



BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



FACULTAD DE MEDICINA

INSTITUTO DE CIENCIAS

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS
MICROBIOLÓGICAS**

**Análisis *in silico* de la interacción entre las fasinas PhaP1, PhaP2
y PhaP3 con el gen *phbC* de *Azospirillum brasilense* Sp7 y
detección de la PhaP3.**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE: LICENCIADO

EN BIOMEDICINA

PRESENTA:

Yahev Domínguez Antúnez

Director de tesis:

DC. LUIS JAVIER MARTÍNEZ MORALES Codirectora

de tesis:

DC. MARÍA DE LOS ÁNGELES MARTÍNEZ MARTÍNEZ

Enero, 2025

Primeramente, quiero agradecer a mis padres por acompañarme siempre en mi camino, apoyarme en cualquier situación y nunca soltarme. Agradecer a mi abuelo por su gran amor y apoyo durante este proceso.

Agradezco a Dios por siempre proveer, darme sabiduría, paz durante las adversidades y nunca soltarme de su mano, reforzar mi fe en el y que todo lo puedo en sus manos.

Así mismo quiero agradecer a mi tutor de tesis, al Dr. Luis Javier Martínez Morales por su paciencia, apoyo y compromiso para hacer posible esta investigación.

También a los docentes que estuvieron presentes para la realización de esta investigación, la Dra. Lucia, la Dr. Claudia, Dr. Angeles quienes brindaron su apoyo y tiempo para el seguimiento de mi trabajo.

A todos los docentes que me acompañaron durante la carrera, gracias por su apoyo, palabras de ánimo, consejos y pasión transmitida para con la investigación.

Agradezco a los amigos que estuvieron en mi camino, a Yovanni por empezar este viaje juntos, Rubén por los momentos inigualables, a Jess y Andy por su apoyo, consuelo y momentos de calidad en el laboratorio. También a los chicos que me acompañaron en los experimentos, Damián, Miguel por su apoyo y acompañamiento en los momentos grises.

Índice

Índice.....	2
Abreviaturas.....	4
Antecedentes.....	5
□ <i>Azospirillum brasilense</i>	5
□ Características de <i>Azospirillum</i> spp.....	5
□ Polihidroxicanoatos.....	6
□ Síntesis de PHA.....	7
□ PHA sintasa (PhbC).....	8
□ Poli-β-hidroxi-butirato (PHB).....	9
□ Fasinias (PhaP).....	11
□ Reguladores PhaR y PhaM.....	12
□ Regulador PhaQ.....	14
□ Regulador PhaF.....	15
□ Regiones promotoras de <i>phaC</i> en <i>Pseudomonas</i> sp BJ-1.....	16
□ Fasinias en <i>Azospirillum brasilense</i> sp7.....	17
Justificación.....	18
Planteamiento del problema.....	19
Hipótesis Científica.....	19
Objetivos.....	19
Objetivo General.....	19
Objetivos Especificos.....	19
Estrategia de trabajo.....	21
Materiales y métodos.....	22
Resultados.....	24
Discusión.....	34
Conclusión.....	36
Perspectiva.....	37
Anexos.....	37
Bibliografía.....	53

Abreviaturas

C/N	Relación Carbono: Nitrógeno
ADN	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad Óptica
GAP	Proteínas de Unión al Gránulo
G	Gramos
H	Horas
kDa	kilo Dalton
LB	Medio Luria-Bertani
MMKM	Medio mínimo K-Malato
L	Litro
Lb	Libras
PHB	Poli- β -hidroxibutirato
PHA	Polihidroxicanoatos
LCL _{PHA}	PHA de cadena larga
MCL _{PHA}	PHA de cadena media
SCL _{PHA}	PHA de cadena corta
mL	Mililitro
Mg	Miligramos
Min	Minutos
μ l	Microlitro
mM	Milimolar
M	Molar
NCBI	Centro Nacional para la

Información Biotecnológica

Nm	Nanómetros
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pb	Pares de bases
S	Segundos
%	Porcentaje
°C	Grados Centígrados
V	Volts

Introducción:

Azospirillum brasilense es una rizobacteria de vida libre, capaz de fijar nitrógeno, solubilizar fosfatos, colonizar y promover el crecimiento de cultivos, por lo que forma parte del grupo de bacterias conocidas como bacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPR, **plant growth promoting rhizobacteria**) (1). Además, tiene la capacidad de acumular gránulos insolubles de poli- β -hidroxibutirato (PHB). El PHB es una fuente de carbono y energía que utiliza la bacteria cuando se encuentra en condiciones de inanición (2) (Figura 1).

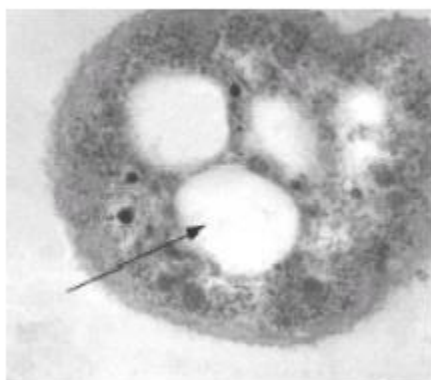


Figura 1. Gránulos de PHB en *Azospirillum brasilense*. (2).

Características de *Azospirillum* spp.

Azospirillum brasilense pertenece a la subclase α -proteobacteria. Es un bacilo Gram negativo (3), mide de 0.8-1 μm de ancho y 2 - 4 μm de largo. El hábitat natural de esta bacteria es la rizosfera. *Azospirillum* presenta una forma vibroide capaz de adaptar su flagelación a diferentes ambientes, el desarrollo de un flagelo polar se presenta en *Azospirillum* al encontrarse en medios líquidos; en medios sólidos o semisólidos puede desarrollar flagelos periféricos, donde su desplazamiento asemeja la forma de un abanico (twitching) (4) (Figura 2). Tiene la capacidad de desplazarse a lugares óptimos de nutrientes y oxígeno para su crecimiento, responde a los cambios en el equilibrio de C/N (5). La relación de carbono y nitrógeno empleada durante su crecimiento influye en la producción de PHB (poli β -hidroxibutirato).

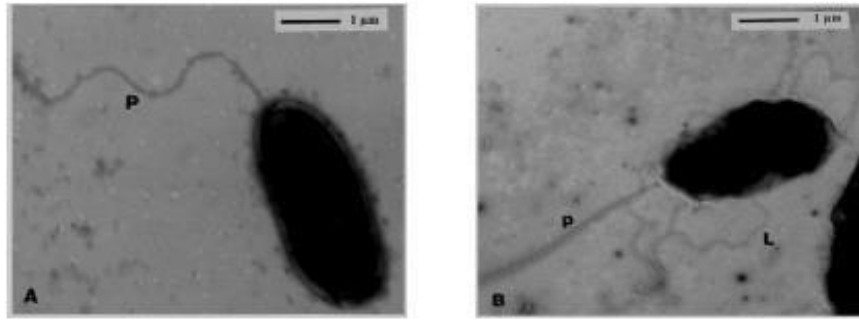


Figura 2. Micrografía electrónica de *A. brasilense* Sp7. Se muestra un flagelo polar (P) cuando se cultiva en un medio líquido (A), mientras que en un medio sólido o semisólido (B) se generan flagelos laterales. (4).

Polihidroxicanoatos

Los polihidroxicanoatos (PHA) son polímeros de ácidos hidroxicanoicos. La formación de PHA se lleva a cabo por la acción de enzimas intracelulares, que condensan el grupo carboxilo de un monómero con el grupo hidroxilo del siguiente (6) (Figura 3). El PHA se sintetiza durante la fermentación de lípidos, azúcares y alcoholes en proporciones elevadas de C/N. En los microorganismos, el PHA se acumula como polímero amorfo en forma de gránulos, los cuales se alojan en el citoplasma y funcionan como estructuras de reserva de carbono y energía para la supervivencia de la bacteria ante condiciones de crecimiento desfavorables (7).

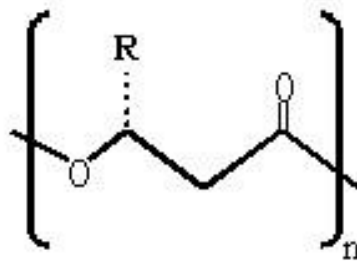


Figura 3. Estructura general de polihidroxicanoatos (PHA) (6).

Síntesis de PHA

La composición monomérica de los biopolímeros de PHA es diversa, dependiendo de las rutas metabólicas empleadas, así como la fuente de carbono utilizada para

dicho proceso. Estos polímeros se originan a partir de tres vías metabólicas principales: la degradación de azúcares con la obtención de acetil-CoA, el proceso de degradación de ácidos grasos (β -oxidación) y la biosíntesis de ácidos grasos (8) (Figura 4).

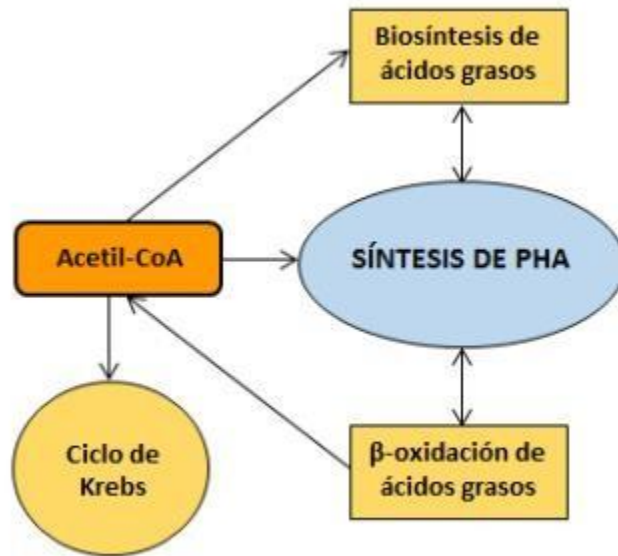


Figura 4. Vías metabólicas implicadas en la síntesis de PHA (8).

Los PHA's se pueden clasificar de acuerdo con su estructura monomérica, composición química y número de carbonos. Así, los PHA's de cadena corta (SCL_{PHA}), están compuestos por monómeros de 3 a 5 átomos de carbono, los PHAs de cadena media (MCL_{PHA}), están formados por monómeros de 6 a 14 átomos de carbono y los PHA's de cadena larga (LCL_{PHA}) contienen monómeros de 15 o más átomos de carbonos (9).

Los gránulos de PHA se acumulan cerca de la membrana de las bacterias alcanzando un 80% del peso seco celular, donde el 97.5% representa el contenido de PHA, 2% de proteínas y se ha reportado también, una pequeña cantidad de lípidos (10).

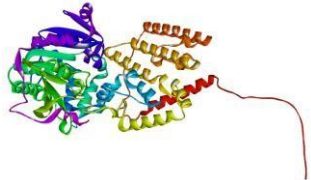
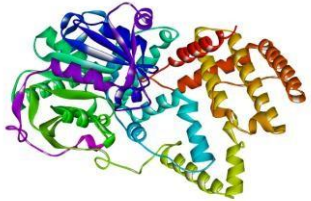
PHA sintasa (PhbC)

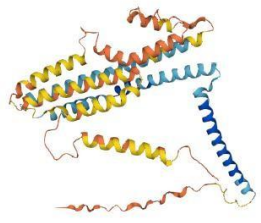
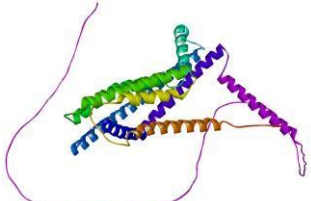
La enzima PHA sintasa (PhbC) es la encargada de la formación de PHA mediante la polimerización del ácido hidroxialcanoico en polímeros de PHA. Las enzimas PhbC se pueden clasificar en cuatro grupos de acuerdo con la estructura primaria de la proteína, la especificidad del sustrato y composición de las subunidades. Las enzimas PhbC de clase I (PhaC) pueden emplear como sustrato el tioéster de CoA de hidroxialcanoatos (11).

Las enzimas PhbC de clase II (PhaC1 y PhaC2), son subunidades más pequeñas que las PhbC de clase I. Estas enzimas tienen la capacidad de utilizar tioésteres CoA de hidroxialcanoatos como sustrato. Las PhbC de clase II se encuentran principalmente en *Pseudomonas aeruginosa* (12) (Tabla 1).

Las PhbC de clases III (PhaC y PhaE) y IV (PhaC y PhaR) necesitan dos subunidades para su funcionamiento: una subunidad catalítica PhbC y una subunidad PhaR. Las PhbC de clases III y IV prefieren tioésteres de CoA de hidroxialcanoatos de como sustratos. Estas enzimas son características en *Bacillus megaterium* (12) (Tabla 1).

Tabla 1. Clase de PHA sintasas (PhbC) (12), modelos obtenidos de AlphaFold.

Clase	Cepa	kDa	Estructura 3D
PhbC Clase I	<i>Cupriavidus necator</i>	64.3	
PhbC Clase II	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	62.6	

PhbC Clase III	<i>Allochromatium vinosum</i>	27.2	
PhbC Clase IV	<i>Bacillus megaterium</i>	22-41	

Poli-β-hidroxi-butirato (PHB)

El Poli-β-hidroxi-butirato (PHB) es un homopolímero de longitud reducida que incluye un grupo metilo en su cadena lateral (13). El PHB pertenece al grupo de los polihidroxi-alcanoatos (PHAs). A pesar de presentar propiedades similares a los plásticos derivados del petróleo, el PHB se caracteriza por su biodegradabilidad, baja elasticidad y alta rigidez (14).

El proceso de síntesis de PHB es genotípicamente determinado, lo que indica que no es efectuado de igual manera en todos los microorganismos. La síntesis de PHB consta de tres procesos enzimáticos. Durante el primer proceso, la enzima β-cetotiolasa (codificada por el gen *phbA*), facilita la condensación de dos moléculas de acetil-CoA, dando como resultado la formación de acetoacetil-CoA. El segundo proceso se lleva a cabo cuando la molécula de acetoacetil-CoA es reducida a β-hidroxi-butiril-CoA por la enzima acetoacetil-CoA reductasa dependiente de NADPH (codificada por el gen *phbB*). Como último paso, la molécula de β-hidroxi-butiril-CoA es polimerizada en PHB por la enzima PHB polimerasa (codificada por el gen *phbC*) (14) (Figura 5).

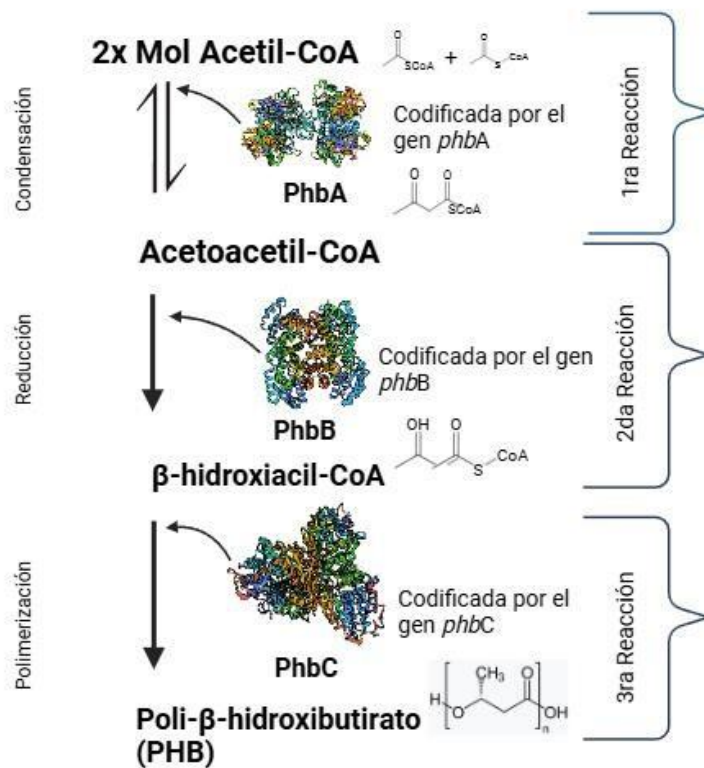


Figura 5. Vía de síntesis de PHB, modificado de (14). creado en BioRender.

