



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

TESIS PROFESIONAL

“Análisis de interacciones entre PhaP4, PhaP5 y PhaP6 y factores σ^{24} y σ^{32} con la región promotora del gen *phaC* de *Azospirillum brasilense* Sp7”

para obtener el grado de

LICENCIADO EN BIOMEDICINA

Presenta:

Yovani Aguilar Carrillo

Director:

D.C. Luís Javier Martínez Morales

Asesor metodológico:

D. C. Lucía Soto Urzúa

Noviembre, 2023



"La vida puede ser pesada, especialmente si intentas cargar con todo a la vez. Una parte de madurar y entrar en nuevos capítulos de tu vida tiene que ver con tomar y dejar ir"

Dr.h.c. Swift



AGRADECIMIENTOS

A estas personas quiero expresar mi más profundo agradecimiento:

En primer lugar, les agradezco a mis padres que siempre me han brindado su apoyo incondicional para poder cumplir todos mis objetivos personales y académicos. Ellos son los que con su cariño me han impulsado siempre a perseguir mis metas y nunca abandonarlas frente a las adversidades. También son los que me han brindado el soporte material, económico y afectivo para poder concentrarme en los estudios y nunca abandonarlos. A mis hermanas que en el día a día con su presencia, respaldo y cariño me impulsan para salir adelante, además de saber que mis logros también son los suyos.

Agradezco a Dios por bendecirnos la vida, por guiarnos a lo largo de nuestra existencia, ser el apoyo y fortaleza en aquellos momentos de dificultad y de debilidad.

Quisiera expresar mi más profundo agradecimiento a mi director de tesis, el Dr. Luis Javier Martínez. Su experiencia, comprensión y paciencia contribuyeron a mi experiencia en el complejo y gratificante camino de la investigación. No tengo palabras para expresar mi gratitud por su inmenso apoyo durante este viaje.

Asimismo, quisiera expresar mi gratitud a todas las personas que contribuyeron con el desarrollo de mi investigación. Agradezco la Dra. Lucía, a la Dra. Sandra y a la Dra. Liliana que dedicaron su tiempo a revisar mi trabajo. Los comentarios de mejora, las sugerencias de bibliografía, las entrevistas y conversaciones para revisar conceptos, propuestas y análisis son la base de estas páginas. Esta tesis no sería la que es sin sus recomendaciones.

Un sincero agradecimiento a Kelly y a Europa mis mejores amigas de la universidad que estuvieron conmigo en los momentos de estrés y alegría durante este largo y retador camino. Su apoyo, confianza, soporte y cariño han sido invaluable. Ustedes han contribuido a mi fortaleza y ánimo de una manera u otra. Gracias por ser mi punto de apoyo, mi equipo de aliento y, lo más importante, la familia que yo elegí.

Igualmente, quisiera expresar mi gratitud a todas las personas que me apoyaron en el laboratorio, principalmente a Jess a quien le agradezco su ayuda incondicional que me ha brindado a lo largo de este proceso y cada palabra de aliento que me ha brindado en este proceso. A Yahev con quien empecé este camino en el laboratorio y a quien agradezco cada momento compartido. A Dacia e Iván quienes me enseñaron como ser un buen instructor y de igual forma su apoyo en experimentos.

¡Gracias a todos!



INDICE

AGRADECIMIENTOS.....	I
INDICE	1
RESUMEN	3
ABSTRACT	4
INTRODUCCIÓN.....	5
ANTECEDENTES	6
<i>AZOSPIRILLUM BRASILENSE</i>	6
POLIHIDROXIALCANOATOS.....	7
VÍAS DE SÍNTESIS DE PHB	10
BIOGÉNESIS DE LOS GRÁNULOS DE SCLPHA.....	11
PROTEÍNAS ASOCIADAS AL GRANULO DE PHB.....	12
<i>PhaC sintasas (PhaC)</i>	13
<i>PHA depolimerasas (PhaZ)</i>	13
<i>Fasinas (PhaP)</i>	14
<i>Reguladores (PhaR y PhaM)</i>	17
PRODUCCIÓN DE PHB POR <i>A. BRASILENSE</i>	18
FACTORES SIGMA	20
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	24
OBJETIVOS.....	25
GENERAL	25
ESPECÍFICOS.....	25
MATERIAL Y MÉTODOS	26
ESTRATEGIA DE TRABAJO	26
.....	26
<i>Análisis bioinformáticos</i>	27
<i>Obtención de modelos tridimensionales de PhaP4, PhaP5 y PhaP6 y los factores de σ^{24} (RpoE) y σ^{32} (RpoH)</i>	27
<i>Docking molecular tripartita entre PhaP4, PhaP5 y PhaP6 con factores sigma (σ^{24} y σ^{32}) y región promotora del gen phaC</i>	27
<i>Análisis experimental</i>	28
<i>Bacterias y plásmidos utilizados</i>	28
<i>Construcción de los vectores pGFPN2-RpoE y pCHYN2-RpoH</i>	29
<i>El vector pXGFPN-2</i>	29
<i>El vector pXCHYN-2</i>	29
<i>Obtención de las construcciones pGFPN2-RpoE y pCHYN2-RpoH</i>	30
<i>Amplificación de los genes de rpoH y rpoE</i>	30
<i>Digestión de los productos de PCR y vectores</i>	31
<i>Ligación y transformación en E. coli S17-1</i>	31

RESULTADOS	32
OBTENCIÓN DE MODELOS TRIDIMENSIONALES DE PHAP4, PHAP5 Y PHAP6 Y FACTORES SIGMA Σ^{24} Y Σ^{32}	32
DETERMINACIÓN DE PROBABLES CAJAS PROMOTORAS -10 Y -35 DEL GEN PHAC.....	34
DOCKING MOLECULAR TRIPARTITA ENTRE PHAP4, PHAP5 Y PHAP6 CON FACTORES SIGMA Y REGIÓN PROMOTORA DEL GEN PHAC.....	34
<i>Obtención de las construcciones pGFPN2-RpoE y pCHYN2-RpoH.....</i>	<i>49</i>
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIONES.....	55
PERSPECTIVA.....	55
BIBLIOGRAFÍA	56
ANEXOS	65
ANEXO I.....	65
TÉCNICAS DE LABORATORIO.....	65
ANEXO II.....	76
PREPARACIÓN DE SOLUCIONES	76
ANEXO III	78

Resumen

Las fasinas (PhaP) son proteínas anfifílicas involucradas en la regulación de la producción, cantidad y tamaño de los gránulos de polihidroxibutirato (PHB) en *Azospirillum brasilense* Sp7. Se han reportado seis genes codificantes para proteínas fasinas que presentan un dominio Phasin_2, *phaP1*_{Abs} al *phaP6*_{Abs}. Existen cuatro tipos de proteínas asociadas a gránulos (GAP's) de PHB; donde estudios efectuados han sugerido una posible interacción con alguna de las fasinas (si es posible poner de una vez el tipo) con el DNA.

