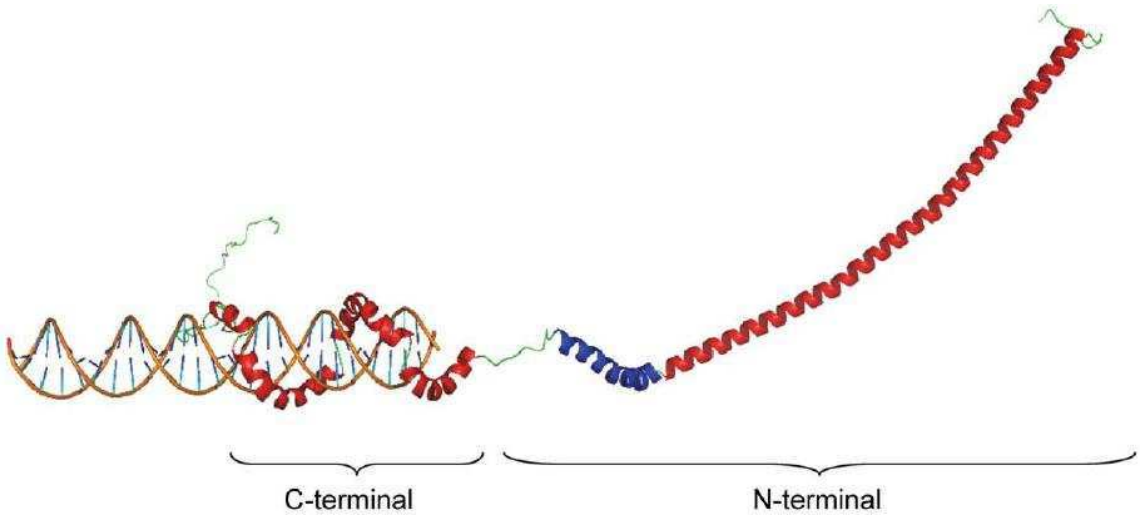


Figura 5: Phasina PhaF de *Pseudomonas putida* ($PhaF_{Pp}$) acomplejada con el DNA. En azul se muestra el motivo de oligomerización. Tomado de Maestro 2013.

2.6.4. Regiones desordenadas presentes en las phasinas

Maestro et al. propusieron que la phasina multifuncional $PhaF_{Pp}$ pertenece a una nueva familia de proteínas intrínsicamente desordenadas debido a las regiones desestructuradas encontradas mediante métodos de predicción *in silico* en el dominio N-terminal.

Las proteínas intrínsecamente desordenadas o nativamente desestructuradas no se pliegan en una estructura tridimensional determinada sino que forman ensamblados dinámicos que le dan una naturaleza flexible, importante para desempeñar sus funciones. Una proteína puede ser desestructurada en su totalidad o presentar algunos segmentos o regiones desestructuradas (Sickmeier et al. 2007).

Se observó que la phasina $PhaF_{Pp}$ es parcialmente desestructurada en ausencia de PHA pero es capaz de estructurarse en presencia de compuestos hidrofóbicos que imitan el PHA, como el oleato de sodio, y en presencia de solventes estabilizantes de estructura como el TFE (Maestro et al. 2013).

2.6.5. Motivos *coiled coil* descriptos en phasinas

Métodos de predicción *in silico* revelaron que la segunda hélice del dominio N-terminal de PhaF$_{Pp}$ presenta un patrón de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos que se repite cada 7 residuos, llamado héptada, característico de una conformación *coiled coil*.

Los motivos *coiled coil* cumplen una importante función en la estabilización de la estructura terciaria y cuaternaria de las proteínas, y muchas veces están involucrados en las interacciones proteína-proteína, en la oligomerización y en procesos de señalización (Delorenzi & Speed 2002). Estos dominios están formados por asociaciones intra o extra moleculares entre 2 o más α-hélices que se cruzan entre sí y se encuentran estabilizados por interacciones entre residuos de las mismas. Son de carácter anfipático y presentan un patrón de aminoácidos hidrofóbicos e hidrofílicos que se repite cada 7 residuos. Las 7 posiciones de la héptada se designan desde la "a" a la "g", siendo generalmente hidrofóbicos los residuos que ocupan la posición "a" y "d", separados por las posiciones "b" y "c" de los 3 residuos hidrofílicos y generalmente cargados "e", "f" y "g" (Figura 6). Las secuencias de proteínas que forman motivos *coiled coil* exhiben patrones comunes de distribución de aminoácidos que parecen ser distintos al de otros tipos de proteínas (Lupas et al. 1991).

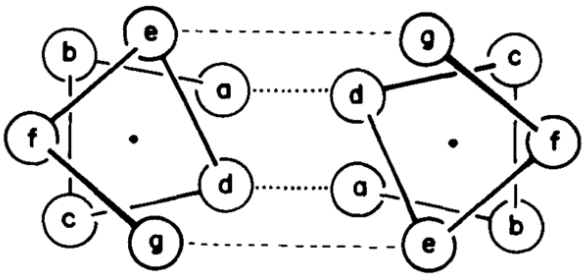


Figura 6: Representación gráfica de las 7 posiciones de los residuos que forman un dominio *coiled coil.*

En la phasina PhaF$_{Pp}$ las posiciones "d" están ocupadas por residuos de lisina, lo que sugiere fuertemente que los aminoácidos 111–133 forman un cierre de leucinas que estaría involucrado en la oligomerización de la proteína.

Métodos bioinformáticos de predicción de motivos *coiled coil* revelaron que algunas phasinas tienen alta probabilidad (>75%) de contener motivos *coiled-coil*, entre ellas las de *R. eutropha* y las pertenecientes a distintas especies de *Pseudomonas* y *Bacillus*. Por otro lado, otras phasinas tienen mediana probabilidad de contener este dominio (25%-75%), entre ellas una phasina de *Azotobacter vinelandii* (Maestro et al. 2013).

2.6.6. Perfiles de hidrofobicidad

Dado que las phasinas son proteínas de unión a gránulos hidrofóbicos de PHA muchos autores analizaron la presencia de dominios o parches hidrofóbicos que permitan la interacción con el polímero en este tipo de proteínas. GA014 de *Rodoccocus ruber* de 14 kDa fue una de las primeras PGAPs caracterizadas, y fue descripta como una phasina que presenta dos dominios hidrofóbicos de 8 aminoácidos cada uno, ubicados en el extremo C- terminal y propuestos como dominios de interacción con los gránulos de PHA (Pieper-Fürst et al. 1994). Estos dominios no se encontraron al analizar los perfiles de hidrofobicidad de $PhaP1_{Re}$ y $PhaF_{Pp}$, que presentan máximos y mínimos alternados (Figura 7), ni en otras phasinas, como la de PhaP *B. megaterium* de 20 kDa, que es más hidrofílica que las anteriormente mencionadas (McCool & Cannon 1999).

A pesar de que la evidencia experimental indica que los dominios hidrofóbicos descriptos en GA14 son esenciales para la unión a los gránulos, (Pieper-Fürst et al. 1994), análisis de mutantes $PhaP_{Re}$ revelaron que toda la proteína está involucrada en el proceso y que no hay una región en particular responsable de la interacción con los gránulos (Neumann et al. 2008).

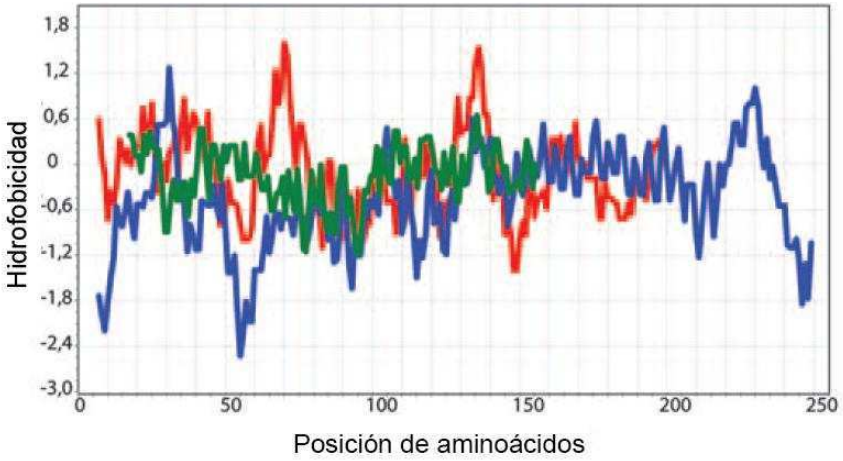


Figura 7: Gráficos de hidrofobicidad de GA014, $PhaP1_{Re}$ y $PhaF_{Pp.}$ En Rojo: $PhaP1_{Re}$; en azul: $PhaF_{Pp}$ y en verde: GA14 de *R. rubrum.* Tomado de Neumann 2008.

Tercera Parte: La respuesta a estrés térmico en *E. coli*

3.1. Generalidades

La respuesta a estrés térmico permite a las células adaptarse a cambios metabólicos y ambientales, y aumentar su supervivencia bajo condiciones de estrés (Bukau 1993; Gross et al. 1996). Esta respuesta es inducida por varios tipos de estrés, incluyendo factores físico-químicos como la temperatura, condiciones oxidantes, y diferentes tipos de compuestos perjudiciales para la célula. Además, el mismo es inducido por la expresión de distintos tipos de proteínas recombinantes (Kanemori et al. 1994; Dong et al. 1995; Hoffmann & Rinas 2004). Por ejemplo, al ocurrir un aumento en la temperatura, se produce un aumento transitorio en la concentración del regulador maestro σ^{32} (Yura 2000). El factor σ^{32} regula la transcripción de varios promotores relacionados con el estrés térmico. En particular induce la síntesis de más de 20 proteínas, las cuales se denominan en conjunto proteínas de choque térmico o Hsp (*heat shock proteins*, por sus siglas en inglés). Estas proteínas codifican principalmente chaperonas y proteasas ATP-dependientes, las cuales son responsables del plegado correcto y degradación proteica tanto en condiciones normales como bajo condiciones de estrés. En respuesta al choque térmico, la síntesis de las Hsp aumenta hasta 15 veces (Bukau

1993; Georgopoulos et al. 1994) y luego disminuye, hasta alcanzar un nuevo estado de equilibrio. Las Hsp más importantes son los sistemas compuestos por DnaK-DnaJ-GrpE y GroEL-GroES (Arsène et al. 2000), los cuales pueden llegar a representar hasta un 20% de las proteínas totales a 46°C (Georgopoulos et al. 1994; Gross et al. 1996). La expresión de las Hsp se encuentra regulada por el factor σ^{32} , codificado por el gen *rpoH* (Gross et al. 1996). Los factores sigma son una familia de proteínas relativamente pequeñas que se asocian de manera reversible al núcleo (*core*) de la RNA polimerasa (RNAP), ya que la misma por sí sola no puede iniciar la transcripción. El factor σ^{32}, codificado por *rpoH*, regula la transcripción de los genes relacionados al estrés térmico. En células *ΔrpoH* los niveles de las principales chaperonas, excepto GroELS y Factor de inicio o TF (por sus siglas en inglés: *Trigger Factor*), y de varias proteasas se encuentran drásticamente disminuídos, mientras que los niveles de proteínas agregadas están aumentados, aún en condiciones óptimas de cultivo (Schlieker et al. 2002).

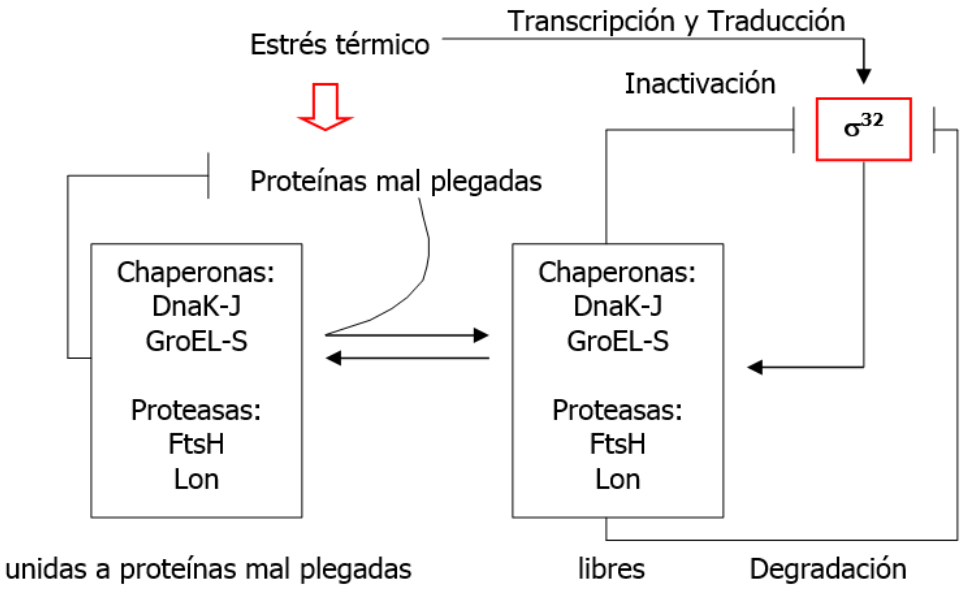


Figura 8: Diagrama de la regulación de σ^{32}. Debido a un estrés térmico, se induce la transcripción y traducción de σ^{32}, y aumenta la concentración de proteínas mal plegadas. σ^{32} activa la expresión de chaperonas y proteasas, las cuales se unen a las proteínas mal plegadas. Cuando la concentración de proteínas mal plegadas es menor que la de las chaperonas y

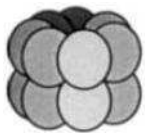
proteasas, las mismas se unen a σ^{32}, inactivándolo o degradándolo. Basado en datos de Guisbert et al. 2008.

3.2. Chaperonas

En el citoplasma de *E. coli*, una fracción de las proteínas que se sintetizan requieren de la actividad de chaperonas para su correcto plegado. Bajo condiciones de estrés, las chaperonas se vuelven muy importantes para la supervivencia celular. En particular, en condiciones de estrés térmico, las células responden aumentando la expresión de chaperonas moleculares para lidiar con el aumento de proteínas mal plegadas y con la agregación de proteínas. Todas las clases de chaperonas tienen la capacidad de evitar la agregación de determinadas enzimas que son termolábiles a elevadas temperaturas, pero los distintos sistemas de chaperonas cumplen distintas funciones durante el estrés térmico *in vivo* (Schlieker et al. 2002).

Algunas chaperonas, además de intervenir en procesos que evitan el plegado incorrecto o el agregado de proteínas, intervienen en otros procesos, como el rescate de proteínas que se encuentran en estado de agregación. En particular, el sistema de chaperonas formado por DnaK y ClpB interviene en procesos de desagregación y subsecuente replegado de proteínas agregadas. Las especies proteicas no nativas que no pueden ser replegadas correctamente pueden ser degradadas por la acción de las proteasas ClpXP y Lon.

Tabla 1: Chaperonas de *E. coli* y sus principales características

Familia	Estructura	ATP	Representante en *E. coli*	Especies reactivas por célula	Fenotipo del mutante de deleción	Función
HSP100	6 subunidades	+	ClpA	ND	Sin cambios	Degradación de proteínas junto con la proteasa ClpP
			ClpB	500	Termotolerancia reducida	Disolución de agregados proteicos junto con el sistema DnaK
HSP90	Dímero	+	HtpG	1050	Reducción de la tasa de crecimiento a 44ºC	Desconocida
HSP70	Monómero	+	DnaK y co-chaperona: DnaJ/GrpE	9900	Termosensible (cremiento reducido a partir de los 39ºC)	-Plegado *de novo* de proteínas -Prevención de la agregación de proteínas a altas temperaturas -Regulación de la respuesta a choque térmico - Disolución de agregados proteicos junto con ClpB
HSP60	14 subunidades 	+	GroEL y co-chaperona: GroES	1230	Letal	- Plegado *de novo* de proteínas - Prevención de la agregación de proteínas a altas temperaturas
sHSP	8 a 24 subunidades	-	IbpA IbpB	<600	Sin cambios	Prevención de la agregación de proteínas a altas temperaturas
Trigger-factor	Monómero	-	Trigger-factor	20000	Sin cambios	Plegado *de novo* de proteínas en asociación con los ribosomas.

3.2.1. Factor de Inicio *o Trigger Factor*

El factor de inicio o *trigger factor* (TF), es una proteína ATP-dependiente que se encuentra asociada a los ribosomas y a los complejos formados por DnaK-J-GrpE y GroEL-S (Horwich et al. 1993; Ellis & Hartl 1999; Bukau et al. 2000). El TF se une a las regiones hidrofóbicas de las proteínas al salir del ribosoma, de manera de evitar un plegado prematuro de la proteína, o interacciones intra o intermoleculares (Deuerling et al. 2003).

3.2.2. DnaK

DnaK, perteneciente a la familia de Hsp70, y sus co-chaperonas DnaJ y GrpE intervienen en el plegado de una amplia variedad de proteínas. A 30ºC, DnaK se asocia a aproximadamente un 15% de las proteínas (Deuerling et al. 1999; Teter et al. 1999) y actúa mediante repetidos ciclos de plegado (Bukau & Horwich 1998).

DnaK también juega un rol en el plegado de los polipéptidos que están siendo sintetizados, reconociendo secuencias polipeptídicas lineales ricas en aminoácidos hidrofóbicos, motivo que tipícamente se encuentra en el interior de una proteína correctamente plegada y que al ser expuesto a la superficie es indicio de conformaciones no nativas. Se postula que dichas regiones hidrofóbicas se encuentran presentes en todos los polipéptidos desplegados y que los sitios de unión de DnaK ocurren en promedio cada 40 residuos (Rüdiger et al. 1997). La asociación de esta chaperona causa la estabilización de las proteínas sustrato, evitando su agregación. *dnaK* no es esencial para el crecimiento a 30°C, pero sí es necesaria para el crecimiento a temperaturas mayores a 37°C, y menores a 15°C (Bukau & Walker 1989; Deuerling et al. 1999), así como en mutantes que no producen TF, lo que indica superposición de funciones entre las dos chaperonas.

3.2.3. Chaperoninas: GroELS

Otro tipo de chaperonas son las llamadas chaperoninas, que son grandes complejos proteicos cilíndricos que están formados por dos anillos apilados. Las chaperoninas difieren sustancialmente de las chaperonas de la familia Hsp70 tanto por su estructura como por su mecanismo de acción, pero ambos tipos son ATP-dependientes. GroEL, la chaperonina de *E. coli*, está formada por 14 subunidades en total, presentando 7 en el anillo superior y 7 en el anillo inferior. Su estructura con forma de anillo o de barril es esencial para su función en el plegado de proteínas (Frydman 2001). El complejo GroELS se une a al menos un 10% de las proteínas (Horwich et al. 1993) y el tamaño máximo de la proteína que puede albergar en su cavidad es de 55 kDa. *groEL* es esencial para el crecimiento a todas las temperaturas, por lo que se propone que algunas proteínas esenciales para el crecimiento dependen del sistema GroE para el plegado de *novo*. En contraste con TF y DnaK, el sistema GroELS se asocia a polipéptidos recién sintetizados de una manera post-traduccional exclusivamente (Frydman 2001).

3.2.4. Pequeñas proteínas de choque térmico: IbpA e IbpB

Las "pequeñas proteínas de choque térmico" o sHsp (*small heat shock proteins*, por sus siglas en inglés), son una clase de chaperonas que evitan el agregado irreversible y ayudan en el plegado de varios tipos de proteínas (Kuczyńska-Wiśnik et al. 2002). Las sHsp fueron encontradas en todos los organismos estudiados y han sido caracterizadas por su bajo peso molecular (12-30 kDa) (Jakob et al. 1993; Arrigo & Landry 1994). Las mismas forman una estructura oligomérica, y contienen un dominio α-cristalino conservado. Este dominio es muy similar al presente en una proteína que evita la formación de cataratas (asociadas al agregado de proteínas) en las lentes del ojo de vertebrados (Jakob & Buchner 1994). Las sHsp se unen a proteínas mal plegadas, las estabilizan, y luego las entregan a sistemas de chaperonas ATP-dependientes de las familias Hsp70 (DnaK) y Hsp40 (DnaJ) (Ehrnsperger et al. 1997; Veinger et al. 1998; Lee & Vierling 2000).

En *E. coli* se conocen dos miembros de las sHsp: IbpA e IbpB (*inclusion body protein*), las cuales comparten un 52.5% de identidad y forman un operón (Allen et al. 1992). Su expresión está regulada por RpoH, y es inducida en condiciones de estrés térmico y de otros tipos de estrés (Allen et al. 1992), durante la producción de proteínas heterólogas, y durante la formacion de biofilms (Allen et al. 1992; Hoffmann & Rinas 2004; Kuczyńska-Wiśnik et al. 2010). Estas proteínas presentan actividad de chaperonas *in vitro*, en ausencia de ATP, lo que las diferencia de otro tipo de chaperonas como DnaK o GroEL (Arrigo & Landry 1994). IbpA evita la formación de grandes agregados proteicos mientras que IbpB interactúa con los agregados mediante la interacción con IbpA (Ratajczak et al. 2009). Estas chaperonas, además de interactuar con las proteínas que están siendo sintetizadas para evitar su agregación, también son sustrato para la proteasa Lon, lo que sugiere cierta comunicación entre las sHSPs y la maquinaria de degradación proteica (Bissonnette et al. 2010).

Estudios realizados en cepas con los genes *ibpA* e *ibpB* delecionados mostraron defectos en el crecimiento solamente a temperaturas mayores a 46°C (Thomas & Baneyx 1998). Kitagawa y colaboradores realizaron estudios de resistencia a distintos tipos de estrés, en cepas con mutaciones en los genes *ibpA*, *ibpB* y en ambos genes a la vez; y en cepas que sobreexpresaban ambos genes (Kitagawa et al. 2000; Kitagawa et al. 2002). Los autores no observaron diferencias al analizar el porcentaje de viabilidad de las distintas mutantes en condiciones de estrés térmico, sin embargo, en estas condiciones se observó una mayor viabilidad en la cepa que sobreexpresa *ibpA*, seguido de la cepa que sobreexpresa *ibpB*, y la que sobreexpresa ambos genes. Además, la sobreexpresión de estos genes produjo un efecto protector evidenciado por: *i)* una disminución en el porcentaje de proteínas agregadas, *ii)* un aumento en la resistencia a paraquat (provoca estrés oxidativo por iones superóxido) y etanol y *iii)* una supresión de la sensibilidad a estrés térmico de una mutante en el gen *rpoH*.

Cuando se realizaron ensayos *in vitro* con IbpA e IbpB purificadas (Kitagawa et al. 2002) se observó que las mismas forman multímeros de entre 2 y 3 MDa. Se observó además que ambas proteínas protegen a varias enzimas de la inactivación por calor, superóxido de potasio, agua oxigenada y congelamiento/descongelamiento. Tanto IbpA como IbpB se encontraron unidas a las enzimas en sus formas no nativas.

Cuarta Parte: Estrés inducido por la producción de proteínas heterólogas en *E. coli*

4.1. Generalidades

Con el objetivo de optimizar la producción de compuestos y proteínas heterólogas en *E. coli*, es necesario estudiar el efecto que estos productos ejercen sobre su metabolismo y fisiología. Se han realizado varios estudios acerca de las consecuencias de la producción de proteínas heterólogas en esta bacteria (Hoffmann and Rinas, 2004b). En ellos se han reportado cambios en la velocidad específica de crecimiento, debido a la presencia de plásmidos y a la expresión de las proteínas codificadas en él (Bentley et al. 1990; Corchero & Villaverde 1998; Hoffmann et al. 2001). También se reportó una disminución en la concentración de proteínas relacionadas a la síntesis proteica, tales como factores de elongación o subunidades proteicas ribosomales (Dong et al. 1995; Hoffmann et al. 2002). Esto podría deberse a una competencia por los ribosomas libres cuando se expresa la proteína recombinante a niveles muy altos (Vind et al. 1993).

La síntesis de proteínas heterólogas en *E. coli* puede disparar distintos tipos de estrés, en particular, estrés térmico. Esto es debido a un aumento en la concentración de proteínas mal plegadas en la célula (Goff & Goldberg 1985) que desencadena la respuesta frente a estrés térmico. Se han reportado numerosos casos de inducción a este tipo de estrés debido a la producción de proteínas recombinantes en *E. coli*. Se ha observado en estos casos un aumento en la transcripción (Jürgen et al. 2000), síntesis (Rinas 1996; Parsell & Sauer 1989; Kanemori et al. 1994; Hoffmann & Rinas 2000) y acumulación (Dong et al. 1995; Jürgen et al. 2000) de varias chaperonas relacionadas al estrés térmico. Por ejemplo, en células recombinantes de *E. coli* productoras de un factor de crecimiento humano (hFGF-2) inducido por temperatura, se observó que en la primera fase de producción de la proteína, la misma se acumuló en su totalidad como cuerpos de inclusión, y luego se observó un aumento en la concentración de varias Hsp, como DnaK, GroEL-S, ClpB, IbpA e IbpB. Luego del aumento en la concentración de las Hsp, se comenzó a detectar al factor de crecimiento en la fase soluble, lo cual indicaría

que la producción de esta proteína recombinante en *E. coli* requiere de chaperonas para su correcto plegado. (Hoffmann & Rinas 2000). En otro trabajo se estudió la producción de α-glucosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* en *E. coli* (Jürgen et al. 2000). Se observó un aumento en la expresión y concentración de las siguientes proteínas: DnaK, GroEL, Lon, ClpB e IbpB. Además, se detectó la presencia de DnaK, GroEL, IbpA, IbpB y OmpT (*outer membrane protein*) en los cuerpos de inclusión

4.2. Cuerpos de inclusión

Los cuerpos de inclusión bacterianos (*Inclusion Bodies* o IB, por sus siglas en inglés) son agregados intracelulares formados principalmente por proteínas mal plegadas resistentes a proteasas. Estas estructuras son dinámicas y ocurren por un desbalance entre la agregación y la liberación de proteínas, principalmente en condiciones de alta expresión de genes recombinantes (Carrió & Villaverde 2001). Si bien se ha reportado que en respuesta a la sobre-producción de proteínas aumenta el nivel de expresión de genes que codifican para chaperonas y proteasas (Goff & Goldberg 1985; Allen et al. 1992; Rinas 1996; Hoffmann & Rinas 2000; Jürgen et al. 2000), los IB se generan porque las chaperonas no logran el correcto plegado de las proteínas o no llegan a degradar los polipéptidos mal plegados o desplegados, probablemente debido a su cantidad limitante en células recombinantes cuando la síntesis de proteínas está ocurriendo a velocidades muy altas. En estas condiciones, ocurren asociaciones intermoleculares entre residuos hidrofóbicos expuestos de proteínas en proceso de plegado, conduciendo al agregado de intermediarios de plegado en estas estructuras (King et al. 1996). Los IB actúan como reservorios transitorios de proteínas mal plegadas, para luego ser procesadas por la maquinaria celular, proceso en el que intervienen chaperonas y proteasas.

Además de proteínas mal plegadas, bajo ciertas condiciones se ha registrado la presencia de proteínas con estructura secundaria (Oberg et al. 1994) y actividad enzimática asociada a IB (Worrall & Goss 1989; Kostas et al. 1991) lo que indica que los IB también pueden contener proteínas correctamente plegadas. La presencia de

distintas conformaciones proteicas depende de la influencia de parámetros químicos y físicos durante la construcción de los IB (Carrió et al. 2000).

4.2.1. Localización, morfología y organización interna de los IB

Los IB pueden ser observados al microscopio óptico como partículas refractantes de hasta 2 μm^3 (Carrió et al. 1998) y como agregados densos de estructura indefinida por miscroscopía electrónica de transmisión (Transmission electron microscopy o TEM, por sus siglas en inglés), encontrándose un número bajo de IB por célula, por lo general 1 o 2 (Carrió et al. 1998; Bowden et al. 1991). Imágenes obtenidas por microscopía electrónica de barrido de estas partículas purificadas revelan formas cilíndricas u ovoides con diferentes topologías en la superficie (Bowden et al. 1991; Carrió et al. 2000). La mayoría de los IB se encuentran en el citoplasma, pero se pueden encontrar IB formados por proteínas de secreción como la β-lactamasa, en el espacio periplásmico (Georgiou & Valax 1999). A pesar de ser partículas muy densas, los IB se encuentran altamente hidratados (Taylor et al. 1986) y muestran una arquitectura porosa (Carrió et al. 2000). Se observó que la cinética de agregación de proteínas que forman los IB es de primer orden (Hoffmann et al. 2001), y que primero se forman preagregados que luego se combinan para formar partículas más grandes, que luego siguen incorporando proteínas y creciendo en tamaño.

4.2.2. Rol de las chaperonas en el proceso de construcción-deconstrucción de cuerpos de inclusión

En bacterias productoras de proteínas recombinantes se observó que el proceso de replegado de proteínas ocurre simultáneamente al de agregación de proteínas (Carrió et al., 1999), indicando que los IB están en un proceso permanente de construcción-deconstrucción que involucra tanto el agregado como la liberación de proteínas.

Se han encontrado distintas chaperonas como componentes de los IB de *E. coli*, como las chaperonas DnaK y GroEL (junto con sus co-chaperonas DnaJ-GrpE y GroES respectivamente) (Parsell et al. 1994; Glover & Tkach 2001) y las pequeñas chaperonas IbpA e IbpB (Allen et al. 1992). Mediante el uso de cepas mutantes para cada una de las principales chaperonas de *E. coli* y el estudio de la localización de las chaperonas en los IB, Carrió y Villaverde investigaron el rol que cumple cada chaperona en el proceso de construcción-deconstrucción de IB (Carrió & Villaverde 2003). Los autores utilizaron como modelo la proteína recombinante VP1LAC, que forma IB de gran tamaño cuando es sobreexpresada en *E. coli.* En mutantes *dnaK*, se observó un aumento en la cantidad de proteína agregada y un aumento en el tamaño de los cuerpos de inclusión. Además, se encontró que un producto de degradación de VP1LAC estaba ausente en estas mutantes, lo que sugiere que DnaK estaría involucrada en la degradación de la proteína mediante un mecanismo proteasa (Sherman & Goldberg 1992; Tomoyasu et al. 2001). En este contexto se observó que la co-chaperona DnaJ está involucrada en la formación de complejos proteína-proteasas (Huang et al. 2001; Jubete et al. 1996). Estos resultados sugieren que las principales funciones de DnaK en el proceso de formación de IB son evitar la agregación y facilitar la degradación de proteínas mal plegadas. Esta chaperona se localiza en la superficie de los agregados y, en menor cantidad, en el citoplasma, lo que indica que existe una interacción de esta chaperona con los IB ya formados, sugiriendo que DnaK interviene en la recuperación de proteínas en estado de agregación y por ende en la desintegración de IB *in vivo.* Por otro lado, los autores observaron que GroEL en ausencia de su cochaperona, interveniene en el proceso de organización de pequeños agregados proteicos en estructuras organizadas de mayor tamaño durante la construcción de los IB, y que además está involucrada en la remoción de proteínas de los mismos. Por último, si bien las pequeñas chaperonas IbpA e IbpB también pueden ser encontradas en IB (Allen et al. 1992; Laskowskaa et al. 1996), el impacto de sus respectivos mutantes en los IB bacterianos es más moderado (Carrió & Villaverde 2003).

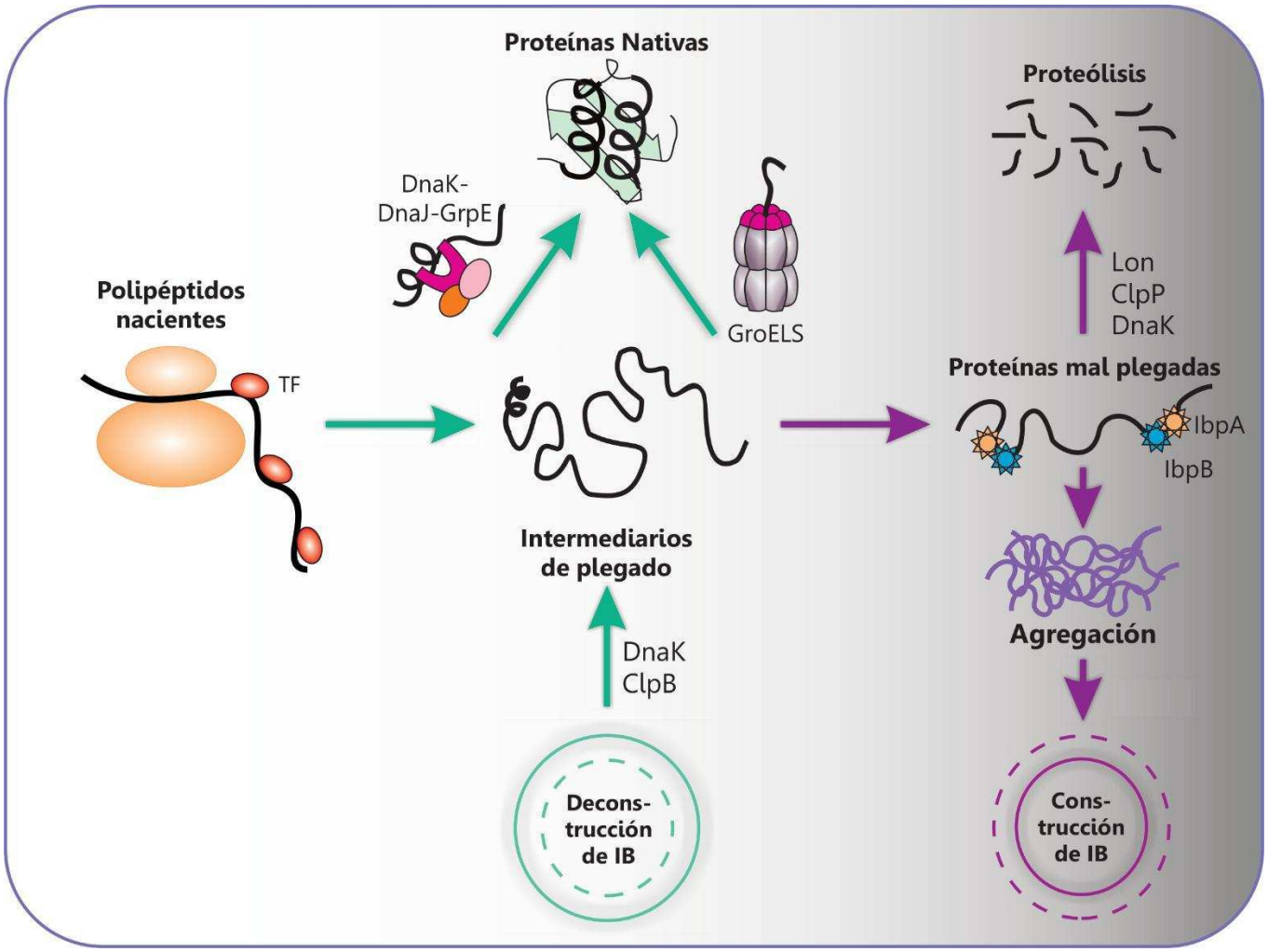


Figura 9: Rol de las chaperonas en el proceso de plegado, agregación y proteólisis de proteínas y en la construcción-deconstrucción de IB: TF se une a las regiones hidrofóbicas de las mismas al salir del ribosoma, de manera de evitar interacciones intra o intermoleculares que lleven a un plegado prematuro. Algunas proteínas requieren la acción de chaperonas para alcanzar su conformación nativa. En este proceso ATP-dependiente intervienen las chaperonas DnaK y el sistema GroELS. IbpA e IbpB, se unen a proteínas mal plegadas, en particular durante condiciones de estrés térmico y evitan su agregación, además intervienen en el proceso de proteólisis por ser sustrato de la proteasa Lon. Por otro lado, el sistema bi-chaperona formado por DnaK y ClpB interviene en procesos de desagregación o de liberación de proteínas de los IB y subsecuente replegado de proteínas agregadas. Por último, las especies proteicas no nativas que fallaron en ser plegadas correctamente pueden ser degradadas por la acción de las proteasas ClpP y Lon.

4.3. Producción de proteínas heterólogas en *E. coli* : Aplicaciones biotecnológicas de las chaperonas

La síntesis efectiva de proteínas en huéspedes recombinantes ha sido una estrategia ampliamente utilizada en investigación y en la industria. *E. coli* es el organismo más comúnmente utilizado para la producción de proteínas heterólogas debido a que puede cultivarse con facilidad en fermentadores y porque permite todo tipo de manipulaciones genéticas. A pesar de que muchas proteínas pueden ser expresadas a altos niveles en poco tiempo en *E. coli*, en muchos casos los productos de expresión se acumulan intracelularmente de forma no nativa, dando lugar a la formación de IB. La agregación es una consecuencia predominante en sistemas de expresión muy fuertes. Las proteínas en este estado son por lo general inactivas y se deben realizar procedimientos especiales para replegarlas a su forma nativa.

Se ha reportado que las chaperonas reducen la agregación y se utilizan para aumentar la producción de la forma activa de las proteínas *in vivo* (Fahnert et al. 2004). Algunos trabajos demostraron que la coproducción de GroEL/ES o DnaK, aumenta la solubilidad de proteínas recombinantes promoviendo el plegado de la proteína de interés (Thomas et al. 1997). También se han realizado varios estudios acerca del rol y las aplicaciones de las sHsp en la producción de proteínas recombinates en *E. coli*, incluyendo la GFP (*green fluorescent protein*), utilizando cepas mutantes en los genes *ibpA e ibpB*, y cepas que sobreexpresaban estos genes (Han et al. 2004). Se observó una mayor acumulación de las proteínas recombinantes en las cepas que sobreexpresan las sHsp, debido a que estas últimas evitan la degradación de las proteínas recombinantes por proteasas citoplasmáticas.

Ninguna de las chaperonas estudiadas puede ser considerada capaz de plegar correctamente cualquier proteína dado que algunas chaperonas funcionan bien para un sustrato pero no para otros. Esto depende de la afinidad relativa entre la chaperona y los intermediarios de plegado del sustrato, así como también de la cinética de agregado. Estos parámetros son difíciles de predecir, por lo que el uso de chaperonas en aplicaciones biotecnológicas depende de experimentos de prueba y error. Por este motivo la estrategia más utilizada consiste en coproducir al menos

dos de las principales chaperonas de *E. coli* junto con la proteína de interés (Nishihara et al. 2000).