También se han descrito algunas proteínas (GAP's) asociadas al granulo de PHA, también conocidos como carbonosomas (Figura 6). La PHA sintasa (PhbC), responsable de la polimerización de los monómeros de β-hidroxiacil-CoA. La PHB depolimerasa (PhaZ), responsable de la movilización del polímero acumulado en los microorganismos cuando el ambiente se vuelve desfavorable. Y proteínas reguladoras (PhaR) y fasinas (PhaP) (7).

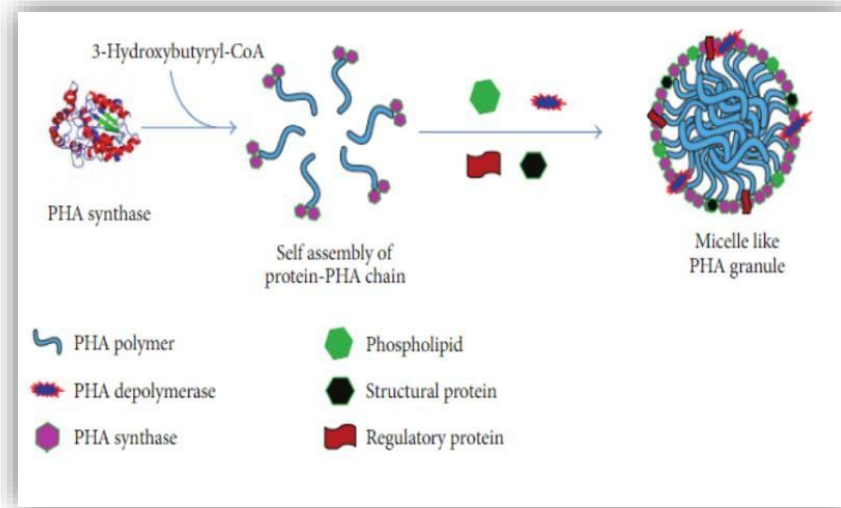


Figura 6. Representación de la formación de los gránulos de PHB (7).

Fasinas (PhaP)

Las fasinas son proteínas anfipáticas no catalíticas de bajo peso molecular (13-28 kDa). Estas proteínas contienen regiones hidrofóbicas que les permiten unirse a los gránulos de PHA y una región hidrofílica expuesta en el citoplasma (7).

En *Ralstonia eutropha*, ahora conocida como *Cupriavidus necator* (15), se caracterizó la proteína PhaP1 y con ella otras 6 fasinas adicionales (PhaP2-PhaP7). Así mismo, se comprobó que PhaP1 dispone de una acción moduladora en la producción de PHB dependiente del gen *phbC* (16). Se observó que PhaP1 se encuentra unida a la superficie hidrofóbica del polímero de PHB (inmediatamente de la formación de este) desempeñando un papel esencial en la formación, tamaño y cantidad de gránulos. Sin embargo, en presencia de PhaP1 la importancia relativa de las otras fasinas es menor, ya que la eliminación individual de cualquiera de ellas no produce ningún efecto apreciable sobre la síntesis de polímeros (16).

Antecedentes específicos

Se han caracterizado los tres genes esenciales para la biosíntesis de PHB, *phbA* (β -cetotilasa), *phbB* (acetoacetyl-CoA A reductasa) y *phbC* (PHB sintasa). Se

estableció un mapa físico de *A. brasilense*, donde los 3 genes se arreglan en el operón *phbCAB* ubicado en el plásmido 4 en el que los genes *phbB* y *phbA* se cotranscriben y el gen *phbC*, es divergente (17). Los genes en el operón *phbCAB* tienen tamaños de 1240 pb (*phbC*), 1176 pb (*phbA*), y 723 pb (*phbB*) respectivamente (18) (Figura 7).

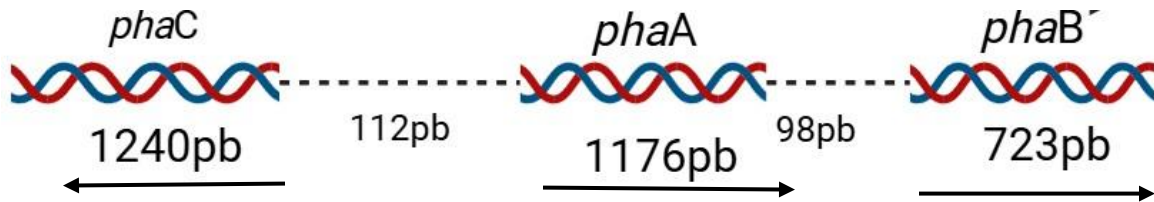


Figura 7. Mapa físico de *A. brasilense* Sp7 *phbCAB*, ubicados en el plásmido 4 modificado de (17 y 18).

Reguladores PhaR y PhaM

PhaR es una proteína que actúa como un represor transcripcional autorregulado involucrado en la expresión de PhaP1, PhaP3 y PhaR, controlando la síntesis de PHB. En condiciones de no acumulación de PHB, PhaR reprime la actividad de *phaP1* uniéndose a su región promotora (19). También se une a la región intergénica de *phaP3* reprimiendo su transcripción. La regulación de los genes *phaP* por PhaR es crucial al comienzo de la síntesis de PHB. Cuando las proteínas PhaP1 y Pha3 son expresadas constantemente, provocan un aumento en la concentración citosólica de PhaR libre. Finalmente, PhaR libre se une a *phaP1* y *phaP3* reprimiendo su expresión (19) (Figura 8).

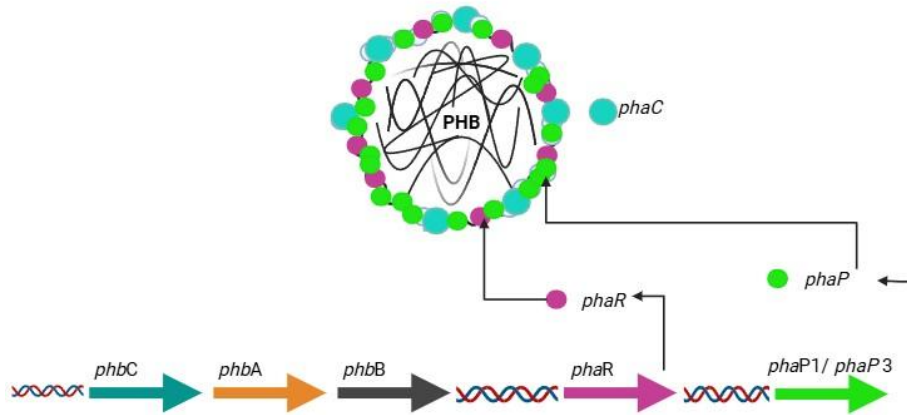


Figura 8: La síntesis de PHA regulada por PhaR en *Paracoccus denitrificans*. En ausencia de la cadena de PHB, PhaR libre se une a las regiones promotoras de *phaR* y *phaP* inhibiendo su transcripción. Sin embargo, en presencia de una cadena naciente de PHB, PhaR se une a los gránulos de PHB liberando el efecto negativo en la transcripción de *phaR* y *phaP* permitiendo que la transcripción continúe (19). Creado en Biorender.

PhaM, otra proteína asociada a gránulos de PHA caracterizada en *C. necator*. Es una proteína de unión al ADN de 32 kDa que comparte similitudes a las fasinias y muestra una identidad no significativa (15%) con la proteína PhaR (20) (Figura 9).

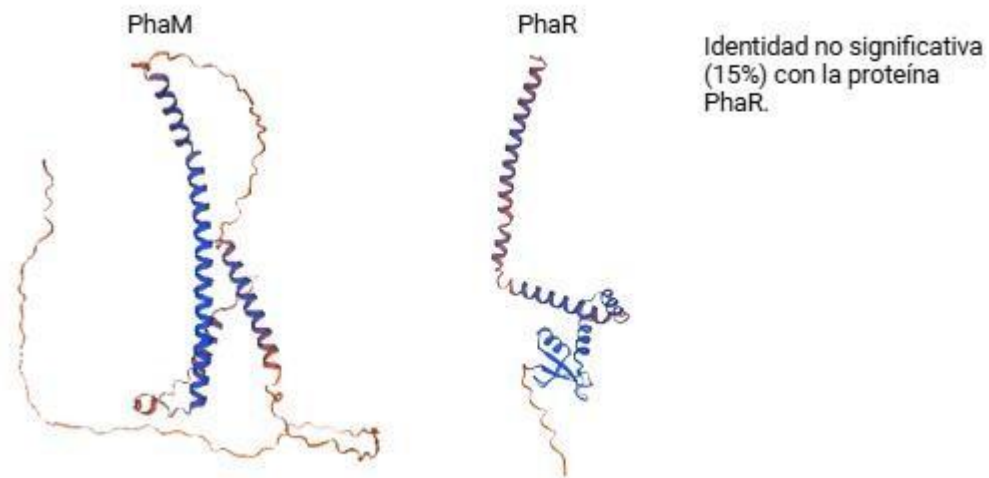


Figura 9: Modelos *in silico* de PhaM y PhaR con una identidad no significativa del 15% (20).

Obtenidos en Swiss-Model.

Su estructura predicha muestra un lado C-terminal similar a las histonas, teniendo la capacidad de unión de PhaM al ADN. En el lado C-terminal, los cuatro residuos

de lisina de PhaM son responsables de unir los gránulos de PHB a la región nucleoide (20). PhaM junto con PhaC1, forman el complejo PhaM-PhaC1 que se unen a la región nucleoide, interactuando con los gránulos de PHB (21). La sobreexpresión de PhaM aumenta la cantidad de gránulos pequeños, mientras que la delección del gen *phaM* produce una menor cantidad de gránulos de PHB, siendo de mayor tamaño (21). Posiblemente PhaM actúa como activador fisiológico de PhaC1. Además PhaM separa los gránulos de PHB, interactuando también con PhaP5 para influir en la localización subcelular de los gránulos de PHB en *C. necator* (20) (Figura 10).

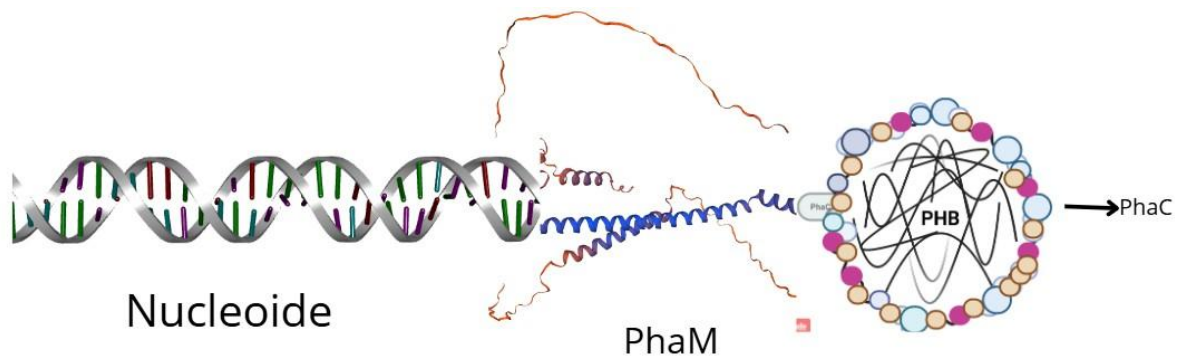


Figura 10: Interacción entre el gránulo de PHB con la región nucleoide de *C. necator* se logra mediante la interacción de PhaM (20). Creado en BioRender.

Regulador PhaQ

PhaQ se ha caracterizado por ser una proteína reguladora en *Bacillus megaterium*, difiriendo de PhaR en *C. necator* en cuanto a la secuencia de aminoácidos. PhaQ autorregula negativamente su propia expresión al interactuar con su región promotora, afectando la unión de ARN polimerasa con su promotor (22). El gen *phaQ* se localiza región río arriba del gen *phaP* transcribiéndose junto con este. La región intergénica de *phaQ-phaP* no muestra una región promotora, la expresión diferencial sugiere que hay una degradación selectiva por parte de la célula al momento de la transcripción de *phaQP*. La sobreexpresión de *phaQ* disminuye la expresión de *phaP*, esto indica que PhaQ regula negativamente a *phaP*. PhaQ interactúa con el ADN y con los gránulos de PHB, sugiriendo que el PHB puede inducir la expresión de *phaP* en la regulación mediada por PhaQ (22).

Regulador PhaF

PhaF es la fasina más importante en especies de *Pseudomonas*, organizada estructuralmente en un dominio N-terminal y otro dominio C-terminal, siendo responsable de la unión a DNA (16) (Figura 11).

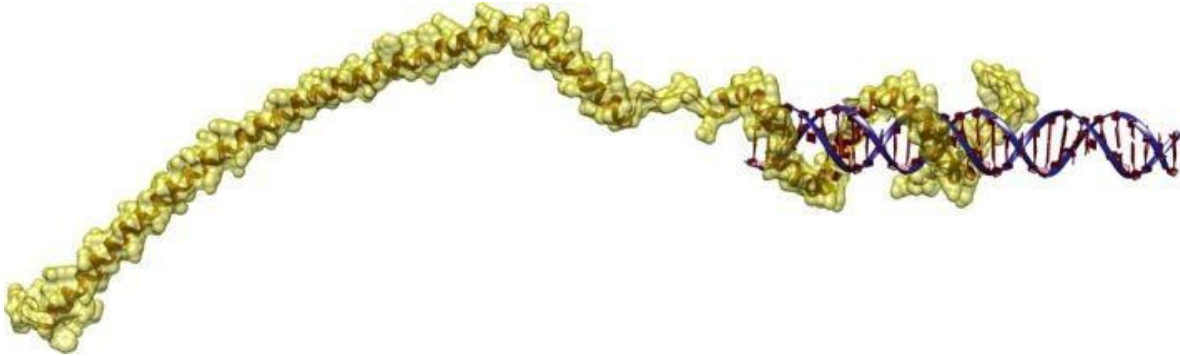


Figura 11. Estructura predicha de la fasina PhaF de *Pseudomonas putida* KT2440 interactuando con DNA (16).

La actividad de PhaF no solo se limita a estabilizar el PHA dentro de la célula, también cumple una función crucial en la localización del gránulo en el centro celular, garantizando una distribución uniforme entre las células hijas durante la división celular al unirse simultáneamente al polímero de PHA y al ADN (23). En este marco, la ausencia de PhaF tiene un impacto significativo en la cantidad de PHA presente. También se ha demostrado que PhaF está implicado en la expresión de genes como *phaC1* sintasa (24).

Regiones promotoras de *phaC* en *Pseudomonas* sp BJ-1

En *Pseudomonas* sp BJ-1, se clona y secuencía el operón responsable de la síntesis de PHB. Se analiza la secuencia de 9110 pb y se muestra la presencia de dos operones (25). El primer operón comprende los genes *phbA*, *phbB* y *phbC*, por otro lado, el segundo operón comprende los genes *flp1* y *flp2* (codifican proteínas que contribuyen a la adherencia). La transcripción de los genes del primer operón está regulada por una única región promotora hipotética, mientras que los otros dos genes *flp* están controlados por dos regiones promotoras hipotéticas (25) (Figura 12).