Las fasinas son proteínas predominantes en el granulo de PHB; sin embargo, no hay suficiente información publicada sobre las fasinas de *A. brasilense* Sp7. La generación de modelos tridimensionales de las fasinas 4, 5 y 6 y de los factores σ^{24} y σ^{32} , permitieron realizar el docking molecular de la interacción entre fasina-factor sigma, fasinas-DNA, factor sigma-DNA y complejo proteico-DNA, estos últimos tres con el fin de evaluar posibles uniones a las probables cajas -10 y -35 río arriba del gen *phaC* (codifica PHB sintasa). Las fasinas han demostrado unirse a regiones de los factores sigma que participan en la detección de las cajas -10 y -35, además se observó que podrían evitar la unión de los factores sigma sobre estos motivos promotores, por lo que podrían ocasionar el bloqueo o en caso contrario la promoción de la transcripción, debido a que las fasinas interactúan con regiones de los factores sigma involucradas en la unión a estos motivos promotores. Sugiriendo con ello la posible intervención en la producción de PHB donde existe la posibilidad de un aumento o disminución de la transcripción de la proteína PhaC. Así mismo, la clonación en los vectores de los factores sigma permitirán realizar análisis *in vitro* de las interacciones entre las fasinas y los factores sigma con DNA. Debido a la unión de fasinas a regiones promotoras de los genes que codifican para proteínas participantes en la producción de PHB, este podría ser un punto clave para incremento en la obtención de éste, puesto que es un biopolímero de interés como plástico industrial a causa de sus propiedades de biodegradabilidad y a su origen a partir de recursos renovables.

Abstract

Phasins (PhaP) are amphiphilic proteins involved in the regulation of the production and size of polyhydroxybutyrate (PHB) granules in *Azospirillum brasilense* Sp7. Six genes coding for phasin proteins presenting a Phasin_2 domain, *phaP1*_{Abs} to *phaP6*_{Abs}, have been reported. There are four types of granule-associated proteins (GAPs), where studies have suggested possible interactions of phasins (one of the four types of GAPs) with DNA. Phasins are predominant proteins in the PHB granule, however there is not enough published information on *A. brasilense* Sp7 phasins. The generation of three-dimensional models of phasins 4, 5 and 6 and of the σ^{24} and σ^{32} factors allowed molecular docking of the interaction between phasin-transcription factor, phasin-DNA, sigma-DNA factor, and protein-DNA complex, the latter three in order to evaluate possible binding to the probable -10 and -35 boxes upstream of the *phaC* gene (encoding PHB synthase). Phasins have been shown to bind to regions of the sigma factors involved in the detection of the -10 and -35 boxes, it was also observed that they could prevent the binding of sigma factors on these promoter motifs, which could cause the blocking or otherwise the promotion of transcription, because the phasins interact with regions of the sigma factors involved in the binding to these promoter motifs. Thus, suggesting the possible intervention in PHB production where there is the possibility of an increase or decrease of PhaC protein transcription. Likewise, the cloning of sigma factors into the vectors will allow in vitro analysis of the interactions between phasins and sigma factors with DNA. Due to the binding of phasins to promoter regions of proteins involved in PHB production, this could be a key point for increasing PHB production since it is a biopolymer of interest as an industrial plastic due to its biodegradability properties and its origin from renewable resources.

Introducción

Actualmente la contaminación por plásticos en el medio ambiente es un tema de importancia mundial, a pesar de su gran practicidad su principal desventaja es debido a su uso de una sola vez; una gran cantidad de estos productos tienen como último destino las alcantarillas, calles, y finalmente, su impacto se observa en la contaminación de mantos acuíferos, mares y suelos (1). Dado a su economicidad, resistencia y fácil moldeado, los plásticos derivados del petróleo como el PET (Polietileno Tereftalato) provocaron que estos se volvieran para el ser humano imprescindible para el desarrollo de la vida cotidiana. Pero, su uso desmedido y su defectuoso proceso de eliminación ha llevado a ser un factor determinante en el deterioro de ecosistemas marinos y terrestres. Llegando al punto en el que incluso se han formado islas de basura en el océano pacífico (1, 2).

Entre algunas soluciones a este problema se encuentra el uso de polímeros biodegradables, uno de ellos son los polihidroxicanoatos (PHA). Los PHA son una clase de polímeros producidos a partir de recurso renovables, producidos por diversos microorganismos como bacterias y arqueobacterias, adicionalmente estos poseen propiedades similares a los polímeros sintéticos, como es el caso de polipropileno o el PET (3). En el medio ambiente los PHA pueden bioasimilarse o biodegradarse completamente en productos inocuos, en el área alimentaria puede usarse para el envasado de productos y en su aplicación médica este puede ser usado como biomaterial para implantes temporales (4, 5). Uno de los polihidroxicanoatos más estudiados es el PHB, su biogénesis depende de varias enzimas como la PhaA, la PhaB y la PhaC, mientras la degradación es por medio de la PhaZ, enzimas que son codificadas por los genes *phaA*, *phaB*, *phaC* y *phaZ*, respectivamente (6). Las investigaciones se han centrado en la optimización de la producción, por tal motivo, estos biopolímeros pueden ser una solución prometedora ante la contaminación por plásticos.

Antecedentes

Azospirillum brasilense

Azospirillum brasilense es una rizobacteria con una distribución geográfica amplia alrededor del mundo, encontrándose en suelos que van desde regiones tropicales, subtropicales, templadas, frías hasta regiones desérticas (7).

A. brasilense es una bacteria Gram negativa, perteneciente a la subclase de las proteobacterias y dentro de la familia *Rhodospirillaceae* (Figura 1), las principales características de identificación para el género son la forma vibroide, el pleomorfismo y la movilidad en espiral (8, 9). Una característica fenotípica usada como criterio de reconocimiento tentativo del género, es el color escarlata que toman las colonias, cuando se cultivan en medio adicionado con colorante Rojo Congo (10).