Quinta Parte: Resultados Previos e hipótesis de trabajo

5.1. Producción de poli(3-hidroxibutirato) en *E. coli* recombinante y estrés

Debido a los numerosos inconvenientes asociados a la producción de PHAs en bacterias productoras naturales, la producción heteróloga de PHAs en *E. coli* surge como una atractiva alternativa. *E. coli* presenta varias ventajas sobre los productores naturales, ya que, al no tener la capacidad de sintetizar el polímero, tampoco posee la maquinaria enzimática necesaria para degradarlo, puede crecer a altas velocidades y a temperaturas óptimas mayores que los productores naturales y es fácil de lisar. Además, es el microorganismo más conocido, su genoma se encuentra totalmente secuenciado, y tanto su fisiología y como comportamiento han sido estudiados con mucho detalle, por lo cual presenta una mayor facilidad para realizar manipulaciones genéticas con el fin de aumentar los rendimientos del polímero. Sin embargo, se ha reportado que la síntesis del polímero afecta el metabolismo y la fisiología de cepas de *E. coli* recombinantes productoras de PHB. Han y colaboradores estudiaron el efecto causado por la producción del polímero en una cepa de *E. coli* que expresa los genes *pha* de *C. necator* (Han et al., 2001) mediante ensayos de proteómica, a fin de identificar proteínas cuya concentración difería bajo condiciones de acumulación de PHB. Los autores observaron que la concentración de proteínas solubles totales fue un 30% menor en la cepa que acumula PHB. En particular, se observó una disminución en la concentración del factor de elongación EF-Tu, y un aumento en la proteína Dps, proteína que protege al DNA durante hambreado, regulada por σ^S. La síntesis de PHB compite con otros 3 caminos metabólicos en la célula por la disponibilidad de acetil-CoA (Lee et al., 1994b; Lee y Chang, 1995). Estos caminos son el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la vía de formación de acetato y la síntesis de ácidos grasos. Además, varios aminoácidos son sintetizados a partir de intermediarios metabólicos del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. Una disminución en la síntesis de aminoácidos podría

provocar una disminución en la síntesis de proteínas, lo que explicaría la reducción en la cantidad del factor de elongación Ef-Tu. También se observó un aumento en la concentración de YfiD, una piruvato formato liasa alternativa, la cual se expresa en respuesta a estrés ácido (Blankenhorn et al., 1999). Al entrar en fase estacionaria, *E. coli* acidifica el medio de cultivo, debido a la producción de metabolitos ácidos. Se ha observado que células de *E. coli* productoras de PHB presentaban también cambios a nivel morfológico, ya que mucha de ellas presentaban filamentación y eran más frágiles debido a cambios en la estructura de la pared celular (Lee, 1994). Esto podría ser una razón por la que *E. coli* no pueda mantener la homeostasis celular, haciendo que el citoplasma también se acidifique, lo que explicaría el incremento en la concentración de YfiD. Por otro lado, al analizar la concentración de Hsp, se observó un aumento en la concentración de DnaK y GroELS bajo condiciones de acumulación de PHB. En conjunto, los resultados obtenidos en el trabajo de Han y colaboradores (Han et al., 2001) sugieren que la producción de PHB en *E. coli* generaría un estrés en las células y proponen que dicho estrés se intensificaría en ausencia de phasinas, dado que la ausencia de proteínas que participan en la formación de gránulos del polímero y los recubren eficientemente, podría tener como consecuencia el contacto directo del PHB con otros componentes celulares, como DNA, RNA y proteínas, lo que podría generar desnaturalización proteica en la superficie de los gránulos.

Este estrés producido por la síntesis de PHB puede compararse a la respuesta observada durante la producción de proteínas heterólogas en *E. coli* que también genera un aumento de la transcripción (Jürgen et al. 2000) y concentración (Hoffmann & Rinas 2004) de chaperonas tales como GroEL, GroES, DnaK, IbpA e IbpB.

5.2. Efectos de la phasina PhaP de *Azotobacter* sp. FA8 en *E. coli* recombinante

5.2.1. Efecto de $PhaP_{Az}$ sobre la producción de poli(3-hidroxibutirato)

En nuestro laboratorio se realizaron estudios para analizar el estrés generado por la síntesis de PHB en *E. coli* e investigar la posibilidad de que $PhaP_{Az}$ pudiera

aliviar dicho estrés. Estos estudios revelaron que las cepas de *E. coli* productoras de PHB que sobreexpresaban $PhaP_{Az}$, crecían más y acumulaban mayor cantidad de polímero que la cepa control que no expresaba $PhaP_{Az}$ (de Almeida et al. 2007) (Figura 10). Estos resultados sugieren que, como se observó en otras bacterias productoras de PHB, $PhaP_{Az}$ ejerce un efecto promotor del crecimiento en cepas de *E. coli* recombinante productoras del polímero.

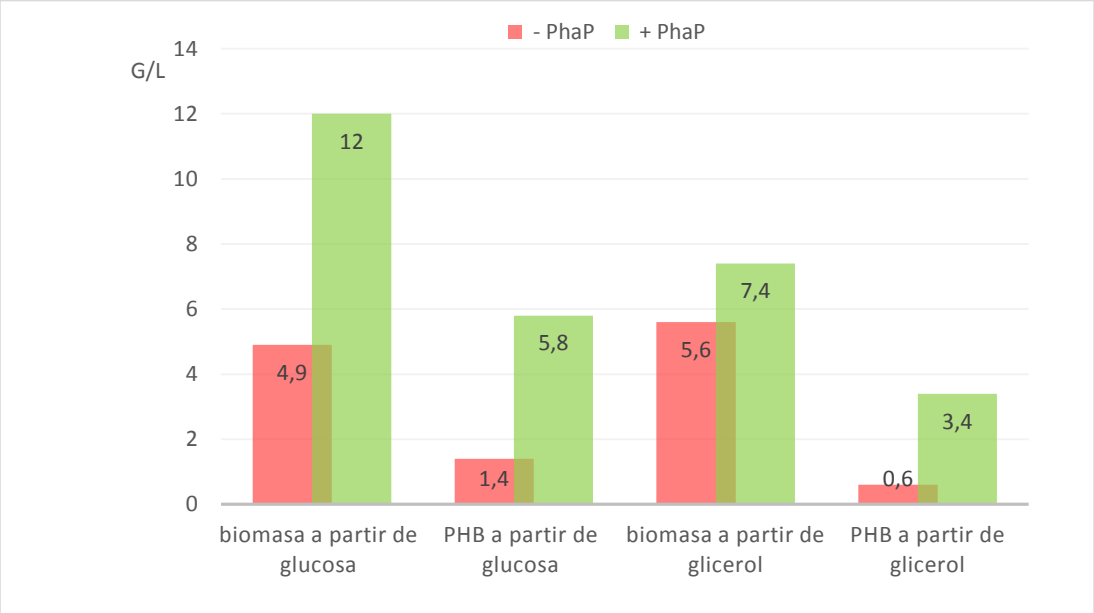


Figura 10: Efecto de la expresión de $PhaP_{Az}$ sobre la biomasa y la producción de PHB en *E. coli* recombinante.

Al analizar la expresión de chaperonas y proteínas asociadas al estrés térmico, mediante PCR cuantitativa, se observó un aumento en la expresión de estas proteínas en la cepa que acumula el polímero, lo que indica que la acumulación del polímero genera un estrés en la células, coincidiendo con lo descripto por Han y colaboradores (Han et al. 2001). Este efecto no se observó en las cepas que producen $PhaP_{Az}$, en las cuales los niveles de expresión de proteínas de choque térmico eran incluso más bajos que en las cepas control sin PHB, indicando claramente que la presencia de $PhaP_{Az}$ disminuye el estrés producido por la presencia de PHB (Figura 11) (de Almeida et al. 2011).

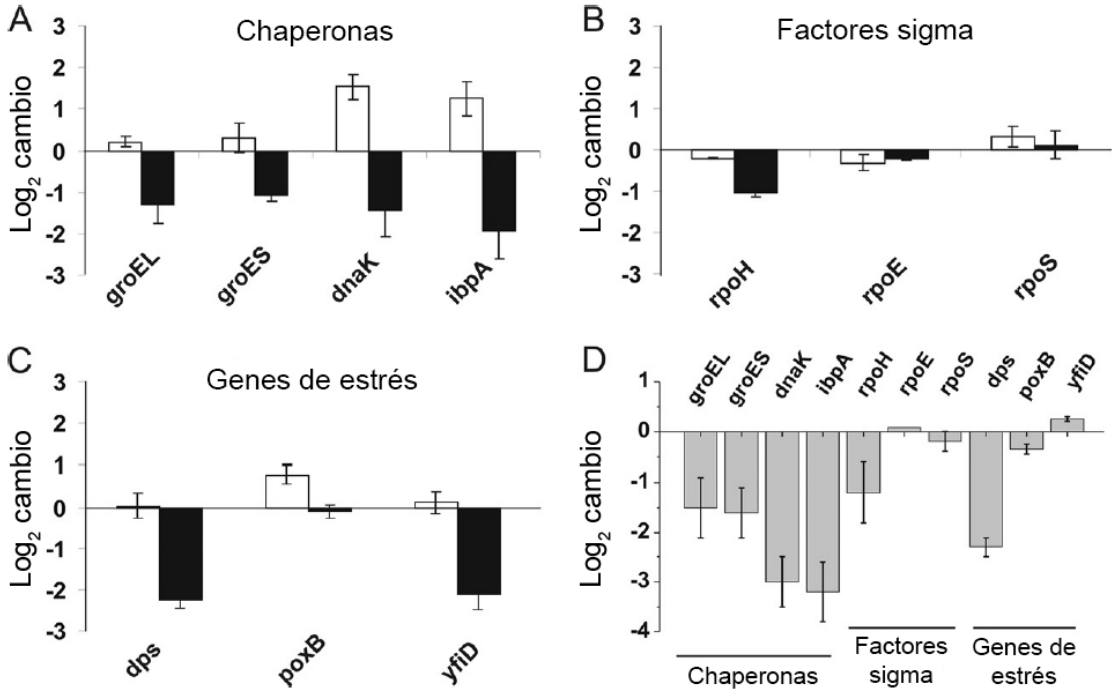


Figura 11: Efectos de PHB y $PhaP_{Az}$ en la expresión de genes involucrados en la respuesta a estrés por qRT-PCR. La expresión de chaperonas (A), factores sigma (B), y genes relacionados a estrés (C) en cepas K24K1 (productoras de PHB; barras blancas) y K24KP (productora de PHB y $PhaP_{Az}$, barras negras) fue comparada con la expresión en la cepa control KQ1. (D) La expresión de todos los genes seleccionados en K24KP fue comparada con la expresión en K24K1. Tomado de de Almeida et. al. 2011.

En base a estos resultados surgió la hipótesis de que la producción de PHB induce una respuesta del sistema de respuesta al choque térmico debido a una disminución de chaperonas citoplasmáticas disponibles por captura de las mismas sobre la superficie de los gránulos de PHB. (de Almeida et al. 2011). Esta hipótesis es apoyada por un trabajo de Han en el cual se estudiaron las proteínas asociadas a gránulos de PHB en cepas de *E. coli* conteniendo los genes *pha* de *R. eutropha,* en ausencia de *phaP*. En dicho trabajo, se encontró que las Hsp IbpA e IbpB eran las principales proteínas asociadas a los gránulos y se localizaban en la superficie de los mismos. Además, al analizar el proteoma de los gránulos en una cepa mutante en IbpA/B, observaron una mayor cantidad de proteínas unidas a los gránulos sobre el total de proteínas solubles. Entre las proteínas que encontraron unidas al polímero se detectó a GroEL. Los gránulos de la cepa mutante presentaban una morfología distinta a los de la cepa salvaje, con una forma más distorsionada y un borde irregular (Han et al. 2006). Por otro lado, Tessmer y colaboradores observaron que en ausencia de PhaP, la proteína mayoritaria en los gránulos era IbpA, mientras que

en presencia de $PhaP_{Az}$, no se encontró a IbpA unida a los gránulos, y en su lugar se encontraba unida la phasina. Los autores sugireron que IbpA estaría actuando como una phasina, evitando la fusión de los gránulos entre sí, y la unión de proteínas citosólicas de manera inespecífica (Tessmer et al. 2007). La presencia de Hsp en la superficie de los gránulos también fue descripta para mutantes del productor natural *R. eutropha* que no producen PhaP (Pötter et al. 2004).

En base a los resultados obtenidos en nuestro laboratorio y los resultados de otros investigadores, hemos propuesto que el efecto protector de $PhaP_{Az}$ en las células productoras de PHB se debe a que evita la titulación de las chaperonas en la superficie de los gránulos de PHB, y por lo tanto la inducción de la respuesta al choque térmico (Figura 12).

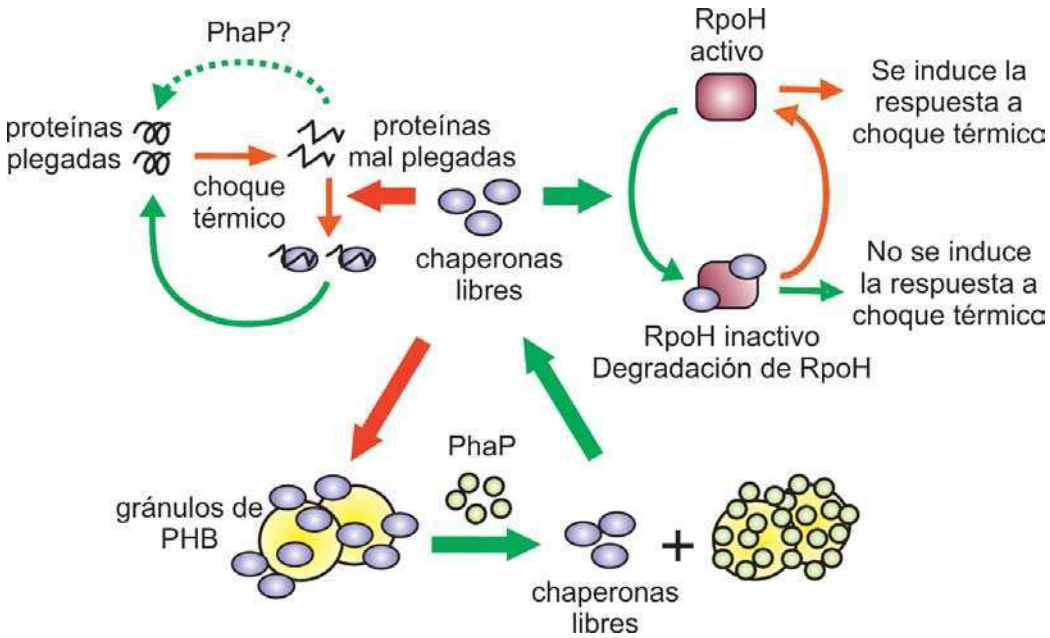


Figura 12: Modelo hipotético del efecto de $PhaP_{Az}$ en células que producen PHB

5.2.2. Efecto de $PhaP_{Az}$ en cepas no productoras de PHB

A partir de los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, que revelan que la presencia de $PhaP_{Az}$ en cepas productoras de PHB reduce la expresión de genes relacionados a estrés a niveles aún menores que los observados en una cepa control (ver Figura 11), se decidió analizar el efecto de $PhaP_{Az}$ en cepas no productoras de PHB, observándose que la expresión de esta proteína heteróloga tiene un

inesperado efecto protector en *E. coli* tanto en condiciones normales como de estrés, lo que resulta en un mayor crecimiento y mayor resistencia, tanto a estrés térmico (Figura 13) como a estrés oxidativo por paraquat.

En particular, se observó que la expresión de *phaP*$_{Az}$ en *E. coli* recombinate aumentó la viabilidad celular y redujo los niveles de expresión de *ibpA*, luego del choque térmico.

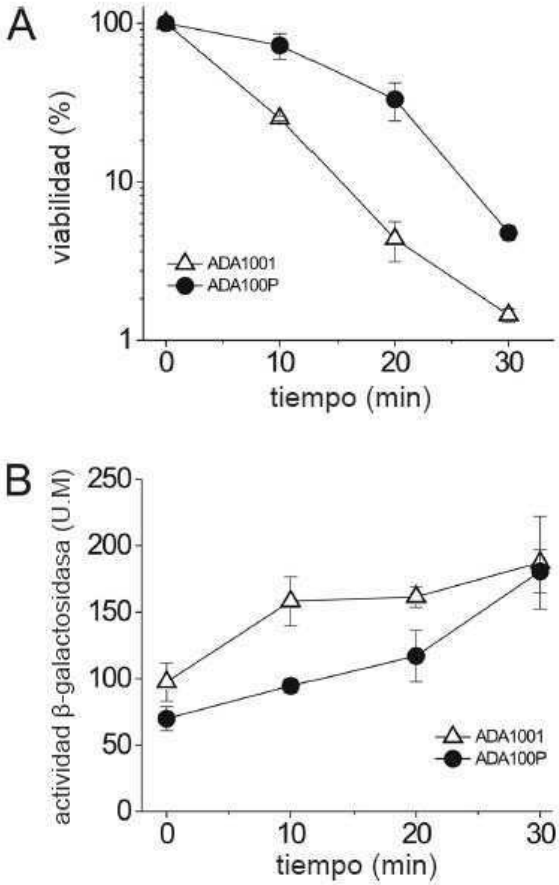


Figura 13: Resistencia a estrés térmico y expresión de IbpA en cepas de *E. coli* en ausencia y presencia de PhaP$_{Az}$. (Δ) ADA100: cepa control que no produce PhaP$_{Az}$, (•) ADA100P: cepa que sobreexpresa PhaP$_{Az}$. A) Viabilidad luego de tratamiento de estrés térmico a 52ºC a distintos tiempos. B) Expresión de *ibpA* Tomado de de Almeida 2011.

El efecto protector de PhaP$_{Az}$ es similar al observado en *E. coli* que sobreexpresa IbpA e IbpB (Kitagawa et al. 2000), lo que sugiere una superposición en la función entre PhaP$_{Az}$ y IbpA . Esto se vió reforzado por nuestra observación de que la expresión de IbpA se redujo en cepas que expresan PhaP$_{Az}$, tanto durante el crecimiento normal a 37°C, como en respuesta al choque térmico (Figura 13).

Dado que las proteínas de choque térmico son reguladas por RpoH, se analizó el efecto de PhaP$_{Az}$ sobre la concentración de este regulador. Mediante experimentos de Western Blot se observó que PhaP$_{Az}$ reduce los niveles de RpoH durante el

choque térmico, probablemente mediante la reducción de los niveles de proteínas mal plegadas (de Almeida et al. 2011) (Figura 14).

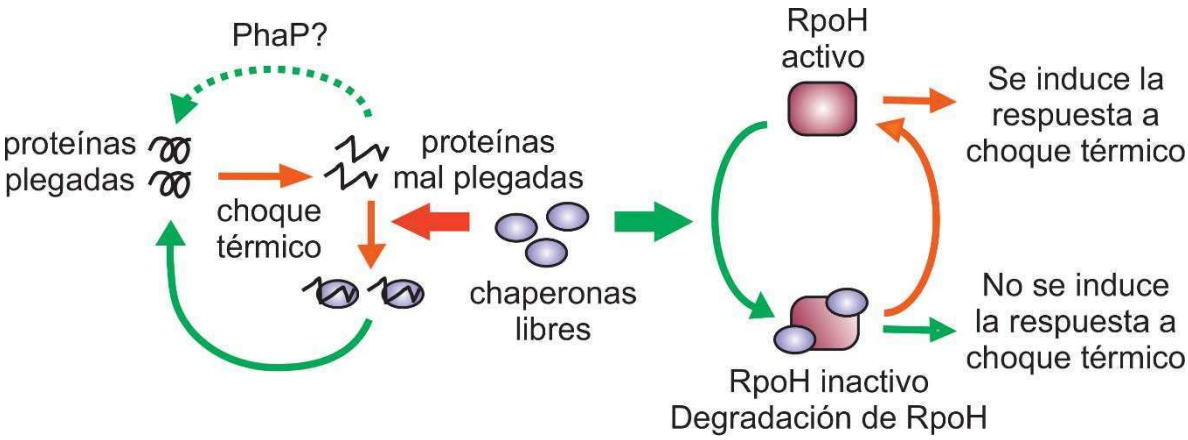


Figura 14: Modelo hipotético del efecto de $PhaP_{Az}$ en *E. coli* no productora de PHB.

Teniendo en cuenta: *i)* la disminución de la transcripción de proteínas de choque térmico observado en cepas que expresan $PhaP_{Az}$, *ii)* la reducción de los niveles de expresión de *rpoH* durante la producción de PHB y *iii)* los niveles de proteína RpoH durante el estrés térmico, surge la hipótesis de que $PhaP_{Az}$ podría afectar el plegado de proteínas, actuando como chaperona.

Objetivos

Objetivo general

Dilucidar el mecanismo por el cual $PhaP_{Az}$ ejerce su acción protectora en *Escherichia coli* recombinante mediante el análisis de la estructura de la proteína, su caracterización físico-química y el estudio del efecto de la misma sobre la agregación y el plegado de proteínas tanto *in vitro* como *in vivo.*

Objetivos específicos

1) Realizar un análisis estructural de $PhaP_{Az}$:

i. Construir una cepa de *E. coli* que sobreexprese $PhaP_{Az}$ fusionada a un *tag* de histidina.
ii. Purificar la proteína con el objetivo de realizar estudios estructurales de la misma.
iii. Realizar un análisis *in silico* para predecir la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de la misma.
iv. Determinar experimentalmente la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de la proteína.
v. Estudiar las principales características fisicoquímicas de $PhaP_{Az}$.
vi. Realizar una comparación estructural de $PhaP_{Az}$ con el resto de las phasinas con estructura descripta.
vii. Analizar la relación entre la estructura y la función de la proteína

2) Dilucidar el mecanismo por el cual $PhaP_{Az}$ ejerce un efecto protector en *E. coli* recombinante.

A. Analizar la localización subcelular de $PhaP_{Az}$:

i. En cepas de *E. coli* recombinantes productoras de PHB
ii. En cepas de *E. coli* no productoras de PHB

B. Estudiar los efectos de $PhaP_{Az}$ en la agregación y en el plegado de proteínas *in vitro e in vivo*:

i. Determinar si $PhaP_{Az}$ evita la formación de agregados proteicos *in vitro*.

ii. Estudiar si $PhaP_{Az}$ interviene en el replegado de proteínas desnaturalizadas por métodos químicos.

iii. Analizar el rol de $PhaP_{Az}$ en la dinámica de formación y disolución de cuerpos de inclusión y en el plegado de proteínas *in vivo*.

Materiales y Métodos

1. Microorganismos y plásmidos utilizados

Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas se detallan en la Tabla 2, junto con los plásmidos utilizados en este trabajo. Las cepas fueron mantenidas a 4°C en placas de medio LB a través de re-siembras periódicas, con el agregado de antibióticos según el requerimiento de cada cepa. Para mantenimiento a largo plazo, se adicionó glicerol a cultivos de 18 h en medio LB hasta una concentración de 20% (v/v), y los glicerolados se guardaron a –70°C.

Tabla 2: Cepas de *E. coli* y plásmidos utilizados en este trabajo.

	Características reelevantes	Fuente o Referencia
Cepas		
BL21 (DE3)	F^- *ompT gal dcm lon* $hsdS_B(r_B^- m_B^-)$ λ(DE3 [*lacI lacUV5-T7 gen 1 ind1 sam7 nin5*])	Novagen
M15/pREP4	NaI^s, Str^s , Rif^s , Thi^- ,Lac^-, Ara^+, Gal^+, Mtl^-, F^-, $RecA^-$, Uvr^+, Lon^+, conteniendo el plásmido pREP4 con el gen *lacI*	Qiagen
PHB-L21	BL21, conteniendo los genes *phaBAC* de *Ralstonia eutropha* bajo el control del promotor Ptrc, integrado en el cromosoma usando el minitransposón pMAB26 (Pais et al. 2014)	Colección de la Dra. Ma. Auxiliadora Prieto (Centro de Investigaciones Biológicas CIB/CSIC, Madrid, España)

Plásmidos		
pQP2	pQE31 conteniendo *phaP* de *Azotobacter* sp. FA8	Este trabajo
pACP	pACYC-Duet1 conteniendo *phaP* de *Azotobacter* sp. FA8	Este trabajo
pACP-GFP	pACYC-Duet1 conteniendo una fusion de $phaP_{Az}$-*gfp* en el extremo C-terminal	Este trabajo
pPD	pET-29 conteniendo el gen *pd,* que codifica para un dominio insoluble de la proteína TolR de *Azoarcus* sp. CIB (Accesion number: DQ988527.1 desde 781 hasta 1149)	Colección del Dr. Eduardo Díaz (Centro de Investigaciones Biológicas CIB/CSIC, Madrid, España)
pGroELS	pET-29, conteniendo los genes *groels* de *E. coli*	(Yasukawa et al. 1995)

2. Medios de cultivo

Para la manutención rutinaria de las cepas se utilizó medio LB caldo o agar. Para los ensayos de acumulación de PHB se utilizó el medio LB suplementado con 10 g/L de glucosa. Para ensayos de sobreexpresión se utilizó isopropil β-D-tiogalactopiranósido (IPTG) en una concentración de 0.1 o 1 mM según corresponda.

Lysogeny broth (LB) (por litro):

Triptona ..... 10 g
NaCl .....10 g
Extracto de levadura.....5 g
En caso de ser necesario, se agregaron 20 g de agar.

Los antibióticos utilizados y sus concentraciones finales fueron: ampicilina (Ap), 100 µg ml^{-1}; kanamicina (Km), 50 µg ml^{-1}, y cloranfenicol (Cm) 20 µg ml^{-1}.

3. Técnicas de biología molecular

3.1. Construcción de los plásmidos pQP2 y pACP

Condiciones de la reacción de PCR para amplificar $phaP_{Az}$:

Desnaturalización inicial:	95°C	5 min.
34 ciclos:		
Desnaturalización:	94°C	45 seg.
Hibridación:	53°C	30 seg.
Extensión:	72°C	1 min.
Extensión final:	72°C	10 min.

Como templado se utilizó el plásmido pRX23 (ver Tabla 2).

Los primers utilizados para la construcción de pQP2 y pACP fueron los siguientes:

Tabla 3: Lista de primers utilizados

Primer	Secuencia	Tm	Características
$PhaP_{Az}$ F BamHI	5' CATGGGATCCCGTAATGGCTTTTTTTGATC 3'	60.3	*Primer forward* con sitio de corte BamHI:
$PhaP_{Az}$ R HindIII	5' TCGAAGCTTGCCGTCAGGCAGTCTT 3'	67.8	*Primer reverse* con sitio de corte HindIII
$PhaP_{Az}$ R XhoI	5' TATCTCGAGGCCGTCAGGCAGTCTT 3'	61	*Primer reverse* con sitio de corte XhoI

3.2. Construcción del plásmido pACP-GFP que produce la proteína de fusión $PhaP_{Az}$-GFP

La fusión *phaP*$_{Az}$*-gfp* fue construída sintéticamente. El diseño analítico de esta construcción incluyó el agregado de sitios de restricción NdeI y XhoI en los extremos para poder ser clonada direccionalmente en el vector pACYCDuet-1. Además, se agregaron sitios de restricción EcoRI, EcoRV y XbaI entre *phaP*$_{Az}$ y *gfp,* de manera de agregar un pequeño péptido que aporte cierta separación entre ambas proteínas de manera de favorecer el correcto plegado de las mismas. Por último, se modificó una base de la secuencia de *gfp* de manera de eliminar un sitio de corte NdeI sin modificar la secuencia aminoacídica de la proteína.

La secuencia de la construcción de 1313 pb se muestra a continuación:

CATATGGCTTTTTTTGATCTGGAAAAAATGGAAAGTGCTTCTAAATCCAACCTGGAT
GCCGTGCAGCAACTGAACAGCAAGATCTTCGAGAGCGCCGAAGAGCTCTACAAG
CTGCAGTTCAAGACCTTGCGGGCTGCGGCTGATGACAATTTCGAGAGTCTGCGCA
AGCTGCTGTCGGTACGCGATCCCCAGGCTTTCCTGGAGTTGCAGGCCTCCTTCTT
CAAGCCCAACGAGCAGGCCGAGCGTCTTGTGGAGTTCAGCCGCCAGACCTACGA
CCTCATTTCCCGCTTCCAAGCAGAGGTCACCAAGCTGACTGAGCGCCAGATTGAG
ATCGGTACCCAGCAGGCGCAGGAAATCGTCGAGGAGATCTGCAAGAACGCCCCG
GCCAGTGCCGAACCGGTCGTATCTGTATTCAAGTCTGCTGTCGAAGGGGCGGGC
AACGTCTACGAGAGCGCACAGAAGGCAGCCAAGCAGGCGTCCGAAATCACTGCA
AGTGGCATTGAGGCGGCTGCCAACGCTGCAGGTCAGGCCGCTGCCCAAGCAGCC
TCGGGCAAGAAGACTGCCGCA**GATATCGAATTCTCTAGA**AGTAAAGGAGAAGAAC
TTTTCACTGGAGTTGTCCCAATTCTTGTTGAATTAGATGGCGATGTTAATGGGCAA
AAATTCTCTGTCAGTGGAGAGGGTGAAGGTGATGCAACATACGGAAAACTTACCC
TTAAATTTATTTGCACTACTGGGAAGCTACCTGTTCCATGGCCAACACTTGTCACTA
CTTTCGCGTATGGTCTTCAATGCTTTGCGAGATACCCAGATCACATGAAACAGCAT
GACTTTTTCAAGAGTGCCATGCCCGAAGGTTATGTACAGGAAAGAACTATATTTTA
CAAAGATGACGGGAACTACAAGACACGTGCTGAAGTCAAGTTTGAAGGTGATACC
CTTGTTAATAGAATCGAGTTAAAAGGTATTGATTTTAAAGAAGATGGAAACATTCTT
GGACACAAAATGGAATACAACTATAACTCACATAATGTATACATCATGGCAGACAA
ACCAAAGAATGGAATCAAAGTTAACTTCAAAATTAGACACAACATTAAAGATGGAA
GCGTTCAATTAGCAGACCATTATCAACAAAATACTCCAATTGGCGATGGCCCTGTC
CTTTTACCAGACAACCATTACCTGTCCACACAATCTGCCCTTTCCAAAGATCCCAA
CGAAAAGAGAGATCACATGATCCTTCTTGAGTTTGTAACAGCTGCTGGGATTACAC
ATGGCATGGATGAACTATACAAA**TAA**GCGGCCGCCTCGAG

CATATG	**Sitio de corte NdeI**
phaP	**Gen que codifica para la phasina $PhaP_{Az}$**
GATATC	**EcoRV**
GAATTC	**EcoRI**
TCTAGA	**XbaI**
gfp	**Gen que codifica para la proteína verde fluorescente**
CAC	**Cambio de T a C para eliminar sitio NdeI**
GCGGCCGC	**NotI**
CTCGAG	**XhoI**

3.3. Aislamiento de DNA plasmídico

El aislamiento de DNA plasmídico a partir de cepas de *E. coli* se realizó utilizando *kits* comerciales de purificación. Cuando los aislamientos de plásmidos se realizaron con el fin de verificar construcciones se utilizó el siguiente protocolo: Se resuspendió el *pellet* (de 3 ml de cultivo en LB) en 0.2 ml de *Buffer* 1. Se agregaron 0.2 ml de *Buffer* 2. Se mezcló por inversión de 4 a 5 veces y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min. Se agregaron 0.2 ml de *Buffer* 3 frío, y luego de mezclar por inversión, se incubó en hielo durante 5 min. Se centrifugó a 13000 rpm en microcentrífuga durante 10 min a 4 °Cy el sobrenadante se pasó a un tubo limpio. Para precipitar, se adicionaron 0.9 ml de etanol absoluto. Se volvió a centrifugar durante 20 min y luego se realizó un lavado con etanol 70%. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar, para luego resuspenderlo en 0.4 ml de agua deionizada.

***Buffer* 1 :** Tris· Cl 25 mM, pH 8.0 ; EDTA 10 mM ; RNasa A 100 µg/ml

***Buffer* 2 :** NaOH 200 mM ; SDS 1%

***Buffer* 3**: Acetato de potasio 3 M pH 5.5

3.4. Digestión con enzimas de restricción

La digestión con enzimas de restricción (marca New England Biolabs o Promega) se realizó de acuerdo al protocolo de Sambrook (Sambrook *et al.*, 1988) siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

3.5. Reacciones de ligado

Se utilizó la enzima T4 DNA ligasa de New England Biolabs. La relación de extremos moleculares (DNA inserto/DNA vector) fue de 3:1. La reacción se llevó a cabo de 16 a 18 h a 16°C.

3.6. Electroforesis en geles de agarosa

La concentración de los geles de agarosa varió entre 0.7% y 1%, según el tamaño del fragmento a analizar. Las electroforesis se realizaron utilizando *buffer* TAE a 100 volts en cubas de Sigma (Sigma Chemical Company, St. Luis, USA). Se utilizaron los marcadores de peso molecular 1 kb y 100 pb de Promega, según el tamaño del fragmento a analizar.

Los geles se tiñeron con solución de bromuro de etidio (0.5 $\mu g \cdot ml^{-1}$) durante 15 min. El DNA se visualizó con un transiluminador de luz UV y los geles se fotografiaron con una cámara digital Kodak Digital Science CD120.

TAE 50X (por litro)

Tris base .....242 g

Acido acético glacial.....57.1ml

EDTA 0.5 M pH 8,0 .....100 ml

Buffer de siembra 6X (por 100 ml)

Azul de bromofenol.....0.25 g

Sacarosa.....40 g

3.7. Purificación y cuantificación de DNA

Se utilizaron los *kits* comerciales de Epoch para la purificación de fragmentos de DNA tratados con enzimas de restricción en mezcla de reacciones o de pequeños trozos de geles de agarosa.

El DNA se cuantificó utilizando geles de agarosa con el 1D Image Analysis Software (Kodak Digital Science) y utilizando como patrón 100 ng de λ*Hin*dIII o utilizando un espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific) con su correspondiente *software*.

3.8. Preparación de células competentes

Para la obtención de células competentes de las diferentes cepas de *E. coli* requeridas se inocularon 10 ml de LB con dos o tres colonias aisladas de un cultivo de 24 horas realizado en medio sólido y se incubaron overnight a 30-37°C y 200 rpm. Este cultivo se utilizó para inocular 50 ml de SOB-glicerol 30 g/l, en un erlenmeyer de 500 ml, partiendo de una DO_{600nm} inicial de 0,05. Se incubó a 30°C y 200 rpm alrededor de 3 horas o hasta alcanzar una DO de 0,5. Luego se procedió a incubar durante 10 min a 4°C y se obtuvo el pellet celular mediante centrifugación (10 min a 4000 rpm a 4°C). Los pasos posteriores varían según si se prepararon células competentes por tratamiento químico (quimiocompetentes) o electrocompetentes.

i) **Quimiocompetentes:** El pellet se resuspendió en 8 ml de una solución de $CaCl_2$ 0,1 M, se incubó 1 hora a 4°C y se centrifugó por 10 min a 4°C a 4000 rpm. Se resuspendió el pellet suavemente en $CaCl_2$ 0,1 M y glicerol 10 % m/v.

ii) **Electrocompetentes:** El pellet se lavó tres veces con 25 ml de glicerol 10% m/v en agua destilada y se resuspendieron en 1 ml de la misma solución de lavado.

En cualquiera de los casos las células se separaron en alícuotas de 50 µl. Las mismas se conservaron a -70°C hasta su utilización.

3.9. Transformación de células competentes

i) **Quimiocompetentes:** Para realizar ensayos de transformación en células quimiocompetentes se agregaron 5-10 µl de DNA (10-50 ng), a 50 µl de células competentes, se incubaron 30 min en hielo, luego se aplicó un golpe térmico a 42°C durante 90 segundos y nuevamente se incubó en hielo por 10 min. Para la recuperación de las células competentes se agregaron 300 µl de SOC y se incubó 1 hora a 37°C con agitación constante (150 rpm). Al terminar el período de recuperación, las células se

centrifugaron 5 min a 5000 rpm y el *pellet* se sembró en placas con medio de selección según correspondiese.

ii) **Electrocompetentes:** 2 μl de DNA se agregaron a 50 μl o 100 μl de células electrocompetentes. La electroporación se efectuó en un electroporador BioRad Micro Pulser™ en cubas de 0,2 cm, en el programa 2 que ofrece el equipo. Para la recuperación de las células competentes se agregó 1 ml de SOC y se incubó 1 hora a 37°C con agitación constante (150 rpm). Al terminar el período de recuperación se centrifugaron las células 5 min a 5000 rpm y se sembró el *pellet* celular en placas con medio de selección según correspondiese.

4. Técnicas para el estudio y manipulación de proteínas

4.1. Determinación de la concentración de proteínas

La concetración de proteínas totales en un extracto se estimó mediante el método de Bradford (Bradford, 1976), empleando albúmina cristalina de suero bovino como estándar.

La concentración de $PhaP_{Az}$ fue determinada espectrofotométricamente. El coeficiente de extensión molar a 280 nm fue calculado usando la herramienta bioinformática Expasy ProtParam (http://web.expasy.org/protparam/).

4.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE)

La electroforesis se realizó a temperatura ambiente en una unidad de electroforesis vertical (10 x 10 cm x 1mm) de acuerdo al protocolo de Laemmli (Laemmli, 1970), utilizando un gel de corrida al 12% y un gel concentrador al 5%. Las electroforesis se llevaron a cabo a amperaje constante de 25 miliamperes hasta que las muestras atravesaran el gel concentrador, para luego aumentarse a 40 miliamperes.

Los geles se tiñeron en una solución de 0.2% de Coomasie Brilliant Blue R-250 en 45% de metanol y 10% de ácido acético durante una hora. Para decolorar, se dejaron durante toda la noche en una solución de 45% de metanol y 10% de ácido acético.

Solución de acrilamida 30% (para 500 ml)

Acrilamida .....146 g

N, N´-Metilen-bisacrilamida.....4 g

***Buffer* gel separador** (4X, para 500 ml)

Tris base……...90.83 g

SDS.....…2 g

Se lleva a pH 8,8 con HCl

***Buffer* gel concentrador** (4X, para 500 ml)

Tris base……30.23 g

SDS.....….2 g

Se lleva a pH 6,8 con HCl

Gel separador (10%) (para 25 ml)

Buffer gel separador 4X .....6.25 ml

Solución de acrilamida: bisacrilamida.....8.35 ml

Persulfato de amonio 10%.....0.130 ml

TEMED..... 0.014 ml

Agua deionizada……..10.5 ml

Gel concentrador (5%) (para 10 ml)

Buffer gel concentrador 4X .....2.5 ml

Solución de acrilamida: bisacrilamida.....1.7 ml

Persulfato de amonio 10%.....0.04 ml

TEMED .....0.02 ml

Agua deionizada .....5.8 ml

***Buffer* de corrida** (por litro)

Tris base .....3 g

Glicina.....14.4 g

SDS.....1 g

***Buffer* de siembra** (4X, para 10 ml)

Tris 0.25M, pH 6.8 .....5 ml

SDS.....0.6 g

Sacarosa.....4 g

Azul de bromofenol.....0.004 g

2-mercaptoetanol .....2 ml

4.3. Purificación de la proteína PhaP de Azotobacter *sp. FA8*

$PhaP_{Az}$ fue producida en la cepa M15/pREP4 y purificada por cromatografía de afinidad a metales, utilizando una columna de níquel (5 mL His Trap HP column GE Healthcare), seguida de una cromatografía de exclusión por tamaño usando una columna Superdex 75 preparativa (GE Healthcare).