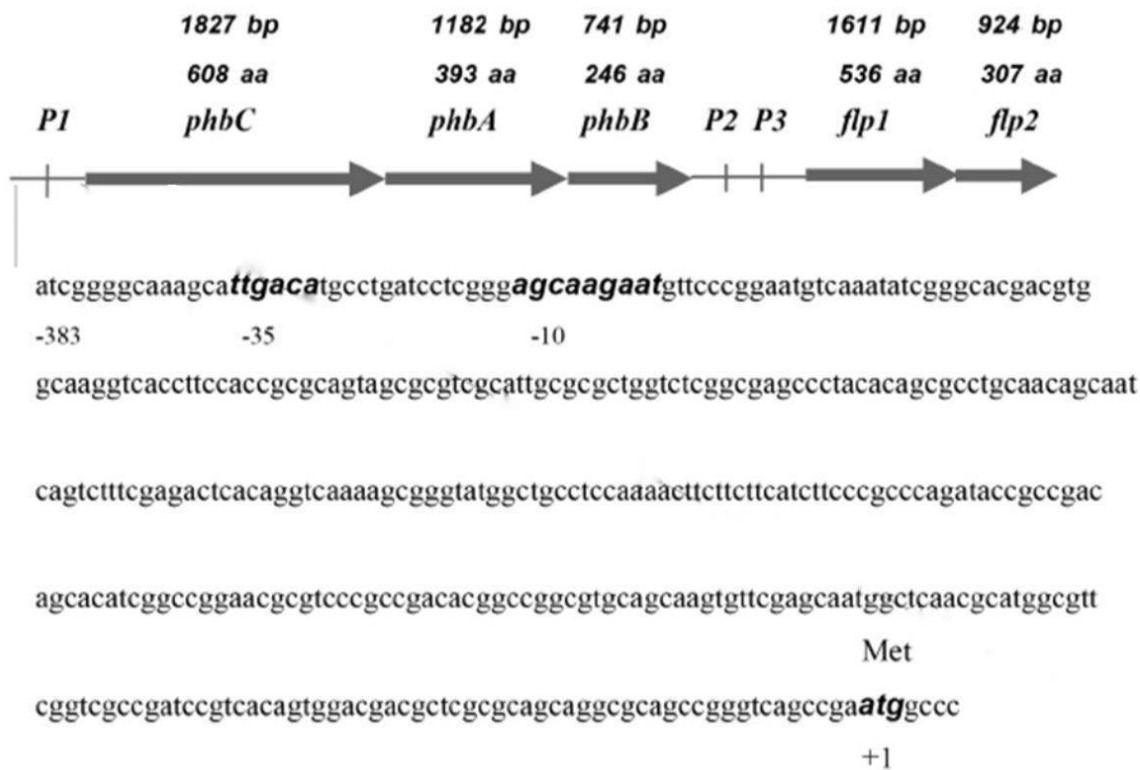


Figura 12. Cajas hipotéticas -10 y -35 región río arriba para el promotor P1 y el gen *phbC* en *Pseudomonas* sp BJ-1 (25).

Fasinas en *Azospirillum brasilense* Sp7

En 2019, Martínez y colaboradores, utilizaron servidores como Swiss-Model y ITASSER, donde predijeron seis fasinas en *A. brasilense* Sp7, tomando como plantilla la fasina PhaP cristalizada de *Aeromonas hydrophila* (PDB 51P0) (7). Conforme a las características de las proteínas en *A. brasilense* Sp7 se denominaron PhaP1_{Abs7} - PhaP6_{Abs7}, donde PhaP1_{Abs7} interviene en la morfología, acumulación y síntesis temprana PHB (7) (Tabla 2) (Figura 13).

Tabla 2. Características de las proteínas fasina-probables de *A. brasilense* Sp7 (7).

Fasina	Localización	E-value	Longitud (aminoácidos)	Ubicación del dominio	α Helices %	Peso molecular
PhaP1	ABSP7_p1: 722945-723373	4.56 e-15	142	29-125	85%	15.23 kDa
PhaP2	Chr: 940913-941398	3.59 e-14	161	46-142	94%	16.98 kDa

PhaP3	Chr: 941668-942204	3.89 e-12	178	67-162	92%	18.57 kDa
PhaP4	Chr: 1633959-1634525	4.61 e-10	188	79-174	95%	20.37 kDa
PhaP5	Chr: 2997626-2998141	6.20 e-03	171	61-155	87%	18.34 kDa
PhaP6	ABSP7_p1: 1595843- 1596694	3.42 e-03	283	25-111	14%	28.84 kDa

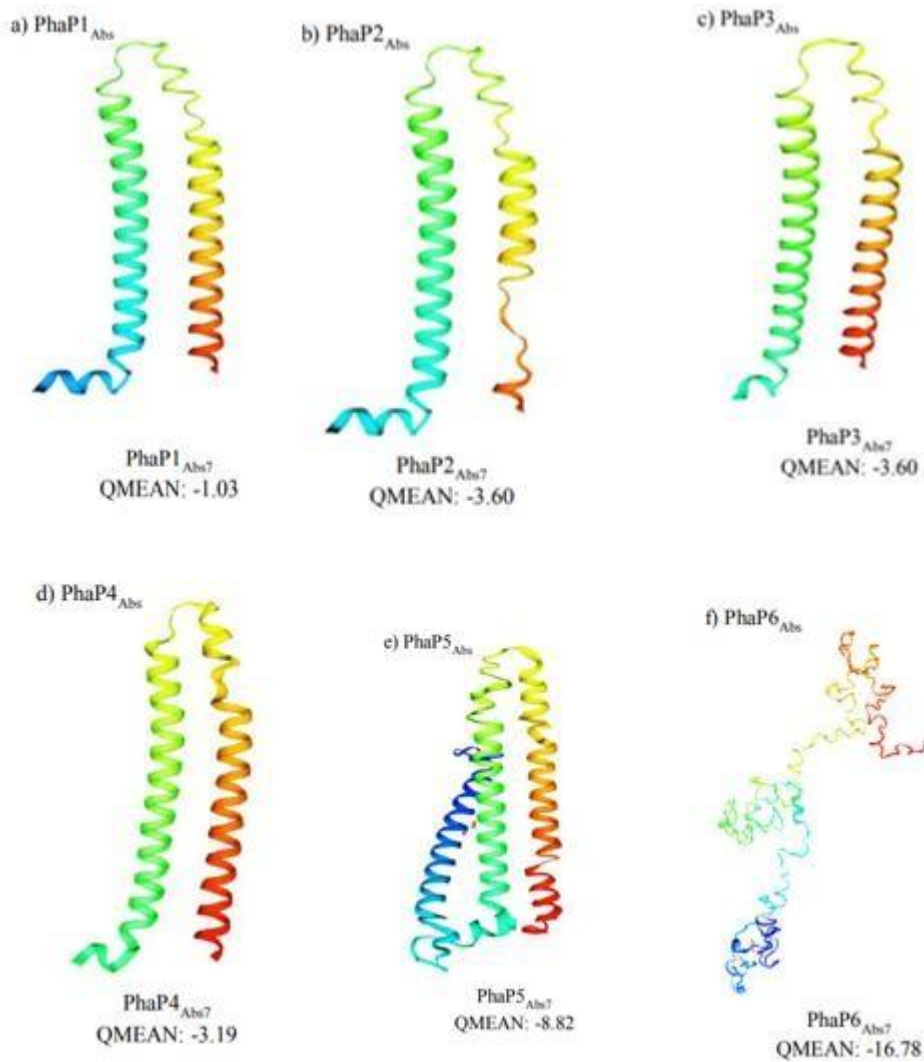


Figura 13. Estructura tridimensional predicha para las proteínas fasinas-probables PhaP1-PhaP6 de *A. brasilense* Sp7 (7).

Justificación

Las fasinas son proteínas que juegan un papel importante en la estructura y síntesis de PHB. Investigaciones previas sugieren que las fasinas disponen de una acción moduladora, misma que se desconoce en la síntesis de PHB dependiente del gen *phbC*. Hasta el momento se han localizado seis proteínas fasina-probables (PhaP1-PhaP6) en *A. brasilense* Sp7. Sin embargo, solo se ha comprobado la actividad de PhaP1 como fasina. Por ello, la búsqueda y análisis de sitios de unión al DNA por métodos bioinformáticos nos permitirán inferir la modulación de la expresión del gen *phbC*.

Planteamiento del problema

En las últimas décadas se ha fijado la vista en una nueva alternativa al uso de plásticos de un solo uso, los bioplásticos, como los polihidroxicanoatos (PHA) generados por bacterias, entre ellas *A. brasilense*. Se han reportado condiciones en las cuales *A. brasilense* incrementa o disminuye la síntesis de PHB.

Se han caracterizado proteínas fasinas, las cuales se ha visto que están asociadas a la modulación, síntesis y degradación de este polímero (PHB) dependientes de genes como *phbC*, encargados de expresar y llevar a cabo la síntesis del polímero, sin embargo, hay escasa información acerca de las propiedades y funciones que desempeñan estas proteínas junto con el gen *phbC*

Estudios sugieren que la PhaP3 tiene un papel en la acumulación de PHB, sin embargo, se desconoce si PhaP3 tiene un rol regulador directo sobre la expresión de los genes involucrados en la síntesis de PHB en *Azospirillum brasilense* Sp7. Se desconoce si la proteína PhaP3 interactúa con secuencias reguladoras en la expresión de genes clave para la biosíntesis de PHB.

Hipótesis científica

La proteína fasina PhaP3 se une a sitios de regulación en la expresión de PHB en *Azospirillum brasilense* Sp7.

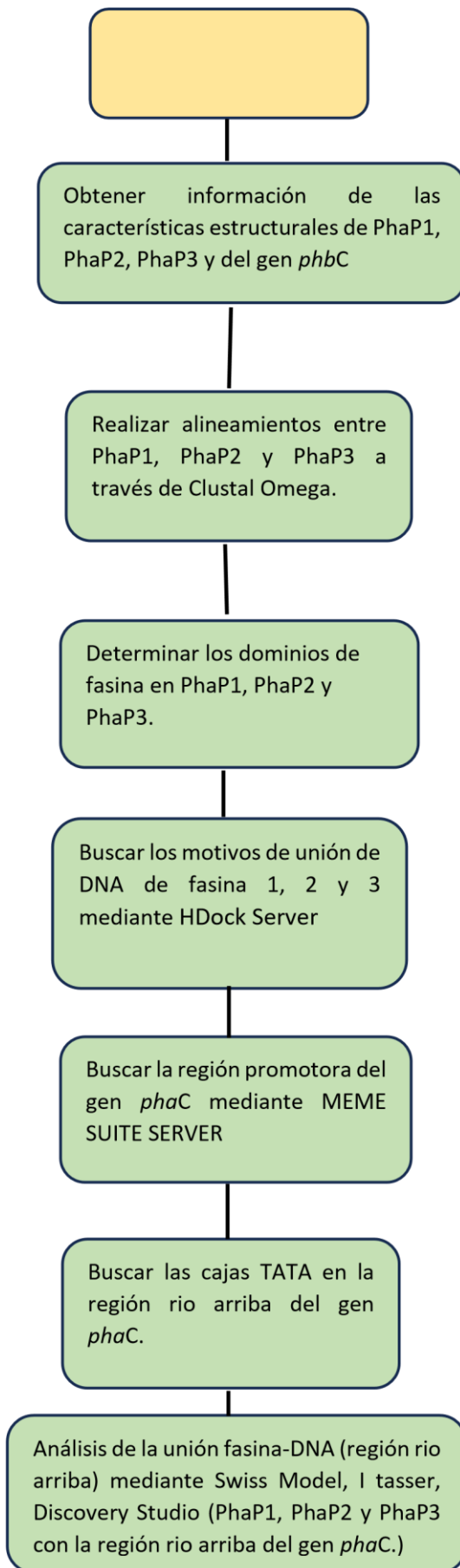
Objetivos

General:

- Analizar *in silico* la actividad como fasina de la proteína PhaP3 de *Azospirillum brasilense* Sp7.
- Inducir y detectar la proteína fasina PhaP3 de *Azospirillum brasilense* Sp7

Específicos:

- Analizar, *in silico*, la estructura tridimensional de las proteínas PhaP1, PhaP2 y PhaP3 de *Azospirillum brasilense* Sp7 por medio de servidores como I-TASSER y SWISS-MODEL.
- Analizar *in silico* los sitios de unión proteína-DNA, de PhaP1, PhaP2 y PhaP3 de *Azospirillum brasilense* Sp7.
- Purificar la proteína fasina PhaP3 de *Azospirillum brasilense* Sp7.



In vitro

Inducir BL21 y purificar la
fasina PhaP3 de *Azospirillum
brasilense* Sp7 mediante
cromatografía de afinidad
NiNTA.

Material y Métodos

Servidores / plataformas utilizadas

Consultando la base de datos NCBI, se obtuvo la secuencia primaria (fasta) de las fasinas: PhaP1 (AMK58_RS17065), PhaP2 (AMK58_RS04265) y PhaP3 (AMK58_RS04270) (Tabla 3). Tomando en cuenta la metodología de por Martínez, *et al*, (2019), se utilizaron servidores como Swiss Model (35) y I-TASSER (30-34), se obtuvieron los modelos tridimensionales de las fasinas (PhaP1, PhaP2 y PhaP3).

Para realizar un acoplamiento molecular entre la región río arriba del gen *phaC* y las fasinas PhaP1, PhaP2 y PhaP3. Se tomaron 233 nucleótidos río arriba más el ATG del gen *phaC* (Figura 14) (Tabla 3). Se buscaron regiones promotoras con la plataforma MEME suite server (36). Con el servidor HDock SERVER (37-40) se realizó el acoplamiento molecular. Se evaluó de forma individual la interacción de cada fasina con la región río arriba del gen *phaC* a través del programa Discovery Studio (41).

Tabla 3. Código fasta de la fasina Pha1, PhaP2 y PhaP3 y del gen *phaC*.

Fasina	Código fasta
PhaP1	MAKQTGNPFLEFDLSKMLGEYKVPGLDVESILASQRKNIEAVTAAANQLAIEGLQAVLRRQ AEIVRSSVEEAGTYVNQVAAAGTPEEKAAKQAEVLKVAFEKALSNIKELAEVAKSNTEAA DVLSKRVSSESLDEVKAAIAKK
PhaP2	MTDKFAAATKTFEDAVSAAKQNV DGLVKSQQEQFEKASAQILKGFDEL TALT KGNVDAVV KSGTIVAKGAE EAGKQVASFTQSSLEKSAATGKALLAVKTIQELVELQSSFAKASFETFVK ESAKLQELSLKTAKDAFAPINDRLQVTVETLSKPVAAKAA
PhaP3	MTTVTKAKPAPAPTQAFESAAAQAKEQVEGFVKAGQEQA AKTFEQTASATKEQVEKLSA QLLKISSELQALNKANVEALIQSGSIATQGAELTREV TAYA QASFDKSVTTGKALLTAKSL KEVDLQSEYVKASFDAFVAESSRLQGIGTRVATAAL TPLKDRVSVTVSTLSKPIAA
<i>phaC</i>	TCTGCGAACCTCACATCCAAACCCATCCGGCCGCTTGAACGGTGGTGGGCGAAATGA AATCTTCATACGAGAGGTGTATGACGGACCCCGGCTCGAACGGACATGGCATAAGCT GTCCGGGATGCCAGGACCGGAACGCACTCCGACCGAACAGACTTCCGGCAGGCACT GTATAAACCGCACAAACGTCCCTCCTGAAGCCTAAACTCGCCTAAAGAAGAAGGACC GCACCAATG

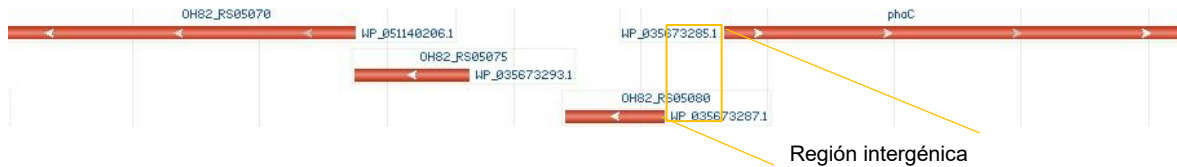


Figura 14. Contexto genómico del gen *phbC*, abarcando la región intergénica (cuadro amarillo) de 233 nucleótidos y el ATG del gen, consultado de la base de datos de NCBI (20/11/2023).