- ❖ Dominio: Bacteria
 - ❖ Filo: Pseudomonadota
 - ❖ Clase: Alphaproteobacteria
 - ❖ Orden: Rhodospirillales
 - ❖ Familia: *Azospirillaceae*
 - ❖ Género *Azospirillum*
 - ❖ Especie: *Azospirillum brasilense*

Figura 1. Clasificación taxonómica de la especie *Azospirillum brasilense*. (Tomado de Schoch, *et al.*, 2020) (5).

Cuando es cultivada en medio líquido desarrolla un flagelo polar, por otra parte, si es cultivada en medio sólido o semisólido desarrollan flagelo laterales además del flagelo polar (Figura 2) (9). Además, poseen un metabolismo oxidativo versátil, teniendo una producción de energía máxima cuando las células bacterianas se cultivan en condiciones de concentración de oxígeno muy bajas, correspondientes a un aproximado del 0.4% de oxígeno disuelto (11).

Las condiciones de microaerofilia promueven el óptimo crecimiento de *A. brasilense*, así mismo, esas condiciones son las más apropiadas para la fijación de nitrógeno en vida libre (11, 12). *A. brasilense* se considera una bacteria promotora del crecimiento vegetal (PGPR, por sus siglas en ingles), capaz de colonizar y promover el crecimiento de diversos cultivos que son de importancia en el área agronómica y hortícola (12, 13). La capacidad promotora de crecimiento vegetal por medio de la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos, la producción de fitohormonas, la producción de enzimas y moléculas de pequeño tamaño, la mejora en la actividad de la membrana, la proliferación del sistema radicular, la absorción de agua y minerales, amortiguar el estrés ambiental, la producción de sideróforos y la competencia contra fitopatógenos (7, 13, 14).

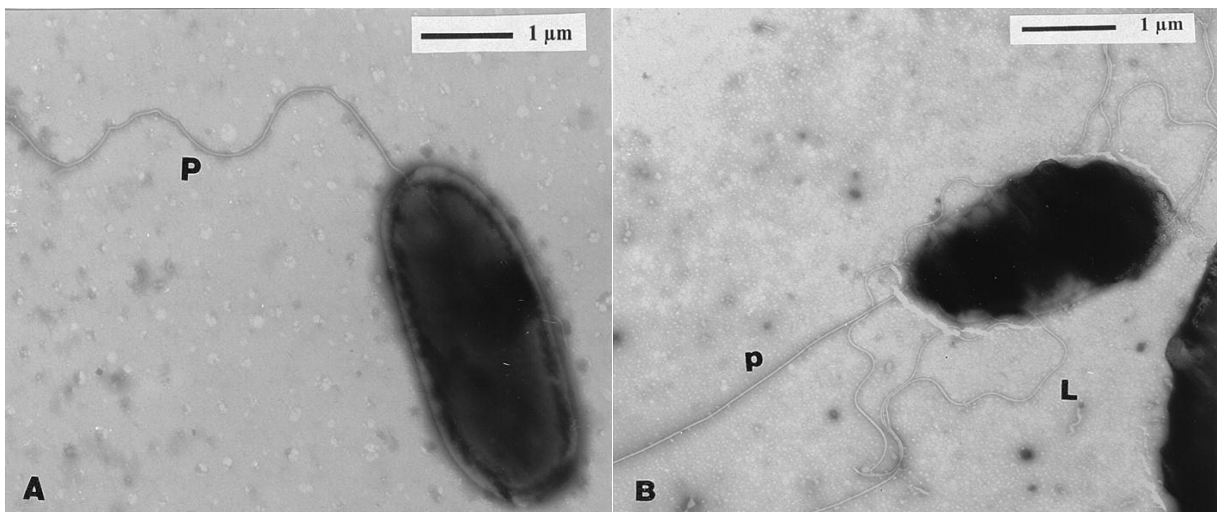


Figura 2. Micrografías electrónicas de transmisión que muestran el flagelo polar y los flagelos laterales, la cepa *Azospirillum brasilense* Sp7 mostró un flagelo polar (P) cuando se cultivó en medio líquido (A) y flagelos laterales (L) y polares (p) cuando se cultivó en medio sólido o semisólido (B). Tomado de Pereg, *et al*, 2000 (9).

Polihidroxicanoatos

Los polihidroxicanoatos (PHA) son polímeros de ácidos hidroxialcanoicos que pertenecen a una familia de poliésteres microbianos que se encuentran dentro de una familia de polímeros termoplásticos (15, 16). Una gran variedad de microorganismos procarióticos (bacterias, arqueas y microalgas) tiene la capacidad de producir estos poliésteres, la producción se promueve por un desequilibrio en las

condiciones de nutrición, en esencia cuando hay una limitación de elementos esenciales (N,P, O, S, K, Fe, Sn, y/o Mg) contra un exceso en la fuente de carbono (17, 18). Los PHA son almacenados intracelularmente por las bacterias como material de reserva, para uso posterior de carbono y energía (3, 16, 19).

La estructura general de la unidad de repetición de PHA se muestra en la figura 3, donde n puede ser mayor a cero, y es quien proporciona el número de unidades repetitivas en la cadena del polímero, mientras que R representan un grupo funcional, el cual varía dependiendo del tipo de PHA (15, 16, 19).

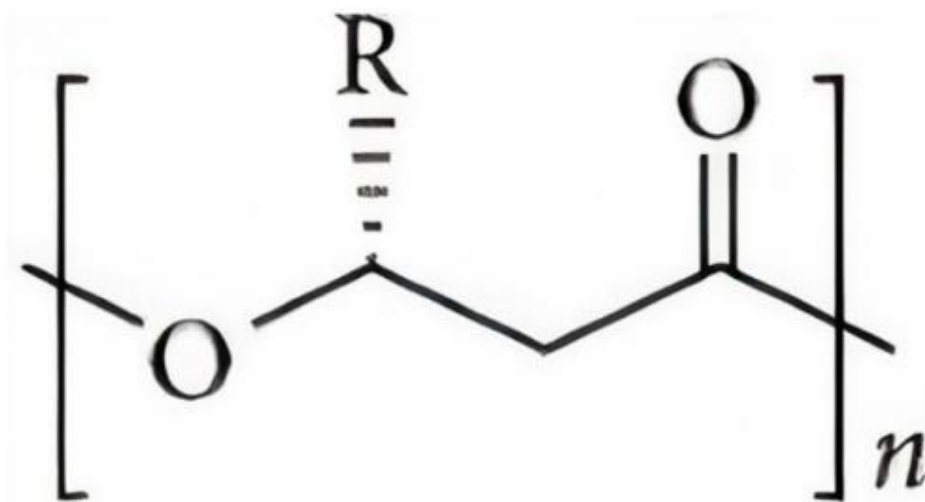


Figura 3. Estructura química general de las moléculas de polihidroxialcanoatos (PHA). Tomado de: McAdam, *et al.* 2020, (16).