4.3.1. Condiciones de cultivo para la producción de $PhaP_{Az}$ fusionada a un *tag* de histidinas en *E. coli*

La cepa *E. coli* M15 con los plásmidos pREP4 y el plásmido de expresión pQP2 se cultivó durante toda la noche en 15 ml de medio LB caldo suplementado con Ampicilina y Kanamicina. Una fracción de este cultivo se utilizó para inocular 50 ml del mismo medio precalentado a 37°C a una DO inicial de 0.1. El cultivo se incubó a 37°C (aproximadamente 1 h) hasta una DO= 0.5 y se le agregó IPTG a una concentración final de 1mM para inducir la expresión de la proteína. El cultivo se incubó durante 4 horas más, luego de las cuales las células se centrifugaron a 8000 rpm durante 10 min y el *pellet* se lavó con *buffer* fosfato 20 mM, pH 7.3. El *pellet* se guardó a -20°C hasta el día siguiente.

4.3.2. Determinación de la solubilidad de la proteína

Se tomaron alícuotas de 1 ml antes de la inducción (control no inducido), 2 horas post inducción y 4 horas post inducción. Se centrifugó para bajar las células y los *pellets* fueron resuspendidos en 50 µl de buffer de siembra 1x de SDS-PAGE y guardados a -20 °C hasta la corrida del SDS-PAGE. A partir de estas muestras se analizó la presencia de proteína en los extractos celulares totales.

A las 4 horas post inducción se centrifugaron las células, se resuspendieron en 5 ml de buffer de lisis y se sonicaron durante 6 ciclos de 10 minutos con pausas en hielo. El lisado se centrifugó a 10.000 g durante 25 minutos a 4 °C. El sobrenadante, o fracción soluble, se guardó en hielo, mientras que el pellet o fracción insoluble se resuspendió en 5 ml de buffer de lisis.

Las muestras se corrieron en un SDS-PAGE y se analizó la presencia de la proteína en la fracción soluble, fracción insoluble y en el extracto celular total.

Buffer de lisis:

Fosfato de sodio……20 mM

NaCl……..0.5 M

Imidazole…….. ……40 mM

PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo)…… 1mM

pH 7.3

4.3.3. Primer paso de purificación: Cromatografía de afinidad a metales

La columna de níquel de 5 ml se equilibró con 5 volúmenes de agua destilada, seguidos de 5 volúmenes de buffer de unión. Luego, se sembraron los 5 ml de la fracción soluble, se lavó con 15 volúmenes de buffer de unión y finalmente se eluyó con 10 volúmenes de buffer de elución. Las fracciones se corrieron en un SDS-PAGE y todas las que mostraron presencia de $PhaP_{Az}$ y baja concentración de proteínas contaminantes se juntaron y dializaron toda la noche utilizando una membrana de diálisis de celulosa (Sigma Aldrich) en 100 volúmenes de buffer de Superdex para eliminar el imidazol y sales provenientes del primer proceso de purificación.

Buffer de unión: pH 7.3

Fosfato de sodio……..20 mM

NaCl……...50 M

Imidazole…….. 40 mM

Buffer de elución: pH 7.3

Fosfato de sodio……..20 mM

NaCl……...50 mM

Imidazol…….. 500 mM

Buffer de Superdex:

Fosfato de sodio……..20 mM

NaCl……..150 mM

Imidazole…….. 500 mM

pH 7.3

4.3.4. Segundo paso de purificación: Cromatografía de Exclusión por Tamaño (SEC)

Luego de la diálisis, la proteína se purificó utilizando un sistema de purificación ÄKTA equipado con una columna Superdex 75 preparativa (GE Healthcare) y un detector UV. Previo a la siembra de la muestra, la columna se equilibró con 1 volumen de columna (125 ml) de agua, seguido de 2 volúmenes de buffer de Superdex, luego se sembraron los 5 ml de muestra obtenidos luego de la diálisis. Durante la corrida, se utilizó una velocidad de flujo de 1ml/min y se colectaron fracciones de 1 ml utilizando un colector automático.

Luego del último paso de purificación, la proteína se concentró utilizando un concentrador para centrífuga Vivaspin 2 de 10 kDa MWCO (Viva Products).

4.4. Técnica de Western Blot

4.4.1. Transferencia de proteínas a membranas de PVDF

Una vez corrido el gel, el mismo se sumergió en *buffer* de transferencia durante 30 min. La membrana de PVDF se recortó de acuerdo al tamaño del gel (7 x 5.5 cm) y se sumergió primero en agua metanol durante unos segundos y luego en *buffer* de transferencia durante 20 minutos. A continuación se armó el sándwich de transferencia: 3 papeles Whatman embebidos en *buffer* de transferencia, membrana, gel, 3 papeles Whatman embebidos en *buffer* de transferencia. El

sándwich se colocó en un aparato de transferencia, semiseco (TE70, ECL Semi-Dry Transfer Unit, Amersham Biosciences) y se corrió a 80 miliamperes durante 40 min.

Una vez finalizada la transferencia, la membrana se lavó con agua destilada y se tiñó con una solución de 0.5% Rojo Punceau S en 1% de ácido acético durante 10 minutos para visualizar las proteínas totales transferidas a la membrana. Al mismo tiempo, el gel se tiñó con solución de Coomasie Brilliant Blue R-250 para verificar la transferencia de las proteínas del gel.

Buffer de transferencia (por litro)

Tris base……..5.8 g

Glicina.....2.88 g

SDS.....0.37 g

Metanol……..200 ml

4.4.2. Revelado utilizando el antisuero anti-PhaP$_{Az}$

Luego de la tinción con Rojo Punceau S, se lavó la membrana varias veces con agua deionizada para eliminar el colorante. Para realizar el bloqueo, la membrana se incubó durante toda la noche en TBS Tween 0.5% con 5% de leche descremada en la heladera. Al día siguiente la membrana se lavó dos veces con TBS y a continuación se incubó con agitación a temperatura ambiente durante 1 hora con una dilución 1/2500 del antisuero anti-PhaP$_{Az}$ en TBS Tween 0.1% con 5% de leche descremada. Luego, se realizaron 3 lavados con TBS Tween 0.5% y un último lavado con TBS. Posteriormente, se incubó durante 1 hora con una dilución 1/5000 del anticuerpo secundario IgG anti-ratón conjugado a fosfatasa alcalina (NEN Life Sciences Products) en TBS Tween 0.1% con 5% de leche descremada. Luego, se realizaron 4 lavados al igual que en el caso anterior. Se reveló con una solución de NTB (nitroblue tetrazolium) y BCIP (5-bromo-4-cloro-3indolil-fosfato) (PerkinElmer Life Sciences, Inc.) y se detuvo la reacción lavando con agua.

TBS 1X

Tris. HCl 10 mM pH 8.0

NaCl 150 mM

4.4.3. Obtención del antisuero

Para fabricar el antisuero se utilizaron 3 hembras de ratón de la cepa CF1 que fueron inmunizadas vía intraperitoneal con dosis de 25 μg de la proteína $PhaP_{Az}$ purificada, que se administró emulsionada con adyuvante de Freund. Dos de los ratones se inmunizaron con 4 dosis, con intervalos de una semana. La tercera hembra se inmunizó con 2 dosis, con intervalos de 20 días. Tres días antes del sangrado a blanco, a cada ratón se le aplicó un *booster* del antígeno vía endovenosa. Cada antisuero fue titulado por separado como se describe a continuación.

4.4.5. Titulación de la concentración de antisuero anti-$PhaP_{Az}$

El antisuero se tituló mediante la técnica de *Inmunoblot* utilizando 30 μg de proteínas totales transferidas a la membrana de nitrocelulosa. Dicho extracto se obtuvo de 30 ml de cultivo de M15/pREP4/pQP crecida en LB durante 8 h. Los tres antisueros de ratón anti-$PhaP_{Az}$ se juntaron y se mezclaron alternativamente, probándose diversas diluciones de cada uno individualmente y de las mezclas, para ver cuál daba mejor señal con el menor pegado inespecífico. Finalmente, para los ensayos de Western blot se utilizó uno de los anticuerpos, a una dilución de 1/2500. El anticuerpo secundario anti-Ratón conjugado a fosfatasa alcalina se utilizó a una dilución constante de 1/5000.

4.5. Preparación de muestras para MALDI TOF TOF

4.5.1. Tinción con Azul de Coomassie Blue Coloidal

Una alícuota del purificado proteico se corrió en un gel SDS-PAGE. Luego de la corrida el gel se tiñó con Azul de Coomasie Coloidal. Se utilizaron reactivos de alta calidad, guantes y recipientes libres de queratinas y contaminantes. Luego de la corrida, el gel se incubó durante 3 hrs en solución fijadora. A continuación, se lavó 3 veces durante 30 minutos con agua destilada, se agregó solución de tinción y se dejó en agitación durante una hora. Luego se agregó 0.5 g/L Coomassie Blue G-250 en polvo al gel en la solución teñidora y se agitó suavemente por 1 día. El gel se lavó con agua destilada y se procedió a cortar la banda de interés para luego hacer la digestión en gel.

Solución Fijadora	**Solución de tinción**
30% (v/v) Etanol	18% (v/v) metanol
2% (v/v) ácido fosfórico)	17% (w/v)$(NH_4)_2SO_4$
	2% (v/v) ácido fosfórico

4.5.2. Digestión en gel

La banda cortada del gel se lavó una vez con agua miliQ y con HCO_3NH_4 50mM y 3 veces con HCO_3NH_4 25mM ACN 50%. Luego se agregó ACN 100%, y luego de incubar por 5 minutos se descartó y se dejó secar en la mesada. Para realizar la reducción y alquilación se adicionaron 50µl de DTT 10 mM en HCO_3NH_4 50 mM y se incubó 30 min a 56-60ºC. Esta solución se descartó y se agregaron 35 µl de iodoacetamida 55 mM en HCO_3NH_4 50 mM. Se incubó durante 30 min en oscuridad a temperatura ambiente y luego de descartar se realizó un lavado con 100µl HCO_3NH_4 50mM seguido de uno con HCO_3NH_4 25mM, ACN 50%. Por último se agregó 100 µl de acetonitrilo y se dejó secar al aire.

Para la digestión tríptica en gel se adicionaron 12 µl de tripsina 1X a cada porción de gel, y se dejó hidratando 10 min a 4°C. Luego se agregó 10µl de bicarbonato de amonio 25mM y se dejó incubando ON a 37°C

Solución stock de tripsina 10X: 100ng/µl diluida en ácido acético 10mM

Tripsina 1X: dilución 1:10 del stock con HCO_3NH_4 50mM.

Para la extracción de péptidos, se sonicó la muestra digerida durante 5 minutos, se centrifugó para extraer el exceso de líquido del digesto de la noche anterior y se depositó en un tubo limpio que contiene 5 µl de ACN 50%/TFA 0.5%(extracto a). Luego de sonicar durante 5 minutos, vortexear durante 10 minutos y centrifugar, se agregó 15µl de ACN 50%/TFA 0.5%. Este paso se realizó entre 3 y 5 veces y a continuación se concentró la muestra a seco durante 20-30 min en *Speed Vac*. Luego se resuspendió en 5µl ACN 50%/TFA 0.5% y se mezcló en una relación 1:1 (2 µl + 2 µl) con matriz 3 mg/ml HCCA (ácido hidroxicinnamico) en ACN 50%/TFA 0.5%.

Por último se sembró en placa MTP Anchor Chip para el equipo Ultraflex II Bruker Daltonics (0.5µl por *spot*, en 2 *spots*).

4.6. Extracción de gránulos de PHB y sus proteínas asociadas

La cepa PHB-L21 fue crecida en medio LB suplementado con glucosa 1% (p/v) e IPTG 0.1 mM durante 24 horas. Las células fueron lisadas utilizando una prensa French. El lisado resultante se sembró en 2 gradientes de glicerol consecutivos, el primero de glicerol 50 y 85% (p/v) y el segundo de 40, 60, 80 and 85 % (p/v).

Luego se corrió un SDS-PAGE de la fracción PHB obtenida para analizar las proteínas que copurifican con los gránulos. El mismo fue teñido con el colorante *Coomasie Blue.*

5. Herramientas bioinformáticas para el análisis *in silico* de proteínas

5.1. Predicción de estructura secundaria

La estructura secundaria de la proteína fue predicha *in silico* utilizando el servidor Phyre2, disponible online:

(http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index).

Para deconvolucionar el espectro de dicroísmo circular (CD) y calcular la contribución de las distintas formas de estructura secundaria se utilizó el algoritmo K2D3 (http://k2d3.ogic.ca/).

Para la representación de las hélices se utilizó la herramienta Pepwheel de Emboss: (http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/pepwheel).

5.2. Predicción de perfil de hidrofobicidad

La hidrofobicidad de la proteína fue evaluada utilizando "Kyte-Doolittle hydropathicity plot" (http://gcat.davidson.edu/rakarnik/kyte-doolittle.htm) con un tamaño de ventana de 9.

5.3. Predicción de regiones desordenadas o desestructuradas

Se utilizó "*Disprot Database of Protein Disorder*" (http://www.disprot.org/predictors.php) para predecir regiones desordenadas o desestructuradas. Los predictores utilizados fueron DisEMBL (http://dis.embl.de), PONDR-FIT y PONDR-VLXT, que adicionalmente predice MoRFs (Molecular Recognition Features), regiones que experimentalmente mostraron ser desordenadas y logran estructurarse cuando son co-cristalizadas con otras proteínas. Arbitrariamente se seleccionaron aquellas secuencias con una disposición de desorden mayor a 0.5.

5.4. Predicción de regiones coiled-coil

Para predecir regiones *coiled coil*, utilizamos la herramienta MARCOIL del Instituto Max Planck (http://toolkit.tuebingen.mpg.de/marcoil). Para calcular la probabilidad de los estados de oligomerización posibles utilizamos el algoritmo de LOGICOIL (http://coiledcoils.chm.bris.ac.uk/LOGICOIL/). Por último, el programa DrawCoil (http://www.grigoryanlab.org/drawcoil/) fue utilizado para crear diagramas de oligomerización a través de regiones *coiled-coil*.

6. Técnicas para determinar la estructura de proteínas

6.1. Dicroismo Circular (CD)

Los experimentos de CD se llevaron a cabo en un spectropolarímetro Jasco J-810 equipado con un sistema Peltier PTC-423S. Los espectros isotérmicos fueron adquiridos a una velocidad de escaneo de 100 nm/min con un tiempo de respuesta de 4 segundos y promediados a partir de por lo menos 6 escaneos a 25 °C.

Estos experimentos se realizaron en *Buffer* P y en el caso de experimentos de estabilización de estructura, en presencia de 2, 2, 2-trifluoroetanol (TFE) u oleato de sodio y una concentración de 3 μM $PhaP_{Az}$. Para los experimentos de unión a DNA se utilizó un stock de 110 μM de un oligonucleótido sintético de secuencia inespecífica, llevándolo a una concentración final de 3 μM, mientras que la concentración de $PhaP_{Az}$ fue de 3 μM.

***Buffer P*:**

Fosfato de sodio……..20 mM

NaCl……..50 mM

DTT……..1 mM

pH 7.3

6.2. Cromatografía de Exclusión por tamaño (SEC):

Los experimentos de SEC se realizaron en una columna Superdex 200 analítica (GE Healthcare). La columna fue calibrada con Tiroglobulina (669 kDa), Aldolasa (144 kDa), Seroalbúmina Bovina (BSA) (67 kDa) y Mioglobina (17 kDa). El volumen de vacío (V_0) y el volumen total (V_t) fueron determinados mediante la siembra de Azul Dextrano y acetona, respectivamente. Se utilizó como *buffer* de elución *buffer P* con 150 mM de NaCl y la concentración de proteína era de 25 μM. Para experimentos de SEC en condiciones desnaturalizantes se utilizó *buffer P* con el agregado de 6 M cloruro de guanidinio (GdmCl). La proteína (25 μM) fue tratada con 6M GdmCl toda la noche para llevar a cabo el proceso de desnaturalización química.

6.3. Dispersión Dinámica de la luz (DLS)

Las medidas de DLS fueron realizadas en un equipo Zetasizer Nano S DLS de Malvern Instruments (Malvern). Las medidas se realizaron en *buffer P*. $PhaP_{Az}$ fue filtrada con filtros de microcentrífuga Ultrafree-MC 0.22 mm (Millipore) antes de realizar las mediciones. La concentración de proteína era 10 μM y la temperatura se mantuvo a 25°C mediante sistema de control por *Peltier*. Los resultados fueron procesados utilizando el *software* incluído en el equipo.

6.4. Dispersión Estática de la Luz (SLS)

El peso molecular promedio del oligómero fue determinado por SLS utilizando un instrumento de dispersión estática de la luz con detector de precisión conectado en tándem a un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con un refractómetro diferencial LKB 2142. La dispersión de la luz a 90° y las señales de índice de refracción del material eluído fueron y analizadas con el *software* Discovery32 proporcionado con los detectores de precisión. Las corridas de SEC fueron realizadas en una columna Superdex 200 analítica (GE Healthcare), la

concentración de proteína utilizada fue 25 μM y el *buffer* de elución fue el *buffer* de Superdex.

6.5. Desplegado Térmico

El desplegado térmico fue monitoreado mediante cambios en la elipticidad molar a 222 nm empleando una velocidad de calentamiento de 2 °C min^{-1}. Se utilizaron 2 concentraciones de proteína: 3 y 1.5 μM. Los espectros de CD a distintas temperaturas fueron realizados empleando las mismas condiciones ya descriptas.

6.6. Desplegado Químico

El desplegado químico de $PhaP_{Az}$ fue monitoreado por CD y por espectroscopía de fluorescencia. La proteína fue incubada toda la noche con concentraciones crecientes de GdmCl en un rango entre 0 y 5.8 M. La concentración de proteína utilizada fue 6.8 μM.

6.7. Espectroscopía de Fluorescencia

Los espectros de emisión de fluorescencia fueron determinados en un espectrofluorómetro Aminco-Bowman con una longitud de onda de excitación de 295 nm a 25 °C. Se preparó un stock 20 μM de la enzima Citrato Sintasa (CS) proveniente de corazón de cerdo (Sigma-Aldrich), disolviéndola en 20 mM Tris HCl (pH 8.0). Las muestras fueron preparadas incubando la CS plegada, la CS desplegada químicamente y 0.15 μM CS con una concentración molar 10 veces mayor de $PhaP_{Az}$ (considerando concentración monomérica) luego del tratamiento a 45°C o a 25 °C durante 25 min, en *buffer P*, y centrifugadas durante 20 min a 13 000 rpm antes de la medición.

Los espectros de emisión de fluorescencia de la sonda 8-anilino, 1-naftaleno sulfonato (ANS) unida a $PhaP_{Az}$ incubada toda la noche con distintas concentraciones de GdmCl fueron determinados a una longitud de onda de

excitación de 370 nm y 4 nm de paso de banda. Las muestras fueron incubadas con 100 µM ANS (concentración final) a 25 °C durante 2 h para asegurar una condición de equilibrio.

7. Determinación de la Actividad Chaperona *in vitro*

Para estos experimentos se utilizó un stock 20 µM de la enzima Citrato Sintasa (CS) proveniente de corazón de cerdo (Sigma-Aldrich), disuelta en 20 mM Tris HCl (pH 8.0).

7.1. Ensayo de agregación de la enzima CS

Se agregó una concentración final de 150 nM a soluciones precalentadas a 45 °C conteniendo distintas concentraciones de $PhaP_{Az}$ o BSA (proteína control) en *buffer P*. La agregación espontánea de la CS a 45 °C fue monitoreada midiendo la dispersión de la luz a 360 nm en un espectrofotómetro JASCO con cubeta termostatizada.

7.2. Ensayo de replegado de CS desnaturalizada por métodos químicos

La CS desnaturalizada fue preparada según lo descripto anteriormente (Buchner et al. 1998). Brevemente, una alícuota de CS (12 µM concentración final) fue disuelta en 20 mM Tris *buffer* (pH 8.0), 5.0 M GdmCl, y 3.0 mM DTT e incubada durante 4 horas. La CS químicamente desnaturalizada fue diluída hasta 60 mM en *buffer P* conteniendo distintas cantidades de $PhaP_{Az}$ o BSA a 25 ºC. La agregación de la enzima fue monitoreada midiendo la dispersión de la luz a 360 nm en un espectrofotómetro JASCO a temperatura ambiente.

8. Técnicas de Microscopía

8.1. Microscopía de Transmisión Electrónica (TEM)

Las células fueron centrifugadas, lavadas 2 veces con PBS y fijadas en 5% (p/v) glutaraldehído en la misma solución. Luego, las mismas fueron suspendidas en 2.5% (p/v) OsO_4 durante 1 h, gradualmente deshidratadas en etanol [30%, 50%, 70%, 90% y 100% (v/v); durante 30 min para cada concentración], luego tratadas con óxido de propileno durante 1 hora y por último embebidas en resina Epon 812. Se realizaron microcortes de la resina con un micrótomo con cuchilla de diamante de diatomea de manera de obtener secciones ultrafinas de 70 nm. Dichas secciones fueron levantadas en rejillas de cobre con capa de carbono de tamaño de malla 400 y subsecuentemente observadas en un microscopio electrónico Jeol-1230 (JeolLtd., Akishima, Japan).

8.2. Microscopía de fluorescencia

Se realizaron precultivos crecidos toda la noche en medio LB a 30°C de las cepas de *E. coli* a analizar. A partir de esos precultivos, se inocularon cultivos en LB a DO 600nm inicial de 0.1. Los cultivos fueron incubados a 30°C con 200 rpm de agitación. Cuando la DO alcanzó un valor de 0.5, se agregó 0.1 mM de IPTG de manera de inducir la expresión de todos los genes heterólogos en estudio.

Los cuerpos de inclusión del dominio insoluble de la proteína TolR de *Azoarcus* sp. CIB (PD) fueron visualizados luego de ser teñidos con 30 $\mu g\ ml^{-1}$ Rojo de Nilo durante 15 minutos, mientras que los gránulos de PHB fueron teñidos con 3 $\mu g\ ml^{-1}$ Rojo de Nilo durante 15 min. Las células fueron fijadas con 4% paraformaldehído a temperatura ambiente durante 1 hora y luego, lavadas 3 veces con PBS. Por último, se visualizaron en un microscopio confocal Laser Confocal espectral (CLSM) Leica TCS SP2-AOBS.

8.3. Análisis de Imágenes:

Las imágenes obtenidas por microscopía fueron analizadas utilizando el programa Image J. Para contar las células con IB y células totales se utilizó la extensión *"Cell counter"*, mientras que para calcular los índices M1/M2 de colocalización de fluorescencia se utilizó la extensión *"JACoP".*

Resultados

Capítulo I:

Análisis Estructural de $PhaP_{Az}$

1.1. Búsqueda *in silico* de las familias de phasinas descriptas

A pesar de que las phasinas no constituyen un grupo altamente conservado y que los primeros reportes indicaron que el grado de conservación entre ellas era muy bajo, se han definido varios motivos proteicos usando el gran número de phasinas previamente descriptas.

Según la base de datos del Pfam, existen cuatro familias de phasinas: *i)* PF09602 (PhaP_Bmeg), *ii)* PF09650 (PHA_gran_rgn), *iii)* PF05597 (Phasin) y *iv)* PF09361 (Phasin_2) (Figura 15)

La primera corresponde a phasinas encontradas en especies de *Bacillus*, tales como *B. megaterium*, mientras que la segunda contiene un grupo diverso de phasinas aún no caracterizadas pertenecientes a diferentes Gammaproteobacterias.

PF05597 incluye 263 secuencias pertenecientes a 196 especies, la mayoría de las cuales se encuentran relacionadas con *Pseudomonas*, entre ellas, $PhaF_{Pp}$.

Por último, PF09361 (Phasin_2), es la familia más numerosa, dado que incluye 952 secuencias encontradas en 501 especies. Todas las phasinas de diferentes cepas de *Azotobacter*, incluída $PhaP_{Az}$, pertenecen a esta familia que además incluye a la phasina más estudiada, PhaP1 de *R.eutropha* ($PhaP1_{Re}$).

Al analizar la secuencia aminoacídica de GA14 de *R. ruber* se observó que esta proteína que presenta 2 dominios hidrofóbicos, carece de dominios conservados característicos de las phasinas, por lo que no se la pudo agrupar en ninguna de las 4 familias descriptas. Esto sugiere que la interacción de GA14 con los gránulos de PHA es probablemente diferente a la de las phasinas, no pudiendo asegurarse que esta proteína de unión a gránulos de PHA sea realmente una phasina.

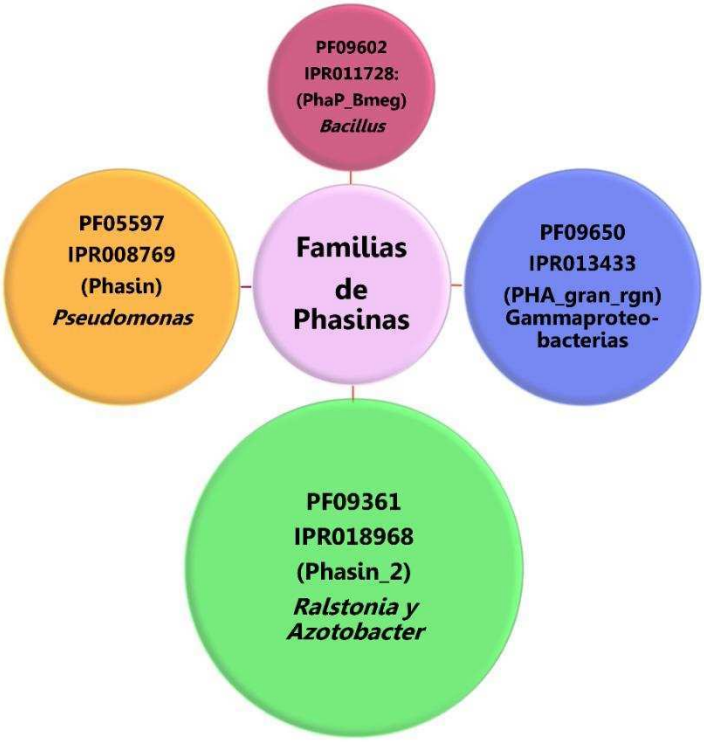


Figura 15: Diagrama de las 4 familias de phasinas descriptas. Se muestra la denominación de cada familia según las bases de datos Pfam e Interpro, así como también los grupos de microorganismos cuyas phasinas se encuentran más representadas en la familia.

1.2. Estructura primaria de $PhaP_{Az}$

La secuencia aminoacídica de PhaP de *Azotobacter* sp. FA8 se encuentra disponible en la base de datos del NCBI (GenBank: CAD42757.1, autores: Pettinari, J.M., Chaneton,L., Vazquez,G., Steinbuchel,A. y Mendez,B.S)

MAFFDLEKMESASKSNLDAVQQLNSKIFESAEELYKLQFKTLRAAADDNF
ESLRKLLSVRDPQAFLELQASFFKPNEQAERLVEFSRQTYDLISRFQAEVTK
LTERQIEIGTQQAQEIVEEICKNAPASAEPVVSVFKSAVEGAGNVYESAQK
AAKQASEITASGIEAAANAAGQAAAQAASGKKTA

Ingresando esta secuencia en la herramienta ProtParam del ExPASy (http://web.expasy.org/protparam) se calcularon los siguientes parámetros:

Número de aminoácidos: 187

Peso molecular: 20.3758 kDa

Punto isoeléctrico (pI) teórico: 4,93

Coeficiente de extinción molar a 280 nm: 4470 M^{-1} cm^{-1}

1.2.1. Perfil de hidrofobicidad

A continuación se estudió la presencia de dominios hidrofóbicos en esta phasina que podrían corresponder a sitios de interacción con los gránulos de polímero.

A partir de la secuencia aminoacídica, pudo obtenerse el perfil de hidrofobicidad de la proteína utilizando el algoritmo de Kyte y Doolittle (Kyte & Doolittle 1982). Los picos positivos corresponden a zonas hidrofóbicas, mientras que por el contrario, los picos negativos corresponden a zonas hidrofílicas (Figura 16)

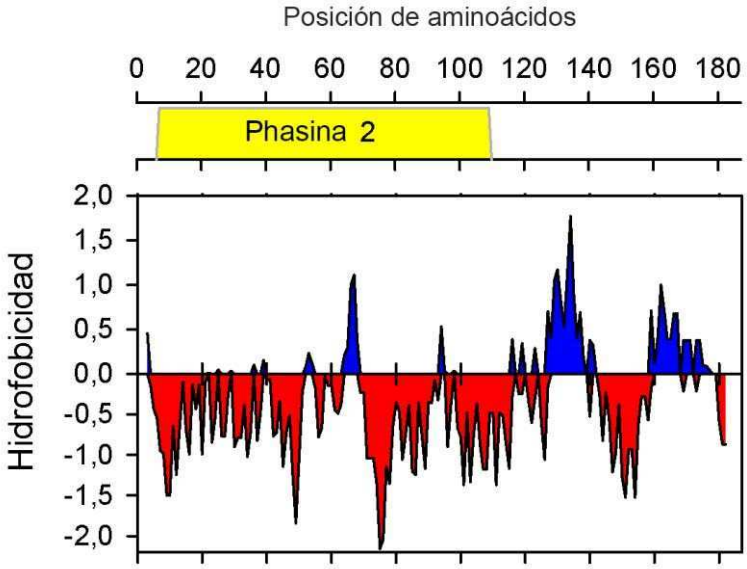


Figura 16: Posición del dominio Phasina 2 y perfil de hidrofobicidad de $PhaP_{Az}$. En azul se marcan las zonas hidrofóbicas y en rojo las zonas hidrofílicas.

Se observaron regiones hidrofílicas alternadas con regiones hidrofóbicas en el extremo C-terminal de la proteína, mientras que en el resto de su secuencia aminoacídica se observaron picos negativos que podrían indicar regiones expuestas al solvente.

Al comparar los perfiles de hidrofobicidad de $PhaP_{Az}$ y PhaP1 de *R.eutropha* ($PhaP1_{Re}$), ambas pertenecientes a la misma familia de phasinas, se observa que los mínimos y máximos ocurren en regiones similares de las proteínas, observándose mayor similitud en el extremo C-terminal. Ninguna de las dos phasinas analizadas contenía regiones hidrofóbicas bien definidas, sin embargo, $PhaP_{Az}$ es un poco menos hidrofóbica que $PhaP1_{Re}$ (Figura 17).

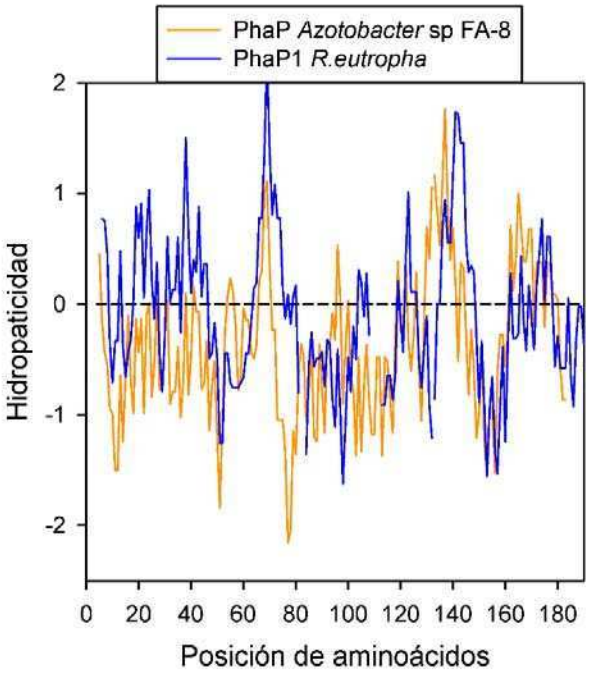


Figura 17: Comparación entre los perfiles de hidrofobicidad de $PhaP_{Az}$ y de $PhaP1_{Re}$

1.3. Caracterización de la Estructura Secundaria:

1.3.1. Predicciones in silico de la estructura secundaria

Como primera aproximación para el estudio de la estructura de esta phasina, utilizamos el servidor Phyre2 para predecir la estructura secundaria de la misma.

Este servidor utiliza una biblioteca de proteínas de estructura conocida tomadas de las bases de datos SCOP (*Structural Classification of Proteins Database*) y PDB (*Protein Database*). La secuencia de cada una de estas proteínas es comparada con una base de secuencias no redundantes para obtener un perfil que se deposita en una biblioteca de motivos de plegado. En esta biblioteca también se guarda la estructura secundaria obtenida experimentalmente y/o por predicción de cada una de las proteínas depositadas. Al introducir una secuencia de una proteína cuya estructura se quiere predecir, el servidor también compara dicha secuencia con la base de datos de secuencias no redundantes y obtiene un perfil para la proteína de interés. Además, realiza un alineamiento simple entre todas las secuencias homólogas que encuentra y la secuencia de interés. Luego, a partir de este alineamiento, el servidor usa 3 programas de predicción distintos para predecir la estructura secundaria de la proteína de interés. El resultado de cada programa es

una predicción de la contribución de α-hélice, hoja β y *random coil.* Cada uno de estos programas obtiene un valor de confianza para cada una de las contribuciones, que luego se promedian para calcular una predicción consenso de la estructura secundaria. Por último, el perfil obtenido y la predicción de estructura secundaria se comparan contra la biblioteca de plegado utilizando un algoritmo de alineamiento que otorga un valor de *score.* Los alineamientos con mayor *score* son utilizados para construir un modelo 3D de la proteína. (Kelley & Sternberg 2009).

Este tipo de aproximación es muy útil para predecir la estructura secundaria de familias de proteínas cuya estructura no se encuentra resuelta por completo.

Este servidor predijo que un 87% de los aminoácidos de $PhaP_{Az}$ se encuentran en conformación α-hélice, mientras que el resto se encuentran en conformación *random coil* o sin estructura definida. Según esta predicción, la proteína estaría compuesta de cuatro hélices intercaladas con regiones sin estructura secundaria determinada: una hélice que comprende desde el aminoácido L6 a L57, una hélice más corta desde P62 a F73, otra desde P75 a N125 y la cuarta desde E131 a A177 (Figura 18). Además, utilizando este programa se obtuvo un modelo 3D de $PhaP_{Az}$ (Figura 19).

Estos resultados coinciden con predicciones realizadas previamente para otras phasinas, como por ejemplo, para las phasinas de algunas especies de *Ralstonia*, que presentaron un 90% de contenido de α-hélice en su estructura secundaria, por lo que se propuso que esto es una característica común a todas las phasinas (Neumann et al. 2008).

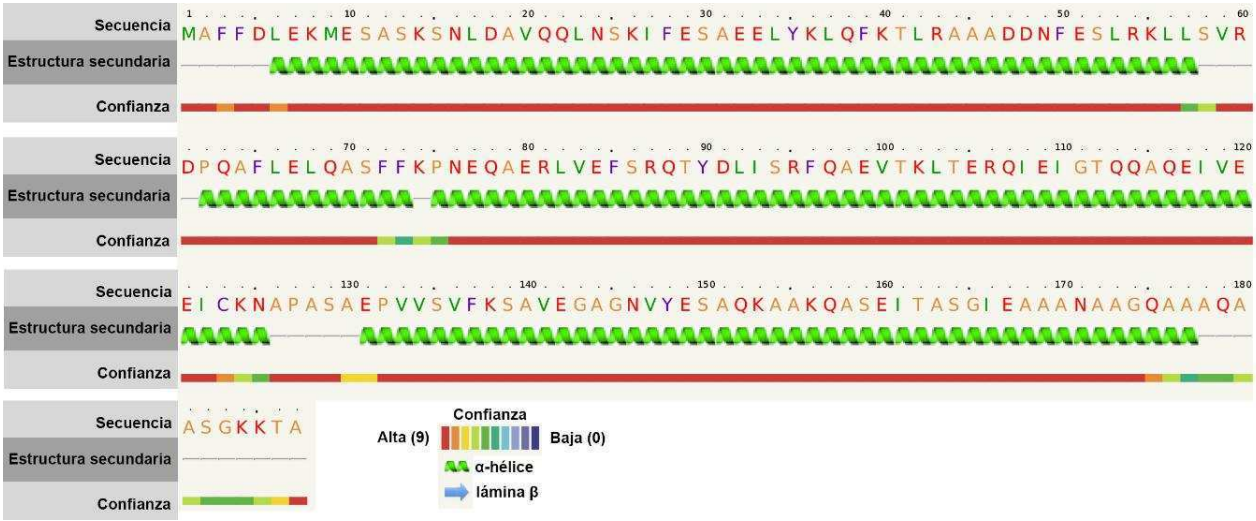


Figura 18: Predicción de estructura secundaria obtenida utilizando el servidor Phyre2

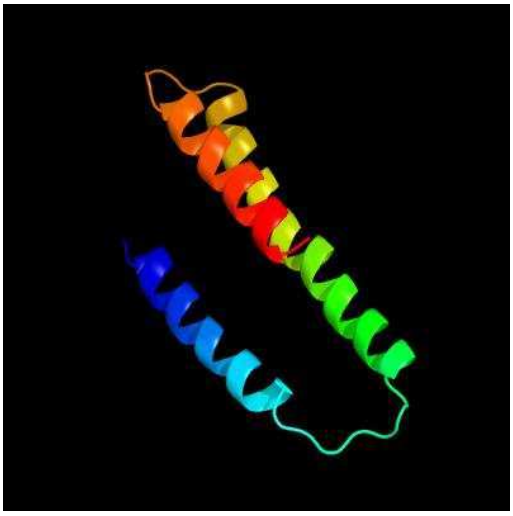


Figura 19: Modelo 3D de $PhaP_{Az}$ obtenido por Phyre2

Neumann y colaboradores proponen que la unión de las phasinas a los gránulos de PHA puede ocurrir, no sólo por un motivo hidrofóbico discreto en la estructura primaria, sino que también intervienen motivos formados por la estructura secundaria, terciaria y cuaternaria de la proteína (Neumann et al. 2008). Para estudiar si las hélices predichas presentan características anfipáticas que podrían explicar las interacciones entre $PhaP_{Az}$ y los gránulos de PHA, representamos dichas hélices utilizando la herramienta Pepwheel de Emboss (http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/pepwheel). Esta representación muestra que la primera (L6 a L57), la tercera (P75 a N125) y la cuarta hélice (E131 a A177) presentan una cara polar y una no polar claramente definidas (Figura 20).