Material Biológico

Se recuperó la cepa *E. coli* BL21 (Tabla 4) conservada a -70°C en glicerol (50 v/v), se tomaron $10\mu\text{l}$ del cultivo y se inocularon en tubos conteniendo 5mL de medio LB suplementado con el antibiótico de selección. Los tubos inoculados se incubaron a 180 rpm a 37°C durante 24 horas. Después se resembraron en placas Petri con agar LB suplementado con el antibiótico de selección tomando $10\mu\text{l}$ del medio sembrado anteriormente.

Transformación y digestión de *E. coli* BL21

Se prepararon células químico-competentes de la cepa *E. coli* BL21. Con el plásmido de selección pQE-31-70042 (PhaP3) (Tabla 4), se realizó una doble digestión y posteriormente una electroforesis en gel de agarosa. De esta manera se hizo la transformación y una doble digestión.

Expresión, purificación y detección de la PhaP3.

Se expresó la proteína PhaP3 induciéndola con IPTG al 0.5mM y se corrió en un gel SDS-PAGE al 12% con marcador de peso molecular MW, posteriormente se realizó una purificación por cromatografía de afinidad e inmunodetección mediante anticuerpos monoclonales antipoli-histidina conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma Aldrich) detección de la PhaP3.

Tabla 4. Cepas, plásmidos utilizados

Cepas	Característica	Referencia
-------	----------------	------------

<i>Escherichia coli</i> BL21	• Genotipo: F ⁻ <i>ompT hsdSB</i> (rB ⁻ , mB ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3).	Escobar <i>et al.</i> , 2020
Plásmidos utilizados		
pQE-31-70042 (PhaP3)	Vector pQE-31 conteniendo el gen <i>phaP3</i> de <i>A. brasiliense</i> Sp7. Amp.	Martínez, <i>et al.</i> 2019.

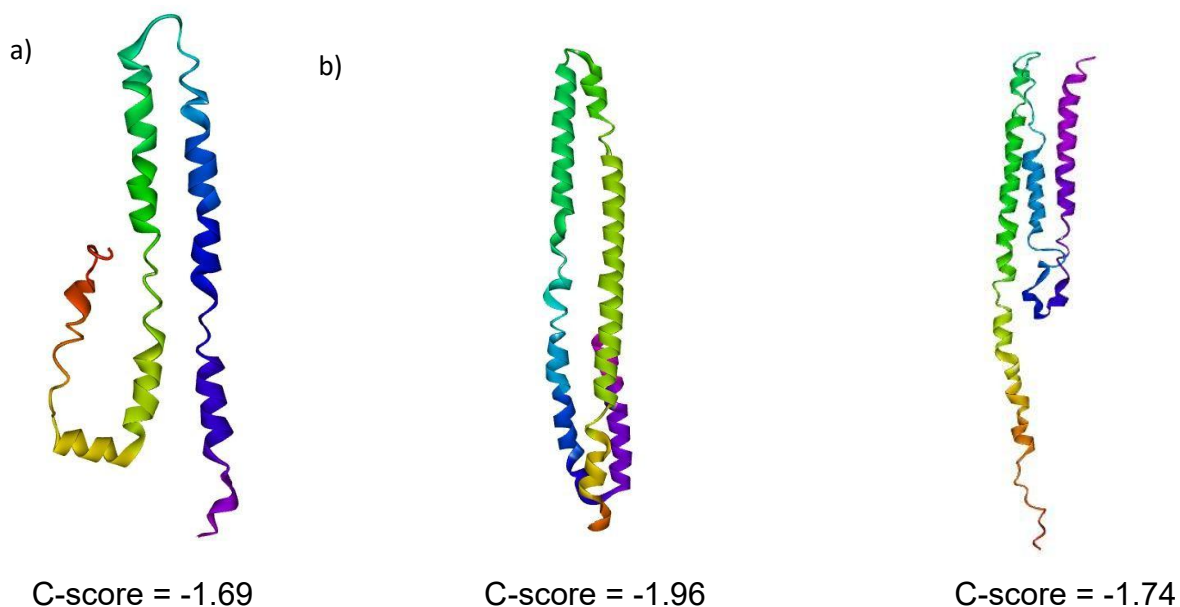
Resultados

Modelado tridimensional de PhaP1, PhaP2 y PhaP3

Se obtuvieron los modelos tridimensionales de las fasinias (PhaP1, PhaP2 y PhaP3) de *A. brasiliense* Sp7, siguiendo la metodología propuesta por Martínez, *et al.* (2019).

Las estructuras tridimensionales de PhaP1, PhaP2 y PhaP3 se obtuvieron utilizando el servidor I-TASSER (Figura 15)., tomando como plantilla la estructura cristalizada de PhaP de *A. hydrophila* (PDB 51P0)

El puntaje de QMEAN mas cercano a cero indica una mayor similitud y confianza en las estructuras predichas, por lo tanto, los resultados de QMEAN son favorables para PhaP1 con un valor de -1.69, PhaP2 con un valor de -1.96 y PhaP3 con valor de -1.74 (Figura 15)



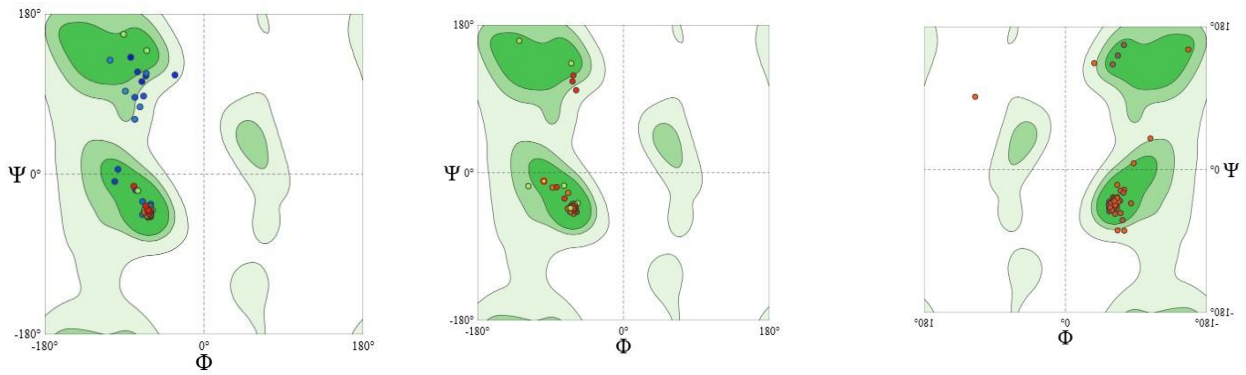


Figura 15. Modelos tridimensionales de las fasinas de *Azospirillum brasilense* Sp7, obtenidos del servidor I-TASSER. a) PhaP1_{Abs7}, b) PhaP2_{Abs7}, c) PhaP3_{Abs7}.

Regiones promotoras del gen *phbC*

Utilizando el servidor MEME suite server (36) se determinaron las regiones promotoras del gen *phaC*. Para ello se tomaron 233 pb río arriba del gen *phaC*. Dicha zona corresponde a la región intergénica de los genes *phaC* y AMK58_RS06755. También se incluyó el codón de inicio (ATG) del gen *phaC* para poder ubicar y visualizar las regiones promotoras -10 y -35. De acuerdo con los datos obtenidos, se eligieron las cajas que estuvieran más próximas a las regiones -10 y -35. De esta manera, la caja -10 (ACCGCAC), se encontró a partir de la región 255 a 231 río arriba del gen *phaC* mientras que la caja -35 (CCTAAA), abarcó la región 211 - 216 pb río arriba del gen *phaC* (Figura 16).

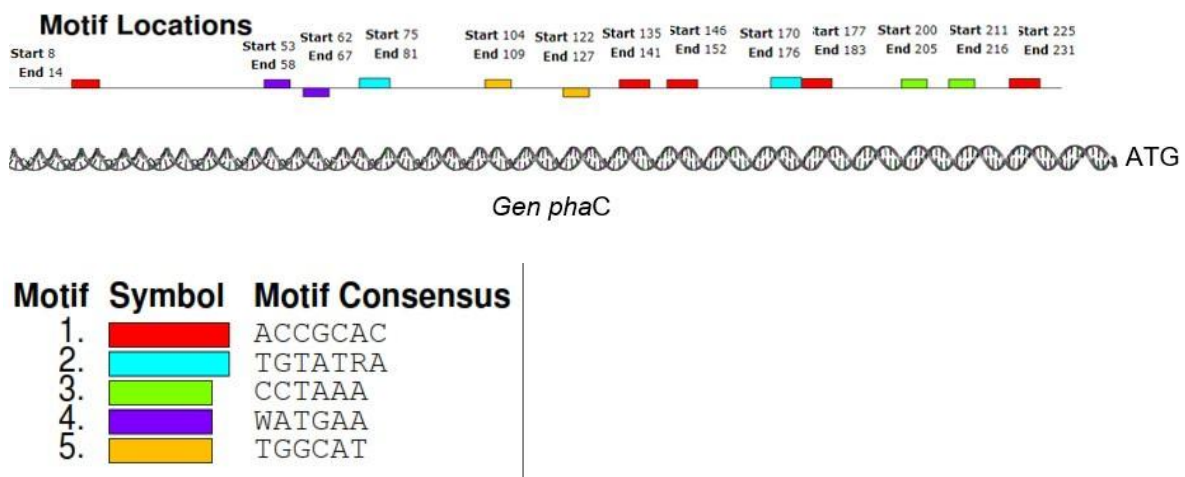
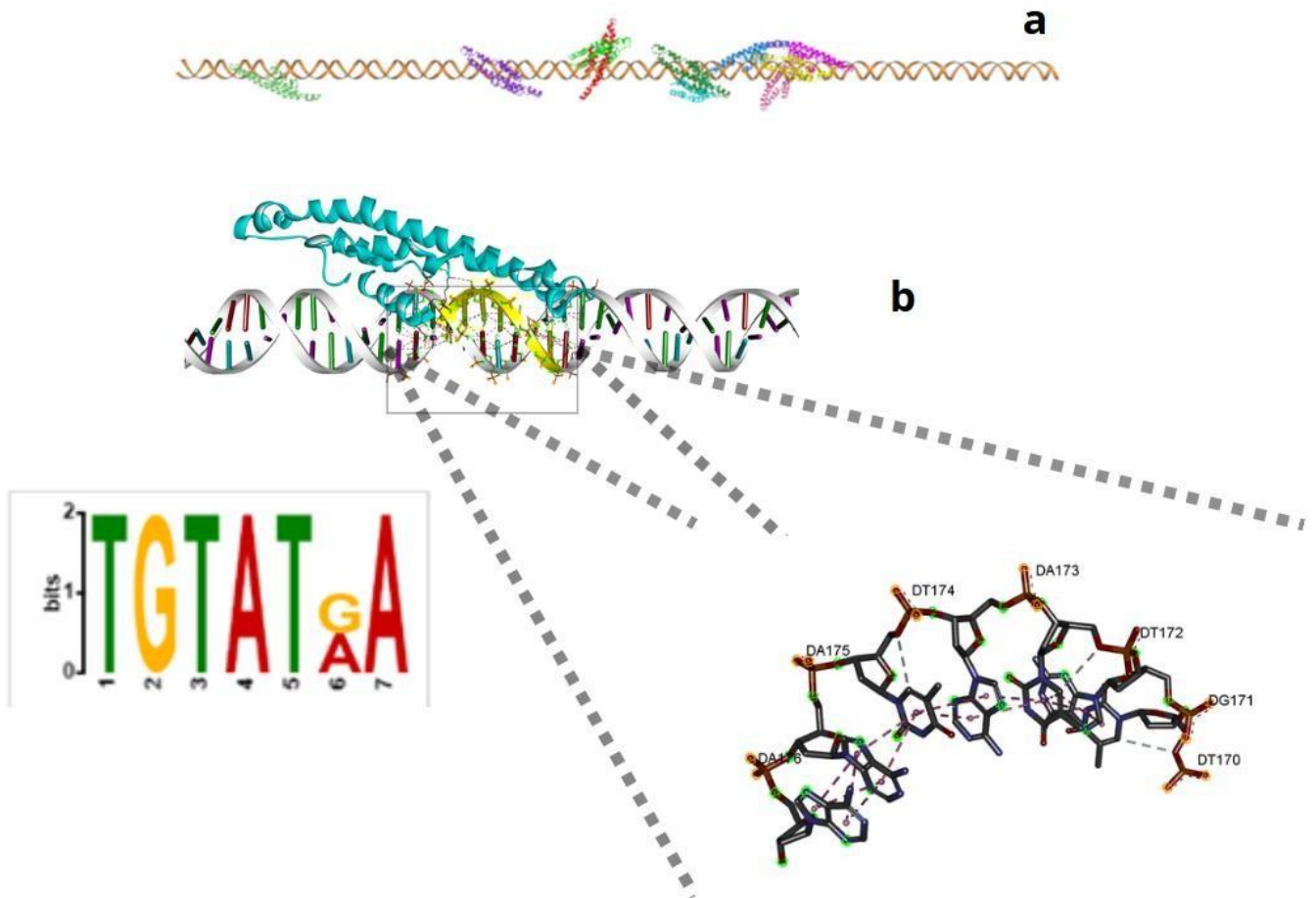


Figura 16. Cajas probables -10 y -35 de la región río arriba del gen *phaC*, determinadas mediante el servidor MEME Suite Server.