El microorganismo productor del biopolímero y el grupo R , ocasionarán que el valor de n varíe. Las sustituciones más comunes del grupo radical y el nombre que recibe el polímero se muestran en la Tabla 1 (16, 20, 21).

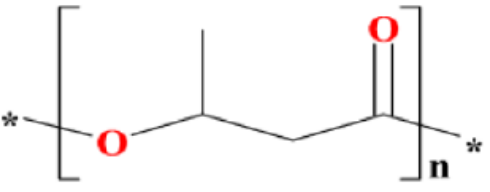
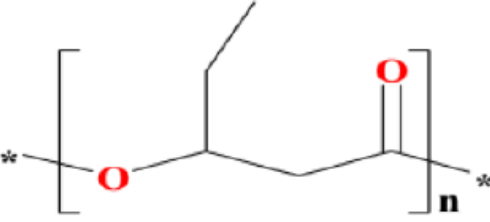
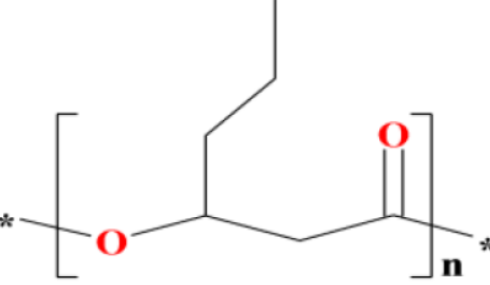
Grupo R	Nombre del polímero	Abreviación	Estructura
CH ₃	poli(3-hidroxi- butirato)	PHB	
CH ₂ CH ₃	poli(3-hidroxi- valerato)	PHV	
CH ₂ CH ₂ CH ₃	poli(3-hidroxi- hexanoato)	PHHx	

Tabla 1. Sustituciones del grupo radical y algunos de los PHA más conocidos. Tomado de Lemos y Mina, 2015 (20).

Los PHA se pueden clasificar en tres grupos, dicha clasificación es de acuerdo con el número de átomos de carbono que constituyen la cadena de los ácidos hidroxialcanoicos. Se pueden definir como PHA de cadena corta (SCL_{PHA}), PHA de cadena media (MCL_{PHA}) y PHA de cadena larga (LCL_{PHA}) (15, 16, 22).

- ❖ PHA de cadena corta (SCL_{PHA}): conformados por monómeros de entre 3-5 átomos de carbono. Ejemplos: 3-hidroxi-*butirato* (3HB), 4-hidroxi-*butirato* (4HB) o 3-hidroxi-*valerato* (3HV) (23, 24).

- ❖ PHA de cadena media (MCL_{PHA}): conformados por monómeros de entre 6-14 átomos de carbono. Ejemplos: 3-hidroxihexanoato (HHx), 3-hidroxidecanoato (HD) (25)
- ❖ PHA de cadena larga (LCL_{PHA}): conformados por monómeros de 15 o más átomos de carbono. Ejemplo: Polihidroxihexanoato (PHH) (17).

Los SCL_{PHA} poseen propiedades termoplásticas similares a las del polipropileno (PP), teniendo al poli-3-hidroxibutirato (PHB) como uno de los biopolímeros más representativo y estudiado de los PHA (16, 19). Los MCL_{PHA} poseen una cristalinidad reducida y una flexibilidad mayor, características que le proporcionan propiedades similares a los elastómeros y el látex (15, 19, 25, 26).

La determinación de que un PHA se forme como un polímero de cadena corta, mediana o larga estará directamente relacionado con la enzima necesaria de llevar a cabo la síntesis (PHA sintasa), dado que esta es específica de acuerdo al sustrato y tiene su actividad sobre monómeros con diferentes número de átomos (20).

Vías de síntesis de PHB

La gran diversidad de producción de PHA puede generarse mediante alguna de las tres vías principales de síntesis básica, en las cuales los precursores variarán de acuerdo con el metabolismo de la bacteria. En la primer vía, los precursores son los carbohidratos, en la segunda vía es la beta oxidación de ácidos grasos y la tercera es la síntesis de *novo* de ácidos grasos (figura 4) (15, 22).