Estas hélices anfipáticas podrían intervenir en la interacción simultánea con los gránulos de PHA y con el entorno acuoso, así como también en interacciones proteína-proteína.

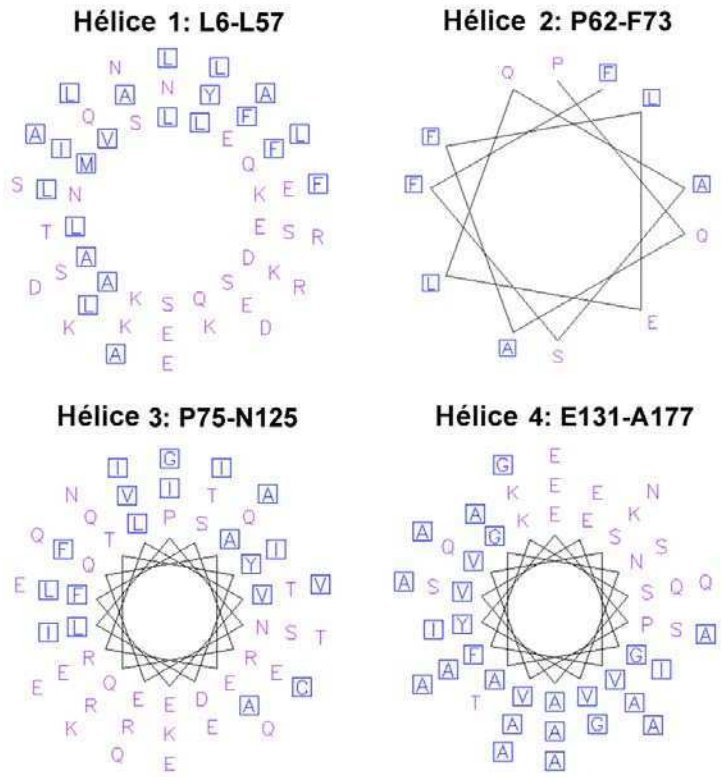


Figura 20: Diagramas de las 4 hélices predichas realizados con Pepwheel. Los aminoácidos no polares se marcan como cuadrados azules.

1.3.2. Determinación experimental de la estructura secundaria

1.3.2.1. Clonado y sobreexpresión de *phaP$_{Az}$*

Con el objetivo de purificar la proteína para obtener datos experimentales de su estructura, se construyó el plásmido pQP2 que permite la producción de PhaP$_{Az}$ fusionada a un *tag* de seis histidinas en el extremo amino terminal.

El gen *phaP$_{Az}$* se amplificó por PCR utilizando como templado el plásmido pRX23, que conteniene el operón *phb* de *Azotobacter* sp. FA8, a partir de los *primers* PhaP$_{Az}$ F BamHI y PhaP$_{Az}$ R HindIII (ver Materiales y Métodos).

El producto de amplificación fue clonado direccionalmente en el vector comercial pQE31 (Qiagen) en los sitios BamHI y Hind III. Este vector presenta un promotor T5 seguido de dos secuencias operadoras *lac*, por lo que es inducible por IPTG (Figura 21). La construcción fue verificada por análisis de restricción y secuenciación.

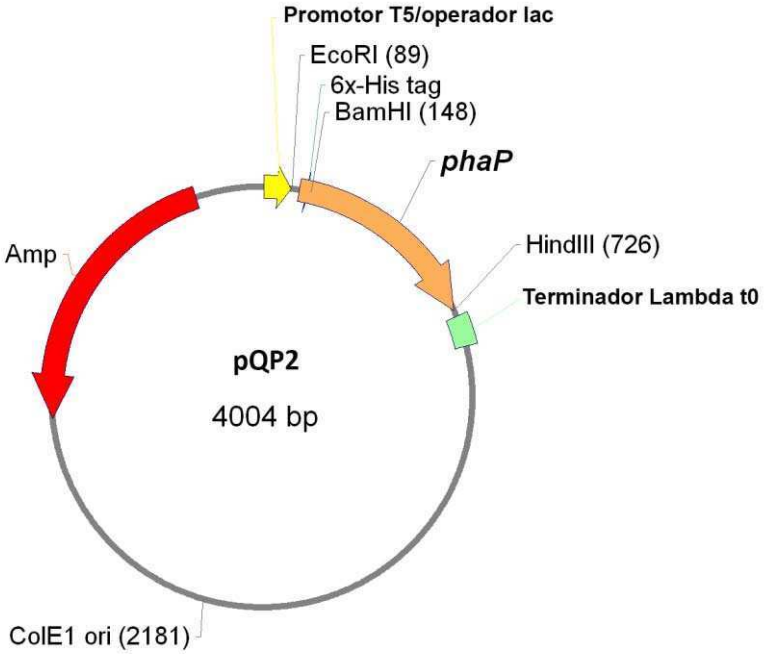


Figura 21: Esquema del plásmido pQP2 que permite la producción de $PhaP_{Az}$ fusionada a un tag de histidina.

Con el objetivo de producir la proteína de fusión de 201 aminoácidos en *E. coli*, se transformó la cepa M15/pREP4 con el plásmido pQP2.

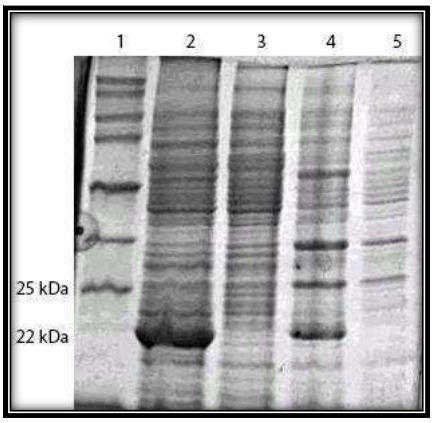
La expresión de $phaP_{Az}$ a partir de pQP2 se verificó por SDS-PAGE. Al sembrar los extractos proteicos totales de los clones inducidos con IPTG 1 mM, se obtuvieron dos bandas de sobreexpresión, una de aproximadamente 50 kDa y otra de aproximadamente 21 kDa. La producción de $PhaP_{Az}$ se verificó por *western blot* utilizando un antisuero específico hecho en ratón. La banda de 50 kDa no se observa al incubar la muestra previamente a la corrida en condiciones reductoras leves (en presencia de β-mercaptoetanol o DTT 1mM).

Para estudiar la posibilidad de que la banda de 50 kDa pudiera corresponder a otra proteína o a dímeros de $PhaP_{Az}$, se analizaron las bandas obtenidas por MALDI

TOF TOF. Al realizar la alquilación en condiciones reductoras las secuencias obtenidas para ambas bandas correspondían a la secuencia esperada para $PhaP_{Az}$ fusionada al his *tag*, descartando la posibilidad de que correspondieran a otra proteína. Por otro lado, al realizar la alquilación en condiciones no reductoras, se observó que la banda de 50 kDa correspondía a 2 moléculas de proteína unidas mediante la única cisteína de su secuencia aminoacídica. Esto indica que la presencia de esta banda de mayor tamaño se debe a artefactos introducidos durante el proceso de purificación, ya que en condiciones reductoras suaves no esta presente. Para evitar la oxidación de la cisteína de $PhaP_{Az}$ se decidió trabajar en presencia de DTT 1mM en todos los experimentos subsiguientes para imitar las condiciones reductoras del entorno celular.

1.3.2.2. Solubilidad de $PhaP_{Az}$

Con el objetivo de determinar si $PhaP_{Az}$ al ser producida en *E. coli* se obtiene en la fracción soluble o en estado de agregación en la fracción insoluble, se determinó la solubilidad de la proteína utilizando el protocolo explicado en materiales y métodos.



1) Marcador de peso molecular Broad Range (Promega)
2) Fracción soluble: Inducción con IPTG 1mM
3) Fracción soluble: sin inducción
4) Fracción insoluble: Inducción con IPTG 1mM
5) Fracción insoluble: sin inducción

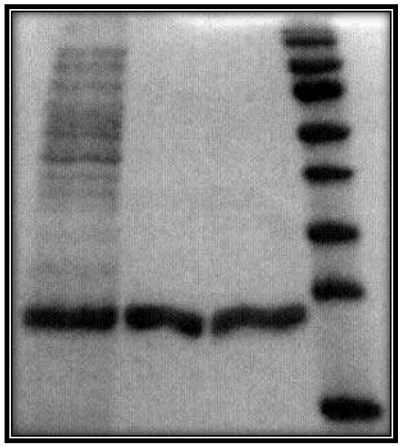
Figura 22: SDS-PAGE de la fracción soluble y la fracción insoluble de la cepa M15/pREP4/pQP2 inducida con IPTG y no inducida.

Si bien $PhaP_{Az}$ es una proteína de unión a gránulos hidrofóbicos de PHB, resultó ser altamente soluble dado que, luego de romper las células bacterianas por

sonicación, la mayoría de las moléculas de proteína producidas se obtienen en la fracción soluble. Esta propiedad permite la purificación de la proteína en condiciones nativas.

1.3.2.3. Purificación de $PhaP_{Az}$

La proteína fusionada al his *tag* se purificó mediante cromatografía de afinidad sobre iones metálicos (IMAC), utilizando una columna de níquel, seguida de una Cromatografía de Exclusión por Tamaño (*Size Exclusion Cromatography* o SEC, por sus siglas en inglés), utilizando una columna Superdex 75 preparativa. Luego de la purificación, se obtuvo una banda mayoritaria de aproximadamente 21 kDa.



Calle 1: Fracción soluble

Calle 2: Luego de la purificación con columna de níquel.

Calle 3: Luego de la purificación con la columna Sephadex 75.

Figura 23: SDS-PAGE teñido con Azul de Coomasie de las fracciones proteicas luego de cada uno de los pasos de purificación

Para verificar que la banda obtenida luego de la purificación correspondiese efectivamente a $PhaP_{Az}$, la misma fue secuenciada por MALDI TOF TOF. La secuencia obtenida mediante esta técnica correspondió a la de la proteína de interés.

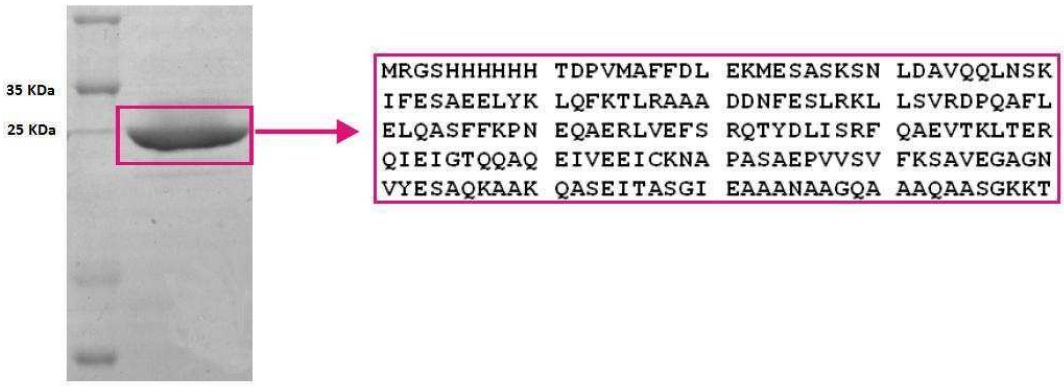


Figura 24: Banda de aproximadamente 21 kDa obtenida luego del último paso de purificación secuenciada por MALDI TOF TOF.

1.3.2.4. Determinación experimental de la estructura secundaria por Dicroismo Circular

Se realizaron experimentos de Dicroísmo Circular (CD) a partir de la proteína purificada para obtener información experimental de la estructura secundaria de $PhaP_{Az}$. Esta técnica se basa en la absorción diferencial de la luz circularmente polarizada hacia la derecha (R) y hacia la izquierda (L) que presentan las moléculas quirales como las proteínas. Al ser absorbidos en distinta magnitud por la muestra proteica, los componentes R y L dan como resultante luz elípticamente polarizada y por este motivo la diferencia de absorbancia se expresa en términos de elipticidad (Θ) y en unidades de grados. El espectro de CD se obtiene cuando la señal de dicroísmo se mide en función de la longitud de onda. En las proteínas, los cromóforos de interés son la unión peptídica (absorbe en el UV lejano, es decir, por debajo de los 240 nm), las cadenas laterales de los aminoácidos aromáticos (absorben en el intervalo de 260 a 320 nm), y los puentes disulfuro (presentan un banda de absorción débil centrada alrededor de los 260 nm). Los datos de elipticidad en unidades de grados obtenidos por CD se normalizan a la concentración molar de la molécula entera o a unidades repetitivas de un polímero. Al realizar mediciones de proteínas por CD en el UV lejano, la unidad repetitiva es la unión peptídica, por lo que los datos obtenidos por el equipo se normalizan al peso promedio por residuo (*Mean Residue Weight* o MRW, por sus siglas en inglés), obteniéndose una elipticidad promedio por residuo ($[\Theta]_{MRW\lambda}$, en unidades de $deg.cm^2.dmol^{-1}$) para cada valor de longitud de onda del espectro.

El MRW se calcula a partir de la siguiente fórmula:

MRW= *M/ (N-1)* donde *M* es el peso molecular de la proteína en Da y *N* es el número de aminoácidos en la cadena polipeptídica.

La elipticidad promedio por residuo a una longitud de onda λ se calcula de la siguiente forma:

$[\Theta]_{MRW\lambda}$= MRW . θ_λ / 10 . *d* . *c* donde θ_λ es la elipticidad observada a la longitud de onda λ, *d* es el camino óptico en cm y *c* es la concentración de la proteína en g/ ml.

Los diferentes tipos de estructura secundaria presentes en las proteínas (α-hélice, lámina β y *random coil*) dan origen a espectros de CD en el UV lejano característicos (Kelly et al. 2005). El espectro de CD en el UV lejano de $PhaP_{Az}$, mostró dos bandas negativas, una a 208 nm y la otra a 222 nm, características de una conformación α-hélice (Figura 25).

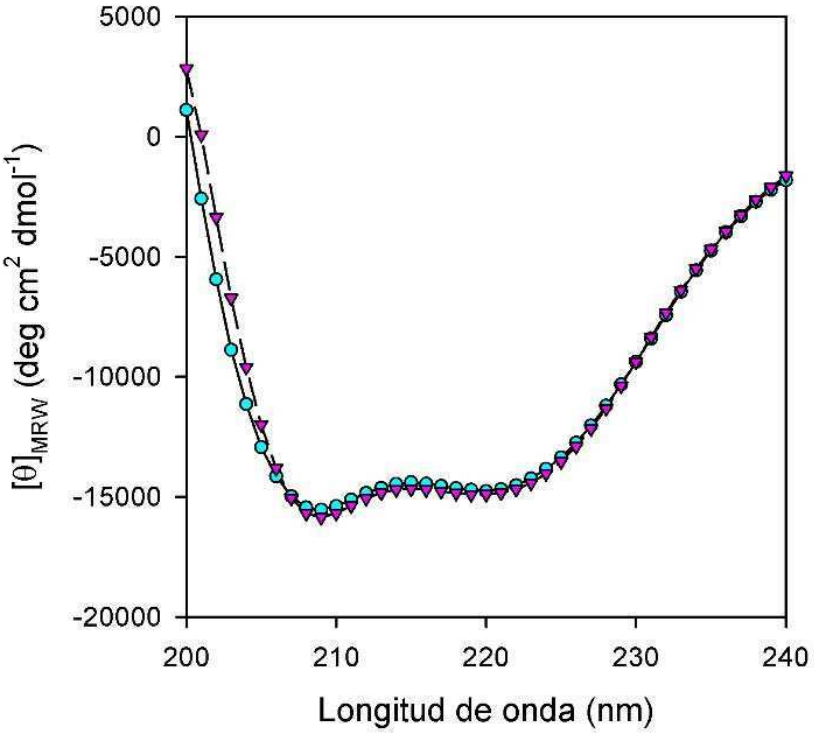


Figura 25: Espectro de dicroismo circular de $PhaP_{Az}$. Círculos: espectro de CD de $PhaP_{Az}$ 3 mM en *buffer P*. Triángulos: espectro de CD de $PhaP_{Az}$ predicho por el algoritmo de K2D3.

Al utilizar el algoritmo del servidor K2D3 (Louis-Jeune et al. 2011) para calcular las contribuciones de las distintas conformaciones de estructura secundaria se obtuvo un valor de 38% de aminoácidos en conformación α-hélice, y un 62% de aminoácidos en conformación *random coil.* Este valor de α-hélice obtenido experimentalmente es significativamente menor al obtenido mediante predicciones *in silico* (87%).

1.3.2.5. Análisis de la presencia de regiones desordenadas

La diferencia en los valores de α- hélice obtenidos experimentalmente o mediante predicciones *in silico*, podría deberse a la presencia de regiones desestructuradas o desordenadas en la proteína. Estas regiones fueron descriptas previamente para otra phasinas, en particular para $PhaF_{Pp}$, que fue propuesta como una phasina perteneciente al grupo de proteínas intrínsecamente desordenadas (Maestro et al. 2013). Para analizar si $PhaP_{Az}$ presenta regiones desestructuradas se utilizaron métodos *in silico* contenidos en la base de datos de Disprot (Disprot Database of Protein Disorder) (Sickmeier et al. 2007). Utilizando DisEMBL (Linding et al. 2003), y seleccionando las regiones predichas con densidades electrónicas no asignadas que por lo general reflejan desorden intrínseco, se encontraron tres segmentos de la proteína que se predicen como desordenados: M1-K14, E149-S159 y A169-A187. Resultados similares fueron encontrados con PONDR-FIT (Xue et al. 2010) que predijo dos regiones desordenadas en el extremo N-terminal (M1-A19) y en el extremo C- terminal (Q152-A187). Por último, se utilizó PONDR-VLXT, que predice *MoRFs* (por sus siglas en inglés, *Molecular Recognition Features*) o segmentos con tendencia a formar estructuras dentro de regiones desestructuradas. PONDR-VLXT encontró una región desordenada adicional entre los aminoácidos V100-A128, correspondiente a un MoRF (Figura 26). Si bien este tipo de motivos tiene tendencia a ser estructurado, se encuentra flanqueado por regiones desordenadas y es muy probable que se encuentre desestructurado en condiciones fisiológicas y ausencia de blanco (Xue et al. 2010).

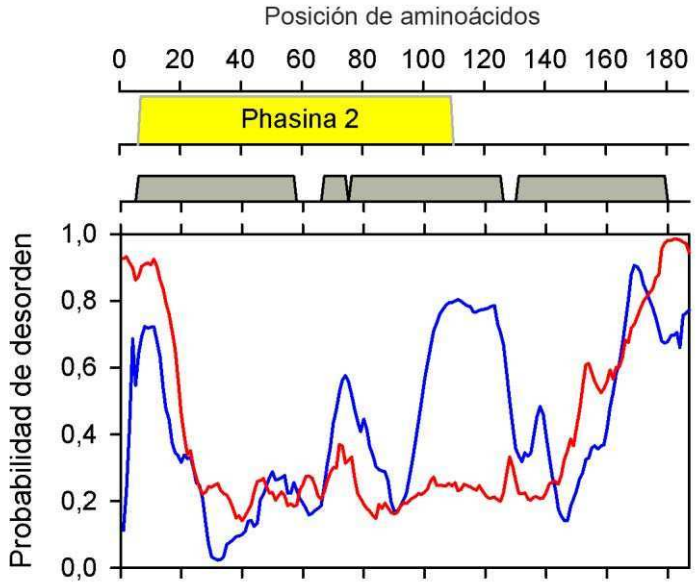


Figura 26: Predicción de regiones desordenadas. En azul se muestra la predicción según el algoritmo de PONDR-VLXT y en rojo según el de PONDR- FIT. En la parte superior de la figura se muestra la posición del dominio Phasina 2 (amarillo) y de las α- hélices (gris) en la secuencia aminoacídica predichas por Phyre2.

A partir de estos datos, se estima que alrededor del 40/45 % de la proteína puede ser desordenada cuando la misma no está unida a ningún blanco y este porcentaje podría llegar a descender a 23/30 % al interactuar con otras moléculas. El porcentaje de desorden predicho en ausencia de blanco es compatible con el contenido de α-hélice obtenido experimentalmente y podría explicar las discrepancias con la predicción de estructura secundaria.

1.3.2.6. Influencia del entorno en la estructura secundaria de $PhaP_{Az}$

La presencia de regiones desestructuradas y la discrepancia entre la proporción de α- hélice predicha *in silico* y los valores experimentales obtenidos indican cierta flexibilidad en la estructura de esta phasina. Para analizar como se ve afectada la estructura según el entorno, se realizaron experimentos de CD en presencia de 2,2,2- trifluoroetanol (TFE) y oleato de sodio.

i) Tratamiento con TFE:

TFE es un solvente que generalmente estabiliza poblaciones preexistentes de α- hélice en péptidos y proteínas (Buck et al. 1995; Luo & Baldwin 1998), por lo que

al agregar este solvente al medio, la proteína tiende a ganar estructura si presenta regiones que contengan aminoácidos que podrían formar parte de una estructura α-hélice. La proporción de α-hélice (calculada por K2D3) aumenta al aumentar la concentración de TFE, alcanzando un valor de saturación de 55% de los aminoácidos en conformación α- hélice con 50% TFE (Figura 27).

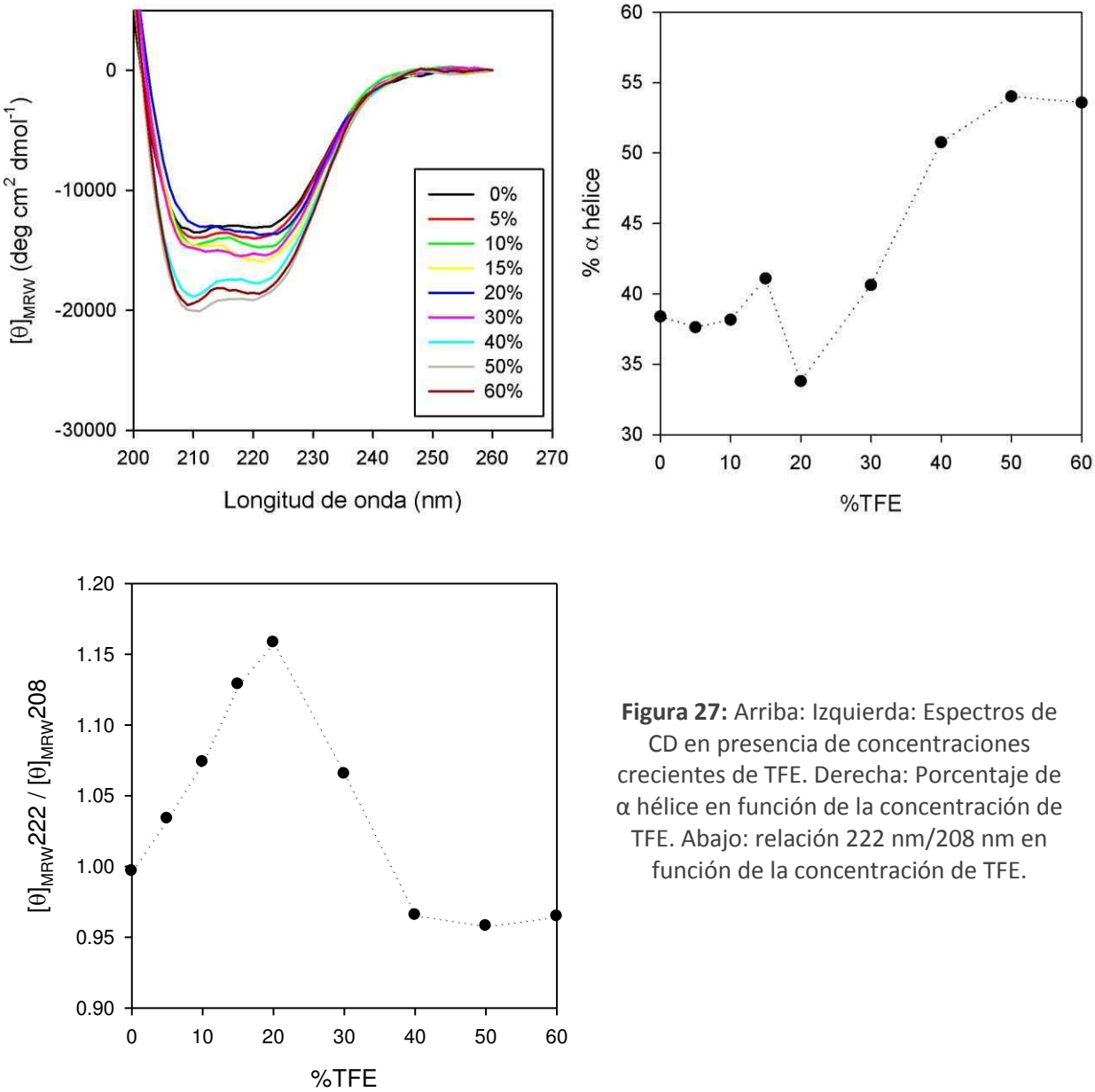


Figura 27: Arriba: Izquierda: Espectros de CD en presencia de concentraciones crecientes de TFE. Derecha: Porcentaje de α hélice en función de la concentración de TFE. Abajo: relación 222 nm/208 nm en función de la concentración de TFE.

Si se observa con detenimiento, puede verse que aunque la relación entre los dos mínimos característicos (222 nm/ 208 nm) se mantiene cercana a 1 (lo que indica que la proteína está predominantemente en conformación α-hélice) esta relación varía de una forma no monótona. Este comportamiento indica que no ocurre una transición de dos estados al agregar TFE al medio, lo que revela que existe una reorganización de estructura secundaria más compleja. Esto sugiere que la proteína presenta cierto grado de flexibilidad que le permite sufrir cambios estructurales inducidos por el entorno.

ii) Tratamiento con oleato de sodio:

Como las phasinas se encuentran normalmente en la superficie lipídica de los gránulos de PHA, la posibilidad de que la estructura de $PhaP_{Az}$ pueda ser afectada por un entorno lipídico fue analizada utilizando oleato de sodio, un componente usando comúnmente como mímica hidrofóbica de PHA para análisis *in vitro* (Maestro et al. 2013). El porcentaje de α-hélice aumentó drásticamente en presencia de oleato, alcanzando un valor de saturación de 68% de los aminoácidos en conformación α-hélice con 10 mM de oleato (Figura 28). No fue possible llegar al *plateau* debido al límite de solubilidad del oleato. El comportamiento de $PhaP_{Az}$ en presencia de este compuesto indica que esta proteína es capaz de cambiar su estructura en un entorno hidrofóbico y sugiere que al interactuar con un blanco hidrofóbico como los PHA podría alcanzar el valor de α-hélice predicho *in silico*.

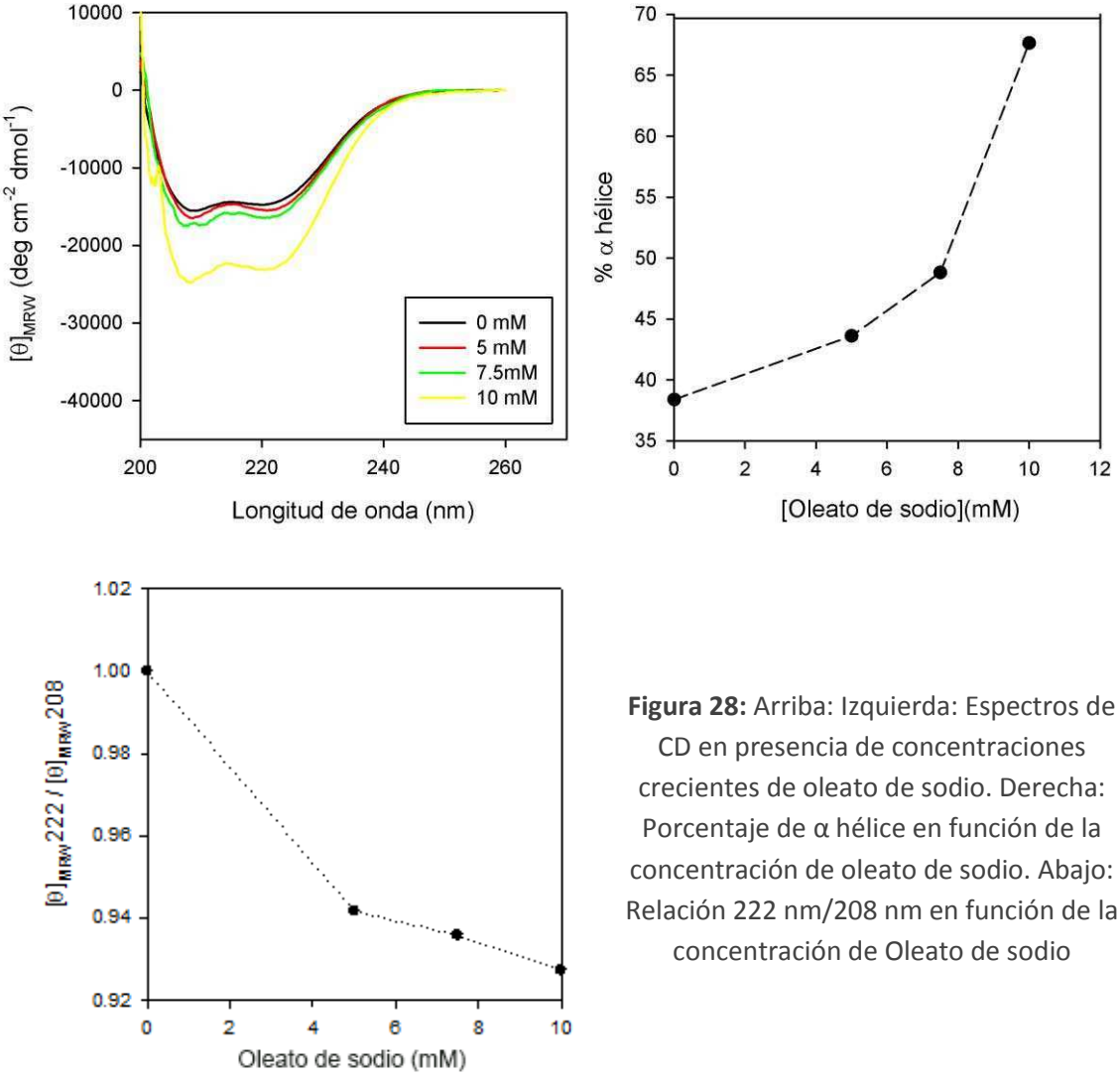


Figura 28: Arriba: Izquierda: Espectros de CD en presencia de concentraciones crecientes de oleato de sodio. Derecha: Porcentaje de α hélice en función de la concentración de oleato de sodio. Abajo: Relación 222 nm/208 nm en función de la concentración de Oleato de sodio

1.3.2.7. Análisis de la capacidad de $PhaP_{Az}$ de unirse a DNA

Se ha reportado previamente que la phasina $PhaF_{Pp}$ tiene un dominio histona, formado por repeticiones en tándem de la secuencia AAKP, que le otorga la capacidad de unirse a DNA inespecíficamente (Galán et al. 2011). Si bien $PhaP_{Az}$ no presenta un dominio con estas características, se evaluó si esta phasina es capaz de unirse a secuencias inespecíficas de DNA. Con este objetivo, se realizaron experimentos de CD de $PhaP_{Az}$ en presencia de un oligonucleótido sintético de DNA doble cadena de 18 pares de bases. El espectro de CD de $PhaP_{Az}$ en presencia de DNA resultó idéntico a la suma aritmética del espectro de $PhaP_{Az}$ sola más el DNA solo

(Figura 29). Esto nos permite concluir que no hay una evidencia clara de la interacción de la proteína con un DNA inespecífico como en el caso de la phasina $PhaF_{Pp}$ donde se observa una diferencia espectral que permite concluir que el DNA cambia su estructura secundaria debido la formación de un complejo phasina-DNA (Galán et al. 2011).

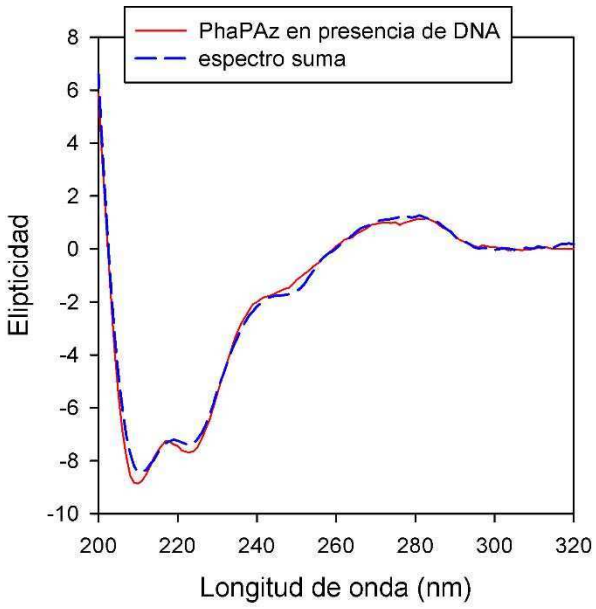


Figura 29: Espectro de CD de $PhaP_{Az}$ en presencia de DNA (rojo) y espectro suma del espectro de $PhaP_{Az}$ + el espectro del oligo de DNA (azul).

1.4. Caracterización de la Estructura Terciaria y Cuaternaria

1.4.1. Cromatografía de Exclusión por Tamaño y Dispersión de la Luz Dinámica

Con el objetivo de estudiar la estructura terciaria y cuaternaria de esta phasina, realizamos experimentos de cromatografía de exclusión por tamaño (*Size Exclusion Cromatography* o SEC, por sus siglas en inglés) y de Dispersión de la Luz Dinámica (*Dinamic Light Scattering* o DLS, por sus siglas en inglés) para determinar si la proteína es monomérica u oligomérica en solución. En ambos casos se empleó un modelo de proteína globular para obtener el peso molecular equivalente o radio hidrodinámico de la misma. El concepto de globular se define según la forma que la proteína adopta en solución y supone que la misma puede ser tratada como una

esfera con un único radio hidrodinámico. De esta forma el radio hidrodinámico de una proteína es función de su peso molecular.

Si bien el peso molecular de $PhaP_{Az}$ es 21 kDa, la misma eluye cerca del volumen de vacío (Vo) al realizar una cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna Superdex 75 analítica. Este volumen de elución corresponde a una proteína globular de al menos 75 kDa.

Este comportamiento fue confirmado por experimentos de DLS, que permiten determinar el diámetro hidrodinámico de proteínas en solución, parámetro que depende del tamaño y de la forma de la molécula. Mediante esta técnica, y utilizando el software del equipo, se obtuvo un diámetro hidrodinámico de 12 nm para $PhaP_{Az}$ (Figura 30).

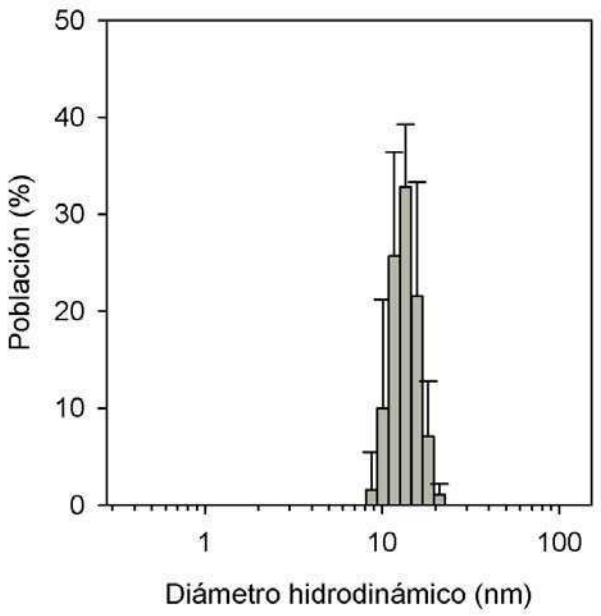


Figura 30: Diámetro hidrodinámico de $PhaP_{Az}$ medido por DLS.

Se ha observado que la dependencia entre la masa molecular y el diámetro hidrodinámico difiere entre las conformaciones nativa y desplegada de las proteínas (Uversky 1993). En consecuencia, las proteínas nativamente desestructuradas presentan un mayor volumen hidrodinámico en comparación con las proteínas globulares, lo que produce un aumento en la masa molecular aparente (Uversky et al. 2000).

Mediante mediciones de los volumenes hidrodinámicos de distintas proteínas, globulares, desplegadas y nativamente desestrucutradas, se han encontrado las siguientes correlaciones empíricas entre el volumen hidrodinámico (V_h) de las mismas y la longitud de la cadena polipeptídica (N) (Uversky 2002):

$V_h = 4/3\ \pi\ R_S^3$	R= radio hidrodinámico medido experimentalmente
$\log (V_h^N) = (2.197 \pm 0.037) + (1.072 \pm 0.015).\ \log (N)$	V_h^N= volumen hidrodinámico de la forma nativa de la proteína
$\log (V_h^{D(GdmCl)}) = (1.723 \pm 0.041) + (1.655 \pm 0.018).\ \log (N)$	$V_h^{D(GdmCl)}$= volumen hidrodinámico de la forma desplegada de la proteína
$\log (V_h^{ND1}) = (2.46 \pm 0.13) + (1.020 \pm 0.053).\ \log (N)$ $\log (V_h^{ND2}) = (2.41 \pm 0.29) + (1.18 \pm 0.12).\ \log (N)$	V_h^{ND1} y V_h^{ND2}= volumen hidrodinámico de 2 conformaciones de la forma nativamente desestructurada de la proteína

En base a estas ecuaciones se espera que un monómero globular plegado de 187 aminoácidos como $PhaP_{Az}$ presente un diámetro hidrodinámico de 4.4 nm, mientras que un monómero nativamente desplegado de este tamaño presente un diámetro entre 6.4 y 7.6 nm y un monómero desplegado un diámetro de 8.4 nm. Esto permite establecer una cota superior de 8.4 nm para una proteína de este tamaño. El diámetro hidrodinámico de 12 nm obtenido experimentalmente es mayor que el esperado para un monómero de este tamaño en cualquiera de las conformaciones mencionadas.

La presencia de regiones desordenadas en $PhaP_{Az}$, que hacen que la proteína no tenga forma de proteína globular, no es suficiente para justificar el diámetro obtenido, lo que sugiere que la proteína no es monomérica en estas condiciones.

Para confirmar los resultados obtenidos se empleó una cromatografía de exclusión por tamaño utilizando una columna analítica Superdex 200, donde la proteína queda incluída. El volumen de elución obtenido para $PhaP_{Az}$ corresponde al de una proteína globular de 200 kDa aproximadamente (Figura 31).