Acoplamiento molecular de PhaP1, PhaP2 y PhaP3 con la región promotora del gen *phaC*

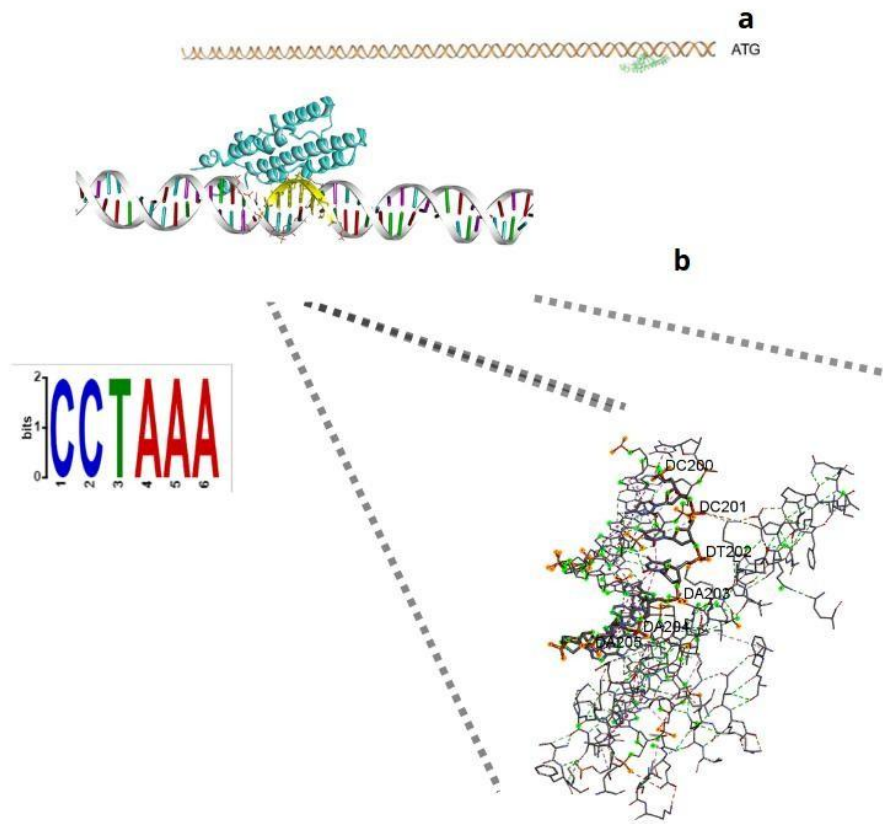
Se realizó un acoplamiento molecular (docking) utilizando el servidor HDock donde se desarrollaron las interacciones proteína-DNA, para este experimento, se tomó como ligando cada una de las fasinias (Tabla 3) y como receptor la región río arriba del gen *phaC* (Tabla3) (Figura 14).

Los resultados obtenidos mostraron que la fasinia PhaP1 se une a la región promotora -60 (TGTATGA), donde destacan enlaces de cargas atractivas y puentes de hidrogeno (Figura 17) (Tabla5). En cambio, las fasinias PhaP2 y PhaP3 se unen a -35 pb de la región río arriba del gen *phaC* (Figura 18, 19). En PhaP2 destacan enlaces de cargas atractivas y puentes de hidrogeno (Tabla 6). Por último, en PhaP3 destacan enlaces de cargas atractivas (cargas eléctricas opuestas) (Tabla 7).



PhaP1-DNA			
Aminoácidos (aa) con interacción con el DNA (<i>phaC</i>)	Nucleótidos de interacción con la proteína PhaP1	Distancia (Å)	Tipo de interacción
Met 1	T 170	3.48	PS
Met 1	G 171	3.48	PS
Met 1	T 172	3.48	PS
Arg 65	A 173	4.36	Pi- Al
Val 68	T 174	4.16	PH
Val 75	A 175	4.55	PH
Lys 141	A 303	4.89	Pi-Al

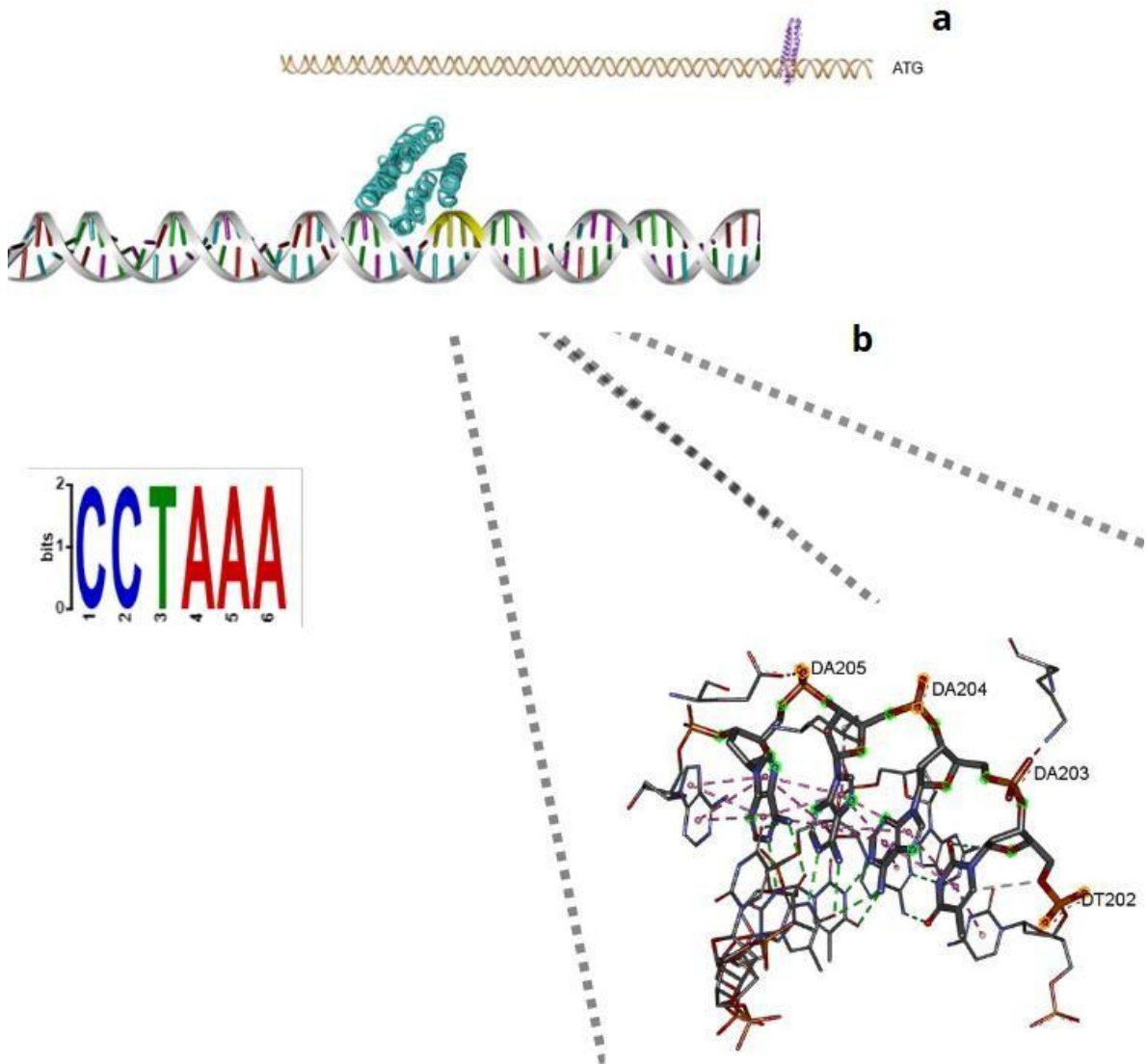
Figura 17. Interacción PhaP1-DNA. a) Acoplamiento molecular realizado con el servidor HDock Server, donde muestra la interacción entre PhaP1 y la región río arriba del gen *phaC*. b) A través del servidor MEME SUITE se nota la caja TATA – 60 TGTATAA, de donde se desprende la interacción de los nucleótidos (marcados), con la proteína PhaP1. Se visualizó en Discovery Studio. Tabla 5, donde se muestran las interacciones entre PhaP1 y la región río arriba del gen *phaC*: (PS) puente salino, (PI-AL) Pi-alkyl y (PH) puentes de hidrogeno. Interacción PhaP1-DNA.



PhaP2-DNA			
Aminoácidos (aa) con interacción con el DNA (<i>phaC</i>)	Nucleótidos de interacción con la proteína PhaP2	Distancia (Å)	Tipo de interacción
Lys 27	C 201	4.18	CA
Ser 61	T 202	4.14	CA
Val 22	A 203	1.74	PI-AL
Ala 18	A 204	3.54	PH
Ser 17	A 205	2.35	PH
Ser 17	A 206	4.46	Pi-AL

Figura 18. Interacción PhaP2-DNA. a) Docking molecular realizado con el servidor HDock Server, dónde muestra la interacción PhaP2 y la region rio arriba del gen *phaC*. b) A traves del servidor MEME SUITE se nota la caja TATA -35 CCTAAA, de donde se desprende la interacción de los nucleótidos (marcados), con la proteína PhaP2. Se visualizo en Discovery Studio. Tabla 6. Se

muestran las interacciones entre PhaP2 y la región río arriba del gen *phaC*: (PS) puente salino, (PIAL) Pi-alkyl y (PH) puentes de hidrogeno, (CA) cargas atractivas.



PhaP3-DNA			
Aminoácidos (aa) con interacción con el DNA (<i>phaC</i>)	Nucleótidos de interacción con la proteína PhaP3	Distancia (Å)	Tipo de interacción
Lys 8	T 202	3.20	PI-DO
Ala 7	A 203	2.85	CA
Glu 67	A 204	2.83	CA
Ala 20	A 205	3.21	PH

Figura 19. Interacción PhaP3-DNA. a) Acoplamiento molecular realizado con el servidor HDock Server, dónde muestra la interacción entre PhaP3 y la region rio arriba del gen *phaC*. b) A traves del servidor MEME SUITE se nota la caja TATA -35 CCTAAA, de donde se desprende la interacción con los nucleotidos (marcados), con la proteína PhaP3. Se visualizo en Discovery Studio.Tabla 7. Se muestran las interacciones entre PhaP3 y la región rio arriba del gen *phaC*: (PS) puente salino, (PI-AL) Pi-alkyl y (PH) puentes de hidrogeno, (CA) cargas atractivas.

Experimentación *in vitro*

Digestión de la construcción pQE-31-70042

El plásmido pQE-31 (3463 pb)-70042 (PhaP3, 537 pb) (Figura 20), fue utilizado para transformar células químico-competentes de *E.coli* BL21, se aisló y purificó el plásmido y se le realizó una doble digestión con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III. De esta manera se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%, observándose bandas con los pesos correspondientes 3.4 kb para pQE-31 y 0.5 kb para PhaP3 (Figura 21).

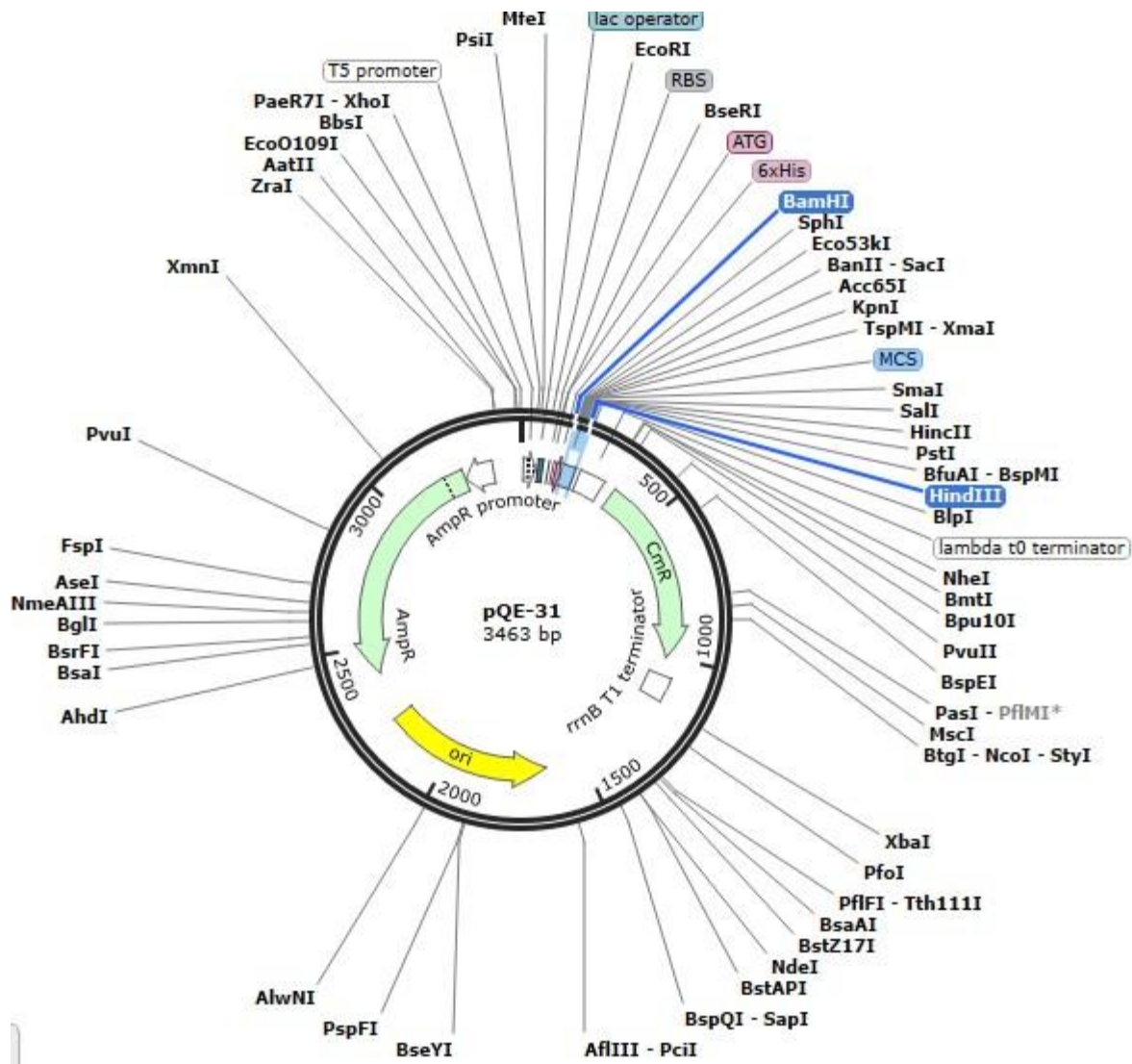


Figura 20. Mapa físico de pQE-31

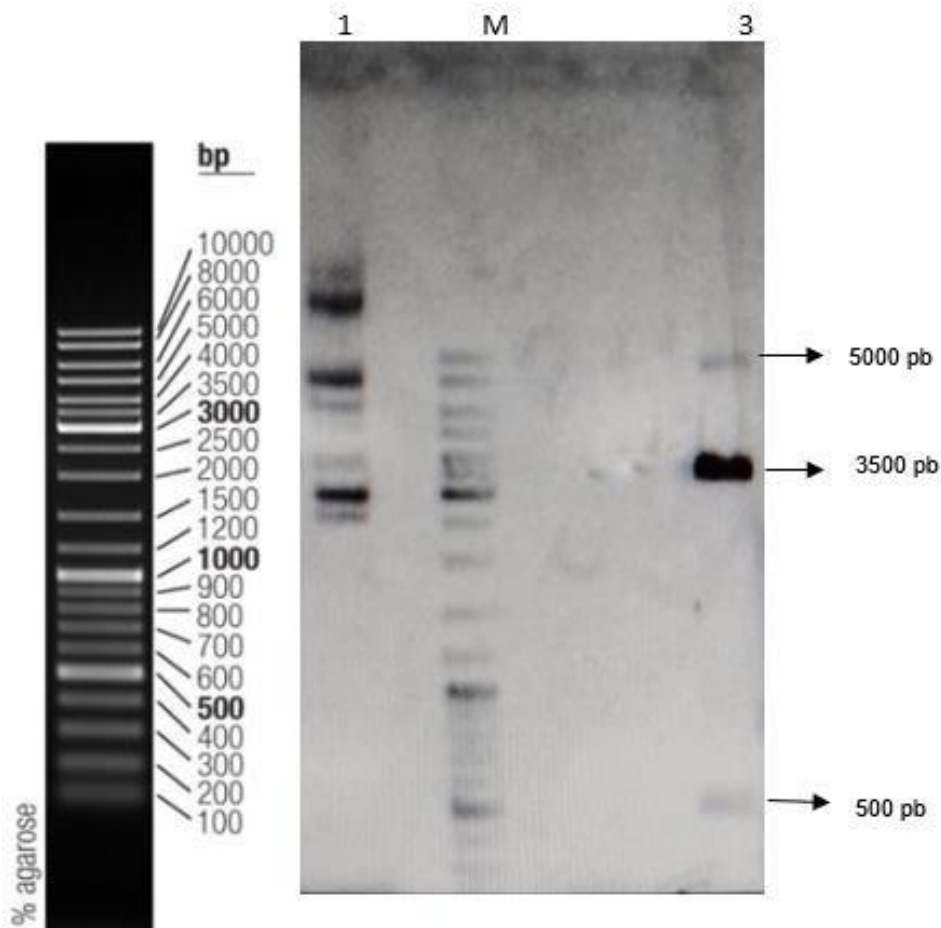


Figura 21. Análisis del plásmido PQE31-70042 y doble digestión con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III. En el carril 1 se encuentra la extracción del DNA genómico de *E. coli* BL21. En el carril M, se encuentra el marcador de peso molecular Ladder Mix). En el carril 3 se muestra la doble digestión del plásmido pQE-31-70042 con las enzimas *Bam*HI y *Hind*III, donde la banda inferior representa el peso de PhaP3 (500 pb), la banda intermedia representa el plásmido pQE-31 (3.5 pb) y la banda superior peso del DNA de *E. coli* BL21 (4.6 a 5.0 pb).