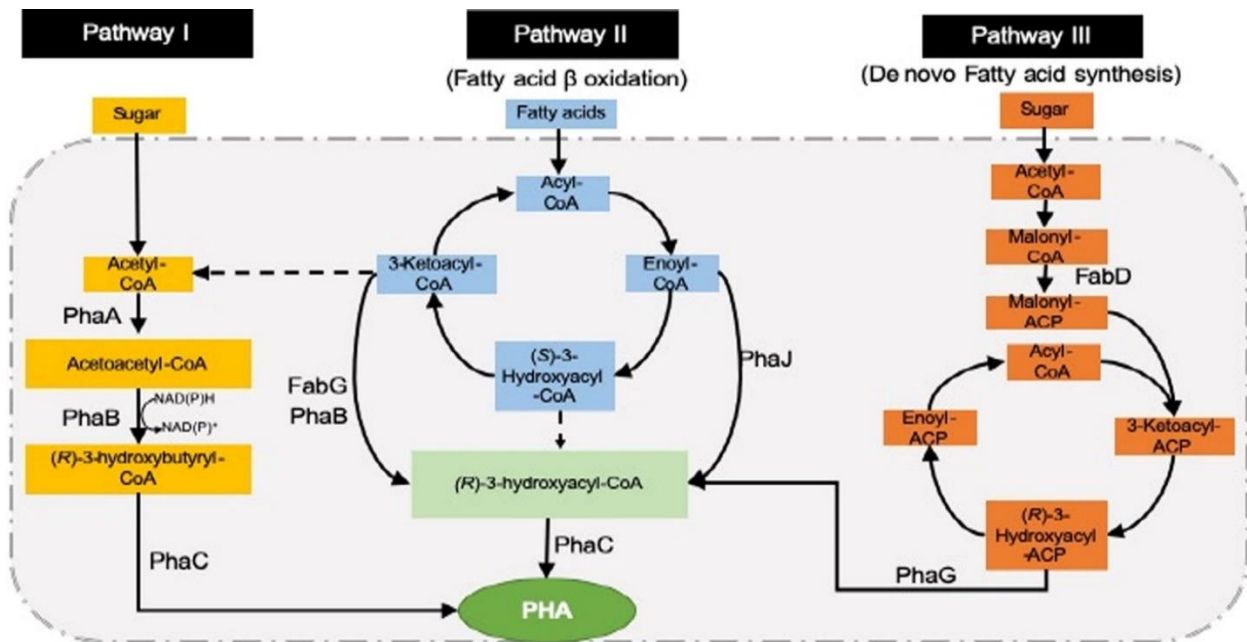


Figura 4. Principales vías metabólicas para la biosíntesis de PHA. PhaA es β-cetotiolasa; PhaB es acetoacetyl coenzima A (CoA) reductasa; PhaC es PHA sintasa; FabG es la proteína transportadora de 3-cetoacil acilo (ACP) reductasa; PhaG es acil-ACPI-CoA transacilasa; PhaJ es enoil-Co. Tomado de Khatami, *et al.* 2021 (15).

Biogénesis de los gránulos de SCLPHA

Con el inicio de la polimerización, el PHA empieza a acumularse en el citoplasma, como inclusiones esféricas insolubles en agua o gránulos insolubles en agua, donde su tamaño y número dependerán de la especie productora y de las condiciones en las que se cultivó (19, 27).

Una vez que las cadenas de polímero naciente (3-HB-CoA) unidas covalentemente a un dímero de PhaC forman estructuras tipo micela, las cuales crecen a medida que los monómeros de 3-HB-CoA van siendo polimerizados, promoviendo el crecimiento del gránulo de PHB (21, 28). Enseguida se lleva a cabo el enlace de proteínas de unión a gránulo (GAP's por sus siglas en inglés), teniendo como estructura final el gránulo de PHB, denominado carbonosomas (figura 5)(19, 27). El diámetro de los carbonosomas va de 0.2 – 0.5 μm y se conforman por un 98% (p/p) de PHB, un 2% de GAP's y un 0.5 % de fosfolípidos, aproximadamente (19, 29).

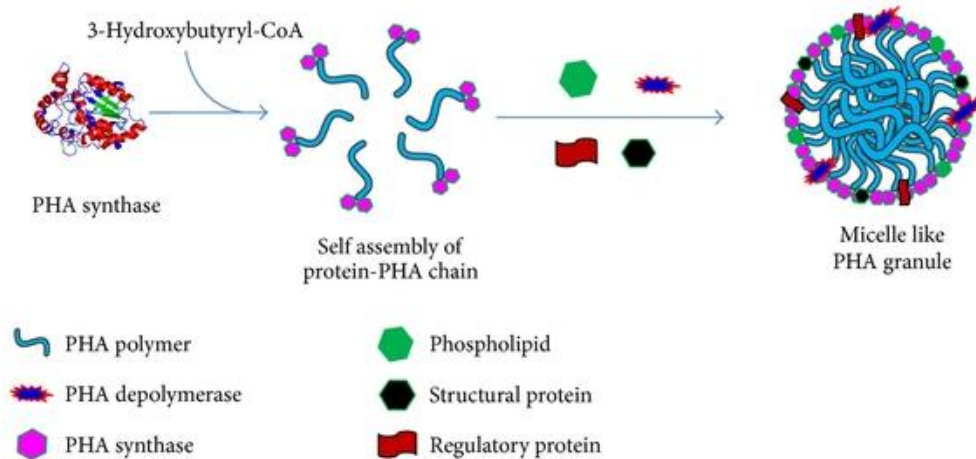


Figura 5. Biogénesis del granulo de PHA en estructura de tipo micela. Tomado de Shrivastav, *et al.* 2013 (21).

Proteínas asociadas al granulo de PHB

Los carbonosomas son una mezcla de poliéster amorfo que se va acumulando en inclusiones intracelulares en el citoplasma, los cuales se encuentran rodeados por una monocapa que contiene Proteínas Asociadas al Granulo [GAP's] (figura 6) (19, 20). Actualmente se han descrito cuatro tipos de GAP's, entre estas proteínas encontramos a la PHA sintasas (PhaC), PHA depolimerasas (PhaZ), reguladores (PhaR o PhaM) y fasinis (PhaP) (3, 19, 27, 28, 30, 31).

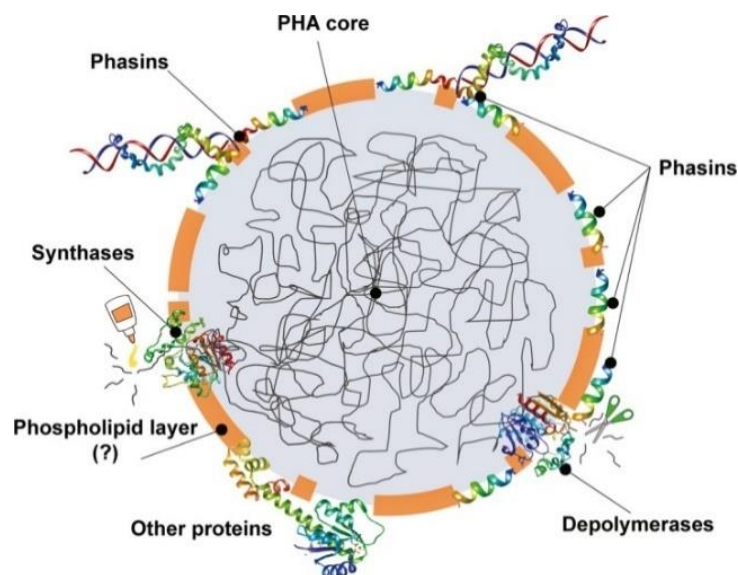


Figura 6. Esquema de la estructura de los gránulos de PHA. Tomado de Maestro y Sanz, 2017 (19).