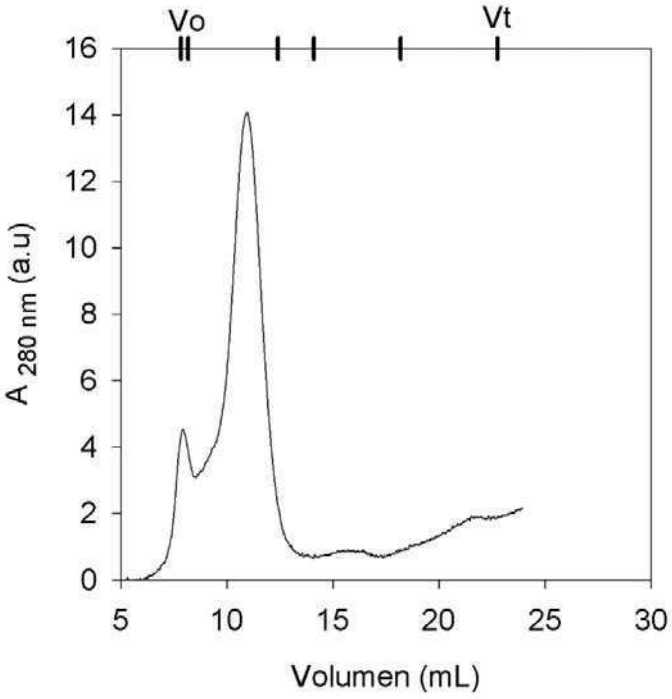


Figura 31: Perfil de elución de $PhaP_{Az}$ al utilizar una columna analítica Superdex 200. En la parte superior del gráfico se indican los volúmenes de elución de los estándares: Tiroglobulina (669 kDa), Aldolasa (144 kDa), Seroalbúmina Bovina (BSA) (67 kDa) y Mioglobina (17 kDa). El volumen de vacío (V0) y el volumen total (Vt) fueron determinados mediante la siembra de Azul Dextrano y acetona, respectivamente.

Este peso molecular corresponde a 9 monómeros, pero teniendo en cuenta la presencia de regiones desordenadas, se espera que el oligómero presente menor molecularidad.

1.4.2. Determinación de la molecularidad por Dispersión de la Luz Estática

Para determinar con mayor precisión la molecularidad del oligómero, se realizaron experimentos de Dispersión de la Luz Estática (*Static Light Scattering* o SLS, por sus siglas en inglés). Esta técnica permite determinar experimentalmente la masa molecular absoluta de una proteína en solución, mediante exposición de la

muestra a un láser de luz de baja intensidad (690 nm). La intensidad de la luz dispersada por la proteína es una función de su peso molecular.

Mediante esta técnica se obtuvo un pico correspondiente a un peso molecular de 90 kDa (Figura 32), lo que indica que la proteína es tetramérica en las condiciones ensayadas. Este resultado es compatible con el estado de oligomerización de las phasinas postulado en la literatura que corresponde a trímeros (Neumann et al. 2008) y tetrámeros (Zhao et al. 2006; Maestro et al. 2013).

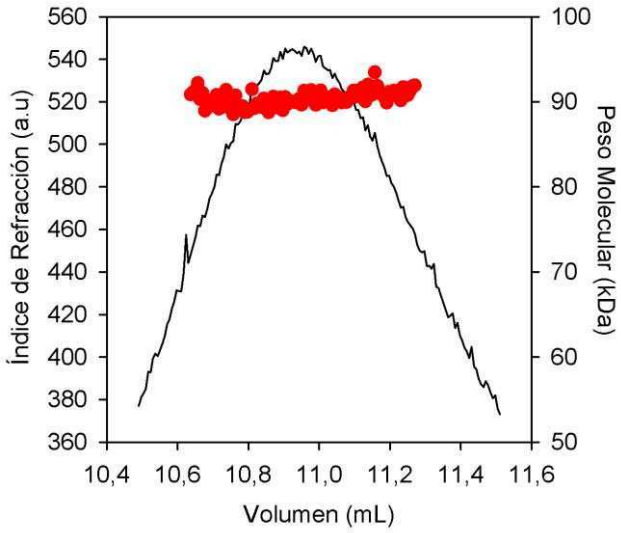


Figura 32: Pico de 90 kDa obtenido por SLS.

1.4.3. Análisis de la presencia de motivos coiled coil

Se ha postulado para otras phasinas, que el dominio de oligomerización involucra un motivo *coiled coil* de interacción entre hélices. Maestro y colaboradores (Maestro et al. 2013) dividieron a las phasinas en dos grupos según la probabilidad de contener motivos *coiled coil* calculada utilizando la herramienta "*COILS*" del ExPASy (http://www.ch.embnet.org/software/COILS_form.html):

i) Phasinas con alta probabilidad (>75%) *coiled coil*

ii) Phasinas con mediana probabilidad (25%-75%) *coiled coil*.

En este trabajo, utilizamos el software MARCOIL (Delorenzi & Speed 2002) para estudiar si estos motivos se encuentran presentes en $PhaP_{Az}$ y para determinar a

cuál de los dos grupos pertenece esta phasina. A partir de esta predicción, se determinó que $PhaP_{Az}$ forma parte del grupo de mediana probabilidad de contener motivos *coiled coil,* dado que presenta una región entre D5 y Q38 con una probabilidad máxima de interacción *coiled-coil* de 32% (Figura 33). Además, el programa predice 2 regiones de menor probabilidad: E67 a K124 con 12% y V136 a A180 con 5.4% de probabilidad máxima.

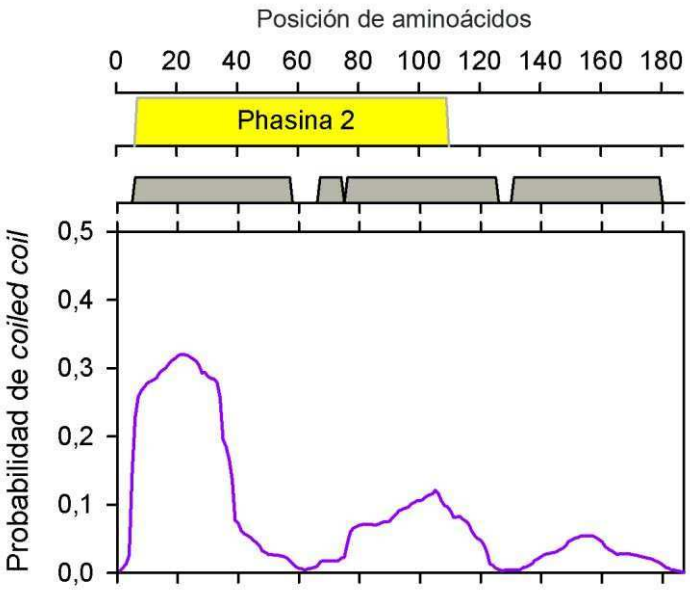


Figura 33: Probabilidad de *coiled coil* predicha por MARCOIL. En la parte superior de la figura se muestra la posición del dominio Phasina 2 (amarillo) y de las α- hélices (gris) en la secuencia aminoacídica predichas por Phyre2.

Es interesante mencionar que las regiones *coiled coil* encontradas en las distintas phasinas, se encuentran en diferentes posiciones a lo largo de la secuencia aminoacídica (Figura 34). $PhaF_{Pp}$, tiene una región con alta probabilidad de formar interacciones *coiled-coil* entre sus dos dominios y también tiene otra región con moderada probabilidad *coiled- coil* en el medio de su dominio N-terminal. $PhaP1_{Re}$, phasina que presenta un patrón de hidrofobicidad similar a $PhaP_{Az}$, también presenta una región *coiled-coil* con la misma probabilidad de ocurrencia que la de $PhaP_{Az}$, pero ubicada en el lado opuesto de la secuencia aminoacídica. Por último, PhaP de *Aeromonas hydrophila,* otra phasina incluída en la familia Phasina 2, tiene una alta probabilidad de tener secuencias *coiled-coil* a los largo de la totalidad de su secuencia.

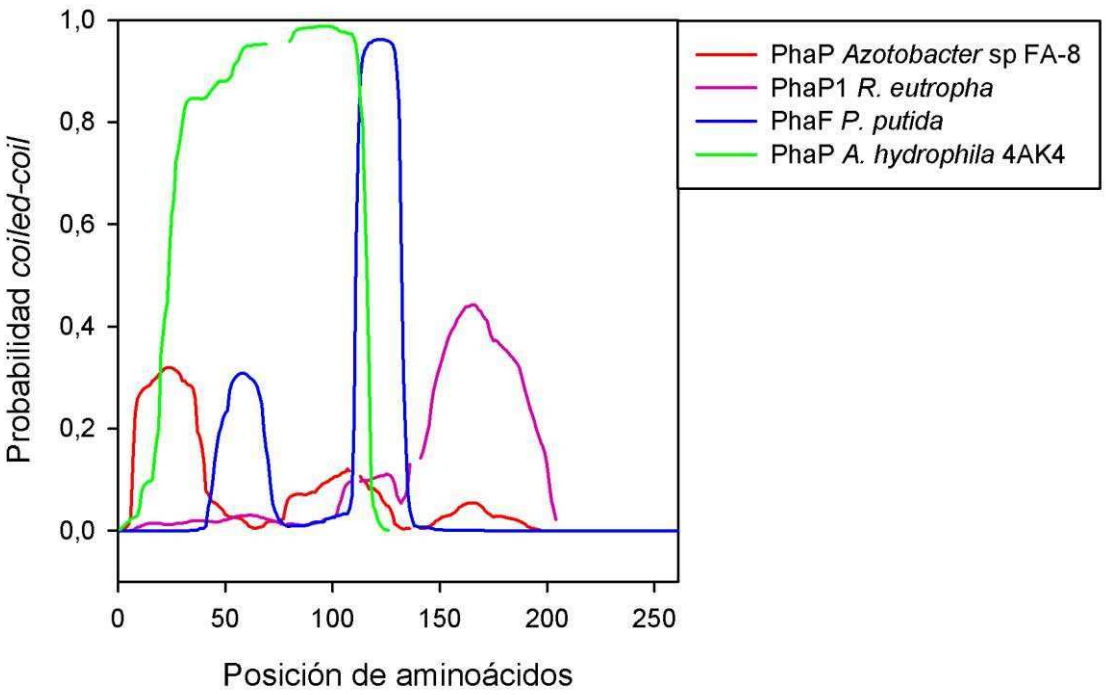


Figura 34: Probabilidad de *coiled coil* a lo largo de la secuencia aminoacídica de distintas phasinas predicha por MARCOIL.

La región con máxima probabilidad *coiled coil* podría ser propuesta como el dominio de homo-oligomerización de $PhaP_{Az}$, es decir, el dominio mediante el cual interactúan 4 monómeros en solución para formar el tetrámero obtenido mediante SLS en ausencia de otros blancos de unión.

Si esta región se analiza utilizando el algoritmo de LOGICOIL (Vincent et al. 2013), que predice la probabilidad de los estados de oligomerización posibles según los aminoácidos que componen la héptada, se obtiene una máxima probabilidad de formación de trímero y en segundo lugar tetrámero, lo que indica que estos tipos de oligómeros son que los favorecen interacciones más estables entre los residuos que forman la héptada característica de los *coiled coil*.

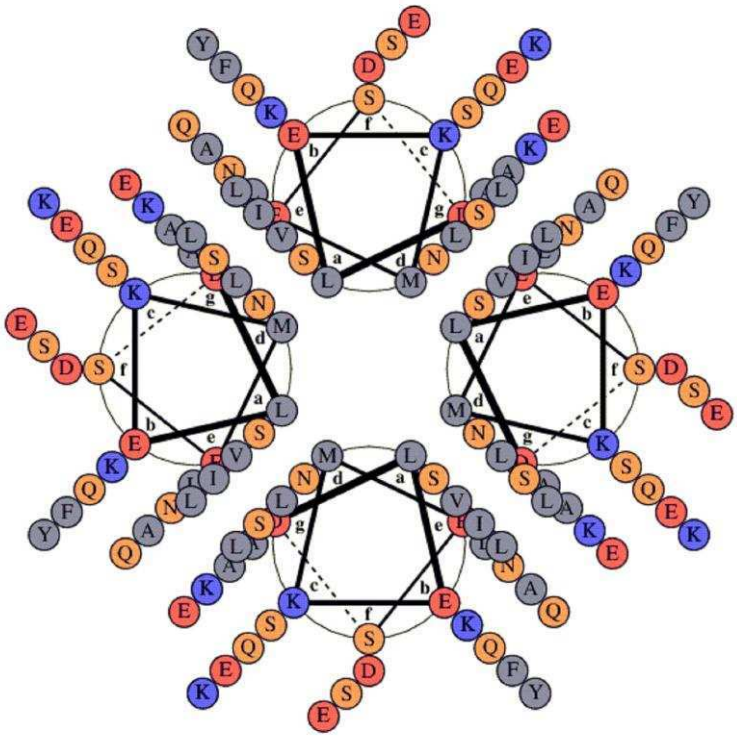


Figura 35: Diagrama de $PhaP_{Az}$ representada como un tetrámero formado por interacciones *coiled coil* entre los monómeros realizada con DRAWCOIL. Código de color según el tipo de aminoácido: gris= hidrofóbicos, naranja= hidrofílicos rojo= cagados negativamente o ácidos, y azul= cargados positivamente o básicos.

1.4.4. Desplegado térmico y químico

La desnaturalización térmica de $PhaP_{Az}$ fue monitoreada mediante CD, pudiéndose observar una transición simétrica a 222 nm, longitud de onda a la cual se lleva a cabo el mayor cambio en elipticidad (Figura 36). Al utilizar una concentración de proteína de 3 μM, la transición cooperativa, que muestra una temperatura media de desnaturalización (Tm) de 55 °C, comienza a 30°C y se completa a 65°C. El proceso de desplegado térmico no fue reversible, dado que por encima de los 65°C la proteína tiende a agregar y el espectro nativo no se recupera por completo luego de enfriar. Esta agregación podría ser causada por la exposición de aminoácidos hidrofóbicos luego del desplegado provocando interacciones inespecíficas que forman agregados insolubles. Aproximadamente a 203 nm puede observarse un punto isodicroico (misma señal de elipticidad para varias curvas a una misma longitud de onda) que coincide con el punto en el cual se cruzan los espectros canónicos de las conformaciones α- hélice y *random coil,* indicando que existe una conversión de una conformación a la otra, siendo el proceso de

desnaturalización térmica, desde oligómero plegado hasta monómero desplegado, de dos estados (Corrêa & Ramos 2009).

Al utilizar menores concentraciones de proteína, se observó una disminución en la Tm y la cooperatividad del proceso. Esta observación es consistente con el proceso de monomerización que ocurre durante el desplegado (Figura 35, izquierda).

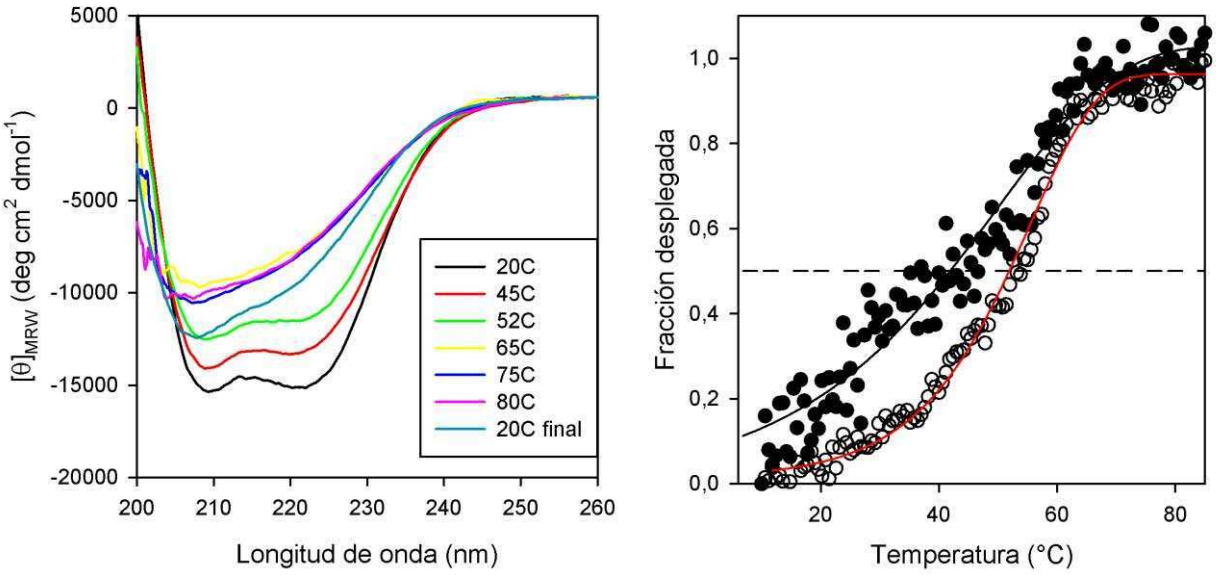


Figura 36: Derecha: Espectros de CD de $PhaP_{Az}$ a distintas temperaturas (20ºC, 45ºC, 52ºC, 65ºC, 75ºC, 80°C y posterior enfriamiento hasta 20ºC). Izquierda: Curva de desplegado térmico de $PhaP_{Az}$ (círculos blancos= 3 µM , círculos negros= 1.5 µM).

El desplegado químico de $PhaP_{Az}$ fue estudiado utilizando GdmCl como agente desnaturalizante. Los cambios en estructura secundaria observados medidos por CD, no se ajustan a un modelo de dos estados, indicando la existencia de al menos una especie intermediaria (Figura 37). Primero, ocurre una transición a 0.25 M GdmCl, luego comienza el proceso de desnaturalización que ocurre desde 0.25 hasta 5.8 M GdmCl. A 0.25 M GdmCl, el espectro de CD en el UV lejano mostró un incremento en la elipticidad negativa, lo que corresponde a un incremento en la estructura secundaria (Figura 37 B). Esto podría ser interpretado como una compactación del oligómero debido a que presenta un comportamiento más globular. No hubo cambios en la elipticidad molar entre 4.5 y 5.8 M GdmCl, pero

pequeños cambios en la señal de elipticidad indicaron que todavía permanece algún tipo de estructura residual al final de la transición.

Debido a que $PhaP_{Az}$ no presenta triptofanos (que pueden ser utilizados para monitorear cambios en la estructura terciaria/cuaternaria de la proteína), se utilizó el compuesto 8- anilinonaftaleno-1- ácido sulfónico (*8-Anilinonaphthalene-1-sulfonic acid* o ANS, por sus siglas en inglés) como sonda para realizar experimentos de fluorescencia que nos permitiesen analizar en mayor detalle los cambios que ocurren durante el proceso de desnaturalización química. El colorante ANS presenta diferentes posiciones de los máximos de sus espectros de emisión y diferentes intensidades de fluorescencia según la polaridad del entorno y su unión a superficies hidrofóbicas (Slavik 1995). Los cambios en la estructura terciaria/cuaternaria observados, presentaron un comportamiento bifásico (Figura 37 B y C).

La especie compactada formada a 0.25 M GdmCl presentó un dramático incremento en fluorescencia acompañado por un corrimiento al azul del espectro, que refleja que el ANS se encuentra en un entorno más hidrofóbico. A medida que aumenta la concentración de GdmCl, la intensidad de emisión de fluorescencia disminuye y el espectro se corre hacia el rojo, mostrando que el ANS se encuentra en un entorno más hidrofílico. Hacia el final de la curva, el espectro alcanzó un valor de 513 nm, valor cercano a los 520 nm obtenidos en solución buffer, indicando que ANS se encuentra expuesto al entorno acuoso casi en su totalidad.

La comparación de las medidas de CD y espectrometría de fluorescencia con ANS mostraron que mientras la estructura secundaria llegó a un *plateau* a 4.5 M GdmCl, el cambio en la estructura terciaria/cuaternaria se completó casi en su totalidad a 2 M GdmCl, indicando que luego de la formación del intermediario compacto a 0.25 M GdmCl, la proteína requiere menor cantidad de GdmCl para perder su estructura terciaria/cuaternaria por completo (Figura 37 B).

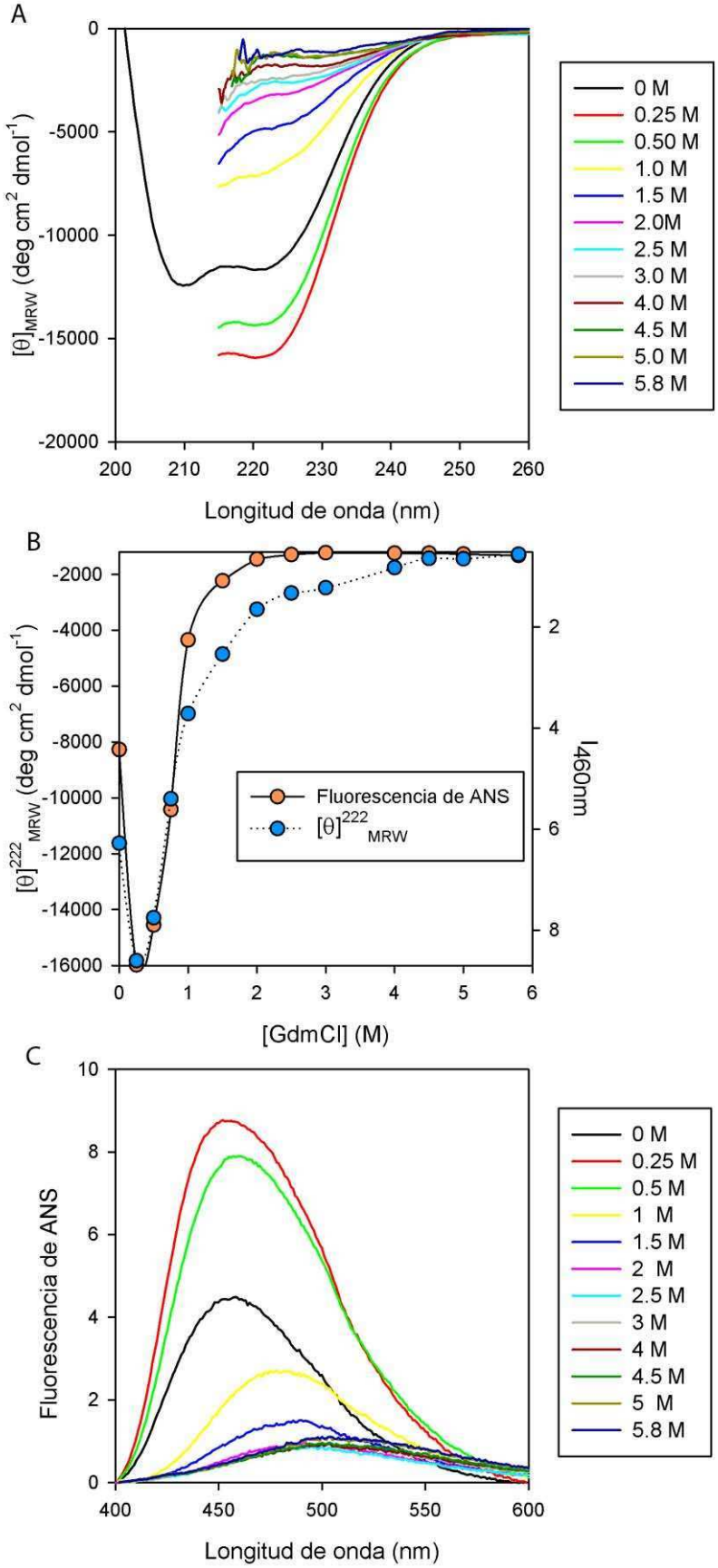


Figura 37: Cambios en la estructura secundaria y terciaria/cuaternaria de $PhaP_{Az}$ (A) Espectros de CD de $PhaP_{Az}$ (3 µM) en *buffer P* a diferentes concentraciones de GdmCl (B) Desplegado químico de PhaP monitoreado por espectroscopía de fluorescencia (●) Fluorescencia de la sonda ANS en función de la concentración de GdmCl (●) Elipticidad molar a 222 nm en función de la concentración de GdmCl. (C) Espectros de fluorescencia de ANS unida a PhaP tratada con diferentes concentraciones de GdmC

1.4.5. Cromatografía de Exclusión por Tamaño (SEC) de la proteína desnaturalizada químicamente

Por último, realizamos experimentos de SEC de una muestra proteica incubada con 6M GdmCl, utilizando una columna Superdex 200 analítica para determinar si la proteína presentaba un cambio de tamaño compatible con los resultados obtenidos luego del proceso de desplegado. Como se muestra en la Figura 38, la muestra desnaturalizada químicamente eluyó a un volumen mayor que la proteína plegada, indicando que su tamaño disminuyó luego del desplegado. El volumen de elución de la proteína desplegada corresponde a un diámetro hidrodinámico de 8.9 nm. Este valor es consistente con el esperado (8.4 nm) para una proteína desnaturalizada de 21 kDa (Uversky 2002). Estos resultados nos permiten concluir que la proteína se encontraba monomérica al final del proceso de desnaturalización química.

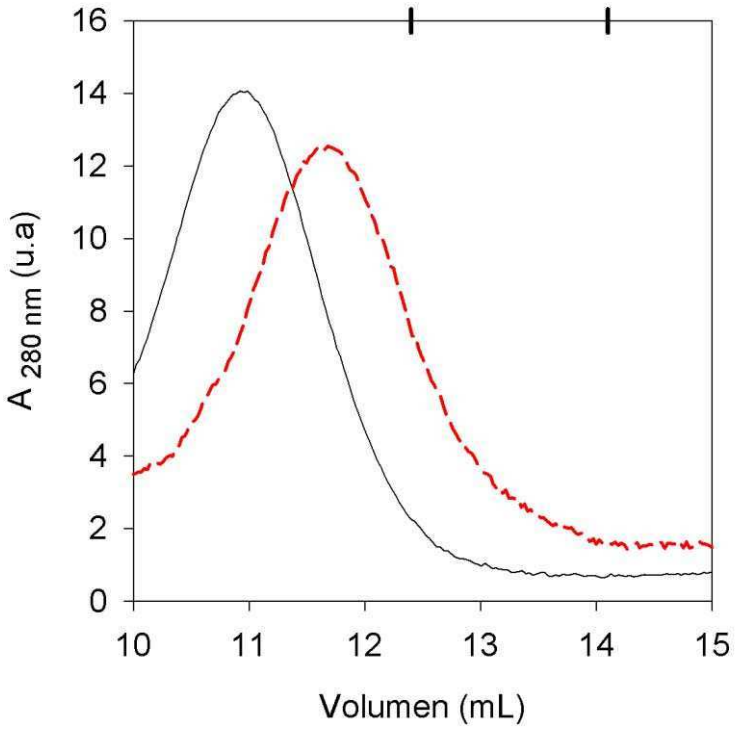


Figura 38: Perfil de elución de $PhaP_{Az}$ nativa (línea econtinua) y $PhaP_{Az}$ químicamente desplegada (línea punteada) en una columna Superdex 200.

Capítulo II:

Efectos fisiológicos de $PhaP_{Az}$ en *E. coli* recombinante

En base a los resultados obtenidos en experimentos previos realizados en el laboratorio, se postuló que $PhaP_{Az}$ podría tener funciones de chaperona. Esta hipótesis se analizó utilizando distintos enfoques. Uno de ellos se orientó a analizar el comportamiento de $PhaP_{Az}$ dentro de las células, analizando su localización y su interacción con otros componentes celulares, y un segundo enfoque se centró en el análisis de su actividad chaperona mediante el estudio del rol de esta proteína en la agregación y replegado de proteínas *in vitro* y en la formación de cuerpos de inclusión *in vivo*.

2.1. Localización subcelular de PhaPAz en *E. coli* recombinante

Con el objeto de investigar la localización de $PhaP_{Az}$ de *Azotobacter* sp. FA8 en cepas de *E. coli* por microscopía de fluorescencia, construimos el plásmido pACP-GFP que porta una fusión de GFP a $PhaP_{Az}$ en el extremo C- terminal de la phasina.

La fusión *$phaP_{Az}$-gfp* se construyó sintéticamente (ver Materiales y Métodos) y fue clonada en el vector pACYCDuet-1, en el MCS 2 bajo un promotor T7lac (promotor T7 seguido de una secuencia operadora *lac*), obteniéndose el plásmido pACP-GFP (Figura 39).

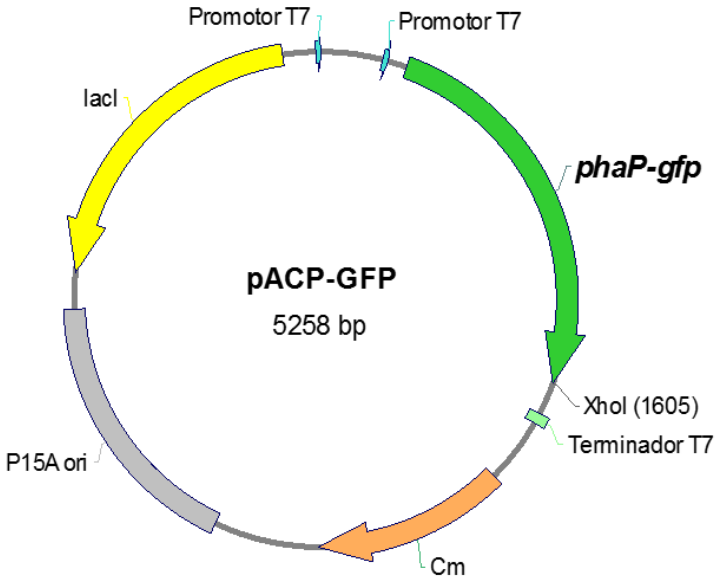


Figura 39: Esquema del plásmido pACP-GFP que expresa la fusión *$phaP_{Az}$-gfp* a partir de un promotor T7.

El plásmido pACP-GFP fue introducido por transformación en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) que expresa la polimerasa del fago T7 a partir de un promotor lac,

inducible por IPTG. Dicha polimerasa permite la expresión de genes clonados bajo el promotor T7. La construcción fue verificada por secuenciación.

Mediante la técnica de SDS-PAGE se logró observar una banda de sobreexpresión del peso molecular esperado (~48 kDa).

2.1.1. Localización de PhaP$_{Az}$ en presencia de PHB

2.1.1.1. Estudio de la localización intracelular de PhaP$_{Az}$-GFP por microscopía de fluorescencia

Para estos experimentos, utilizamos la cepa PHB-L21, que lleva los genes *phb* de *R. eutropha* bajo el control del promotor Ptrc, integrado en el cromosoma por transposición, transformada con el plásmido pACP-GFP. La capacidad de la proteína de fusión de unirse a gránulos de PHB fue verificada por observación microscópica de gránulos purificados y por el análisis de proteínas asociaciadas a los mismos. Se observó una intensa fluorescencia verde en los gránulos purificados y una intensa banda correspondiente a la proteína de fusión al analizar las proteínas asociadas a gránulos por SDS-PAGE (Figura 40), indicando que PhaP$_{Az}$-GFP es capaz de unirse a los gránulos de polímero, manteniendo su función de phasina.

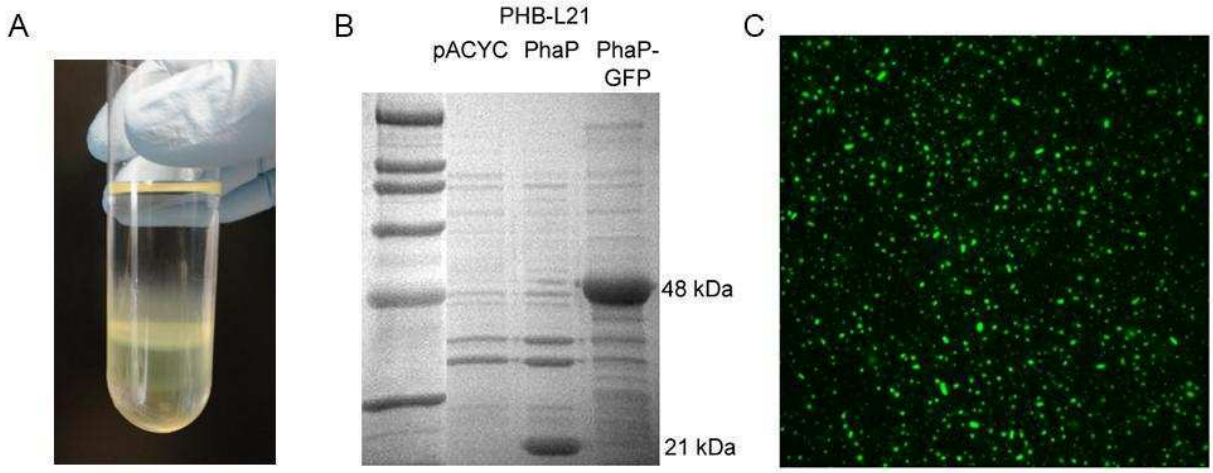


Figura 40: A) Fracción PHB en el gradiente de glicerol. B) Proteínas que copurifican con los gránulos de PHB. C) PhaP$_{Az}$-GFP unida a los gránulos de PHB purificados vistos al microscopio de fluorescencia.

La localización intracellular de la proteína de fusión en *E. coli* productora de PHB se analizó para investigar si era capaz de interactuar con los gránulos *in vivo*, y si la localización en los recombinantes es similar a la descripta previamente en productores naturales del polímero. Los gránulos de PHB se tiñeron con el colorante Rojo de Nilo, con lo que pudieron ser visualizados utilizando microscopía de fluorescencia al igual que la proteína de fusión.

Luego de 24 hrs de inducción, se observa una fuerte fluorescencia verde en todas las células, mientras que la fluorescencia roja era variable debido a la unión del colorante al PHB, resultando en bajas intensidades de fluorescencia para algunas células. En las células donde los gránulos de PHB eran más visibles, se observó que $PhaP_{Az}$ colocalizaba con el polímero (Figura 41). Este resultado verifica que $PhaP_{Az}$ interactúa con los gránulos de PHB tal como fue reportado en estudios previos realizados en el laboratorio (Pettinari et al. 2003).

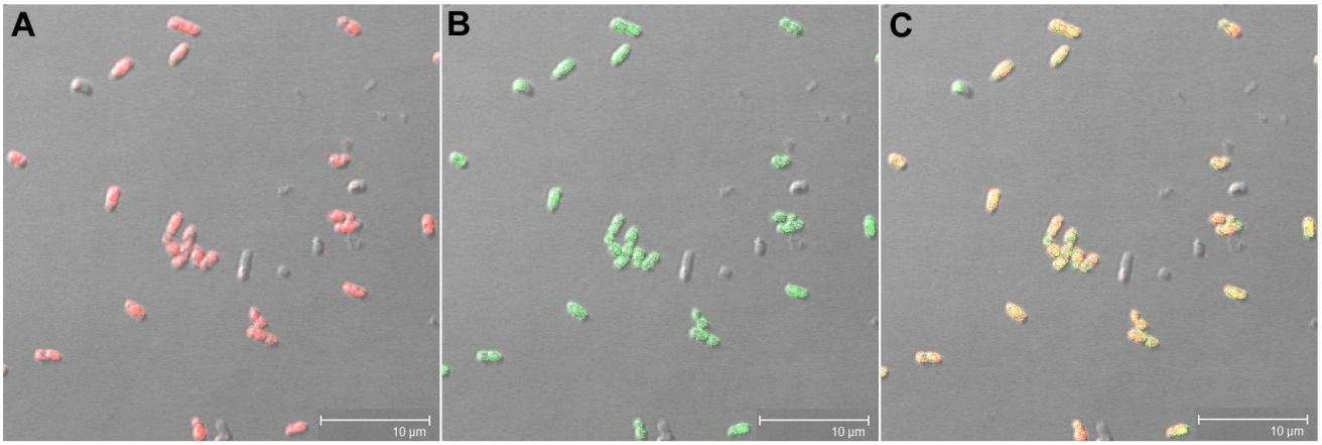


Figura 41: Cultivos de 24 hrs de la cepa PHB-L21/pACP-GFP de *E. coli* que coproduce PHB y $PhaP_{Az}$.

2.1.1.2. Estudio de la localización de $PhaP_{Az}$ por Microscopía de Transmisión Electrónica

Para analizar en mayor detalle la localización intracelular de $PhaP_{Az}$ en una cepa de *E. coli* productora de PHB, utilizamos la técnica de TEM (Microscopía de transmisión Electrónica, por sus siglas es inglés).

Para los experimentos de esta sección y la siguiente, se construyó el plásmido pACP (Figura 42) que expresa *phaP*$_{Az}$ a partir de un promotor T7:

El gen *phaP*$_{Az}$ se amplificó por PCR utilizando como templado el plásmido pRX23 a partir de los siguientes *primers* PhaP$_{Az}$ F BamHI y PhaP$_{Az}$ R XhoI (ver Materiales y Métodos)

El producto de amplificación fue clonado direccionalmente en el vector pACYCDuet-1, utilizando los sitios BglII y XhoI del MCS 2. La construcción fue verificada por secuenciación.

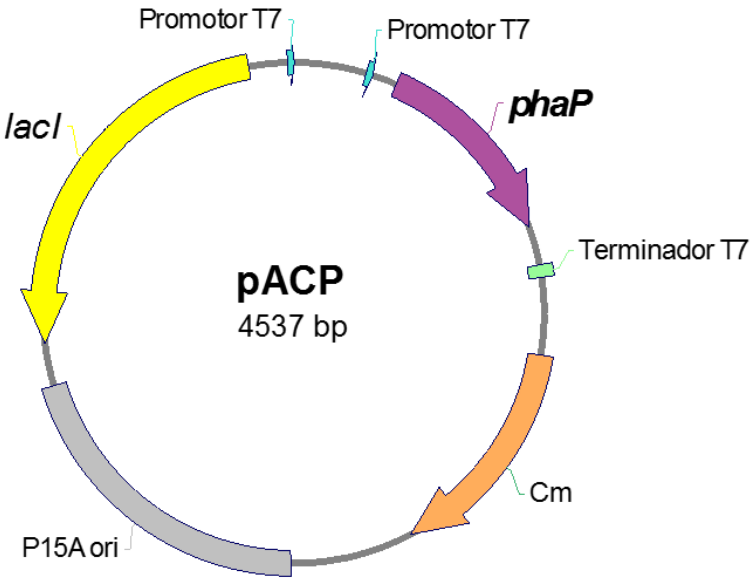


Figura 42: Esquema del plásmido pACP que expresa *phaP*$_{Az}$ a partir de un promotor T7.

La cepa PHB-L21 fue transformada con el plásmido pACP o con el vector pACYCDuet-1 vacío. Luego de 24 hrs de cultivo, se analizó la morfología celular y el tamaño, número y distribución de los gránulos de PHB en ambas cepas. Se observó que al coproducir PhaP$_{Az}$ con el polímero, la morfología de las células cambiaba con respecto a la cepa productora de PHB que no expresa *phaP*$_{Az}$. En particular, se observó que aumenta la longitud de las células, aunque no se observaron diferencias apreciables en la distribución de gránulos (Figura 43).