Purificación y detección de PhaP3

Al realizar la inducción de PhaP3 con IPTG al 0.5 mM durante 3 hrs se obtuvo el paquete celular, se liso y se corrió en un gel SDS- PAGE al 12% cargando 20 μ L de muestra en cada pozo (9.2 μ g/mL de proteína, se utilizó marcador de peso molecular (Page Ruler Plus Prestained Protein Ladder) para identificar el peso esperado de PhaP3 (18.57 kDa) (Figura 20).

Una vez verificadas las bandas, se realizó la purificación por cromatografía de afinidad observando solo una banda en la parte inferior correspondiente a la proteína PhaP3 (Figura 22), posteriormente se hizo la detección de la PhaP3 mediante un Western Blot (anexo I) en la cual se observó una banda en la parte inferior con un peso de 18.5 kDa (Figura 23).

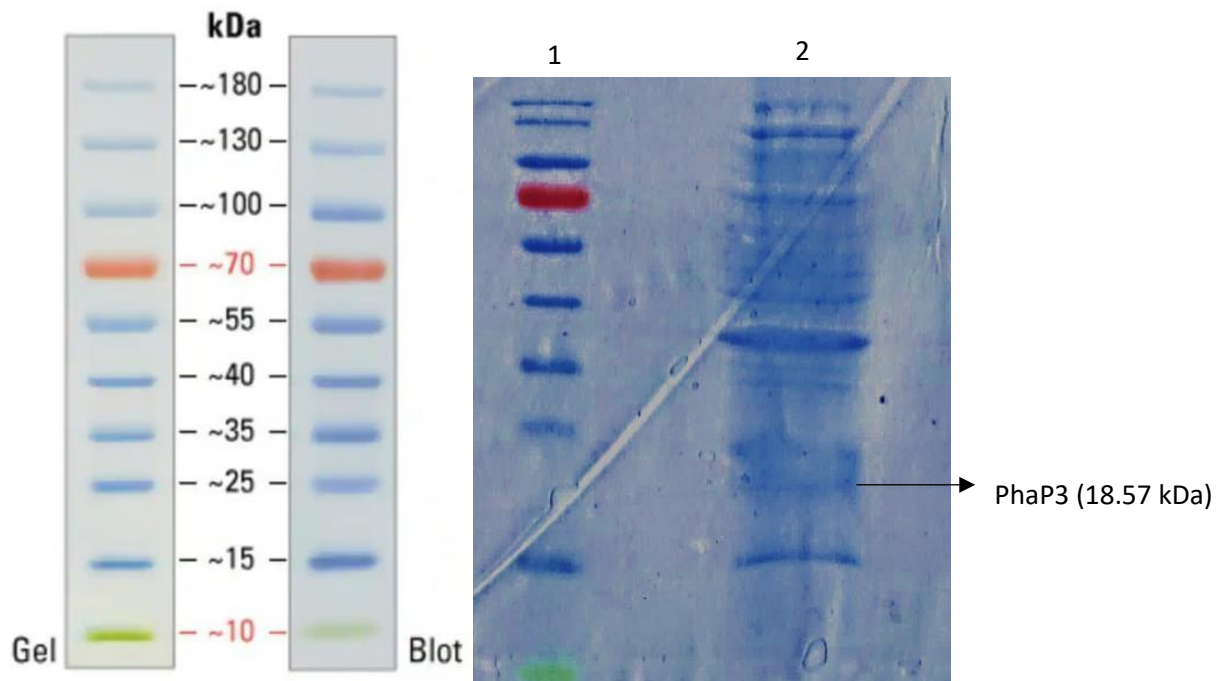


Figura 22. Análisis en electroforesis SDS-PAGE al 12%. En el carril número 1 se muestra el marcador de peso molecular MW. En el carril número 2 se muestra el paquete obtenido de la inducción con IPTG 0.5mM de la proteína PhaP3 con un peso de 18.57 kDa, cargando 20 μ l a una concentración de 9.2 μ g/mL de proteína.

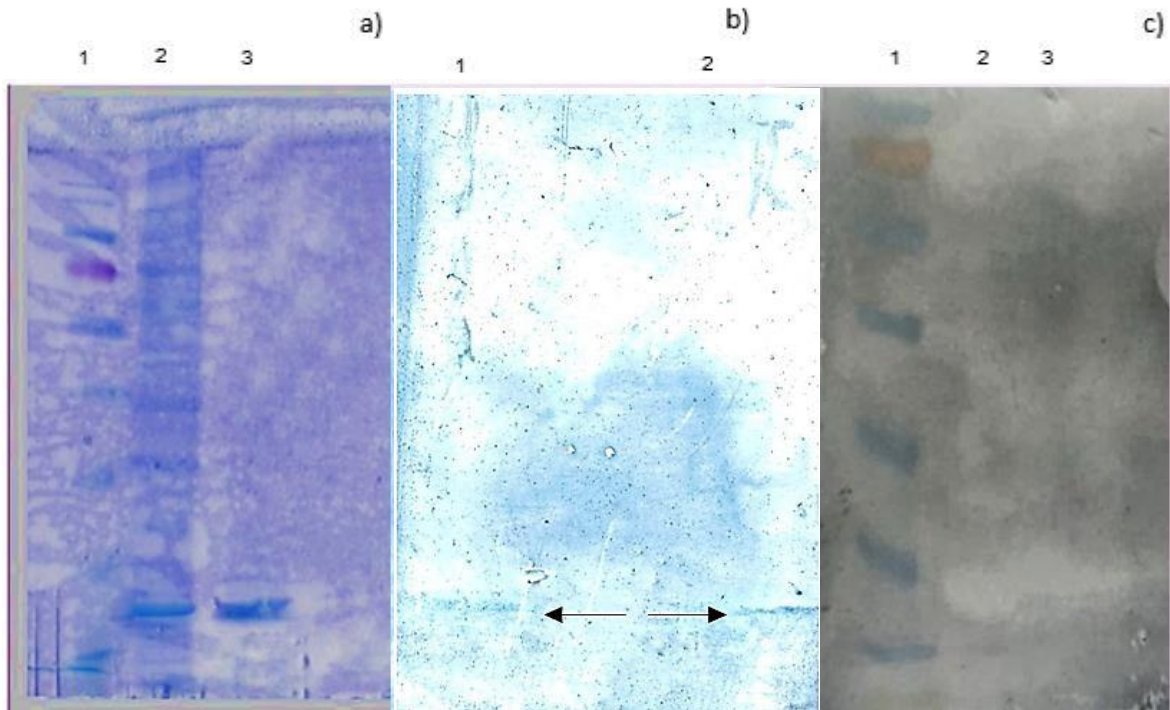


Figura 23. a) SDS-PAGE al 12%. En el carril número 1 se encuentra marcador MW, en el carril 2 el extracto crudo, se tomaron 20 μ L (concentración de 9.2 μ g/mL de proteína) y en el carril 3, la purificación de PhaP3 por cromatografía de afinidad (NiNTA). b) Western Blot utilizando una membrana de nitrocelulosa, donde se observan las bandas en la parte inferior (señalados con una flecha). c) Western Blot. En el carril 1 se encuentra el marcador MW, en el carril 2, extracto crudo y en el carril 3 purificación de la PhaP3 18.5 kDa.

Discusión

La bacteria *Azospirillum brasilense* Sp7 es un microorganismo de interés de estudio, dado a su producción de PHB, se han investigado algunos genes implicados en el metabolismo de este. Entre ellos se encuentra el gen *phbC*, que codifica para la enzima responsable de la polimerización del PHB y las fasinas brindan estabilidad a los gránulos de PHAs por sus características anfipáticas (7). Sin embargo, aún no hay investigaciones sobre la unión del gen *phaC* y PhaP3 en la expresión de PHB en *Azospirillum brasilense* Sp7.

Los análisis bioinformáticos presentados demostraron que:

1. Las fasinas forman un complejo de interacción proteína-DNA.
2. Las regiones promotoras se encontraron región río arriba del gen *phaC*.

3. La proteína PhaP1 interacciona con la región promotora -60 TGTATAA del codón de inicio del gen *phaC*.

4. Las fasinas PhaP2 y PhaP3 interaccionan con la región promotora -35 CCTAAA.

Un punto clave es la identificación de las fasinas y su posible rol en la regulación de la transcripción de *phaC*. Las fasinas son proteínas que desempeñan una función de estabilización de estructuras del ADN y en la formación de complejos reguladores con diversas regiones promotoras (25). La interacción proteína-ADN es esencial para la correcta iniciación de la transcripción de genes como *phaC*.

El presente estudio permitió dar a conocer las regiones promotoras -10 (ACCGAC) y -35 (ACCGAC) de la región río arriba del gen *phaC* de *Azospirillum brasilense* Sp7. En 2010 Zhu y colaboradores reportaron que la transcripción de los genes *phaABC* están controladas por estas regiones promotoras hipotéticas (25). Los resultados obtenidos fueron similares a las regiones promotoras reportadas por Zhu SW, aun cuando no se utilizó el mismo servidor (25).

En *Cupriavidus necátor*; se reportó que PhaP1 dispone de acciones moduladoras en la producción de PHB (20). En *C. necátor*, PhaM se une a los gránulos de PHB en la región nucleoide (20 y 21). En *Pseudomonas*, PhaF, está involucrado en la expresión de genes como *phaC1* (16, 23 y 24). Si bien ha habido un creciente interés relacionado al metabolismo de PHB, aún faltan estudios sobre las fasinas y dar a conocer su posible interacción con DNA y proteínas actuando, así como reguladores transcripcionales.

La interacción de las proteínas PhaP2 y PhaP3 con la región promotora -35 CCTAAA, es un punto clave. Las fasinas PhaP2 y PhaP3 interactúan mediante puentes salinos, puentes de hidrogeno y cargas atractivas (cargas eléctricas opuestas), lo que sugiere que estas interacciones contribuyen a la estabilidad del ADN y a la correcta conformación del complejo promotor-proteína. Dicha estabilización es fundamental para asegurar el proceso de transcripción

Esta estabilización es fundamental para asegurar que el proceso de transcripción sea eficiente y preciso.

Los métodos bioinformáticos con enfoques experimentales permitirán obtener una visión más completa de la proteína PhaP3 y sus interacciones con el DNA. La disposición de herramientas *in silico* como modelado de estructuras, alineamientos y predicción de sitios de unión al DNA, proporcionarán información acerca de la función de las proteínas PhaP. Sin embargo, la validación experimental es fundamental para confirmar dichos resultados.

La comprensión de las regiones promotoras y las interacciones proteína-ADN puede contribuir a nuevas vías para la optimización de la producción de PHA en *Azospirillum brasilense* Sp7

La cromatografía de afinidad Ni-NTA es una técnica ampliamente utilizada para la purificación de proteínas recombinantes, ya que permite un aislamiento eficiente de proteínas que contienen etiquetas de histidina.

La purificación de PhaP3 por cromatografía de afinidad Ni-NTA., detección de la banda correspondiente al peso de la proteína PhaP3 (18.57 kDa) en geles de poliacrilamida y Western Blot podrán contribuir a estudios posteriores y refinar las predicciones hecha a partir de los análisis *in silico*.

Conclusión

Los análisis bioinformáticos presentados demostraron que:

- Las fasinas forman un complejo de interacción proteína-DNA.
- La proteína PhaP1 interacciona con la región promotora -60 TGTATAA del codón de inicio del gen *phaC*.
- Las fasinas PhaP2 y PhaP3 interaccionan con la región promotora -35 CCTAAA, mediante puentes salinos, puentes de hidrogeno y cargas atractivas que aportan estabilidad al ADN.
- Se detectó la PhaP3 (en el plásmido pQE-31-70041) por medio de un Western Blot.

Perspectiva

Los datos obtenidos *in silico* acerca de las fasinas y como interactúan en regiones promotoras, pueden ser un punto clave en la transcripción del gen *phaC* y con ello la producción de PHB, sin embargo, es necesario realizar más estudios *in vitro* para observar la actividad de las fasinas en la transcripción del gen *phaC*.

Con los resultados obtenidos *in silico*, se podrían realizar ensayos *in vitro* con las fasinas y regiones del DNA del gen *phaC*, tales como EMSA, uno de los métodos más utilizados para estudiar la unión entre proteínas y DNA. También ensayos de retardo como fluorescencia, similares al EMSA.

Anexos

Anexo I. Preparación de medios de cultivo

Medio Luria Bertani (LB) tomado de Martínez *et al.*, 2019.

- Reactivos para 1 L de medio LB
- Extracto de levadura 5 g
- NaCl 10 g
- Peptona de caseína 10 g
- Aforar agua a 1L
- El pH se ajusta a 7.0 con NaOH.
- Si se requiere medio sólido agregar 15 g de Agar.
- Esterilizar a 15 lbs durante 15 min

Anexo II. Técnicas de laboratorio

Electroforesis en gel de agarosa tomado de Martínez *et al.*, 2019.

- Pesar la agarosa y disolver en el volumen correspondiente de buffer TAE 1X (Anexo III) calentando por lapsos en horno de microondas (aproximadamente 1 min).
- Una vez fundida la agarosa, esperar a que enfríe hasta aproximadamente 50 °C.
- Colocar el peine en la cámara electroforética y vierta la agarosa disuelta.
- Permitir que gelifique el gel de agarosa (aproximadamente 20 min).
- Agregar el buffer TAE 1X a la cámara electroforética hasta cubrir el gel de electroforesis y retirar el peine del gel de agarosa.
- Cargar, en los pocillos del gel de agarosa, la muestra de ADN de interés (5 – 10 µl) mezclada con 1 µl de buffer de carga 1X (Anexo II) y 1 µl de marcador 1 Kb.
- Tapar la cámara electroforética y conectar los electrodos a la fuente de alimentación.
- Encender la fuente de alimentación y programar a 60 V durante 10 min y posteriormente a 70 – 80 V durante 90 min (dependiendo del porcentaje de agarosa).
- Una vez finalizada la electroforesis, visualizar los fragmentos de ADN mediante luz

UV previa tinción del gel de agarosa en una solución de bromuro de etidio (Anexo II)

Extracción y purificación de DNA plasmídico (Sambrock, 1998) tomado de Martínez *et al.*, 2019.