PhaC sintasas (PhaC)

Las sintasas llevan a cabo la polimerización de los monómeros de 3-HB-CoA durante la síntesis de PHB. Su actividad se basa en la triada catalítica C-H-D (Cisteína, Histidina, Aspartato), y ésta a su vez también participa en la catálisis de las lipasas (32). Se ha sugerido que el aspartato de la triada actúa en el proceso de deprotonación del grupo 3-Hidroxil del HB como un catalizador básico, lo que conlleva a la elongación de los productos de PHA (33). Hay 4 clases de las PHA sintasas según sea su cinética y mecanismo de reacción (Tabla 2). La clase I, III y IV sintetizan polímeros SCL_{PHA}, mientras que la clase II sintetizan polímeros MCL_{PHA} (33).

Clase	Subunidades	Cepa
Clase I	PhaC (~60 kDa)	<i>Cupriavidus necator</i>
Clase II	PhaC (60 – 65 kDa)	<i>Pseudomonas spp</i>
Clase III	PhaC (40-53 kDa) PhaE (20-40 kDa)	<i>Chromatium vinosum</i>
Clase IV	PhaC (~41 kDa) PhaR (~22 kDa)	<i>Bacillus spp</i>

Tabla 2. Clases de PHA sintasas. Tomado de Mezzolla, *et al.* 2018 (33)

PHA depolimerasas (PhaZ)

Las PHA depolimerasas son las responsables de llevar a cabo la hidrólisis y la tiólisis de PHB en ausencia de carbono, en este caso es necesario la movilización del polímero cuando las condiciones ambientales no son las adecuadas y entra en un periodo de inanición (Figura 7) (34). La PHA depolimerasa se une a los poliésteres alifáticos por medio de interacciones específicas entre los enlaces de los poliésteres y el dominio, además de las interacciones hidrófobas. PhaZ tienen un dominio de unión a sustrato C-terminal y un dominio catalítico N-terminal, para comenzar la

degradación primero la PhaZ se une mediante su dominio de unión para posteriormente comenzar a romper la cadena del polímero mediante el dominio catalítico (35).

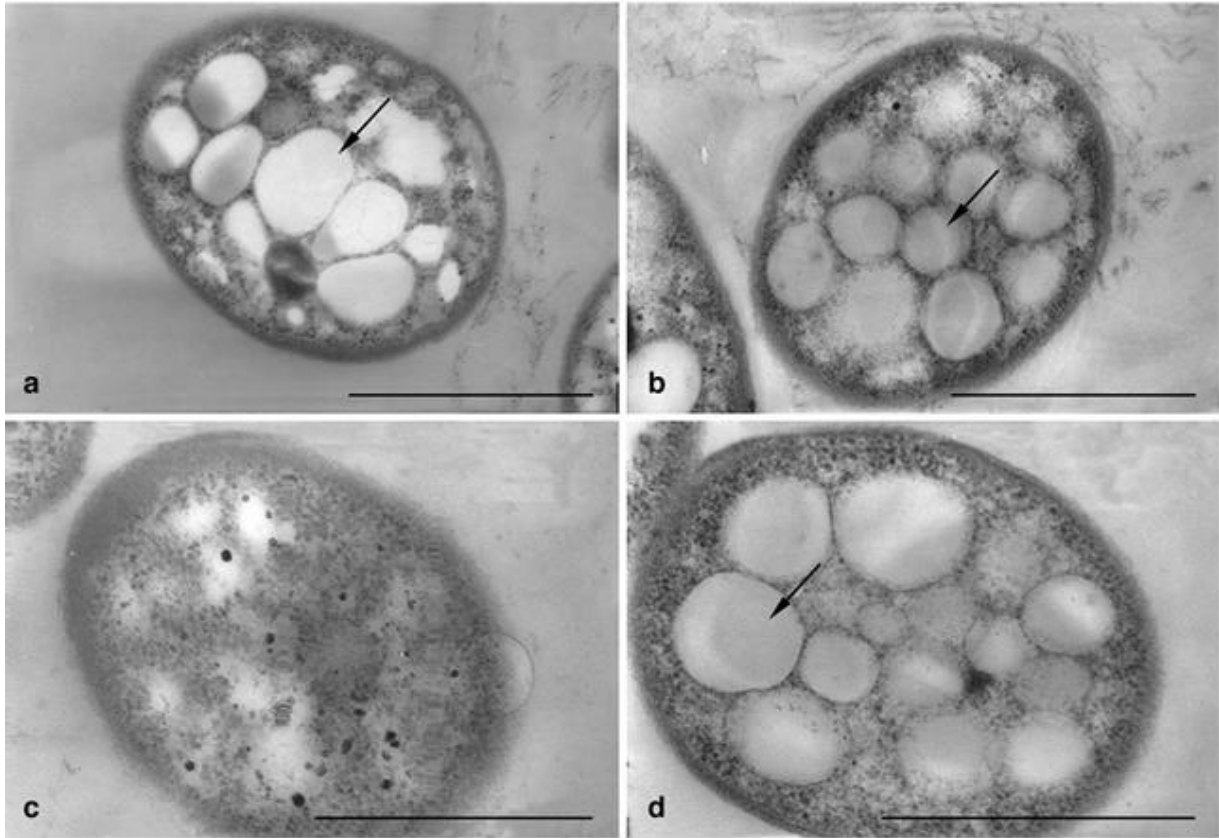


Figura 7. Micrografías electrónicas de *A. brasilense* 7030 (a) y la mutante *phaZ* (b), cultivados durante 48 h en medio alto C: N, y de *A. brasilense* (c) y la mutante *phaZ* (d) después de un período de inanición de 72 h en tampón de fosfato. La flecha indica gránulos de PHB. Tomado de Kadouri, *et al.* 2003 (34).

Fasinas (PhaP)

Las fasinas son los polipéptidos más abundantes en el carbonosoma (19), su nombre se debe al tener analogía con las oleosinas (proteínas presentes en las plantas oleaginosas recubriendo la superficie de los glóbulos de aceite) (19). Son proteínas de bajo peso molecular, contiene un dominio hidrofóbico asociado con el PHA y otro dominio anfifílico expuesto al citoplasma (28). De acuerdo a la base de datos PFAM las fasinas se clasifican en cuatro familias según la secuencia (19).