Se ha reportado que la phasina PhaF$_{Pp}$ interviene en la distribución de los gránulos a las células hijas durante la división celular y que es capaz de interactuar con el DNA en *P. putida* (Galán et al. 2011). Dado que en nuestros experimentos no se ha observado una distribución más homogénea de los gránulos al expresar

$PhaP_{Az}$, no es posible adjudicar a esta proteína una función en el proceso de partición de los gránulos durante la división celular. Se debe tener en cuenta que $PhaF_{Pp}$ posee un dominio tipo histona, de interacción con el DNA, que no está presente en $PhaP_{Az}$, por lo cual es probable que esta phasina no este involucrada en la distribución de gránulos de polímero en *Azotobacter* sp. FA8.

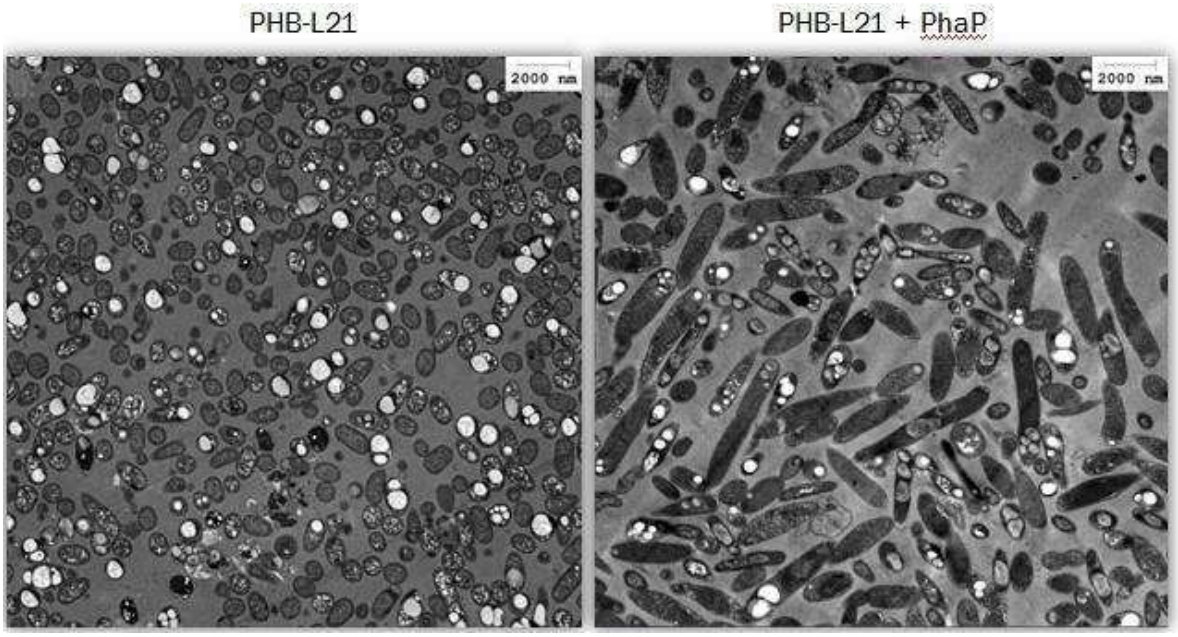


Figura 43: Imágenes de TEM de la cepa PHB-L21 que no produce (izquierda) y que produce $PhaP_{Az}$ (derecha).

2.1.2. Localización de $PhaP_{Az}$ en ausencia de PHB

A continuación, analizamos por microscopía de fluorescencia la localización de $PhaP_{Az}$ en células de *E. coli* BL21(DE3) que no sintetizan PHB, transformada con pACP-GFP. Al estudiar la localización intracelular de $PhaP_{Az}$ en estas células, se observó una distribución uniforme de la fluorescencia durante las primeras 3 hrs de inducción con IPTG, indicando una localización soluble de $PhaP_{Az}$-GFP en el citoplasma (Figura 44 A).

Luego de 4 horas de inducción, se observó que $PhaP_{Az}$-GFP migraba a los polos de las células y a los septos de las células en división, localización que se mantuvo aún hasta las 24 horas post inducción (Figura 44 B). Este comportamiento fue descripto previamente para las phasinas de *Ralstonia eutropha* (PhaP1-5) en

mutantes *phb*-. En estas células que expresaban fusiones de las distintas phasinas, se observaron *foci* fluorescentes cerca de los polos celulares, que se atribuyeron al alto potencial de oligomerización de estas phasinas (Pfeiffer & Jendrossek 2012).

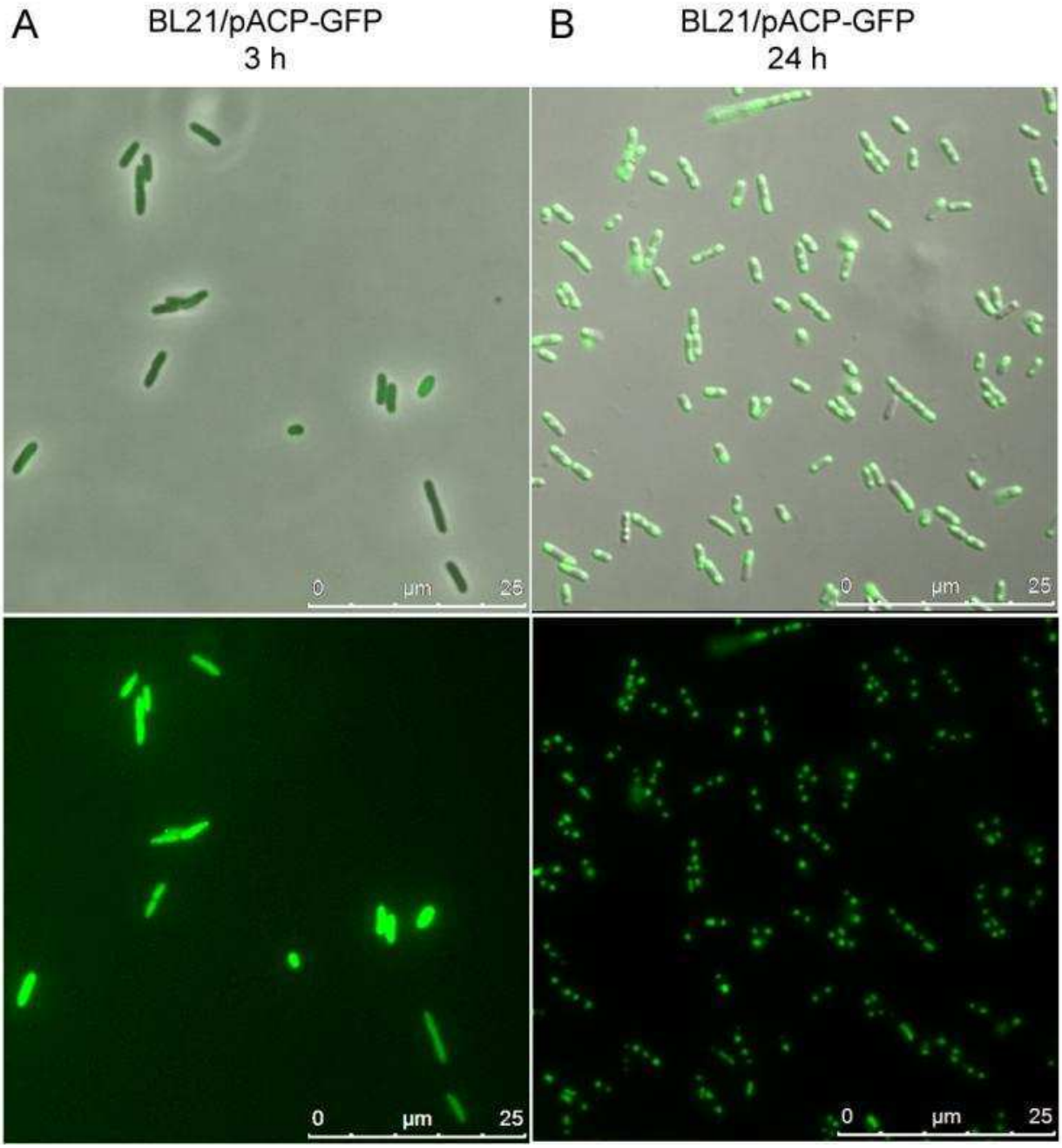


Figura 44: Localización celular de $PhaP_{Az}$-GFP en cepas que no producen PHB. Arriba: imágenes de transmisión superpuestas con fluorescencia. Abajo: imágenes de fluorescencia. A) Células luego de 3 hrs post inducción con IPTG 0.1 mM. B) Células luego de 24 hrs post inducción con IPTG 0.1 mM.

2.2. Rol de $PhaP_{Az}$ en el plegado de proteínas y la formación de cuerpos de inclusión

Experimentos previos del grupo indicaron un rol protector de $PhaP_{Az}$ durante estrés térmico y mostraron que el nivel de expresión de genes relacionados con choque térmico era menor en cepas que expresaban *phaP*$_{Az}$ (de Almeida et al. 2011). En conjunto, estos resultados sugieren que $PhaP_{Az}$ podría tener actividad chaperona.

2.2.1. Determinación de la actividad chaperona de $PhaP_{Az}$ in vitro

Para estudiar si $PhaP_{Az}$ presenta actividad chaperona *in vitro*, se realizaron experimentos de desnaturalización térmica y química utilizando la enzima citrato sintasa dimérica (CS) como proteína modelo en presencia de $PhaP_{Az}$.

La incubación de la CS a 45°C produce una lenta agregación de la enzima en ausencia de aditivos. La formación de estos agregados macromoleculares puede monitorearse midiendo la absorbancia a 360 nm. Este comportamiento de la CS constituye la base de los ensayos de actividad chaperona *in vitro* (Buchner et al. 1998). Por el contrario, se espera que $PhaP_{Az}$ retenga gran parte de su estructura secundaria a 45°C, dado que esta temperatura se encuentra por debajo de su Tm (55.5°C).

El agregado de $PhaP_{Az}$ previo al tratamiento térmico de la muestra que contiene CS no sólo frena el preceso de agregación, sino que también disminuye la cantidad de agregados formados (Figura 45). Este efecto es aún más evidente al ir aumentando la relación molar $PhaP_{Az}$:CS, siendo despreciable la cantidad de agregados insolubles formados a $PhaP_{Az}$:CS altas. Se ha reportado en la literatura que el agregado de BSA como una proteína control sin actividad chaperona no previene la formación de agregados de CS (Alonso et al. 2006).

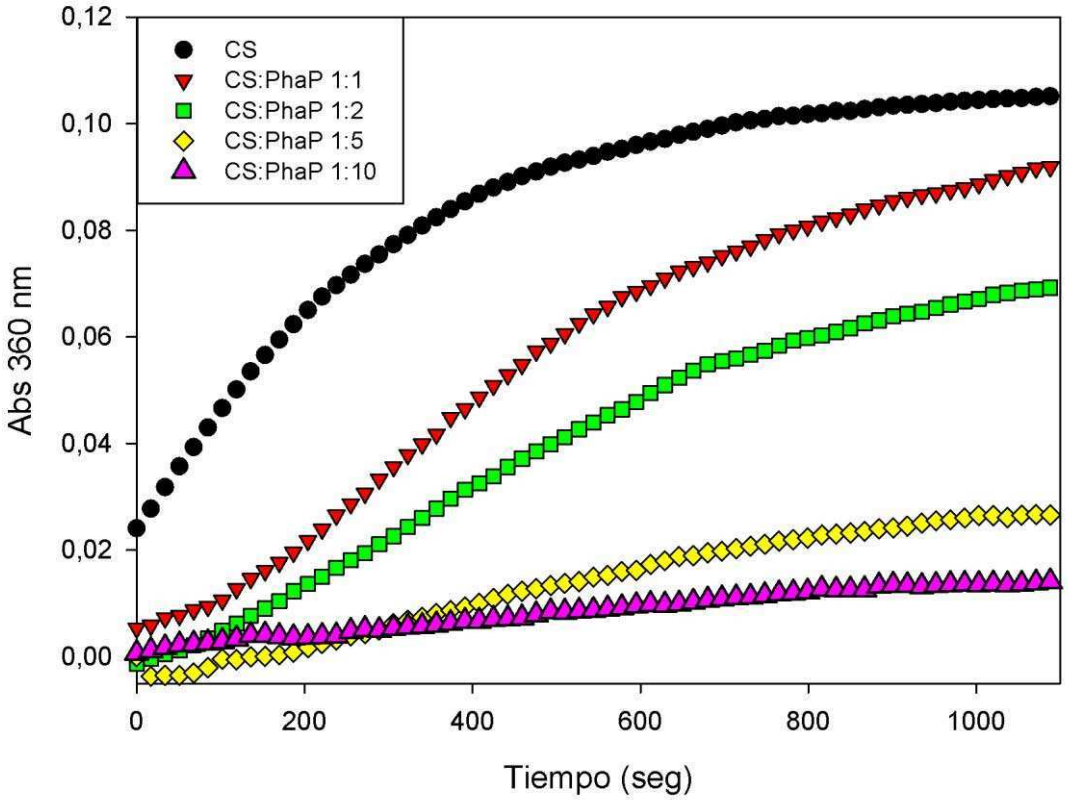


Figura 45: Curvas de agregación de la CS en presencia de distintas relaciones molares de $PhaP_{Az}$

Un experimento control en el que se analizó la dispersión de la luz producida por una muestra conteniendo solo phasina reveló que la proteína por sí sola no forma agregados, dado que no se detecta dispersión a 360 nm. El estado de plegado de $PhaP_{Az}$ en las condiciones del ensayo de actividad chaperona *in vitro* fue analizado por CD, revelando que entre un 50-65% de la proteína retiene su estructura secundaria luego de la incubación a 45 °C durante 30 min (Figura 46). Luego de enfriar la muestra, la proteína recuperó un 90% de su estructura (aunque el espectro obtenido no es idéntico al inicial, lo que puede deberse a la presencia de una mezcla que contenga proteína plegada y mal plegada). Los resultados obtenidos en los experimentos de dispersión de la luz y CD indicaron que $PhaP_{Az}$ no forma agregados en las condiciones ensayadas y retiene parte de su estructura.

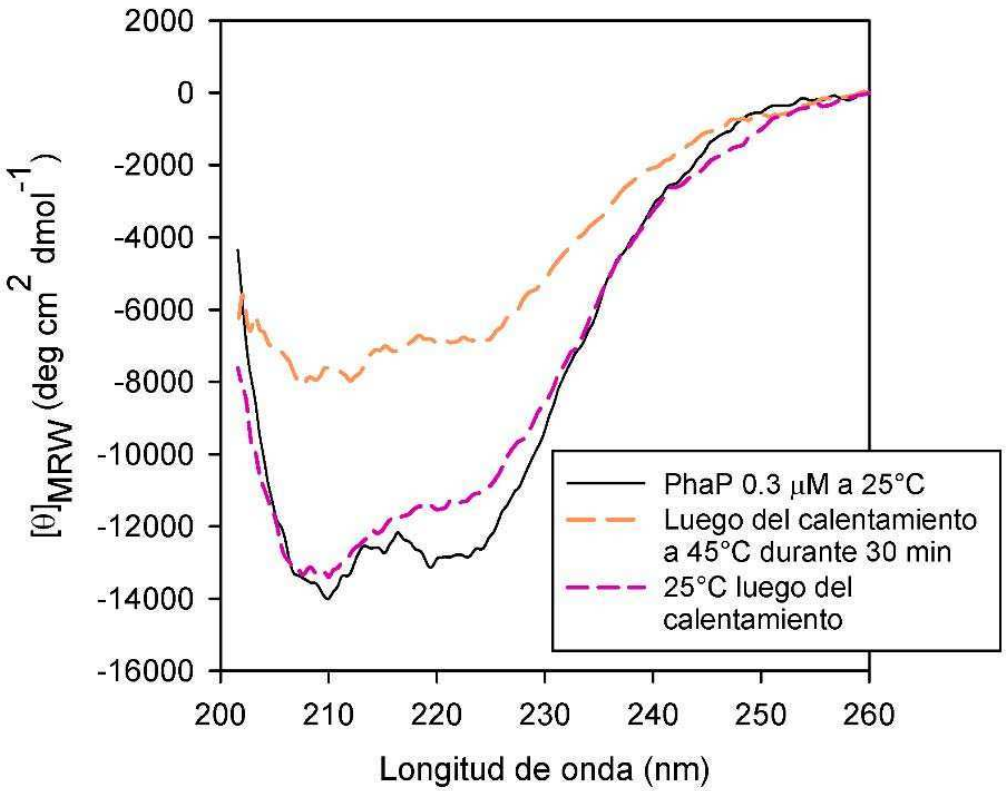


Figura 46: Espectro de CD de $PhaP_{Az}$ en las condiciones del experimento de actividad chaperona *in vitro*: espectro inicial de la proteína 0.3 µM a 25 ºC, luego del calentamiento a 45 °C durante 30 min y luego de enfriarla hasta 25 °C nuevamente.

A continuación, se realizaron experimentos de espectrometría de fluorescencia para estudiar el estado de plegado de la CS luego del tratamiento con $PhaP_{Az}$. Es importante mencionar que la CS presenta triptofanos en su secuencia aminoacídica. Los triptofanos pueden ser utilizados para estudiar el proceso de plegado de la proteína debido a que presentan propiedades intrínsecas de fluorescencia que los hacen sensibles a cambios en el entorno, en particular a los cambios que ocurren cuando la proteína se pliega o desnaturaliza. Por otro lado, $PhaP_{Az}$ no presenta ningún triptofano en su secuencia. Esta observación nos permitió estudiar el estado de plegado de CS tanto en ausencia como en presencia de $PhaP_{Az}$, analizando el espectro de fluorescencia de CS a 25 °C y a 45 ºC. Como control de proteína desplegada, se utilizó una muestra tratada con GdmCl 6M. Se espera que el espectro de la proteína desnaturalizada se desplace hacia el mayores longitudes de onda debido a la exposición de los triptófanos al solvente.

Observamos que el espectro de fluorescencia de la CS a 45 °C en presencia de $PhaP_{Az}$ corresponde al espectro de la forma nativa de la enzima, indicando que la misma se encuentra plegada luego del tratamiento a 45 °C en presencia de $PhaP_{Az}$ (Figura 47).

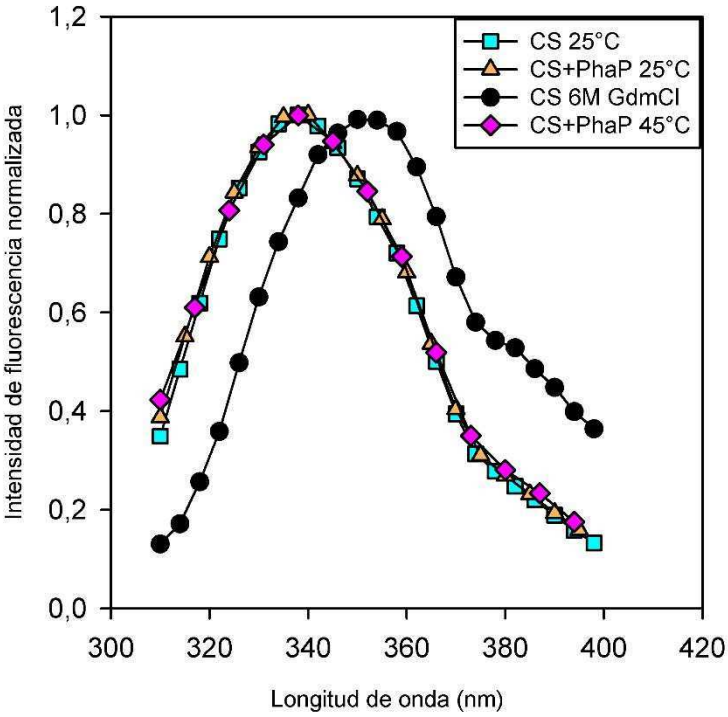


Figura 47: Espectros de fluorescencia de CS en presencia y ausencia de $PhaP_{Az}$ antes y después del tratamiento térmico.

Otra forma de probar actividad chaperona *in vitro* es midiendo la capacidad de evitar la agregación espontánea que ocurre al diluir la CS previamente desnaturalizada mediante agentes químicos, en una condición de replegado (Buchner et al. 1998).

El tratamiento con GdmCl 6 M produce la desnaturalización de la CS, pero la alta concentración del agente desnaturalizante mantiene a las moléculas de proteína desplegada en solución. Cuando la CS desnaturalizada por incubación con 6M GdmCl fue diluída cien veces en un buffer sin agentes desnaturalizantes en ausencia de $PhaP_{Az}$, se observó que la enzima agrega lentamente. Si la dilución se realiza en presencia de $PhaP_{Az}$, se observa que la formación de agregados disminuye tanto en velocidad como en cantidad final (Figura 48).

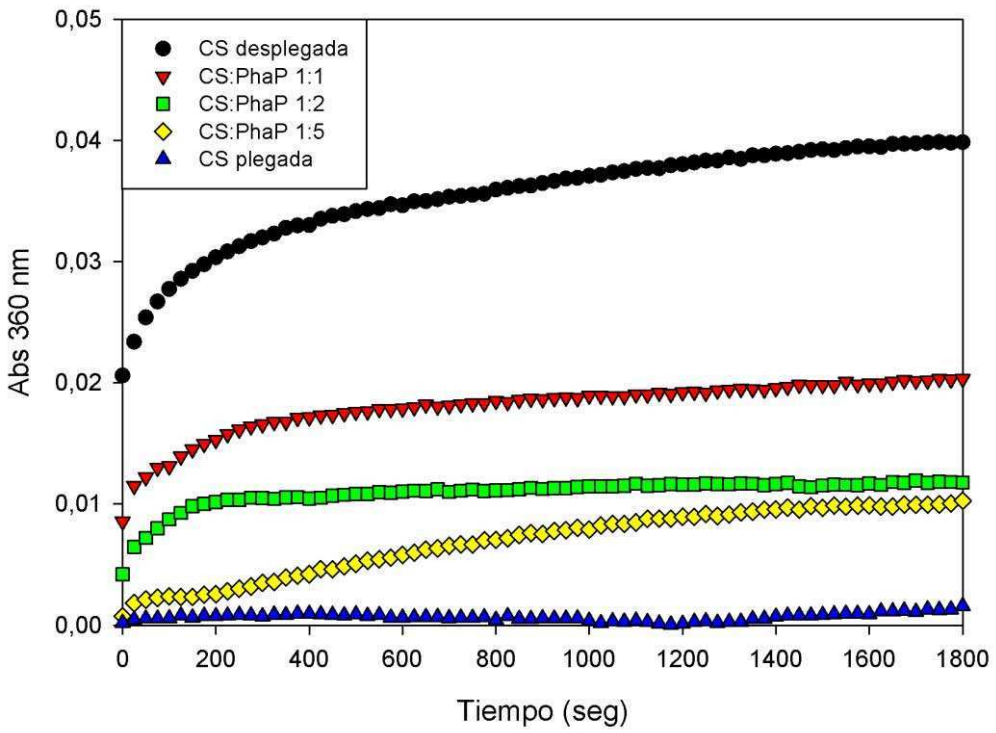


Figura 48: Curvas de agregación de la CS previamente desplegada mediante tratamiento con GdmCl en presencia de distintas concentraciones de $PhaP_{Az}$.

Estos resultados indican que $PhaP_{Az}$ evita la desnaturalización térmica de la CS y que también posee la habilidad de mantenerla soluble cuando está desplegada, ayudando en el proceso de renaturalización.

A partir de estos resultados, puede concluirse que $PhaP_{Az}$ presenta actividad chaperona *in vitro,* dado que evita la formación de agregados térmicos y químicos de CS.

2.2.2. Determinación de la actividad chaperona in vivo

2.3.2.1. Rol de $PhaP_{Az}$ en la formación de IB

Con el objetivo de estudiar si $PhaP_{Az}$ evita el plegado incorrecto de proteínas y la formación de cuerpos de inclusión *in vivo*, construímos una cepa de *E. coli* recombinante que coproduce $PhaP_{Az}$ y PD, un dominio insoluble de la proteína TolR de *Azoarcus* sp. CIB. Elegimos esta proteína como modelo, dado que forma cuerpos de inclusión de gran tamaño al ser sobreexpresada en *E. coli*, pudiendo ser

fácilmente detectados mediante microscopía de transmisión electrónica (TEM). Este sistema nos permitió estudiar la actividad chaperona de $PhaP_{Az}$ *in vivo,* mediante el análisis del rol que esta phasina juega en el equilibrio entre plegado y agregación de proteínas y la dinámica de formación de cuerpos de inclusión. Como control positivo de actividad chaperona, construimos una cepa que coproduce PD y GroELS, una chaperona conservada y ampliamente estudiada.

Los cuerpos de inclusión de PD pudieron ser detectados por contraste de fases y también por TEM como cuerpos intracelulares densos y de gran tamaño (Figura 49).

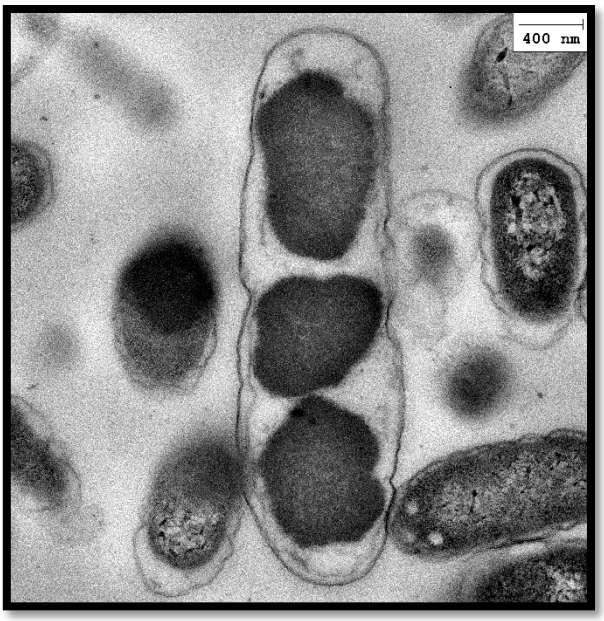


Figura 47: Imagen de TEM de una célula de *E. coli* con cuerpos de inclusión.

Las células que presentaban IB eran de gran tamaño, presentaban una forma irregular y contenían entre 1 y 3 IB por célula. Sólo fueron consideradas las células que estaban totalmente visibles en el campo del microscopio y cuya relación ancho/largo era aproximadamente 1:2, indicando una sección longitudinal y descartando las células cortadas transversalmente cuyo contenido celular no puede estudiarse en su totalidad. Al coexpresar PD con $PhaP_{Az}$, el número total de células conteniendo IB disminuyó y la morfología celular cambió, dado que las células tenían una forma más regular (Figura 50 B). Estos resultados indican que $PhaP_{Az}$

evita la formación de IB en *E. coli* de una forma similar a GroELS, evidenciando el rol de $PhaP_{Az}$ como chaperona *in vivo*.

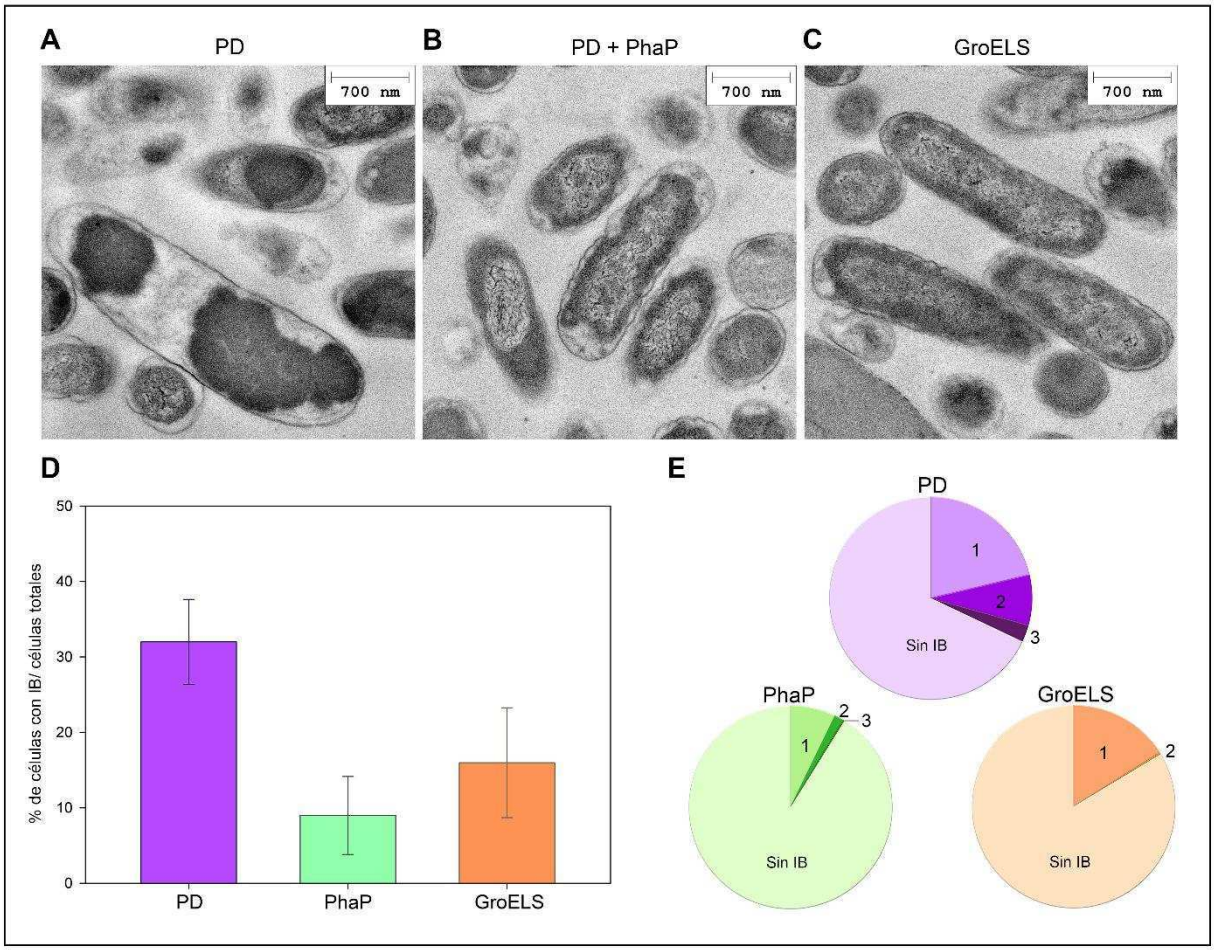


Figura 48: A, B y C) Imágenes de TEM de cepas de *E. coli* que producen PD, PD+$PhaP_{Az}$ y PD+GROELS. D y E) Cuantificación de células de las distintas cepas que presentan cuerpos de inclusión.

2.3.2.2. Interacción de $PhaP_{Az}$ con IB

Para estudiar la interacción entre $PhaP_{Az}$ y cuerpos de inclusión, se realizaron experimentos de microscopía de fluorescencia utilizando la cepa BL21(DE3) transformada con el plásmido pACP-GFP que porta la fusión $PhaP_{Az}$-GFP y pPD, que expresa la proteína PD.

Las proteínas que se encuentran formando parte de los IB no se encuentran correctamente plegadas y debido a su estado de agregación, exponen residuos hidrofóbicos al entorno. Como los gránulos de PHB pueden ser teñidos con Rojo de Nilo debido a su hidrofobicidad, analizamos la posibilidad de teñir los IB de la

misma forma para poder ser visualizados por esta técnica. Fue posible detectar los IB utilizando una concentración diez veces más alta que la utilizada para teñir los gránulos de PHB. Estos experimentos mostraron que luego de 2 horas post inducción, $PhaP_{Az}$-GFP colocaliza con los IB de PD, indicando que $PhaP_{Az}$ se une a los IB *in vivo* (Figura 51). Se cuantificó la colocalización observada utilizando los coeficientes M1 y M2 de Manders que permiten calcular la proporción de la intesidad de fluorescencia en cada canal que coincide con cierta intensidad en el otro canal. Los coeficientes de colocalización M1/M2 fueron M1= 0,939±0,037 y M2=0,692±0,098, siendo M1 la fracción de verde que solapa con el rojo y M2 la fracción de rojo que solapa con el verde, indicando que $PhaP_{Az}$ interactúa con los IB *in vivo*.

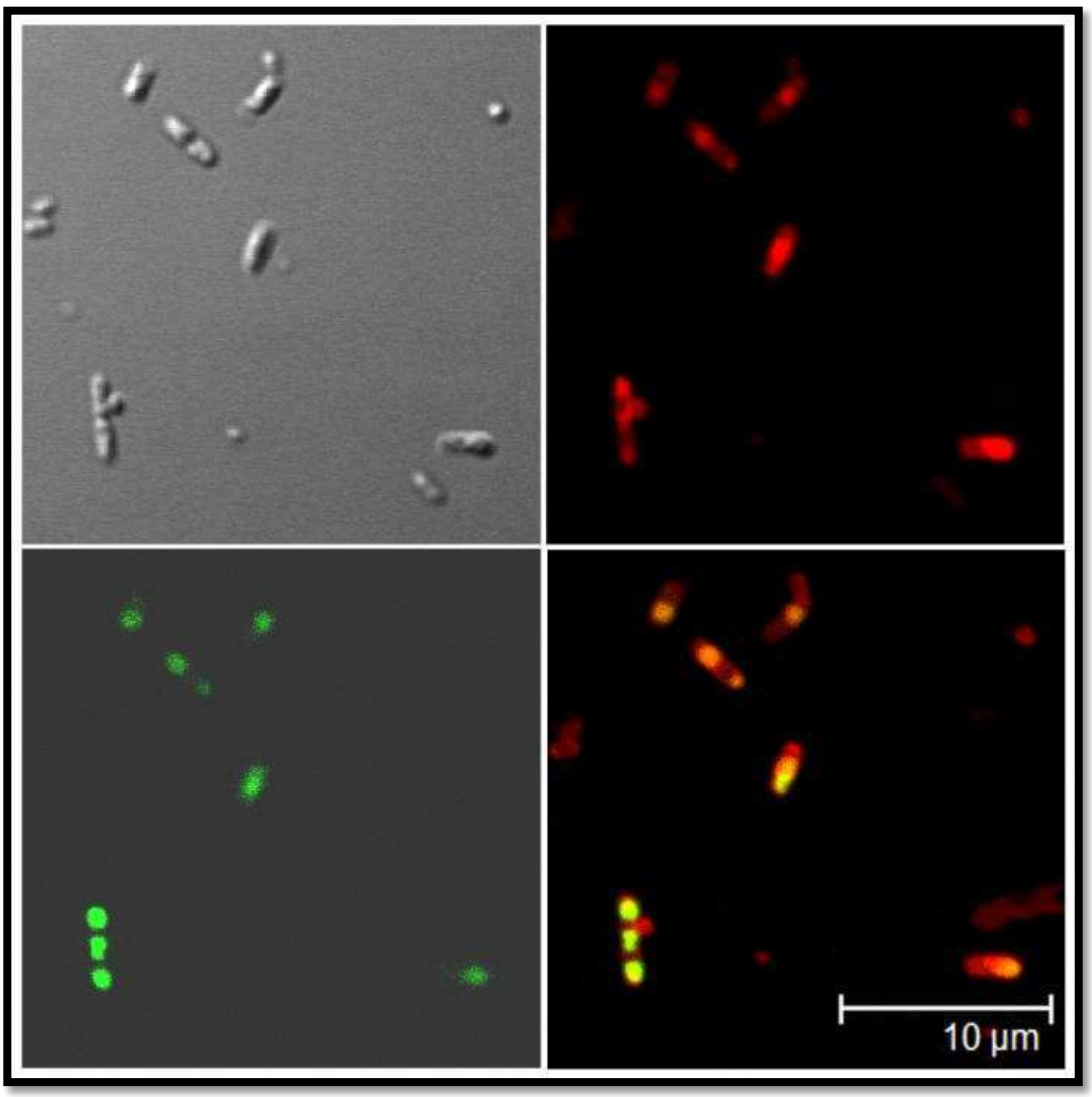


Figura 49: Colocalización de $PhaP_{Az}$-GFP con los cuerpos de inclusión de PD.

Discusión

Los PHA actúan como sustancia de reserva de carbono y energía en productores naturales y juegan un rol importante en la protección a estrés y en la supervivencia bacteriana. Este efecto protector de los PHA ha sido tradicionalmente atribuido a su capacidad de proveer energía y poder reductor para los procesos de respuesta a estrés (Khadouri 2005). Dentro de las proteínas asociadas a gránulos de PHA, las phasinas constituyen un grupo muy diverso, y aunque todas parecen tener un rol estructural en la superficie del gránulo, algunas de las pocas phasinas que fueron estudiadas en detalle revelaron diversas funciones adicionales.

Se ha observado que en los organismos que producen naturalmente PHA, la ausencia de phasinas provoca una disminución en la cantidad de polímero. Por otro lado, en experimentos realizados en *E. coli* recombinante se ha observado que en presencia de phasinas tales como PhaP1 de *R. eutropha* y $PhaP_{Az}$, aumenta tanto la acumulación del polímero como el crecimiento celular. Una posible explicación para este fenómeno podría ser que en ausencia de phasinas, el polímero podría interactuar con componentes de la maquinaria de síntesis proteica, afectando de esta forma la producción de proteínas y en particular la de enzimas necesarias para la síntesis de PHA. Por otro lado, Han y colaboradores observaron que la síntesis (o acumulación) de PHB genera estrés en *E. coli*, y postularon que este estrés podría deberse, al menos en parte, a la interacción entre el polímero y otros componentes celulares (Han et al. 2001; Han et al. 2006). En base a sus características, se ha propuesto que las phasinas podrían formar una barrera entre los gránulos de PHB y el citoplasma, lo que evitaría que el polímero interactue con componentes celulares (Han et al. 2001; Tessmer et al. 2007).

En nuestro grupo de trabajo se realizaron diferentes estudios para analizar los mecanismos mediante los cuales las phasinas mejoran la síntesis del polímero y el crecimiento, evaluando el estrés producido en las células. Durante estos ensayos se observó que la expresión de $PhaP_{Az}$ tiene un efecto beneficioso en *E. coli* independientemente de la acumulación de PHB, dado que cepas que no producen PHB y sobreexpresan $phaP_{Az}$, presentan una mayor velocidad de crecimiento y alcanzan densidades celulares mayores con respecto a células control que no expresan $phaP_{Az}$. Además, se observó que las cepas que producen $PhaP_{Az}$ presentan menores niveles de expresión de genes relacionados a estrés como los genes que

codifican para las chaperonas IbpA, GroELS y DnaK, indicando que $PhaP_{Az}$ disminuye significativamente los niveles citoplasmáticos de estrés durante el crecimiento celular. Este resultado fue inesperado debido a que se sabe que la producción de proteínas heterólogas induce la respuesta a choque térmico en vez de reducirla.