- Inocular 10 µl de cultivo de la cepa de *E. coli* conteniendo el plásmido de interés en una placa Petri de medio sólido LB suplementado con el (los) antibiótico (s) apropiado (s).
- Incubar 24 h a 37 °C.
- Inocular una colonia en un tubo de medio líquido LB suplementado con el antibiótico de selección. Incubar toda la noche a 37 °C y 200 rpm.

- Obtener el paquete celular contenido en 5 – 10 mL de cultivo mediante centrifugación a 12000 rpm durante 2 min en un tubo eppendorf de 1.5 mL.
- Lavar el paquete celular con buffer TE (Anexo II) dos veces.
- Resuspender el paquete celular en 250 µl de la solución I (Anexo II).
- Agregar 500 µl de la solución II y mezclar por inversión hasta obtener una solución viscosa y transparente.
- Añadir 375 µl de la solución III, mezclar por inversión hasta observar la formación de agregados blancos.
- Incubar la muestra 10 min en hielo.
- Centrifugar a 4 °C durante 10 min a 12000 rpm.
- Recuperar el sobrenadante en un tubo eppendorf.
- Adicionar 400 µl de una solución fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1).
- Agitar vigorosamente en vórtex durante 60 s.
- Centrifugar a 4 °C durante 10 min a 12000 rpm.
- Recuperar la fase acuosa en un tubo eppendorf.
- Agregar 400 µl de una solución de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1).
- Agitar vigorosamente en vortex.
- Centrifugar a 4 °C durante 5 min a 12000 rpm.
- Recuperar la fase acuosa en un tubo eppendorf.
- Repetir el lavado con cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) hasta no observar la interfase blanca (2 – 4 lavados).
- Recuperar la fase acuosa en un tubo eppendorf.
- Agregar 800 µL de alcohol isopropílico.
- Mezclar por inversión y almacenar durante 10 – 30 min a -20 °C. Centrifugar a 4 °C durante 10 min a 12000 rpm.

- Decantar el sobrenadante.
- Lavar el paquete dos veces con 1 mL de etanol 70% centrifugando a 12000 rpm durante 5 min.
- Decantar el sobrenadante.
- Permitir que el etanol restante se evapore.
- Hidratar el paquete en 50 μ L de una solución de RNasa H (40 μ g/mL).
- Incubar a 37 °C durante 30 min
- Analizar pureza y rendimiento.

Protocolo de digestión de ADN con endonucleasas de restricción (modificado de Thermo Scientific) tomado de Martínez *et al.*, 2019.

- Mezcla de reacción para 10 μ L.

Buffer 10X específico de enzima o para doble digestión	1 μ L
Enzima de restricción 1 (<i>Bam</i> HI) (10 U/μL)	1 μ L
Enzima de restricción 2 (<i>Hind</i> III) (10 U/μL)	1 μ L
DNA (PQE31)	0.5 – 1 μ g/ μ L
Agua PISA estéril	cbp 10 μ L

- Mezclar suavemente y centrifugar 5 s.
- Incubar a 37 °C durante 8 – 16 h.

- Inactivar la (s) enzima (s) de restricción a 65 u 80 °C durante 10 m.

Protocolo de elaboración de células químicocompetentes (Ramírez, 2013)

tomado de Martínez *et al.*, 2019.

- Estriar una colonia de la cepa de interés (*E. coli* BL21) en una placa de medio LB con agar, conteniendo el antibiótico de selección. Incubar 24 h a 37 °C.
- Inocular una colonia de la cepa de interés en un tubo conteniendo 5 mL de medio LB con antibiótico de selección. Incubar de 12 a 24 h a 37° C y 200 rpm.
- A partir del precultivo anterior, inocular, a una D.O. 600 nm de 1.0, un matraz conteniendo 100 mL de medio líquido LB suplementado con el antibiótico de selección. Incubar a 37 °C y 200 rpm hasta obtener una DO₆₀₀ de 0.4 - 0.5.

(aproximadamente de 5 – 7 h).

- Mantener el cultivo en hielo 20 min.
- Obtener el paquete celular de 10 ml de cultivo en alícuotas de 1 mL en tubos eppendorf de 1.5 mL centrifugando a 4 °C durante 1 min a 8000 rpm. Descartar el sobrenadante.
- Lavar el paquete celular en 1 mL de buffer TE centrifugando los tubos eppendorf a 4°C durante 1 min a 12000 rpm.
- Resuspender el paquete celular en 1 mL de una solución fría de CaCl₂ 0.1 M y mantener a 4 °C durante 15 min.
- Centrifugar a 4 °C durante 1 min a 10000 rpm. Descartar el sobrenadante.
- Repetir los dos pasos anteriores de 4 – 5 veces.
- Resuspender el paquete celular en 100 µL de una solución fría de CaCl₂ 0.1 M con glicerol 15%.
- Almacenar a -70 °C

Protocolo de transformación bacteriana (Sambrook *et al.*, 1989) tomado de

Martínez *et al.*, 2019.

- Agregar 1 μ l de la construcción plasmídica (PQE-70042) en 100 μ l de células químiocompetentes (*E. coli BL21*) cuidadosamente descongeladas.
- Resuspender e incubar las células en hielo durante 30 min.
- Aplicar choque térmico a 42 °C durante 45 - 90 s.
- Mantener en hielo durante 2 min
- Agregar 250 μ l de medio líquido LB precalentado a 42 °C.
- Incubar las células a 37 °C y 200 rpm durante 1:30 - 2:00 h para favorecer la recuperación de las células.
- Espatular el contenido en 2 placas Petri de medio sólido LB suplementado con los antibióticos de selección.
- Incubar 24 h a 37 °C.
- Analizar las clonas obtenidas a través de una digestión de ADN

Expresión de proteínas (Sambrock,1998) tomado de Martínez *et al.*, 2019.

- Inocular 10 μ l de cultivo de la cepa de *E. coli* BL21 conteniendo el plásmido PQE31 una placa Petri de medio sólido LB suplementado con el (los) antibiótico (s) apropiado(s).
- Incubar 24 h a 37 °C.
- Inocular una colonia en un tubo con 5mL de medio líquido LB suplementado con el antibiótico de selección. Incubar toda la noche a 37 °C y 150 rpm.
- Con el precultivo anterior, inocular un matraz conteniendo 200 mL de medio de cultivo líquido LB suplementado con el (los) antibióticos de selección, a una DO₆₀₀ de 0.1
- Incubar a 37 °C a 150 rpm hasta obtener una DO₆₀₀ entre 0.5 y 0.8.
- Posteriormente, añadir IPTG 0.5Mm.
- Incubar nuevamente los matraces a 37 °C y 150 rpm durante 3h.

- Centrifugar la muestra (200 mL), a 4°C y 10000 rpm por 10min.
- Agregar 5 mL de buffer PBS 150 mM y resuspender
- Almacenar la pastilla a -20 °C hasta su uso

Protocolo de determinación de proteínas (BioRad) tomado de Martínez *et al.*, 2019.

- Agregar 500 µl de buffer PBS 150 mM a la pastilla inducida obtenida de -70°C y resuspender.
- Diluir de 5 µl del extracto proteico en 795 µL de agua PISA estéril.
- Agregar 200 µl del reactivo de Bradford (BioRad).
- Mezclar en vórtex e incubar la muestra durante 5 min a temperatura ambiente.
- Medir la DO₅₉₅, utilizar agua PISA estéril como blanco.
- Determinar la concentración de proteína utilizando una curva de calibración de Albúmina sérica bovina (Anexo III)

Protocolo de elaboración del gel de electroforesis SDS-PAGE (Sambrock, 1998) tomado de Martínez *et al.*, 2019.

- De acuerdo con el peso molecular de la proteína de interés buscar la concentración del gel de poliacrilamida a preparar para una eficiente resolución.

Tabla 8: Relación de acrilamida bisacrilamida necesario para separar la proteína de interés (28).

Acrilamida/Bisacrilamida	Rango de separación (kDa)
6	50 - 200
8	30 - 95
10	20 - 80

12	12 - 60
15	10 - 43

- Limpiar los cristales y espaciadores con SDS al 1%.
- Ensamblar los cristales con los espaciadores para la carga del gel.
- Preparar el gel separador (10 mL) de acuerdo con la siguiente Tabla:

Tabla 8. Volúmenes necesarios para la preparación del gel separador (27)

% de gel	Agua	30% acrilamida	Tris - HCL 1.5 M, pH (µl)	SDS al 10% (mL) 8.8 (mL)	APS al 10%	TEMED (µl)
8%	4.6	2.6	2.6	100	100	10
10%	3.4	3.4	2.6	100	100	10
12%	3.2	4.0	2.6	100	100	10
15%	2.2	5.0	2.6	100	100	10

- Colocar cuidadosamente la solución del gel en los cristales dejando de 2- 3 cm libres de solución.
- Agregar alcohol isopropanol hasta llenar los vidrios (eliminará las burbujas que se puedan formar)
- Permitir la polimerización del gel (aproximadamente 30 min).
- Preparar el gel concentrador (10 mL)

Tabla 9. Concentraciones del gel concentrador (27)

% de gel	Agua (mL)	30% acrilamida (mL)	Tris HCL 0.5M, pH 6.8 (mL)	SDS al 10% (µl)	APS al 10% (µl)	TEMED (µl)
5%	5.86	1.34	2.6	100	100	10

- Retirar la capa de isopropanol sobre el gel separador.

- Agregar la solución del gel concentrador en los 2 – 3 cm que quedaron libres.
- Colocar el peine cuidadosamente evitando la formación de burbujas.
- Permitir la polimerización del gel (30 min).
- Retirar el peine y coloque los cristales conteniendo los geles en la cámara de electroforesis SDS-PAGE.
- Posteriormente llenar con buffer de corrimiento la cámara
- Proseguir con la preparación de las muestras de carga (Anexo III)

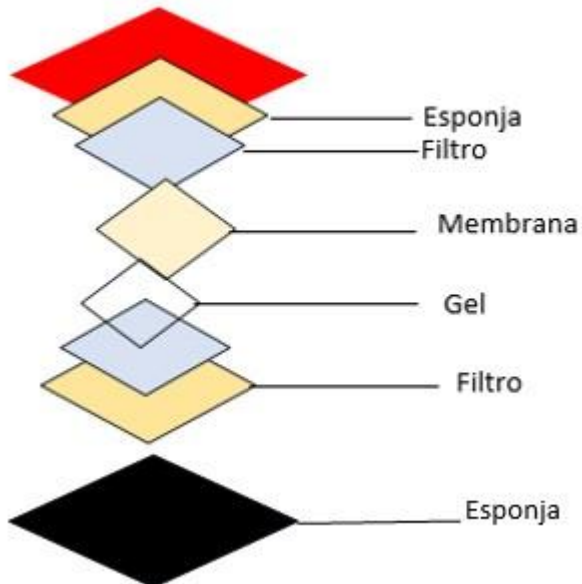
Protocolo para purificación de proteínas (28)

- Preparar la resina, colocar en la columna 1 mL de resina Ni-NTA y 2mL de buffer de lisis (anexo II), esperar a que se eluya por goteo y por densidad se compacte la resina
- Lavar la columna con buffer de lavado tres veces.
- Posteriormente agregar 2mL de la muestra (9.2 µg/MI) de interés esperando a que permita interaccionar con los grupos Ni de la resina por completo (recolectar en tubos falcón).
- Lavar la columna con 2 mL de buffer de lisis con imidazol al 50 mM (recolectar en tubos falcón).
- Lavar la columna con 2 mL de buffer de lisis con imidazol al 100 mM (recolectar en tubos falcón).
- Una vez recolectado los lavados correr las muestras en un gel SDS al 12% para verificar la purificación.

Protocolo Western Blot (Bio Rad).

- Preparar 1L-1.5 L tampón de transferencia (anexo II) para llenar la cámara de transferencia de proteínas (SIGMA-ALDRICH)
- Remojar las esponjas y los filtros en buffer de transferencia durante 15 min.

- Para activar la membrana de nitrocelulosa, se debe humedecer en tampón de transferencia durante 15 min.
- Procede a formar el sándwich, evitando la formación de burbujas (pasando rodillo para eliminarlas), en todo momento usar guantes y tratar de tener el menor contacto con la membrana



Transferencia de proteínas

- Colocar el casete en el tanque de transferencia de modo que el lado del gel apunte hacia el cátodo (-) y el lado de la membrana este orientado hacia el ánodo (+)
- Agregar buffer de transferencia, cubriendo el soporte del casete.
- Conectar el cable del ánodo y el cable del cátodo a sus salidas de alimentación correspondientes.
- Encender la cámara durante 1-2 h a 90 V a 190 mA.
- Una vez completada la transferencia, desmontar y sumergir la membrana con tampón de bloqueo (anexo II) durante 1 h.
- Retirar el tampón de bloqueo y agregar el anticuerpo anti-polihistidina a una concentración de 1:1000 conjugado con fosfatasa alcalina, mantener en agitación durante 2 h.
- Realizar 3 lavador con TBS-tween al 0.05% (anexo II) durante 10 min

- Revelar con la solución BCIP/NBT (anexo II) (agitación constante hasta que se logren ver las bandas).

Anexo II. Preparación de soluciones

Preparación de antibióticos tomado de Martínez *et al.*, 2019.

- **Ampicilina** (50 mg/mL): pesar 50 mg de ampicilina sódica y disolver en 1 mL de agua tridestilada estéril. Esterilizar mediante filtración usando filtros de 0.22 μ m. Almacenar a -20 °C. Concentración de trabajo 50 μ g/mL.
- **Cloranfenicol** (34 mg/mL): pesar 34 mg de cloranfenicol y disolver en 1 mL de etanol absoluto. Almacenar a -20 °C. Concentración de trabajo 34 μ g/mL.

Preparación de soluciones para extracción de DNA tomado de Martínez *et al.*, 2019.

Buffer PBS 1X	Buffer TE	Buffer STE
NaCl 137 mM	Tris 10 mM	NaCl 100 mM
KCl 2.7 mM	EDTA 1 mM	Tris 10 mM
Na ₂ HPO ₄ 10 mM	Ajustar a pH 8 con HCl.	EDTA 1 mM
KH ₂ PO ₄ 1.8 mM		Ajustar a pH 8 con HCl

Preparación de fenol Tris-HCl 0.5 M saturado (pH 8.0) 25 mL. Fundir los cristales de fenol en baño María a 65 °C. Tomar 25 mL de fenol fundido y colocarlo en un matraz de 125 mL. Agregar 1 volumen igual de Tris-HCl 0.5 M pH 8.0 y agitar a 10000 rpm durante 15 min. Permitir la separación de las fases acuosa y orgánica.

Retirar la fase acuosa y agregar 25 mL de Tris-HCl 0.1 M. Agitar durante 15 min. Permitir la separación de las fases y medir el pH con tira reactiva. Si el pH no es de 8.0 agregar nuevamente Tris-HCl 0.1 M pH 8.0. Repetir el proceso hasta que la fase acuosa tenga pH de 8.0. Almacenar el fenol en un frasco ámbar a 4 °C adicionando 1% de Tris-HCl pH 8.0.

Soluciones para Miniprep tomado de Martínez *et al.*, 2019.