- ❖ **PF09361 (Phasin_2 domain):** constituido por 3192 secuencias de fasinas de α , β y γ proteobacterias asociadas a la producción de SCL_{PHA} (PHB). En esta familia se encuentra *Azospirillum brasilense*.
- ❖ **PF09602 (PhaP_Bmeg domain):** constituido por 64 fasinas relacionadas a especies del género *Bacillus*.
- ❖ **PF09650 (PHA_gran_rgn domain):** constituido por 775 secuencias de fasinas no caracterizadas, implicadas en la síntesis, estabilización y degradación de SCL_{PHA}, de proteobacterias.
- ❖ **PF05597 (Phasin domain):** constituido por 871 secuencias de fasinas implicadas en la producción de MCL_{PHA}.

En *A. brasilense* Sp7 no hay mucha información respecto a las fasinas, sin embargo por medio de análisis *in silico* Martínez y colaboradores (2019) reportaron seis fasinas denominadas PhaP1_{Abs7} – PhaP6_{Abs7} (figura 8), donde la síntesis temprana de PHB se ve influida por la fasina PhaP1_{Abs7} (3). Las estructuras secundarias predichas poseen un alto porcentaje de aminoácidos en conformación α -hélice, regiones desordenadas y que le proveen flexibilidad a la proteína (3, 36), además se ha demostrado que se encuentran involucradas en la formación de oligómeros al poseer un motivo de cremallera de leucina.

En *R. eutropha* se ha sugerido que PhaP1_{Reu} tiene acciones moduladoras en la síntesis de PHB de manera dependiente de PhaC (8), en el caso de *P. putida* la fasina PhaF tiene la capacidad de unión a DNA por medio de su dominio C-terminal, acción similar a la de una histona por su carga altamente positiva (19). El dominio C-terminal de PhaF tiene la capacidad de unirse al surco mayor del ADN mediante la formación de una superhélice (figura 9), además se sugiere un desordenamiento estructural de la fasina a menos de encontrarse formando un complejo con el ADN, esto se podría deber a las repulsiones electrostáticas generadas por la naturaleza altamente cargada de este dominio (19, 37). Estudios biofísicos realizados en relación a la fasina PhaF sugieren un dominio N-terminal de unión a PHA, el cual adquiere una conformación de hélice anfipática con la capacidad de reconocer la

superficie del carbonosoma (19, 37). Además, las fasinas tienen función en cuanto a la regulación de la síntesis de PHB, influyendo directamente en el tamaño y número de los carbonosomas (3, 16, 38).

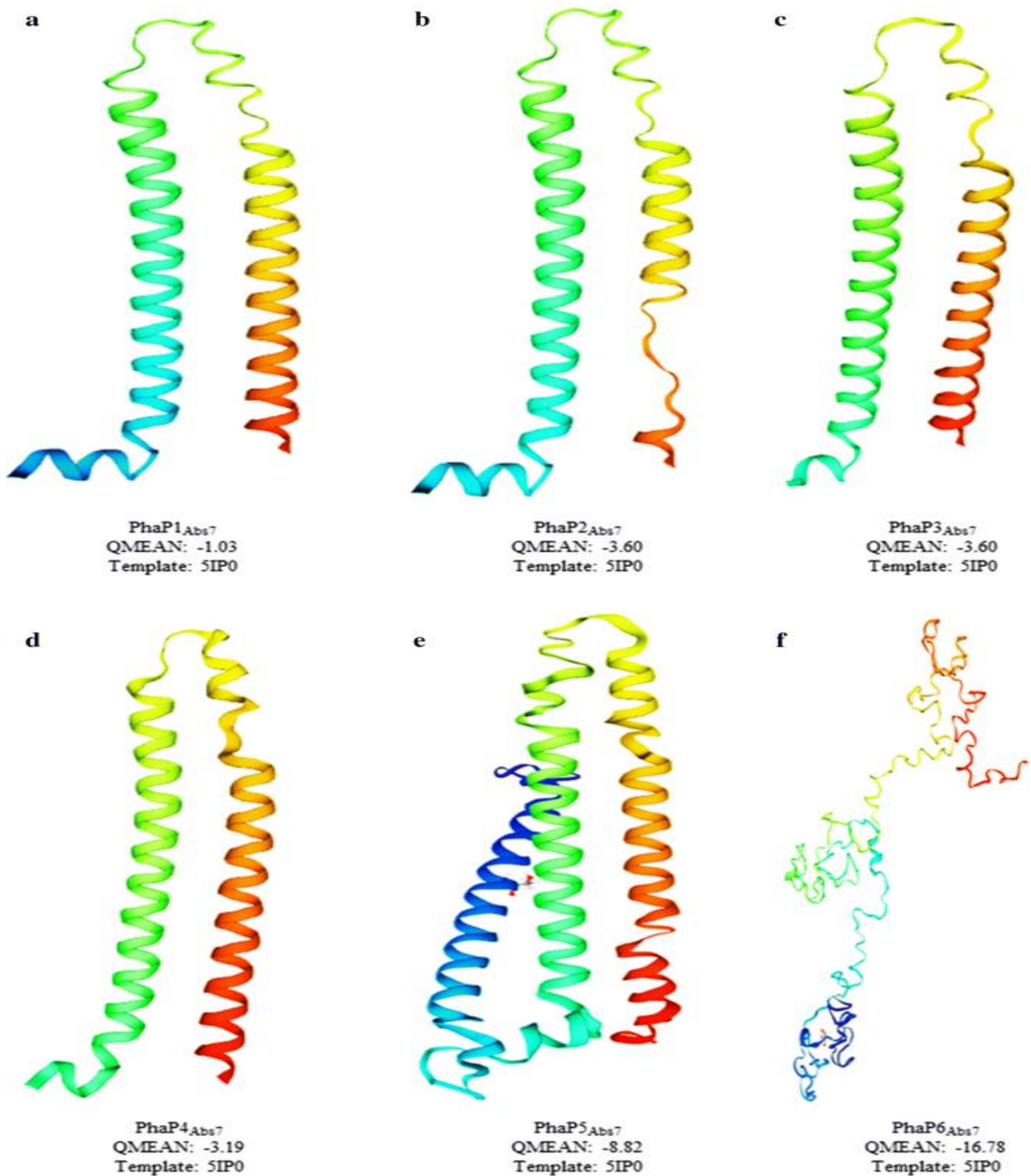


Figura 8. Estructuras tridimensionales predichas de fasinas de *A. brasilense* Sp7. a) PhaP1_{Abs7}, b) PhaP2_{Abs7}, c) PhaP3_{Abs7}, d) PhaP4_{Abs7}, e) PhaP5_{Abs7} y f) PhaP6_{Abs7}. Tomado de Martínez, *et al.* 2019 (3).