Estos resultados llevaron a elaborar la hipótesis de que las phasinas podrían tener un efecto protector en las células. Dado que se sabe que las phasinas afectan la producción de los PHA, y que la síntesis de éstos afectan su vez a las phasinas, sería extremadamente difícil poder analizar el efecto protector de los PHA en los productores naturales, ya que debido a la íntima correlación que existe entre las phasinas y los PHA, cualquier posible efecto que podría darse por diferencias en las phasinas, podrían ser enmascarados por el polímero o por componentes celulares asociados al mismo. Analizar el efecto de $PhaP_{Az}$ en un microorganismo no productor de PHA como *E. coli,* permitió el análisis de los efectos de esta proteína independientemente del metabolismo del polímero, revelando que la misma posee propiedades notables. El objetivo principal de esta tesis doctoral consistió en dilucidar el mecanismo mediante el cual $PhaP_{Az}$ ejerce el efecto protector observado en *E. coli*, tanto en presencia del polímero como en ausencia del mismo. Para cumplir con dicho objetivo, se estudiaron distintos aspectos estructurales y fisiológicos de esta phasina que reveló tener múltiples talentos.

Sobre la estructura de $PhaP_{Az}$

Los resultados obtenidos en esta tesis revelaron que $PhaP_{Az}$ es un tetrámero en solución formado por interacciones de tipo *coiled coil* entre los monómeros. Esta proteína no tiene forma globular, sino que está formada por α- hélices, que pueden estar más o menos estructuradas según el medio donde se encuentre la proteína, intercaladas con regiones desestructuradas que le aportan flexibilidad.

Las evidencias que nos permitieron llegar a la conclusión de que $PhaP_{Az}$ es un tetrámero en solución estabilizado por interacciones *coiled-coil* son*:*

i) El cambio de tamaño observado luego del desplegado químico mediante experimentos de SEC: mientras que la proteína nativa eluyó cerca del volumen de

vacío, la muestra desnaturalizada químicamente eluyó a un volumen mayor que la proteína plegada, indicando que su tamaño disminuyó luego del proceso de desplegado por GdmCl, evidenciando que la proteína plegada es oligomérica.

ii) El perfil de desnaturalización térmica: A pesar de que el proceso de desnaturalización térmica de esta phasina es de dos estados, muestra una dependencia de la Tm con la concentración, dado que al utilizar menores concentraciones de proteína, se observó que disminuye la Tm y la cooperatividad del proceso. Esta observación es consistente con el proceso de monomerización que ocurre durante el desplegado (ver Figura 36). Este comportamiento fue reportado en la literatura, para péptidos que forman oligomeros *coiled-coil*, dado que se observó que los mismos sufren transiciones de dos estados, es decir pasan de oligómero plegado a monómero deplegado, durante el proceso de desnaturalización térmica (Corrêa & Ramos 2009).

iii) El tamaño de la proteína determinado por SLS: mediante esta técnica se obtuvo un pico correspondiente a un peso molecular de 90 kDa, indicando que la proteína es tetramérica.

iv) La relación de elipticidad a 222 nm/208 nm en experimentos de CD en presencia de TFE u oleato de sodio: Cuando $PhaP_{Az}$ fue incubada con cantidades crecientes de TFE (ver Figura 27), el contenido de α-hélice aumentó en una forma bifásica y la relación entre los dos mínimos característicos (222 nm/ 208 nm) presentó un máximo a concentraciones intermedias de TFE. Esta relación inicialmente era cercana a 1, luego comenzó a aumentar al aumentar la concentración de TFE, hasta alcanzar un máximo alrededor de 20-25% TFE, y finalmente alcanzó un valor menor a 1 en concentraciones de 40% TFE o mayores. Se ha reportado previamente que para los péptidos que sólo presentan α- hélice en su estructura secundaria y que interactúan mediante regiones *coiled coil*, la relación entre los mínimos es igual o mayor a 1, mientras que una relación cercana a 0.9 representa α-hélices que no interactúan (Lau et al. 1984; Cooper & Woody 1990). Teniendo esto en cuenta, el comportamiento observado puede ser interpretado de la siguiente manera: en un entorno acuoso $PhaP_{Az}$ podría estar formando un oligómero en el cual los monómeros interactúan mediante *coiled-coils*, que son estabilizados por el agregado de cantidades bajas de TFE, mientras que altas

cantidades de TFE podrían inducir la conversión a una α-hélice simple más rígida. Se ha reportado en la literatura que altas concentraciones de TFE rompen la estructura cuaternaria de oligómeros *coiled-coil* estabilizando α-hélices simples (Lau et al. 1984).

En los experimentos donde se empleó oleato de sodio se observó que cantidades crecientes del compuesto hidrofóbico producen un descenso en la relación 222 nm/ 208 nm, indicando que el incremento en el contenido de α-hélice podría estar acompañado de una estabilización de una α-hélice simple. Estos experimentos podrían sugerir que en un entorno hidrofóbico como el PHB, la proteína podría estar en su forma monomérica, pero sería necesaria evidencia complementaria para poder afirmarlo.

Por otra parte, al observar minuciosamente el espectro de CD de $PhaP_{Az}$ en solución acuosa utilizando distintas concentraciones de proteína, se observó que la relación 222 nm/ 208 nm era levemente dependiente de la concentración según lo esperado para hélices que interactuan por regiones *coiled coil* no covalentemente unidas (Steinmetz et al. 1998).

v) Predicción de motivos coiled coil*:* El programa MARCOIL predice una región entre D5 y Q38 con una probabilidad máxima de interacción *coiled-coil* de 32% (ver Figura 33). Además, el programa predice 2 regiones de menor probabilidad: E67 a K124 con 12% y V136 a A180 con 5.4% de probabilidad máxima. Si analizamos la región con mayor probabilidad *coiled coil* encontrada utilizando el algoritmo de LOGICOIL, se obtiene una máxima probabilidad de formación de trímero y en segundo lugar de tetrámero, indicando que estos tipos de oligómeros son los que favorecen interacciones más estables entre los residuos que forman la héptada característica de los *coiled coil*. Esta predicción es consistente con el tetrámero obtenido experimentalmente por SLS.

Estas evidencias indican que $PhaP_{Az}$ en ausencia de otras phasinas forma homo-tetrámeros *in vitro* mediante interacciones entre los dominios *coiled coil* de sus monómeros. Estos dominios se forman por asociaciones intra o extra moleculares entre 2 o más α-hélices que se cruzan entre sí y se encuentran estabilizados por interacciones entre residuos de las mismas. Teniendo en cuenta estos resultados y el trabajo de Jendrossek y colaboradores que demuestra,

mediante la técnica de doble híbrido, que ocurren interacciones entre las distintas phasinas de *R. eutropha* (Pfeiffer & Jendrossek 2011), podría esperarse que en presencia de otras phasinas se formen hetero-oligómeros más estables tanto *in vitro* como en la matriz proteica formada *in vivo* en la superficie del gránulo.

Sabiendo que $PhaP_{Az}$ forma oligómeros, las curvas obtenidas al estudiar el proceso de desnaturalización química mediante la técnica de CD y la de espectrometría de fluorescencia pueden explicarse de la siguiente manera (ver Figura 36 B): Los cambios en la estructura terciaria/cuaternaria observados al analizar la fluorescencia de la sonda ANS, presentaron un comportamiento bifásico. Primero se forma una especie más compacta a bajas concentraciones de GdmCl y luego se observa que la intensidad de emisión de fluorescencia del ANS va aumentando y desplazándose hacia el rojo, lo que indica que la sonda se encuentra en un entorno más hidrofílico, indicio de que el oligómero se está desarmando. La estructura terciaria/cuaternaria se pierde por completo a 2 M GdmCl. Al analizar la curva de desnaturalización química monitoreada por CD, se observa el mismo comportamiento que para la curva de ANS hasta 2 M GdmCl. A concentraciones mayores a 2 M GdmCl, ocurre una segunda transición que podría estar indicando que la pérdida de estructura secundaria observadada en esta etapa correspondería al deplagado del monómero. Este proceso se completa a 4.5 M GdmCl, donde la señal de CD a 222 nm es prácticamente nula. Finalizando con un monómero desplegado como se verificó al emplear 6 M GdmCl en los experimentos de SLS.

Al comparar las curvas de desplegado térmico y químico puede observarse que mientras que la curva de desplegado térmico presenta 2 estados (plegado y desplegado), la curva de desplegado químico muestra que la proteína pasa por estados intermedios durante el proceso de desnaturalización. Estas diferencias pueden deberse a la cinética de cada uno de los procesos, dado que para obtener la primera curva, la muestra se calentó a una velocidad de 2 °C min^{-1}, mientras que para obtener la segunda curva, la proteína se incubó durante toda la noche en presencia de las distintas concentraciones de GdmCl, de manera de permitir que el sistema alcance el equilibrio. Además, el uso de desnaturalizantes químicos como GdmCl, podría ayudar a estabilizar intermediarios que no pueden alcanzarse mediante desnaturalización térmica.

Por otro lado, las evidencias *in silico* y experimentales que permiten afirmar que esta phasina contiene regiones desestructuradas y por lo tanto, que no es una proteína globular, son:

i) El porcentaje de α-hélice obtenido experimentalmente es significativamente menor que el valor predicho *in silico.*

ii) Los programas de predicción *in silico* de la base de datos Disprot encontraron entre 3 y 4 regiones desordenadas. A partir de estas predicciones se estima que alrededor del 40/45 % de la proteína puede ser desordenada cuando la misma no está unida a ningún blanco y este porcentaje podría llegar a descender a 23/30 % al interactuar con otras moléculas.

iii) Si el tetrámero fuese globular, el diámetro hidrodinámico esperado según su peso molecular sería de aproximadamente 7 nm. Como el diámetro hidrodinámico obtenido fue de 12 nm, si la proteína fuese globular, correspondería a un oligómero de 17 unidades, molecularidad que no es consistente con la molecularidad de 4 obtenida en los experimentos de SLS.

iv) Los experimentos de SEC mostraron que la proteína eluye como una proteína globular de aproximadamente 200 kDa. Este dato no es consistente con el peso molecular del tetrámero (84 kDa), por lo que esta phasina no se comporta como una proteína globular. Este cambio, de menos a más estructurada, sería el que podría ocurrir *in vivo* al interactuar con sus potenciales blancos como gránulos de PHB, otras phasinas u otras proteínas.

Estas regiones desestructuradas permiten que esta phasina modifique su estructura según el entorno, siendo más flexible y desestructurada en un entorno acuoso y más rígida o estructurada en un entorno hidrofóbico.

Sobre las características estructurales comunes a todas las phasinas descriptas hasta el momento

Muchas de las familias de phasinas fueron definidas en base a la similitud entre las secuencias proteicas, pero predicciones *in silico* indican que, además, estas proteínas presentan características estructurales comunes, como una composición

α-hélice preponderante combinada con regiones desordenadas. Estas regiones fueron predichas en un gran número de phasinas y fueron observadas experimentalmente en $PhaF_{Pp}$, que presenta una región intrínsecamente desestructurada en su dominio de unión al DNA, ubicado en el extremo C- terminal, y una región desestructurada adicional en el extremo N- terminal, que podría estar involucrada en la unión a los gránulos de PHA (Maestro et al. 2013). Estas regiones también fueron encontradas en distintos tipos de proteínas involucradas en diversas funciones, incluyendo histonas, proteínas que controlan el ciclo celular y chaperonas (Babu et al. 2012). Una búsqueda comparativa realizada en una gran cantidad de phasinas mostró que las regiones desordenas son una característica común en este tipo de proteínas, sugiriendo que podrían contribuir a la diversidad funcional de las mismas. Las phasinas pertenecientes a diferentes familias estudiadas hasta el momento fueron descriptas como trímeros o tetrámeros y además, se encontró que todas las phasinas tienen mediana o alta probabilidad de contenener regiones de interacción de tipo *coiled-coil* que podrían actuar como superficies de oligomerización. Sin embargo, la localización y la extensión de dichas regiones difiere en gran medida, aún entre phasinas pertenecientes a la misma familia. Esto sugiere que la interacción entre los monómeros, con los gránulos de PHA, con otras phasinas u otras proteínas, puede diferir para las distintas phasinas. Estas características estructurales comunes fueron predichas y verificadas experimentalmente para $PhaP_{Az}$.

Sobre su unión a gránulos de PHB

$PhaP_{Az}$ tiene la capacidad de unirse a gránulos de PHA tanto *in vitro* como *in vivo* en *E. coli* recombinante. En los productores naturales de PHA, se observó que las phasinas interactúan con los gránulos de polímero, pero también lo hacen entre ellas (Pfeiffer 2011), formando una red compleja que involucra muchas proteínas relacionadas con la síntesis del polímero (Dennis 2008). Al trabajar con *E. coli* recombinante, se supone que no hay otras proteínas involucradas en el metabolismo de PHB aparte de $PhaP_{Az}$ y las 3 enzimas necesarias para la biosíntesis de PHA producidas heterólogamente. Como consecuencia, los resultados obtenidos indican

que $PhaP_{Az}$ es capaz de unirse a los gránulos tanto *in vitro* como *in vivo* en ausencia de otras phasinas. Esto también fue reportado para PhaP1 de *R. eutropha,* cuya capacidad de unión a gránulos de PHA en *E. coli* recombinante ha sido utilizada para desarrollar protocolos de purificación en los cuales otras proteínas fusionadas a las phasinas pueden ser recuperadas por copurificación con los gránulos (Banki, 2005). También se han propuesto diferentes aplicaciones para estas fusiones, como por ejemplo, las fusiones al extremo N- terminal de $PhaF_{Pp}$ como método ecológico para la liberación de insecticidas al ambiente (Moldes et al. 2004; Moldes et al. 2006).

Además, se observó mediante experimentos de TEM que la expresión de $phaP_{Az}$ en *E. coli* productora de PHB produce un cambio en la morfología celular y en el tamaño, número y disposición de los gránulos en el citoplasma. Las células que producen $PhaP_{Az}$ son más alargadas que las células control, presentan una distribución asimétrica de los gránulos y en muchas de ellas los gránulos se ubican en los polos celulares. La localización de los gránulos en el citoplasma podría depender de las phasinas presentes en la superficie de los mismos y de sus interacciones con componentes celulares como el cromosoma bacteriano, la membrana plasmática o proteínas celulares.

La phasina bifuncional $PhaF_{Pp}$ presenta un dominio tipo histona que permite la interacción de esta phasina con el DNA (Galán et al. 2011). Los autores sugieren que la interacción simultánea de la phasina con el polímero, el cromosoma bacteriano y proteínas del citoesqueleto son las que determinan la posición de los gránulos en el citoplasma y la distribución de los mismos a las células hijas durante la división celular. $PhaP_{Az}$ carece de un dominio tipo histona y no pudimos obtener evidencias de interacción con el DNA. Cuando se investigó el posible rol de $PhaP_{Az}$ en la distribución intracelular de gránulos de PHB, no se observaron diferencias apreciables con las células control. En vista de estos resultados, es probable que $PhaP_{Az}$ no esté involucrada en el proceso de partición de gránulos de PHB durante la división celular como se ha observado para $PhaP_{Pp}$ y podría considerarse la posibilidad de que en *Azotobacter* esta función sea realizada por otra phasina u otro tipo de proteína.

Sobre su localización subcelular en ausencia de PHB

Los experimentos realizados utilizando la proteína de fusión a GFP mostraron que esta variante también es capaz de unirse a los gránulos, indicando que la adición de GFP no afecta la capacidad de unión al gránulo. Estos resultados concuerdan con los obtenidos en trabajos previos, en los que se observó que las fusiones de las phasinas de *R. eutropha* a YFP tanto en el extremo N como en el C terminal, no afectan la unión al gránulo (Pfeiffer & Jendrossek 2012).

Al estudiar la localización intracelular de $PhaP_{Az}$-GFP se observó que inicialmente (durante las primeras horas post inducción) se distribuyó homogéneamente en el citoplasma en ausencia de polímero, mientras que a partir de las 4 horas post inducción la proteína se concentró alrededor de los polos celulares formando intensos *foci* de fluorescencia. Este fenómeno también fue reportado para phasinas de *C. necator,* y se propuso que podría ser debido a la formación de oligómeros de phasina (Pfeiffer & Jendrossek 2012). Sin embargo, esta explicación parece no ser aplicable para $PhaP_{Az}$. Aunque esta proteína es tetramérica en solución, los resultados obtenidos en esta tesis indican que es muy soluble y que no forma agregados detectables o cuerpos de inclusión. Por otro lado, se ha observado que a medida que las células envejecen, las proteínas mal plegadas tienden a acumularse alrededor de los polos celulares, y que las chaperonas como IbpA se unen a ellas (Lindner et al. 2008). Dado que hemos demostrado experimentalmente que $PhaP_{Az}$ se une a los cuerpos de inclusión, puede hipotetizarse que la localización de esta proteína (o de otras phasinas) en los polos de las células puede estar relacionada con este fenómeno.

Sobre el rol de $PhaP_{Az}$ como chaperona

En trabajos anteriores hemos visto que las cepas de *E. coli* productoras de PHB que sobreexpresan *$phaP_{Az}$* crecen más y acumulan más PHB (de Almeida et al. 2007). Estos resultados sugieren que, como lo observado en otras bacterias productoras de PHB, $PhaP_{Az}$ ejerce un efecto promotor del crecimiento en los recombinantes

productores de PHB. Los análisis de proteoma de las cepas de *E. coli* recombinantes productoras de PHB mostraron un aumento en las proteínas de estrés térmico comparado con las cepas no productoras de PHB, lo que indica que la acumulación del polímero causa un estrés en las células (Han et al. 2001). El estrés producido por la síntesis de PHB puede ser comparado con la respuesta observada durante la producción de proteínas heterólogas en *E. coli*, lo que genera un aumento en la transcripción (Gill et al. 2000; Jürgen et al. 2000) y en la concentración (Hoffmann & Rinas 2004) de muchas chaperonas como GroEL, GroES, DnaK, IbpA e IbpB. En un trabajo previo realizado en nuestro laboratorio hemos planteado la hipótesis de que la producción de PHB podría inducir la respuesta a estrés térmico reduciendo los niveles de chaperonas citoplasmáticas disponibles por titulación de las mismas en la superficie de los gránulos de PHB (de Almeida et al. 2011). Esta hipótesis se ve reforzada por los resultados de análisis de proteínas asociadas a gránulos de PHB en *E. coli* en presencia y ausencia de PhaP1 de *R. eutropha*. Estos estudios mostraron que varias proteínas de estrés térmico se unen a los gránulos en ausencia de $PhaP_{Az}$, pero se encuentran excluídas del mismo en presencia de la phasina (Tessmer et al. 2007). Teniendo en cuenta estos datos, no fue sorpresivo observar que en cepas productoras de PHA que expresan $PhaP_{Az}$, los niveles de expresión de proteínas de choque térmico fueran menores que en cepas sin $PhaP_{Az}$. Sin embargo, fue inesperado que estos niveles también resultasen menores en cepas control sin PHB (de Almeida et al. 2011). La falta de inducción de proteínas de choque térmico en células que expresan $PhaP_{Az}$, junto con el efecto protector observado en células expuestas a estrés térmico y oxidativo (de Almeida et al. 2011), llevaron a formular la hipótesis de que $PhaP_{Az}$ podría tener actividad chaperona. Esta hipótesis fue verificada por los resultados obtenidos *in vivo* e *in vitro* en este trabajo.

La actividad chaperona *in vitro* fue monitoreada utilizando la enzima citrato sintasa, una de las proteínas más usadas para ensayos de actividad chaperona debido a la agregación espontánea de esta enzima a 45°C en ausencia de chaperonas (Buchner et al. 1998). Los experimentos realizados utilizando esta enzima mostraron que:

i) $PhaP_{Az}$ es capaz de proteger a CS del desplegado térmico, dado que la formación de agregados de esta enzima disminuye a medida que va aumentando la

relación $PhaP_{Az}$:CS. El efecto máximo observado se produjo al agregar 10 veces más phasina que CS, relación en la cual se evita casi por completo la formación de dichos agregados macromoleculares.

ii) Adicionalmente, se demostró que la phasina evita la formación de agregados, observándose un aumento en la velocidad de replegado de CS y en la cantidad total de proteína replegada, al incubar CS desnaturalizada químicamente y diluída (para disminuir la concentración del agente desnaturalizante y de esta forma inducir la agregación) en presencia de $PhaP_{Az}$..

iii) Por último, los experimentos de espectroscopía de fluorescencia permitieron estudiar el estado de plegado de la CS en presencia y en ausencia de $PhaP_{Az}$ luego de ser sometida a las condiciones de los experimentos de actividad chaperona *in vitro*, pudiendo verificarse que la enzima se encontraba correctamente plegada luego del tratamiento con $PhaP_{Az}$ tanto en condiciones de agregación térmica como en condiciones de agregación por dilución del agente desnaturalizante.

Estos resultados demuestran que $PhaP_{Az}$ presenta actividad chaperona *in vitro,* dado que $PhaP_{Az}$ no sólo evita la agregación de CS, sino que también facilita el proceso de replegado la enzima, ayudándola a adoptar su conformación nativa. Teniendo en cuenta que $PhaP_{Az}$ es una proteína de carácter anfipático y de naturaleza flexible que modifica su estructura en un entorno hidrofóbico, un posible mecanismo de acción mediante el cual podría ejercer su rol como chaperona podría ser la interacción con regiones hidrofóbicas de polipétidos nacientes, intermediarios de plegado o proteínas mal plegadas, evitando la exposición de dichas regiones al solvente acuoso, favoreciendo el correcto plegado y desplazando el equilibrio hacia la forma plegada de la proteína.

La capacidad de $PhaP_{Az}$ de proteger a las células contra estrés térmico y oxidativo sugirió que esta phasina además podría exhibir actividad chaperona *in vivo.* Para analizar más en detalle esta hipótesis, se estudió el efecto de $PhaP_{Az}$ en la dinámica de formación de los cuerpos de inclusión formados por PD, una proteína que agrega al ser sobreexpresada en *E. coli*. Se utilizaron técnicas de microscopía

para monitorear el tamaño y la cantidad de cuerpos de inclusión, comparando los resultados obtenidos con $PhaP_{Az}$ con los obtenidos para la chaperona GroELS.

i) Cuando la proteína recombinante PD fue coexpresada con GroELS o $PhaP_{Az}$, se observó que el número de IBs disminuyó sensiblemente luego de 24 hrs de cultivo. Es más, se observó también un efecto sobre la morfología de las células, que resultaron de menor tamaño y forma más regular. Adicionalmente, se vió también una disminución en la cantidad de cuerpos de inclusión por célula. El efecto observado para $PhaP_{Az}$ es similar al observado para la chaperona GroELS.

Estos resultados indican que $PhaP_{Az}$ juega un rol en el proceso de construcción-deconstrucción de IB como fue observado para otras chaperonas tales como DnaK, que disminuye los niveles de agregación y ayuda en la solubilización de los agregados pequeños, GroEL, que está involucrada en la organización de agregados pequeños en cuerpos de inclusión más grandes y en la remoción de proteínas de los cuerpos de inclusión, y las pequeñas proteínas de choque térmico IbpA e IbpB, que se unen a proteínas desnaturalizadas por calor, protegiéndolas de su agregación irreversible (Carrió & Villaverde 2003). Sin embargo, no queda aún claro si $PhaP_{Az}$ está involucrada en la protección contra la formación de IB, la disolución de IB debido a la remoción de las proteínas mal plegadas o ambos.

ii) Además, se observó que $PhaP_{Az}$ colocaliza con los IB *in vivo*, demostrando que esta proteína tiene una interacción efectiva con las proteínas mal plegadas dentro de las células.

Esta característica ha sido observada para muchas chaperonas tales como DnaK y GroEL, los principales responsables del plegado de proteínas en *E. coli* (junto con sus co-chaperonas DnaJ-GrpE y GroES, respectivamente), que también fueron identificadas como componentes de los cuerpos de inclusión en *E. coli* (Carrió & Villaverde 2005).

El efecto de $PhaP_{Az}$ sobre el plegado de proteínas y la formación de cuerpos de inclusión permiten atribuir sus efectos protectores, observados en trabajos anteriores, a su actividad de chaperona (figura 50) verificando las hipótesis formuladas al inicio de esta tesis.

Figura 50: Evidencia experimental *in vitro* e *in vivo* del rol de $PhaP_{Az}$ como chaperona. Evidencia *in vitro* (arriba): Se observó que $PhaP_{Az}$ evita la agregación espontánea de la citrato sintasa (CS) y facilita su replegado luego de la desnaturalización química. Evidencias *in vivo* (abajo): Se observó que $PhaP_{Az}$ se une a los cuerpos de inclusión (IB) formados por proteínas mal plegadas, y que reduce el número y el tamaño de los IB. Los efectos de $PhaP_{Az}$ en la expresión de genes relacionados al estrés térmico y en la resistencia a estrés (observados en un trabajo previo de Almeida et al., 2011) pueden ser explicados por su actividad chaperona. En presencia de $PhaP_{Az}$ la cantidad de proteínas mal plegadas que disparan la respuesta al choque térmico, está reducida (triángulo izquierdo). Como resultado, la respuesta a choque térmico, que incluye la expresión de chaperonas y otros genes relacionados a estrés, no se encuentra inducida. $PhaP_{Az}$ ejerce un efecto protector del estrés (triángulo derecho), probablemente mediante la reducción de proteínas mal plegadas generadas durante el estrés, que se refleja en un aumento en la supervivencia al estrés térmico y a la exposición a paraquat.

Sobre las similitudes entre PhaP$_{Az}$ *y las chaperonas*

En los primeros experimentos realizados en *E. coli* recombinante se observó que los efectos protectores de PhaP$_{Az}$ podrían compararse con los observados al sobreexpresar IbpA. Adicionalmente, la trancripción de esta proteína fue la más afectada en las bacterias con PhaP$_{Az}$. Estos resultados sugirieron que podría haber algún tipo de superposición funcional entre estas proteínas. A raíz de esta hipótesis se compararon las estructuras primarias de ambas proteínas, pero no se encontraron similitudes significativas de PhaP$_{Az}$ con IbpA, con otras chaperonas o con otras proteínas de *E. coli*.

Curiosamente, al realizar una búsqueda en bibliografía y en bases de datos, se encontró que, al igual que PhaP$_{Az}$, algunas de las chaperonas bien conocidas como la DnaK, presentan regiones desordenadas que son esenciales para su actividad (Smock et al. 2011). Además, se han descripto chaperonas (DnaK) encontradas dentro del género *Rickettsia*, que contienen dominios Phasina 2, indicando cierta similitud entre algunas chaperonas y esta phasina. Si bien estos datos son aún demasiado débiles como para poder sacar algún tipo de conclusión, sugieren que podría haber algún tipo de relación estructural entre PhaP$_{Az}$ y chaperonas bien caracterizadas.

Sobre los posibles sitios de unión a PHB y proteínas mal plegadas

Los experimentos de CD realizados en presencia de TFE y oleato demostraron que PhaP$_{Az}$ tiene una importante capacidad de cambiar según el entorno, probablemente debido a sus regiones desestructuradas. Esta flexibilidad estructural le permitiría interactuar con diferentes blancos, incluyendo los gránulos de PHA y otras proteínas.En base a los resultados obtenidos en este trabajo, se pueden formular hipótesis acerca de la región de la proteína responsable de la interacción con los gránulos de PHB y con las proteínas mal plegadas. Predicciones *in silico* mostraron que PhaP$_{Az}$ presenta cuatro hélices anfipáticas que podrían interactuar con los gránulos por su cara hidrofóbica. Además, los experimentos en presencia de oleato de sodio indicaron que la proteína se estructura en un entorno hidrofóbico,

sugiriendo que la misma interactúa con el polímero a través de sus regiones desestructuradas.

La estructura secundaria de la proteína consiste en 4 α-hélices. La hélice 4 corresponde a una zona predicha como desestructurada que presenta regiones hidrofóbicas alternadas con regiones hidrofílicas. Por otra parte, al analizar la disposición de los residuos en esta hélice utilizando gráficos de *Pepwheel* (ver Figura 20) se observa una cara predominantemente hidrofóbica. Además, esta hélice no estaría involucrada en la oligomerización de la phasina, dado que no presenta motivos *coiled coil*. Debido a estas características, es un posible dominio de unión al gránulo de PHA. Por otro lado, la hélice 3, aunque no presenta una cara hidrofóbica tan clara como la hélice 4, corresponde a una zona que, de acuerdo con los programas bioinformáticos, es desestructurada pero podría adquirir estructura en presencia de blancos de interacción (predicción por PONDR-VLXT, línea negra en el gráfico de desorden) por lo que también podría ser un posible sitio de unión con los gránulos. Por último, la hélice 1 es la que contiene el motivo *coiled coil* propuesto como dominio de oligomerización, pero por otro lado, también posee una cara hidrofóbica clara y regiones desestructuradas. Si bien

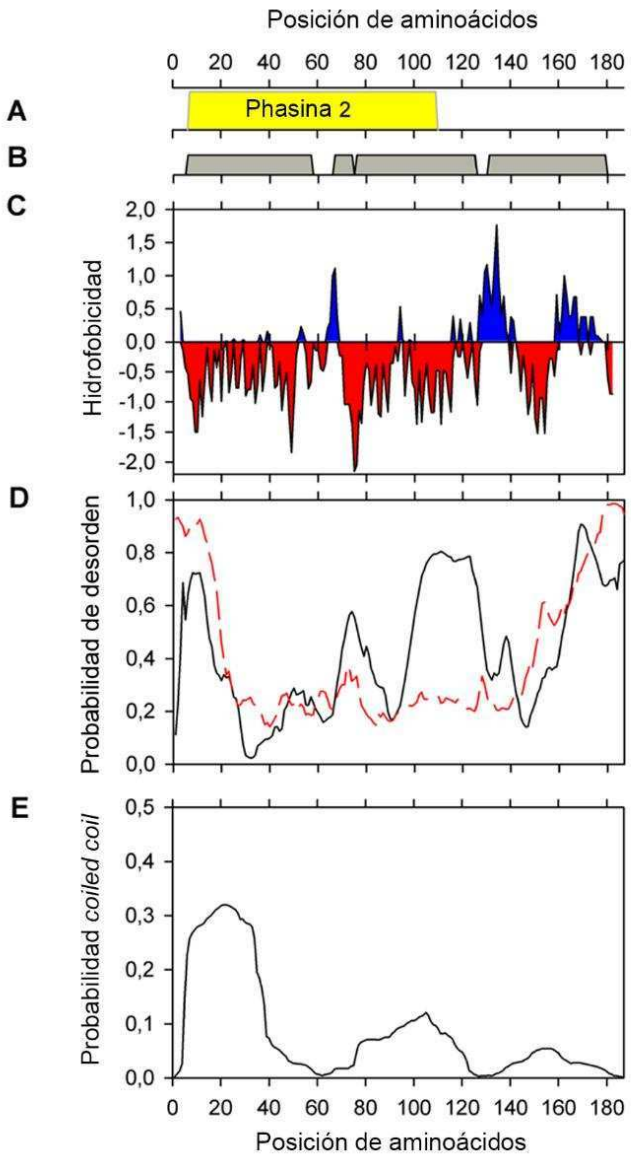


Figura 51: Análisis *in silico* de $PhaP_{Az}$. A) Posición del dominio Phasina 2. B) Posición de las 4 α-hélices predichas por Phyre 2. C) Perfil de hidrofobicidad. D) Probabilidad de desorden según PONDR-VLXT (negro) y PODR-FIT (rojo). E) Probabilidad *coiled coil* según algoritmo de MARCOIL.

$PhaP_{Az}$ es tetramérica en solución acuosa, el aumento de la estructura secundaria observado en presencia de oleato de sodio sugiere que $PhaP_{Az}$ podría sufrir cierta estructuración al estar unida a los gránulos de PHA. Teniendo en cuenta estos resultados, no puede descartarse la hipótesis de que la molecularidad de la proteína fuese distinta en diferentes situaciones, como por ejemplo cuando interactúa con otras moléculas con las cuales interacciona, como por ejemplo otras phasinas, PHB o proteínas mal plegadas. Además, la relación de señal de elipticidad medida a 222/208 se hace menor a 1 a concentraciones altas de oleato, indicando que la proteína pasa por estados intermedios durante el proceso de estructuración por aumento de hidrofobicidad en el entorno, lo que podría significar que el oligómero se disocia para unirse al gránulo. Por estos motivos no puede descartarse la posibilidad de que $PhaP_{Az}$ se una al polímero en su forma monomérica. En ese caso, si no estuviera involucrada en la formación de un oligómero, la hélice 1 también podría ser una zona de interacción con el polímero debido a su carácter anfipático y la presencia de regiones desestructuradas.

Neumann y colaboradores estudiaron la unión de distintos segmentos de PhaP1 fusionados a GFP a gránulos de PHA en *R. eutropha* y observaron que toda la proteína era necesaria para que ocurra la unión a PHA, dado que la fluorescencia de PhaP1 completa estaba restringida a los gránulos, mientras que las fusiones de los distintos segmentos mostraron altos niveles de fluorescencia en el citoplasma (Neumann et al. 2008). Si bien en este trabajo de tesis se lograron identificar zonas de $PhaP_{Az}$ con características que le permitirían interactuar con los gránulos, como la presencia de regiones desestructuradas y hélices anfipáticas, no puede descartarse la hipótesis de que todas las regiones analizadas en su conjunto sean necesarias para que ocurra la unión a los gránulos de manera similar a lo observado para PhaP1.

Al comparar las regiones estudiadas en $PhaP_{Az}$ con las regiones encontradas en las distintas phasinas descriptas en la literatura, puede observarse que los motivos *coiled coil*, las regiones desestructuradas y las zonas hidrofóbicas se encuentran en diferentes posiciones a lo largo de la secuencia aminoacídica en las distintas phasinas, no pudiéndose utilizar esta comparación para reforzar alguna de las hipótesis propuestas.

En este trabajo doctoral, se describió que $PhaP_{Az}$, además de unirse a gránulos de PHB, puede interactuar con proteínas mal plegadas y cuerpos de inclusión. Los sitios postulados como posibles sitios de unión a PHA también pueden ser postulados como sitios de unión a proteínas mal plegadas, dado que las mismas exponen residuos hidrofóbicos al medio intracelular, por lo que ambos serían blancos de unión de carácter hidrofóbico.

Sobre el rol de la actividad chaperona de las phasinas en productores naturales

En este trabajo demostramos que $PhaP_{Az}$ tiene actividad chaperona *in vitro* e *in vivo* en un sistema recombinante, propiedad que podría ser extensiva a otras phasinas, pero ¿qué rol cumpliría esta actividad chaperona en el metabolismo de PHA en los productores naturales? Los trabajos de Dennis y Jendrossek (Dennis et al. 2008; Jendrossek 2009) proponen que *i)* ocurren interacciones complejas entre las diferentes proteínas asociadas a los gránulos, *ii)* la organización espacial de estas proteínas en la superficie del gránulo está controlada y *iii)* las PGAPs ordenadas en una sofisticada estructura 3D cumplen distintas funciones en el metabolismo de los PHA. Por otra parte, Ushimaru y Tsuge (Ushimaru et al. 2014) observaron que $PhaP_{Ac}$ y $PhaP_{Re}$ intervienen en la modulación de la actividad de las sintasas $PhaC_{Ac}$, $PhaC_{Re}$ y $PhaC_{Da}$ *in vitro*. Los autores observaron que ambas phasinas aumentan la actividad de $PhaC_{Ac}$ pero inhiben la actividad de $PhaC_{Re}$ y $PhaC_{Da}$. Estos resultados indicarían que existe una modulación a nivel molecular de las sintasas mediada por las phasinas, y que esta interacción phasina-sintasa sería específica y desencadenaría distintos efectos. Además, observaron que la phasina $PhaP_{Ac}$ produce un aumento en la solubilidad de la sintasa de *R. eutropha* $PhaC_{Re}$ *in vitro*, lo que estaría indicando que $PhaP_{Ac}$ afecta el plegado $PhaC_{Re}$, sugiriendo que la activación de $PhaC_{Re}$ podría estar mediada por la actividad chaperona de la phasina.

En base a los resultados obtenidos en esta tesis, se podrían proponer las siguientes hipótesis:

i) A través de su actividad chaperona, las phasinas podrían estar involucradas en la formación y la organización de la compleja red proteica de la cubierta del

gránulo, facilitando el proceso de plegado de las proteínas estructurales y su correcto ensamblaje.

ii) Otra posible hipótesis es que las phasinas podrían modular la actividad de las enzimas que intervienen en el metabolismo de PHA, ya sea facilitando su plegado o evitando su agregación y posterior degradación.

iii) Paralelamente se podría también postular para las phasinas un rol en la protección de otras proteínas no relacionadas a los PHA protegiéndolas de la desnaturalización o favoreciendo su plegado.

Se ha observado que en los microorganimos que los producen naturamente, los PHA protegen a las células frente a varios tipos de estrés, y contribuyen a su adaptabilidad y sobrevida en el ambiente. Este efecto se ha atribuido hasta ahora a la capacidad del polímero de proveer carbono y energía para diferentes procesos celulares. Si las phasinas actuaran como chaperonas en estos organismos, podrían tener un papel activo en la protección de las células contra diferentes tipos de estrés, complementando las funciones de fuente de carbono y energía del polímero.

Conclusiones y Perspectivas

Conclusiones

Aunque el aumento en la síntesis del polímero y en el crecimiento de *E. coli* recombinante productora de PHB en presencia de phasinas ha sido conocido durante años (York et al. 2001; de Almeida et al. 2007) los mecanismos que subyacen este efecto se han mantenido desconocidos y generalmente fueron atribuidos al rol de $PhaP_{Az}$ en la superficie del gránulo, evitando la interacción entre el polímero y otros componentes celulares, tales como proteínas. El análisis estructural de $PhaP_{Az}$ realizado en este trabajo, reveló que esta phasina presenta tres hélices con caras no polares claramente definidas que le permitirían interactuar con el polímero, pero además le darían la capacidad de interactuar con regiones hidrofóbicas expuestas de proteínas mal plegadas. Además, $PhaP_{Az}$ mostró una notable capacidad de cambiar según su entorno probablemente debido a la presencia de regiones desestructuradas. Esta flexibilidad estructural sugiere que esta proteína podría interactuar con diferentes blancos, incluidas las proteínas mal plegadas, lo que apoyaría la hipótesis de que la supresión de la inducción de proteínas de choque térmico observada previamente se debe a la contribución de $PhaP_{Az}$ en la prevención de la acumulación de proteínas mal plegadas. Los resultados obtenidos en esta tesis demuestran que $PhaP_{Az}$ tiene actividad chaperona tanto *in vitro* como *in vivo* y sugieren que el efecto protector observado en *E. coli* no es sólo pasivo, sino que podría involucrar un rol activo en el plegado de proteínas y/o en la prevención del desplegado de las mismas, expandiendo el amplio rango de diferentes actividades asociadas a las phasinas. Si los efectos demostrados para $PhaP_{Az}$ son una característica general de las phasinas, estas proteínas podrían jugar un importante rol en la homeostasis proteica en productores naturales y recombinantes de PHA, complementando los recursos provistos por la degradación del polímero con actividades chaperonas específicas que podrían ayudar a las células a hacer frente a diferentes tipos de estrés. Los efectos estudiados en esta tesis, además de tener implicancia en el metabolismo de PHA y en la protección frente a estrés, abren la puerta a nuevas aplicaciones biotecnológicas para esta proteína en el campo de la producción de proteínas recombinantes y otros productos heterólogos en *E. coli*.