Solución I	Solución II	Solución III
Glucosa 50 mM	SDS 0.2 N	Ác. Acético 11.5 mL
Tris-HCl 25 mM	NaOH 1 %	Acetato de Potasio 5M
EDTA 10 mM		60 mL

Soluciones para SDS-PAGE

Buffer de corrimiento

Tris 25 mM

Glicina 192 mM

SDS 0.1%

Solución de acrilamida

Acrilamida 29.2%

Bis-acrilamida 0.8%

Buffer de Carga de proteínas 2X

Tris-HCl pH 6.8 1.5M

SDS 2%

Glicerol 10%

Azul de Bromofenol 0.0006%

Ditiotreitol 0.1 M

Solución de tinción

Azul de Coomassie 0.25 %

Metanol 50 %

Ácido acético 10 %

Solución de desteñido

Ácido acético 20 %

Metanol 40 %

Soluciones para la purificación de proteína

Buffer de lisis (ajustar pH 8)

KH_2PO_4 20 mM

KCl 250 mM

Imidazol 20 mM

Buffer de lavado (ajustar pH 8)

NaH_2PO_4 50 mM

KCl 250 mM

Imidazol 20 mM

Soluciones para Western Blot

Buffer de transferencia

Tris 50mM

Glicina 80mM

SDS 0.1%

Metanol 20%

Tampón de bloqueo

Tris 20 mM

NaCl 150 mM

Tween 0.05 %

Leche desnatada en polvo 5 %

Buffer de lavado

Tris 20 mM

NaCl 150 mM

Tween 0.05 %

pH de 7.6

Anticuerpo Anti-polihistidina

Concentración 1:1000

Preparación de NBT/BCIP

220µl NBT (75mg/mL de dimetilformamida) concentración final 330 mg/ ml.

Adicionarlos a 50 mL de buffer fosfatasa alcalina pH 9.5 (0.1M Tris/HCL, 0.1M de NaCl (esterilizar a 15 lb/ 20 min, almacenar a temperatura ambiente).

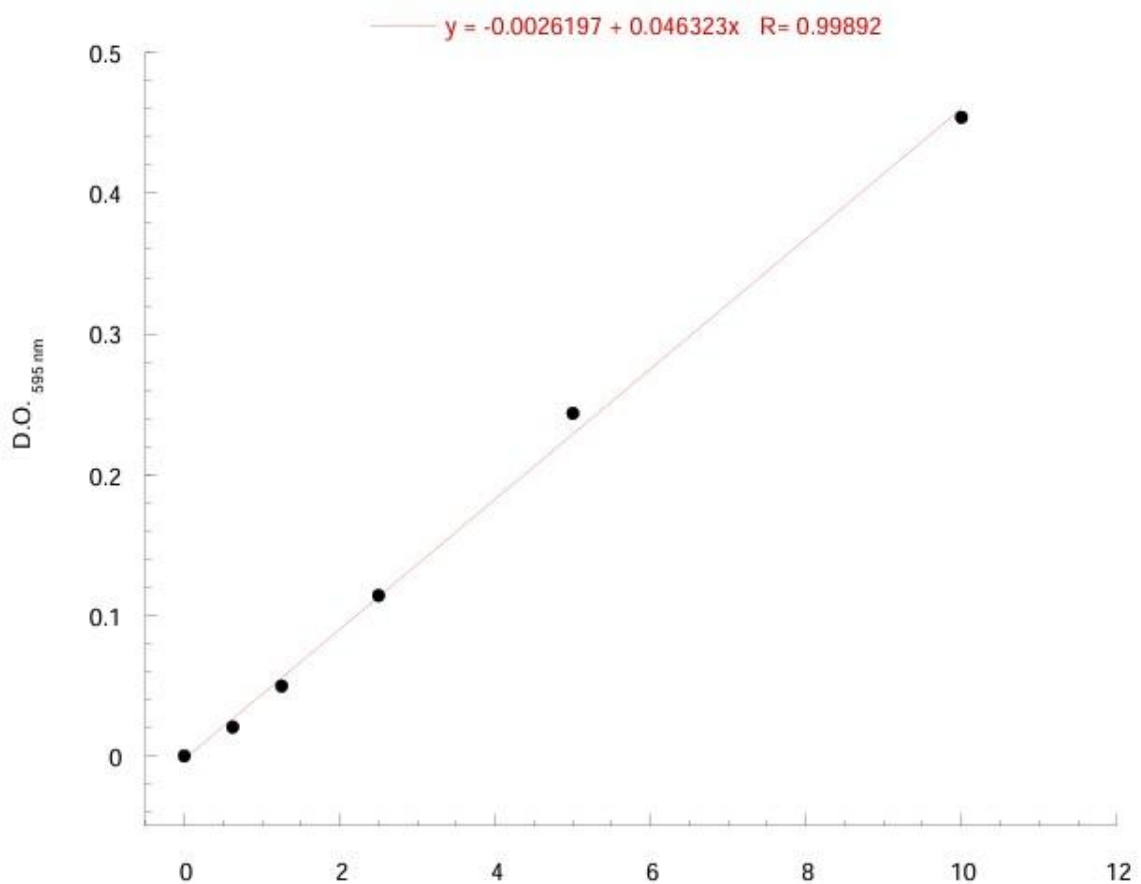
Preparar por separado MgCl₂ (esterilizar por separado y almacenar a temperatura ambiente, mezclar suavemente).

Agregar 170µl de BCIP (50mg/mL en dimetilformamida, concentración final,170 mg/mL, mezclar suavemente.

Anexo III Curva de calibración

Curva de calibración BSA tomado de Martínez *et al.*, 2019

Curva de calibración BSA
microgramos/ mL



BIBLIOGRAFIA:

1. Fernandes Domingues Duarte C, Cecato U, Biserra TT, Mamédio D, Galbeiro S. 2020. *Azospirillum* spp. en gramíneas y forrajeras. Revisión. Rev Mex Cienc Pecu 11:223–240. <https://doi.org/10.22319/rmcp.v11i1.4951>
2. Cholula Cordero LP. 2005. Estudio de La Producción de Poli-β-hidroxibutirato (PHB) En *Azospirillum brasilense* Sp7. Tesis. Instituto Politecnico Nacional, Cd. Reynosa, Tamaulipas.
https://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/1143/389_2005_CE BIOGEN_ MAESTRIA_cholula_cordero_laura_patricia.pdf?sequence=1
3. Caballero-Mellado J. El género *Azospirillum*. UNAM, Cuernavaca, Mor., México.
<http://www.biblioweb.tic.unam.mx/libros/microbios/Cap10/>
4. Pereg Gerk L, Gilchrist K, Kennedy IR. 2000. Mutants with enhanced nitrogenase activity in hydroponic *Azospirillum brasilense* -wheat associations. Appl Environ Microbiol 66:2175–2184. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.5.2175-2184.2000>
5. Steenhoudt O, Vanderleyden J. 2000. *Azospirillum*, a free-living nitrogen-fixing bacterium closely associated with grasses: genetic, biochemical and ecological aspects. FEMS Microbiol Rev 24:487–506.
<https://doi.org/10.1111/j.15746976.2000.tb00552.x>

6. Lemos Delgado AC, Mina Cordoba A. 2015. Polihidroxicanoatos (PHA's) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Inf Téc* 79:83. <http://dx.doi.org/10.23850/22565035.139>
7. Martínez Martínez MDLA. 2019. Caracterización genética y funcional de proteínas fasin probables de *Azospirillum brasilense* Sp7. Tesis. BUAP, Instituto de Ciencias Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/items/5ad63b57-e911-4c31-9f1acdc7e5b187c8>
8. Laura Álvarez da Silva. 2016. "BIOPLÁSTICOS: Obtención y aplicaciones de polihidroxicanoatos." *Bioplásticos: obtención y aplicaciones de polihidroxicanoatos* (us.es).
9. Yolanda González García, Juan Carlos Meza Contreras, Orfil González Reynoso. 2013. Síntesis y biodegradación de polihidroxicanoatos: plásticos de origen microbiano. *Revista internacional de contaminación ambiental* 39. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0188-49992013000100007
10. Griebel R, Smith Z, Merrick JM. 1968. Metabolism of poly(β -hydroxybutyrate). I. Purification, composition, and properties of native poly(β -hydroxybutyrate) granules from *Bacillus megaterium*. *Biochemistry* 7:3676–3681. <https://doi.org/10.1021/bi00850a047>
11. Mezzolla V, D'Urso O, Poltronieri P. 2018. Role of PhaC Type I and Type II enzymes during PHA biosynthesis. *polymers* 10:910. <https://doi.org/10.3390/polym10080910>
12. Foong CP, Lakshmanan M, Abe H, Taylor TD, Foong SY, Sudesh K. 2018. A novel and wide substrate specific polyhydroxicanoate (PHA) synthase from unculturable bacteria found in mangrove soil. *J Polym Res* 25:23. <https://doi.org/10.1007/s10965-017-1403-4>

13. Koch M, Forchhammer K. 2021. Polyhydroxybutyrate: A useful product of chlorotic cyanobacteria. *Microb Physiol* 31:67–77. <https://doi.org/10.1159/000515617>
14. Aguilar García AG. 2016. Análisis del efecto de la co-transcripción de los genes *phbABC* sobre la producción de PHB de *Azospirillum brasilense* Sp245. Tesis. BUAP, Instituto de ciencias centro de investigaciones microbiológicas. <https://repositorioinstitucional.buap.mx/items/cad63c59-5af1-4492-b030-98e78b05c85b>
15. Moriuchi R, Dohra H, Kanesaki Y, Ogawa N. 2019. Complete Genome Sequence of 3-chlorobenzoate-degrading bacterium *Cupriavidus necator* NH9 and reclassification of the strains of the genera *Cupriavidus* and *Ralstonia* based on phylogenetic and whole-genome Sequence Analyses. *Front Microbiol* 10:133. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00133>
16. Maestro B, Sanz JM. 2017. Polyhydroxyalkanoate-associated phasins as phylogenetically heterogeneous, multipurpose proteins. *Microbial biotechnology* 10:1323–1337. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12718>
17. Kadouri D, Burdman S, Jurkevitch E, Okon Y. 2002. Identification and isolation of genes involved in poly(β -Hydroxybutyrate) biosynthesis in *Azospirillum brasilense* and characterization of a *phbC* mutant. *Appl Environ Microbiol* 68:2943–2949. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.6.2943-2949.2002>
18. Martínez-Martínez MDLA, Urzúa LS, Carrillo YA, Ramírez MB, Martínez Morales LJ. 2023. Polyhydroxybutyrate metabolism in *Azospirillum brasilense* and Its applications, a review. *Polymers* 15:3027. <https://doi.org/10.3390/polym15143027>
19. Maehara A, Doi Y, Nishiyama T, Takagi Y, Ueda S, Nakano H, Yamane T. 2001. PhaR, a protein of unknown function conserved among short-chain-length polyhydroxyalkanoic acids producing bacteria, is a DNA-binding protein and represses *Paracoccus denitrificans phaP* expression in vitro. *FEMS*

- Microbiology Letters 200:9–15. <https://doi.org/10.1128/jb.184.14.3992-4002.2002>
20. Wahl A, Schuth N, Pfeiffer D, Nussberger S, Jendrossek D. 2012. PHB granules are attached to the nucleoid via PhaM in *Ralstonia eutropha*. BMC Microbiol 12:262. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-12-262>
 21. Pfeiffer D, Jendrossek D. 2014. PhaM Is the physiological activator of poly(3hydroxybutyrate) (PHB) synthase (PhaC1) in *Ralstonia eutropha*. Appl Environ Microbiol 80:555–563. <https://doi.org/10.1128/aem.02935-13>
 22. Lee TR, Lin JS, Wang SS, Shaw GC. 2004. PhaQ, a New class of poly- β hydroxybutyrate (PHB)-responsive repressor, regulates *phaQ* and *phaP* (Phasin) expression in *Bacillus megaterium* through interaction with PHB. J Bacteriol 186:3015–3021. <https://doi.org/10.1128/jb.186.10.3015-3021.2004>
 23. Galán B, Dinjaski N, Maestro B, De Eugenio LI, Escapa IF, Sanz JM, García JL, Prieto MA. 2011. Nucleoid-associated PhaF phasin drives intracellular location and segregation of polyhydroxyalkanoate granules in *Pseudomonas putida* KT2442. Molecular Microbiology 79:402–418. <https://doi.org/10.1111/j.13652958.2010.07450.x>
 24. Tarazona NA, Hernández-Arriaga AM, Kniewel R, Prieto MA. 2020. Phasin interactome reveals the interplay of PHAF with the polyhydroxyalkanoate transcriptional regulatory protein PHAD in *Pseudomonas putida*. Environmental Microbiology 22:3922–3936. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15175>
 25. Zhu SW, Fang ZY, Jiang HY, Cheng BJ. 2010. Molecular and functional analysis of the poly- β -hydroxybutyrate biosynthesis operon of *Pseudomonas* sp BJ-1. Genet Mol Res 9:2349–2356. <https://doi.org/10.4238/vol9-4gmr845>
 26. Martínez-Martínez MDLA, González-Pedrajo B, Dreyfus G, Soto-Urzúa L, Martínez-Morales LJ. 2019. Phasin PhaP1 is involved in polyhydroxybutyrate granules morphology and in controlling early biopolymer accumulation in

Azospirillum brasilense Sp7. AMB Expr 9:155.
<https://doi.org/10.1186%2Fs13568-019-0876-4>

27. Introducción a la SDS-PAGE - Separación de proteínas basada en el tamaño.
<https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/protocol/proteinbiology/gel-electrophoresis/sds-page>.
<https://www.sigmaaldrich.com/MX/es/technical-documents/protocol/proteinbiology/gel-electrophoresis/sds-page>.
28. Purificación por Cromatografía de afinidad: Usando metales para inmovilizar proteínas. 19. <https://www.youtube.com/watch?v=7JxY1LeONTo>
29. Escobar Garduño E, Scior T, Soto Urzúa L, Martínez Morales LJ. 2020. Identification of residues for chaperone-like activity of OppA protein in *Yersinia pseudotuberculosis*. AMB Expr 10:153. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01090-8>
8. <https://doi.org/10.1186/s13568-020-01090-8>
30. Zheng W, Zhang C, Li Y, Pearce R, Bell EW, Zhang Y. 2021. Folding nonhomologous proteins by coupling deep-learning contact maps with U-TASSER assembly simulations. Cell rep methods 1:100014.
31. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. Nat Protoc 5:725-738.
32. Yang, J., & Zhang, Y. (2015). I-TASSER server: New development for protein structure and function predictions. Nucleic Acids Research, 43(W1), W174–W181.
33. Yang J, Yan R, Roy A, Xu D, Poisson J, Zhang Y. 2015. The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. Nat Methods 12:7–8.
34. Zhang Y. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. BMC Bioinformatics 9:40.
35. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R,

- HeerFT, de Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R, Schwede T. 2018. SWISSMODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* 46: W296–W303.
36. Bailey TL, Johnson J, Grant CE, Noble WS. 2015. The MEME Suite. *Nucleic Acids Res* 43: W39–W49.
37. Remmert M, Biegert A, Hauser A, Söding J. 2012. HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment. *Nat Methods* 9:173–175.
38. Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23:2947–2948.
39. Sievers F, Wilm A, Dineen D, Gibson TJ, Karplus K, Li W, Lopez R, McWilliam H, Remmert M, Söding J, Thompson JD, Higgins DG. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using ClustalOmega. *Mol Syst Biol* 7:539.
40. Berman HM. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28:235–242.
41. BIOVIA., Dassault Systèmes, [Discovery Studio Visualizer], [Software version 4.5], San Diego: Dassault Systèmes, [2022]