Perspectivas

Los estudios planteados en esta tesis contribuyeron a aumentar el conocimiento sobre la estructura de la phasina PhaP de *Azotobacter* sp. FA8 y revelaron los múltiples talentos de esta proteína. A partir de este trabajo surgen algunas preguntas que serán abordadas en futuras líneas de investigación:

¿Las características estructurales y funcionales descriptas para $PhaP_{Az}$ son extensivas a otras phasinas? Para dilucidar esta cuestión se podrían realizar estudios estructurales de distintas phasinas, como por ejemplo las de *Pseudomonas extremoaustralis* y *Pseudomonas putida,* así como también de otras phasinas del género *Azotobacter*. Se deberá estudiar si presentan el mismo efecto protector al ser producidas en *E. coli* recombinante y si las mismas también tienen actividad chaperona.

¿Hay otras phasinas codificadas en el genoma de Azotobacter sp. FA8 que pudieran cumplir otros roles asignados a otras phasinas? Se podría realizar una búsqueda en el genoma de este microorganismo de genes que posiblemente codifiquen para otras phasinas. En el caso de encontrarlos, se analizarían las características principales y la función de cada una de las phasinas encontradas. Adicionalmente, se podría analizar la función del producto del gen *phaF* presente en el operón PHB de *Azotobacter* sp. FA8.

¿La molecularidad de la proteína cambia al estar unida a los gránulos de polímero in vivo? Esta pregunta se podría resolver mediante la implementación de técnicas de microscopía de fluorescencia avanzadas, realizando análisis de ¨*number and brightness*" (N&B), que permitiría dilucidar la molecularidad de la phasina en un entorno celular, en presencia y en ausencia de PHB.

¿Cuál es el mecanismo mediante el cual $PhaP_{Az}$ ejerce su rol como chaperona? Sería interesante estudiar si $PhaP_{Az}$ está involucrada en la protección contra la formación de IB, la disolución de IB debido a la remoción de las proteínas mal plegadas o ambos, analizando si *$phaP_{Az}$* complementa el fenotipo en mutantes de cada una de las chaperonas de *E. coli,* lo que podría indicar solapamiento de funciones.

¿Cómo interviene la actividad chaperona de la phasina en su contexto natural? La respuesta a esta cuestión involucra diseñar estrategias para estudiar el rol de la actividad chaperona de $PhaP_{Az}$ en el productor natural *Azotobacter* sp. FA8 en condiciones de acumulación de PHB y en mutantes que no produzcan el polímero.

Por último, el efecto protector observado en *E. coli* y la actividad chaperona de $PhaP_{Az}$, descripta en esta tesis, abren la puerta a una línea de investigación que estudie el uso de esta phasina en el desarrollo de nuevas aplicaciones biotecnológicas, como la producción de proteínas recombinantes y de compuestos de interés biotecnológico en bacterias, como por ejemplo el etanol, butanol y 1,3-propanodiol.

Bibliografía

Allen, S.P. et al., 1992. Two novel heat shock genes encoding proteins produced in response to heterologous protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 174(21), pp.6938–47.

de Almeida, A. et al., 2007. Effects of granule-associated protein PhaP on glycerol-dependent growth and polymer production in poly(3-hydroxybutyrate)-producing *Escherichia coli. Applied and environmental microbiology*, 73(24), pp.7912–6.

de Almeida, A. et al., 2011. Unexpected stress-reducing effect of PhaP, a poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated protein, in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 77(18), pp.6622–9.

Alonso, L.G. et al., 2006. Chaperone Holdase Activity of Human Papillomavirus E7 Oncoprotein. *Biochemistry*, 45(3), pp.657–67.

Anderson, a J. & Dawes, E. a, 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological reviews*, 54(4), pp.450–72.

Arrigo, A.-P. & Landry, J., 1994. Expression and Function of the Low-molecular-weight Heat Shock Proteins. In *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. pp. 335–373.

Arsène, F., Tomoyasu, T. & Bukau, B., 2000. The heat shock response of *Escherichia coli. International journal of food microbiology*, 55(1-3), pp.3–9.

Ayub, N.D. et al., 2004. A Polyhydroxybutyrate-Producing *Pseudomonas* sp. Isolated from Antarctic Environments with High Stress Resistance. *Current Microbiology*, 49(3), pp.170–174.

Ayub, N.D., Tribelli, P.M. & López, N.., 2009. Polyhydroxyalkanoates are essential for maintenance of redox state in the Antarctic bacterium *Pseudomonas* sp. 14-3 during low temperature adaptation. *Extremophiles.*, (1), pp.59–66.

Babu, M.M., Kriwacki, R.W. & Pappu, R. V., 2012. Versatility from Protein Disorder. *Science*, 337(6101), pp.1460–1461.

Banki, M.R., Gerngross, T.U. & Wood, D.W., 2005. Novel and economical purification of recombinant proteins : Intein-mediated protein purification using in vivo polyhydroxybutyrate (PHB) matrix association. *Protein Science*, 14(6), pp.1387–1395.

Barnard, G.C. et al., 2005. Integrated Recombinant Protein Expression and Purification Platform Based on *Ralstonia eutropha*. *Applied and environmental microbiology*, 71(10), pp.5735–5742.

Bentley, W.E. et al., 1990. Plasmid-encoded protein: The principal factor in the "metabolic burden" associated with recombinant bacteria. *Biotechnology and Bioengineering*, 35(7), pp.668–681.

Bissonnette, S. a et al., 2010. The IbpA and IbpB small heat-shock proteins are substrates of the AAA+ Lon protease. *Molecular microbiology*, 75(6), pp.1539–49.

Bowden, G.A., Paredes, A.M. & Georgiou, G., 1991. Structure and Morphology of Protein Inclusion Bodies in *Escherichia coli. Nature Biotecnology*, 9, pp.725 – 730.

Brandl, H. et al., 1988. *Pseudomonas oleovorans* as a Source of Poly(beta-Hydroxyalkanoates) for Potential Applications as Biodegradable Polyesters. *Applied and environmental microbiology*, 54(8), pp.1977–82.

Braunegg, G., Bona, R. & Koller, M., 2004. Sustainable Polymer Production. *Polymer-Plastics Technology and Engineering*, 43(6), pp.1779–1793.

Buchner, J., Grallert, H. & Jakob, U., 1998. Analysis of chaperone function using citrate synthase as nonnative substrate protein. *Methods in Enzymology*, 290, pp.323–338.

Buck, M. et al., 1995. Structural Determinants of Protein Dynamics: Analysis of 15N NMR Relaxation Measurements for Main-Chain and Side-Chain Nuclei of Hen Egg White Lysozyme. *Biochemistry*, 34(12), pp.4041–4055.

Bukau, B. et al., 2000. Getting newly synthesized proteins into shape. *Cell*, 101(2), pp.119–22.

Bukau, B., 1993. Regulation of the Escherichia coli heat-shock response. *Molecular Microbiology*, 9(4), pp.671–680.

Bukau, B. & Horwich, A.., 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 92(3), pp.351–66.

Bukau, B. & Walker, G.C., 1989. Delta dnaK52 mutants of *Escherichia coli* have defects in chromosome segregation and plasmid maintenance at normal growth temperatures. *Journal of bacteriology*, 171(11), pp.6030–8.

Carrió, M.M., Corchero, J.L. & Villaverde, a, 1998. Dynamics of i*n vivo* protein aggregation: building inclusion bodies in recombinant bacteria. *FEMS microbiology letters*, 169(1), pp.9–15.

Carrió, M.M., Corchero, J.L. & Villaverde, a, 1999. Proteolytic digestion of bacterial inclusion body proteins during dynamic transition between soluble and insoluble forms. *Biochimica et biophysica acta*, 1434(1), pp.170–6.

Carrió, M.M., Cubarsi, R. & Villaverde, a, 2000. Fine architecture of bacterial inclusion bodies. *FEBS letters*, 471(1), pp.7–11.

Carrió, M.M. & Villaverde, a, 2001. Protein aggregation as bacterial inclusion bodies is reversible. *FEBS letters*, 489(1), pp.29–33.

Carrió, M.M. & Villaverde, A., 2005. Localization of Chaperones DnaK and GroEL in Bacterial Inclusion Bodies. *Journal of Bacteriology*, 187(10), pp.3599–3601.

Carrió, M.M. & Villaverde, A., 2003. Role of molecular chaperones in inclusion body formation. *FEBS Letters*, 537(1-3), pp.215–221.

Cooper, T.M. & Woody, R.W., 1990. The effect of conformation on the CD of interacting helices: Atheoretical study of tropomyosin. *Biopolymers*, (30), pp.657–676.

Corchero, L. & Villaverde, A., 1998. Plasmid Maintenance in *Escherichia coli* Recombinant Cultures is Dramatically , Steadily , and Specifically Influenced by. *Biotechnology and bioengineering*, 58(6), pp.625–632.

Corrêa, D.H.A. & Ramos, C.H.I., 2009. The use of circular dichroism spectroscopy to study protein folding , form and function. *African Journal of Biochemistry Research*, 3(5), pp.164–173.

Dawes, E.. & Senior, P.., 1973. The role and regulation of energy reserve polymers in micro-organisms. *Adv Microb Physiol.*, (10), pp.135–266.

Delorenzi, M. & Speed, T., 2002. An HMM model for coiled-coil domains and a comparison with PSSM-based predictions. *Bioinformatics*, 18(4), pp.617–625.

Dennis, D. et al., 2008. PhaP is involved in the formation of a network on the surface of polyhydroxyalkanoate inclusions in *Cupriavidus necator* H16. *Journal of bacteriology*, 190(2), pp.555–63.

Dennis, D. et al., 2003. Preliminary analysis of polyhydroxyalkanoate inclusions using atomic force microscopy. *FEMS Microbiology Letters*, 226(1), pp.113–119.

Derbyshire, V. et al., 1997. Genetic definition of a protein-splicing domain: functional mini-inteins support structure predictions and a model for intein evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(21), pp.11466–71.

Deuerling, E. et al., 1999. Trigger factor and DnaK cooperate in folding of newly synthesized proteins. *Nature*, 400, pp.693–696.

Deuerling, E. et al., 2003. Trigger Factor and DnaK possess overlapping substrate pools and binding specificities. *Molecular microbiology*, 47(5), pp.1317–28.

Dong, H. et al., 1995. Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *Journal of bacteriology*, 177(6), pp.1497–1504.

Ehrnsperger, M. et al., 1997. Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *The EMBO journal*, 16(2), pp.221–9.

Ellis, R.J. & Hartl, F.U., 1999. Principles of protein folding in the cellular environment. *Current opinion in structural biology*, 9(1), pp.102–10.

Fahnert, B., Lilie, H. & Neubauer, P., 2004. Inclusion Bodies : Formation and Utilisation. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 89, pp.93–142.

Frydman, J., 2001. Folding of newly translated proteins *in vivo*: the role of molecular chaperones. *Annual review of biochemistry*, 70, pp.603–47.

Galán, B. et al., 2011. Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* KT2442. *Molecular microbiology*, 79(2), pp.402–18.

Georgiou, G. & Valax, P., 1999. Isolating Inclusion Bodies from Bacteria. In *Methods in enzymology*. Elsevier, pp. 48–58.

Georgopoulos, C. et al., 1994. Properties of the heat shock proteins of Escherichia coli and the autoregulation of the heat shock response. In *The Biology of Heat Shock Proteins and Molecular Chaperones*. Cold Spring Harbor, NY.: Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 209–249.

Gill, R.T., Valdes, J.J. & Bentley, W.E., 2000. A comparative study of global stress gene regulation in response to overexpression of recombinant proteins in *Escherichia coli. Metabolic engineering*, 2(3), pp.178–89.

Glover, J.R. & Tkach, J.M., 2001. Crowbars and ratchets: Hsp100 chaperones as tools in reversing protein aggregation. *Biochemistry and Cell Biology*, 79(5), pp.557–568.

Godoy, F. a et al., 2003. Poly-beta-hydroxyalkanoates consumption during degradation of 2,4,6-trichlorophenol by Sphingopyxis chilensis S37. *Letters in applied microbiology*, 36(5), pp.315–20.

Goff, S.A. & Goldberg, A.L., 1985. Production of abnormal proteins in *E. coli* stimulates transcription of ion and other heat shock genes. *Cell*, 41(2), pp.587–595.

Griebel, R., Smith, Z. & Merrick, J.M., 1968. Metabolism of poly(β-hydroxybutyrate). I. Purification, composition, and properties of native poly(β-hydroxybutyrate) granules from *Bacillus megaterium*. *Biochemistry*, 7(10), pp.3676–3681.

Gross, C.A. et al., 1996. The Function and Regulation of Heat Shock Proteins in *Escherichia coli.* In *Stress Proteins in Biology and Medicine*. pp. 167–189.

Guisbert, E. et al., 2008. Convergence of molecular, modeling, and systems approaches for an understanding of the *Escherichia coli* heat shock response. *Microbiology and molecular biology reviews*, 72(3), pp.545–54.

Han, M. et al., 2006. Analysis of Poly (3-Hydroxybutyrate) Granule-Associated Proteome in Recombinant *Escherichia coli*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 16, pp.901–910.

Han, M., Yoon, S.S. & Lee, S.Y., 2001. Proteome Analysis of Metabolically Engineered *Escherichia coli* Producing Poly (3-Hydroxybutyrate). *Journal of Bacteriology*, 183(1), pp.301–308.

Han, M.-J. et al., 2004. Roles and applications of small heat shock proteins in the production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Biotechnology and bioengineering*, 88(4), pp.426–36.

Haywood, G.W. et al., 1990. Accumulation of a Polyhydroxyalkanoate Containing Primarily 3-Hydroxydecanoate from Simple Carbohydrate Substrates by *Pseudomonas* sp . Strain NCIMB 40135. *Applied and environmental microbiology*, 56(11), pp.3354–3359.

Henryssont, T. & Mccarty, P.L., 1993. Influence of the Endogenous Storage Lipid Poly- , 3-Hydroxybutyrate on the Reducing Power Availability during Cometabolism of Trichloroethylene and Naphthalene by Resting Methanotrophic Mixed Cultures. , 59(5), pp.1602–1606.

Hoffmann, F., Posten, C. & Rinas, U., 2001. Kinetic model of in vivo folding and inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology and bioengineering*, 72(3), pp.315–22.

Hoffmann, F. & Rinas, U., 2000. Kinetics of Heat-Shock Response and Inclusion Body Formation During Temperature-Induced Production of Basic Fibroblast Growth Factor in High-Cell-Density Cultures of Recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology Progress*, 16(6), pp.1000–1007.

Hoffmann, F. & Rinas, U., 2004. Stress Induced by Recombinant Protein Production in *Escherichia coli*. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 89, pp.73–92.

Hoffmann, F., Weber, J. & Rinas, U., 2002. Metabolic adaptation of *Escherichia coli* during temperature-induced recombinant protein production: 1. Readjustment of metabolic enzyme synthesis. *Biotechnology and bioengineering*, 80(3), pp.313–9.

Horwich, A.. et al., 1993. Folding *in vivo* of bacterial cytoplasmic proteins: role of GroEL. *Cell*, 74(5), pp.909–17.

Huang, H.C. et al., 2001. The molecular chaperone DnaJ is required for the degradation of a soluble abnormal protein in *Escherichia coli. The Journal of biological chemistry*, 276(6), pp.3920–8.

Huijberts, G.N. et al., 1992. *Pseudomonas putida* KT2442 cultivated on glucose accumulates poly(3-hydroxyalkanoates) consisting of saturated and unsaturated monomers. *Applied and environmental microbiology*, 58(2), pp.536–44.

Jakob, U. et al., 1993. Small heat shock proteins are molecular chaperones. *The Journal of biological chemistry*, 268(3), pp.1517–20.

Jakob, U. & Buchner, J., 1994. Assisting spontaneity: the role of Hsp90 and small Hsps as molecular chaperones. *Cell*, 19, pp.205–211.

Jendrossek, D., 2009. Polyhydroxyalkanoate granules are complex subcellular organelles (carbonosomes). *Journal of bacteriology*, 191(10), pp.3195–202.

Jendrossek, D. & Pfeiffer, D., 2013. New Insights in Formation of Polyhydroxyalkanoate (PHA) granules (Carbonosomes) and Novel Functions of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB). *Environmental microbiology*.

Jossek, R. & Steinbüchel, a, 1998. *In vitro* synthesis of poly(3-hydroxybutyric acid) by using an enzymatic coenzyme A recycling system. *FEMS microbiology letters*, 168(2), pp.319–24.

Jubete, Y., Maurizi, M.R. & Gottesman, S., 1996. Role of the Heat Shock Protein DnaJ in the Lon-dependent Degradation of Naturally Unstable Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 271(48), pp.30798–30803.

Junker, R.N.H., Stubbe, J.O.A. & York, G.M., 2001. Accumulation of the PhaP Phasin of *Ralstonia eutropha* Is Dependent on Production of Polyhydroxybutyrate in Cells. , 183(14), pp.4217–4226.

Jürgen, B. et al., 2000. Monitoring of genes that respond to overproduction of an insoluble recombinant protein in *Escherichia coli* glucose-limited fed-batch fermentations. *Biotechnology and bioengineering*, 70(2), pp.217–24.

Kanemori, M., Mori, H. & Yura, T., 1994. Induction of heat shock proteins by abnormal proteins results from stabilization and not increased synthesis of sigma 32 in *Escherichia coli. Journal of bacteriology*, 176(18), pp.5648–53.

Kelley, L.A. & Sternberg, M.., 2009. Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. *Nature Protocols*, 4(3), pp.363–71.

Kelly, S.M., Jess, T.J. & Price, N.C., 2005. How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et biophysica acta*, 1751(2), pp.119–39.

Kessler, B. & Witholt, B., 1999. Poly(3-hydroxyalkanoates). In *Encyclopedia of bioprocess technology*. New York: John Wiley & Sons, pp. 2024–2040.

King, J. et al., 1996. Thermolabile folding intermediates: inclusion body precursors and chaperonin substrates. *FASEB J.*, 10(1), pp.57–66.

Kitagawa, M. et al., 2002. *Escherichia coli* small heat shock proteins, IbpA and IbpB, protect enzymes from inactivation by heat and oxidants. *European Journal of Biochemistry*, 269(12), pp.2907–2917.

Kitagawa, M., Matsumura, Y. & Tsuchido, T., 2000. Small heat shock proteins, IbpA and IbpB, are involved in resistances to heat and superoxide stresses in *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters*, 184(2), pp.165–71.

Koller, M. et al., 2005. Production of polyhydroxyalkanoates from agricultural waste and surplus materials. *Biomacromolecules*, 6(2), pp.561–5.

De Koning, G.J.M. & Maxwell, I.A., 1993. Biosynthesis of poly-(R)-3-hydroxyalkanoate: An emulsion polymerization. *Journal of environmental polymer degradation*, 1(3), pp.223–226.

Kostas, T. et al., 1991. High activity of inclusion bodies formed in *Escherichia coli* overproducing Clostridium thermocellum endoglucanase D. *FEBS Letters*, 282(1), pp.205–208.

Kuchta, K. et al., 2007. Studies on the influence of phasins on accumulation and degradation of PHB and nanostructure of PHB granules in *Ralstonia eutropha* H16. *Biomacromolecules*, 8(2), pp.657–62.

Kuczyńska-Wiśnik, D. et al., 2002. The E*scherichia coli* small heat-shock proteins IbpA and IbpB prevent the aggregation of endogenous proteins denatured *in vivo* during extreme heat shock. *Microbiology (Reading, England)*, 148(Pt 6), pp.1757–65.

Kuczyńska-Wiśnik, D., Matuszewska, E. & Laskowska, E., 2010. *Escherichia coli* heat-shock proteins IbpA and IbpB affect biofilm formation by influencing the level of extracellular indole. *Microbiology (Reading, England)*, 156(Pt 1), pp.148–57.

Kyte, J. & Doolittle, R.F., 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *Journal of molecular biology*, 157(1), pp.105–32.

Lageveen, R.G. et al., 1988. Formation of Polyesters by *Pseudomonas oleovorans*: Effect of Substrates on Formation and Composition of Poly-(R)-3-Hydroxyalkanoates and Poly-(R)-3-Hydroxyalkenoates. *Applied and environmental microbiology*, 54(12), pp.2924–32.

Laskowskaa, E., Wawrzynow, A. & Taylor, A., 1996. lbpA and IbpB , the new heat-shock proteins bind to endogenous *Escherichia coli* proteins aggregated intracelullarly by heat shock. *Biochimie*, 78, pp.117–122.

Lau, S.Y.M., Taneja, A.K. & Hodges, S., 1984. Synthesis of a Model Protein of Defined Secondary and Quaternary Structure. *The Journal of Biological Chemistry,* 259(21), pp.13253-13261.

Lee, G.J. & Vierling, E., 2000. A small heat shock protein cooperates with heat shock protein 70 systems to reactivate a heat-denatured protein. *Plant physiology*, 122(1), pp.189–98.

Linding, R. et al., 2003. Protein Disorder Prediction. *Structure*, 11(11), pp.1453–1459.

Lindner, A.B. et al., 2008. Asymmetric segregation of protein aggregates is associated with cellular aging and rejuvenation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), pp.3076–81.

López, N.I. et al., 1995. Effect of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) content on the starvation-survival of bacteria in natural waters. *FEMS Microbiology Ecology*, 16(2), pp.95–101.

Louis-Jeune, C., Andrade-Navarro, M. a & Perez-Iratxeta, C., 2011. Prediction of protein secondary structure from circular dichroism using theoretically derived spectra. *Proteins*, (September), pp.374–381.

Luo, Y. & Baldwin, R.L., 1998. Trifluoroethanol stabilizes the pH 4 folding intermediate of sperm whale apomyoglobin. *Journal of molecular biology*, 279(1), pp.49–57.

Lupas, a, Van Dyke, M. & Stock, J., 1991. Predicting coiled coils from protein sequences. *Science (New York, N.Y.)*, 252(5009), pp.1162–4.

Madison, L.L. & Huisman, G.W., 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 63(1), pp.21–53.

Maehara, a et al., 1999. Analyses of a polyhydroxyalkanoic acid granule-associated 16-kilodalton protein and its putative regulator in the pha locus of *Paracoccus denitrificans*. *Journal of bacteriology*, 181(9), pp.2914–21.

Maestro, B. et al., 2013. A new family of intrinsically disordered proteins: structural characterization of the major phasin PhaF from *Pseudomonas putida* KT2440. *PloS one*, 8(2), p.e56904.

Malm, T. et al., 1992. A new biodegradable patch for closure of atrial septal defect. An experimental study. *Scand J Thorac Cardiovasc Surg.*, 26(1), pp.9–14.

Matsusaki, H. et al., 1998. Cloning and molecular analysis of the Poly(3-hydroxybutyrate) and Poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyalkanoate) biosynthesis genes in *Pseudomonas* sp. strain 61-3. *Journal of bacteriology*, 180(24), pp.6459–67.

Mayer, F. & Hoppert, M., 2007. Determination of the thickness of the boundary layer surrounding bacterial PHA inclusion bodies, and implications for models describing the molecular architecture of this layer. *Journal of Basic Microbiology*, 37(1), pp.45–52.

McCool, G.J. & Cannon, M.C., 1999. Polyhydroxyalkanoate inclusion body-associated proteins and coding region in *Bacillus megaterium*. *Journal of bacteriology*, 181(2), pp.585–92.

Mergaert, J. et al., 1992. Biodegradation of polyhydroxyalkanoates. *FEMS microbiology reviews*, 9(2-4), pp.317–21.

Merrick, J.M. & Doudoroff, M., 1961. Enzymatic Synthesis of Poly-β-Hydroxybutyric Acid in Bacteria. *Nature*, 189, pp.890–892.

Moldes, C. et al., 2004. *In Vivo* Immobilization of Fusion Proteins on Bioplastics by the Novel Tag BioF. *Applied and environmental microbiology*, 70(6), pp.3205–3212.

Moldes, C. et al., 2006. New tool for spreading proteins to the environment: Cry1Ab toxin immobilized to bioplastics. *Applied microbiology and biotechnology*, 72(1), pp.88–93.

Neumann, L. et al., 2008. Binding of the major phasin, PhaP1, from *Ralstonia eutropha* H16 to poly(3-hydroxybutyrate) granules. *Journal of bacteriology*, 190(8), pp.2911–9.

Nikel, P.I. et al., 2005. Statistical optimization of a culture medium for biomass and poly (3-hydroxybutyrate) production by a recombinant *Escherichia coli* strain using agroindustrial byproducts. *International microbiology : the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 8(4), pp.243–50.

Nishihara, K. et al., 2000. Overexpression of trigger factor prevents aggregation of recombinant proteins in *Escherichia coli. Applied and environmental microbiology*, 66(3), pp.884–9.

Oberg, K. et al., 1994. Native-like Secondary Structure in Interleukin-1.beta. Inclusion Bodies by Attenuated Total Reflectance FTIR. *Biochemistry*, 33(9), pp.2628–2634.

Pais, J. et al., 2014. Improvement on the yield of polyhydroxyalkanotes production from cheese whey by a recombinant *Escherichia coli* strain using the proton suicide methodology. *Enzyme and microbial technology*, 55, pp.151–8.

Parsell, D. a & Sauer, R.T., 1989. Induction of a heat shock-like response by unfolded protein in Escherichia coli: dependence on protein level not protein degradation. *Genes & Development*, 3(8), pp.1226–1232.

Parsell, D.. et al., 1994. Protein disaggregation mediated by heat shock protein Hsp104. *Nature*, 372, pp.475 – 478.

Peralta-gil, M. et al., 2002. Expression of the *Azotobacter vinelandii* Poly- β -Hydroxybutyrate Biosynthetic phbBAC Operon Is Driven by Two Overlapping Promoters and Is Dependent on the Transcriptional Activator PhbR . *Journal of bacteriology,* 184(20), pp. 5672-5677.

Pettinari, M. et al., 2003. Insertion sequence-like elements associated with putative polyhydroxybutyrate regulatory genes in *Azotobacter* sp. FA8. *Plasmid*, 50(1), pp.36–44.

Pettinari, M.J. et al., 2001. Poly (3-Hydroxybutyrate) synthesis genes in *Azotobacter* sp . FA8. *Applied and environmental microbiology* , 67(11), pp.5331–5334.

Pfeiffer, D. & Jendrossek, D., 2011. Interaction between poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins as revealed by two-hybrid analysis and identification of a new phasin in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology*, 157(Pt 10), pp.2795–807.

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

Pieper-Fürst, U. et al., 1995. Identification of the region of a 14-kilodalton protein of *Rhodococcus ruber* that is responsible for the binding of this phasin to polyhydroxyalkanoic acid granules. *Journal of bacteriology*, 177(9), pp.2513–23.

Pieper-Fürst, U. et al., 1994. Purification and characterization of a 14-kilodalton protein that is bound to the surface of polyhydroxyalkanoic acid granules in *Rhodococcus ruber*. *Journal of bacteriology*, 176(14), pp.4328–37.

Pötter, M. et al., 2002. Regulation of phasin expression and polyhydroxyalkanoate (PHA) granule formation in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology*, 148(Pt 8), pp.2413–26.

Pötter, M. et al., 2004. The complex structure of polyhydroxybutyrate (PHB) granules: four orthologous and paralogous phasins occur in *Ralstonia eutropha*. *Microbiology*, 150(Pt 7), pp.2301–11.

Pötter, M., Müller, H. & Steinbüchel, A., 2005. Influence of homologous phasins (PhaP) on PHA accumulation and regulation of their expression by the transcriptional repressor PhaR in *Ralstonia eutropha* H16. *Microbiology*, 151(Pt 3), pp.825–33.

Pötter, M. & Steinbüchel, A., 2005. Poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins: impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. *Biomacromolecules*, 6(2), pp.552–60.

Prieto, M.A. et al., 1999. PhaF, a polyhydroxyalkanoate-granule-associated protein of *Pseudomonas oleovorans* GPo1 involved in the regulatory expression system for *pha* genes. Journal of Bacteriology, 181(3), pp. 858-68.

Qi, Q., Steinbuchel, A. & Rehm, B.H.A., 2000. *In vitro* synthesis of poly (3-hydroxydecanoate): purification and enzymatic characterization of type II polyhydroxyalkanoate synthases PhaC1 and PhaC2 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied microbiology and biotechnology*, 54, pp.37–43.

Quagliano, J., Alegre, P. & Miyazaki, S., 1994. Isolation and characterization of *Azotobacter* sp. for the production of poly-beta-hydroxyalkanoates. *Rev Argent Microbiol.*, 26(1), pp.21–7.

Ratajczak, E., Zietkiewicz, S. & Liberek, K., 2009. Distinct activities of *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB promote efficient protein disaggregation. *Journal of molecular biology*, 386(1), pp.178–89.

Rinas, U., 1996. Synthesis Rates of Cellular Proteins Involved in Translation and Protein Folding Are Strongly Altered in Response to Overproduction of Basic Fibroblast Growth Factor by Recombinant *Escherichia coli. Biotechnology progress*, 12(2), pp.196–200.

Robson, R.L. et al., 1984. Genome size and complexity in A*zotobacter chroococcum*. *Journal of general microbiology*, 130(7), pp.1603–12.

Rüdiger, S. et al., 1997. Substrate specificity of the DnaK chaperone determined by screening cellulose-bound peptide libraries. *EMBO Journal*, 16(7), pp.1501–7.

Ruiz, J. a et al., 2006. dye (arc) Mutants: insights into an unexplained phenotype and its suppression by the synthesis of poly (3-hydroxybutyrate) in *Escherichia coli* recombinants. *FEMS microbiology letters*, 258(1), pp.55–60.

Ruiz, J., Lopez, N.. & Mendez, B., 1999. Polyhydroxyalkanoates degradation affects survival of *Pseudomonas oleovorans* in river water microcosms. *Rev Argent Microbiol*, 31(4), pp.201–4.

Ruiz, J.. et al., 2001. Polyhydroxyalkanoate Degradation Is Associated with Nucleotide Accumulation and Enhances Stress Resistance and Survival of *Pseudomonas oleovorans* in Natural Water Microcosms. *Applied and environmental microbiology*, 67(1), pp.225–230.

Schlieker, C., Bukau, B. & Mogk, A., 2002. Prevention and reversion of protein aggregation by molecular chaperones in the *E. coli* cytosol: implications for their applicability in biotechnology. *Journal of biotechnology*, 96(1), pp.13–21.

Segura, D., Guzmán, J. & Espín, G., 2003. *Azotobacter vinelandii* mutants that overproduce poly-beta-hydroxybutyrate or alginate. *Applied microbiology and biotechnology*, 63(2), pp.159–63.

Sherman, M.. & Goldberg, A.., 1992. Involvement of the chaperonin dnaK in the rapid degradation of a mutant protein in *Escherichia coli*. *The EMBO journal*, 11(1), pp.71–7.

Sickmeier, M. et al., 2007. DisProt: the Database of Disordered Proteins. *Nucleic acids research*, 35(Database issue), pp.D786–93.

Slavik, J., 1995. Anilinonaphthalene sulfonate as a probe of membrane composition and function. *Biochimica et Biophysica Acta*, 694(1), pp.1–25.

Smock, R.G., Blackburn, M.E. & Gierasch, L.M., 2011. Conserved, disordered C terminus of DnaK enhances cellular survival upon stress and DnaK *in vitro* chaperone activity. *The Journal of biological chemistry*, 286(36), pp.31821–9.

Steinbüchel, a et al., 1992. Molecular basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 10(3-4), pp.347–50.

Steinbüchel, A. & Hein, S., 2001. Biochemical and molecular basis of microbial synthesis of polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, (71), pp.81–123.

Steinbüchel, A. & Lütke-Eversloh, T., 2003. Metabolic engineering and pathway construction for biotechnological production of relevant polyhydroxyalkanoates in microorganisms. *Biochemical Engineering Journal*, 16(2), pp.81–96.

Steinbüchel, A. & Schlegel, H.G., 1991. Physiology and molecular genetics of poly (p-hydroxy- alkanoic acid) synthesis in *Alcaligenes eutrophus*. *Molecular microbiology*, 5(3), pp.535–542.

Steinmetz, M.O. et al., 1998. A distinct 14 residue site triggers coiled-coil formation in cortexillin I. *The EMBO journal*, 17(7), pp.1883–91.

Sudesh, K., 2004. Microbial polyhydroxyalkanoates (PHAs): an emerging biomaterial for tissue engineering and therapeutic applications. *Med J Malaysia*, 59 Suppl B, pp.55–6.

Sudesh, K., Abe, H. & Doi, Y., 2000. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. *Progress in Polymer Science*, 25(10), pp.1503–1555.

Taylor, G. et al., 1986. Size and Density of Protein Inclusion Bodies. *Nature Biotecnology*, 4, pp.553–557.

Tessmer, N. et al., 2007. Heat-shock protein HspA mimics the function of phasins *sensu stricto* in recombinant strains of *Escherichia coli* accumulating polythioesters or polyhydroxyalkanoates. *Microbiology*, 153(Pt 2), pp.366–74.

Teter, S. a et al., 1999. Polypeptide flux through bacterial Hsp70: DnaK cooperates with trigger factor in chaperoning nascent chains. *Cell*, 97(6), pp.755–65.

Thomas, J. & Baneyx, F., 1998. Roles of the *Escherichia coli* Small Heat Shock Proteins IbpA and IbpB in Thermal Stress Management : Comparison with ClpA , ClpB , and HtpG In Vivo. *Journal of bacteriology*, 180(19), pp.5165–5172.

Thomas, J.., Ayling, A. & Baneyx, F., 1997. Molecular chaperones, folding catalysts, and the recovery of active recombinant proteins from *E. coli*. to fold or to refold. *Appl Biochem Biotechnol*, 66(3), pp.197–238.

Tian, J. et al., 2005. Analysis of Transient Polyhydroxybutyrate Production in *Wautersia eutropha* H16 by Quantitative Western Analysis and Transmission Electron Microscopy. , 187(11), pp.3825–3832.

Timm, A. & Steinbüchel, A., 1990. Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *Applied and environmental microbiology*, 56(11), pp.3360–7.

Tomoyasu, T. et al., 2001. Genetic dissection of the roles of chaperones and proteases in protein folding and degradation in the *Escherichia coli* cytosol. *Molecular microbiology*, 40(2), pp.397–413.

Ushimaru, K. et al., 2014. Phasin Proteins Activate *Aeromonas caviae* Polyhydroxyalkanoate (PHA) Synthase but Not *Ralstonia eutropha* PHA Synthase. *Applied and environmental microbiology*, 80(9), pp.2867–73.

Uversky, V., Gillespie, J. & Fink, A., 2000. Why are "natively unfolded" proteins unstructured under physiologic conditions? *Proteins*, 41(3), pp.415–27.

Uversky, V.N., 2002. Natively unfolded proteins : A point where biology waits for physics. Protein Science , 11, pp.739–756.

Uversky, V.N., 1993. Use of fast protein size-exclusion liquid chromatography to study the unfolding of proteins which denature through the molten globule. *Biochemistry*, 32(48), pp.13288–98.

Veinger, L. et al., 1998. The small heat-shock protein IbpB from *Escherichia coli* stabilizes stress-denatured proteins for subsequent refolding by a multichaperone network. *The Journal of biological chemistry*, 273(18), pp.11032–7.

Verlinden, R. a J. et al., 2007. Bacterial synthesis of biodegradable polyhydroxyalkanoates. *Journal of applied microbiology*, 102(6), pp.1437–49.

Vincent, T.L., Green, P.J. & Woolfson, D.N., 2013. LOGICOIL--multi-state prediction of coiled-coil oligomeric state. *Bioinformatics,* 29(1), pp.69–76.

Vind, J. et al., 1993. Kinetic model of in vivo folding and inclusion body formation in recombinant *Escherichia coli. Journal of molecular biology*, 231, pp.678–688.

Wei, D.-X. et al., 2011. Application of polyhydroxyalkanoate binding protein PhaP as a bio-surfactant. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(4), pp.1037–47.

Wieczorek, R. et al., 1995. Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus. Journal of bacteriology*, 177(9), pp.2425–35.

Wood, D.W. et al., 1999. A genetic system yields self-cleaving inteins for bioseparations. *Nature Biotecnology*, 17, pp.889 – 892.

Worrall, D. & Goss, N., 1989. The formation of biologically active beta-galactosidase inclusion bodies in *Escherichia coli*. *Aust J Biotechnol.*, 3(1), pp.28–32.

Xue, B. et al., 2010. PONDR-FIT: A Meta-Predictor of Intrinsically Disordered Amino Acids. *Biochim Biophys Acta.*, 1804(4), pp.996–1010.

Yao, Y.-C. et al., 2008. A specific drug targeting system based on polyhydroxyalkanoate granule binding protein PhaP fused with targeted cell ligands. *Biomaterials*, 29(36), pp.4823–30.

Yasukawa, T. et al., 1995. Increase of solubility of foreign proteins in *Escherichia coli* by coproduction of the bacterial thioredoxin. *The Journal of biological chemistry*, 270(43), pp.25328–31.

York, G.M., Stubbe, J. & Sinskey, A.J., 2001. New Insight into the Role of the PhaP Phasin of *Ralstonia eutropha* in Promoting Synthesis of Polyhydroxybutyrate. *Journal of Bacteriology*, 183(7), pp.2394–2397.

Yura, T., 2000. The Heat Shock Response: Regulation and Function. In *Bacterial stress responses*. Washington D.C: ASM Press, pp. 3–18.

Zhao, M. et al., 2006. Crystallization and initial X-ray analysis of polyhydroxyalkanoate granule-associated protein from *Aeromonas hydrophila. Acta crystallographica. Section F, Structural biology and crystallization communications*, 62(Pt 8), pp.814–9.