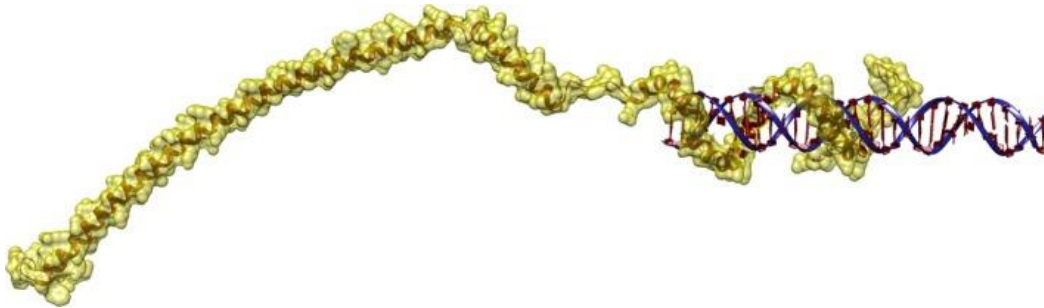


Figura 9. Estructura predicha de un monómero de la fasina PhaF de *P. putida* KT2440 en complejo con ADN. Tomado de Maestro, *et al.* 2017 (19).

Reguladores (PhaR y PhaM)

PhaR es un represor transcripcional autorregulado que tiene su acción sobre la síntesis de las fasinas regulándolas negativamente. Tiene un dominio N-terminal de unión a ADN y otro dominio de regulación para la acumulación de PHB. En *R. eutropha*, en condiciones de no acumulación de PHB el represor PhaR se une a la región promotora del gen *phaP1* reprimiendo así la expresión del gen. Asimismo, tiene la capacidad de unirse a la región intergénica de *phaP3* reprimiendo su transcripción (39). Al final del proceso de síntesis de PHB, los carbonosomas llegan a un volumen crítico ocasionando que el área superficial se vuelva limitada (40). La concentración citosólica de PhaR libre aumenta cuando hay una expresión de los genes *phaP1* y *phaP3* y estos PhaR libres asimismo pueden actuar para reprimir su transcripción. Igualmente, PhaR actúa como un auto regulador, dado que también tiene la capacidad de unirse a la región promotora de su gen y con ello reprimir su expresión. Por lo cual PhaR participa en la biosíntesis de PHB en *R. eutropha* (39). En *R. eutropha*, el represor PhaM tiene la capacidad de llevar a cabo la segregación de los gránulos de PHB con la región del nucleoide. Se ha reportado que PhaP5 interactúa con PhaM formando un complejo PhaP5-PhaM, el cual se une a la región nucleoide (41). Además, se plantea la posibilidad de que la sobreexpresión de PhaP5 genere un bloqueo en la unión de PhaM al DNA y/o la unión de PhaC1, ocasionando que haya un desprendimiento de los gránulos de PHB de la región nucleoide. Asimismo, PhaP5 podría desplazar a PhaM de la superficie de los

gránulos de PHB, ocasionando que la localización subcelular de los gránulos se vea afectada (39).

Producción de PHB por *A. brasilense*

A. brasilense cuando se encuentra bajo condiciones estresantes tiene la capacidad de producir uno de los PHA principales estudiados en las últimas décadas, el poli-3-hydroxibutirato (PHB) (8, 42). En determinadas condiciones se da la producción de PHB, donde el principal factor que controla la síntesis es la relación de carbono/nitrógeno en el medio (42). La síntesis es favorecida cuando hay una deficiencia en la fuente de nitrógeno en el medio con respecto a la fuente de carbono (42, 43).

El PHB es un metabolito secundario que lo usa la bacteria como reserva de carbono y energía en condiciones ambientales de limitación de nutrientes (16). La biosíntesis de PHB en *A. brasilense* tiene la participación de tres enzimas: acetil-CoA acetiltransferasa (PhaA), acetoacetil-CoA reductasa (PhaB) y la PHA sintasa (PhaC), codificadas por los genes *phaA*, *phaB* y *phaC*, respectivamente (44). Kadouri y colaboradores en 2002 reportaron el mapa físico del operón que contiene los genes involucrados en la ruta metabólica del PHB, el operón *phaBAC* (Figura 10) (45). Asimismo, identificaron y caracterizaron los genes que participan en la ruta de despolimerización del PHB en *A. brasilense* Sp7 (34).

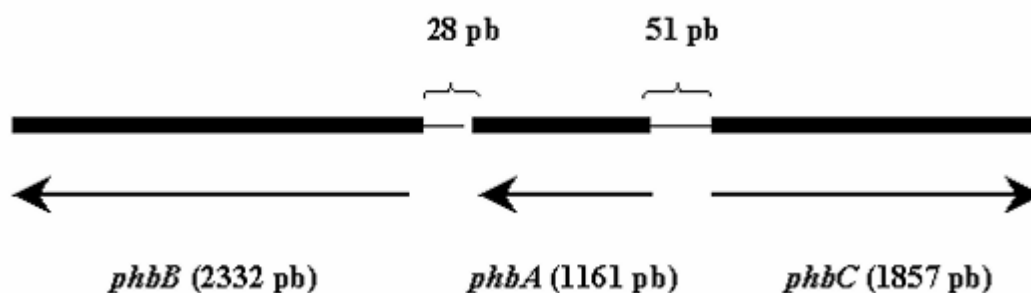


Figura 10. Mapa físico de los genes *phaBAC* de *A. brasilense* Sp7. Las flechas indican la localización y el inicio de la transcripción. Tomado de Kadouri *et al.*, 2002 (45).

Para tener como producto final el PHB es necesario dos moléculas de acetil-CoA provenientes del metabolismo central, y mediante tres reacciones enzimáticas se obtiene el PHB (figura 11) (16, 19).

1. Condensación reversible de dos acetil-CoA a acetoacetil-CoA, catalizada mediante la enzima β -cetotilasa (PhaA).
2. Reducción de acetoacetil-CoA a [R]-3-hidroxiacetil-CoA, catalizada mediante la enzima acetoacetil-CoA reductasa (PhaB).
3. Polimerización de [R]-3-hidroxiacetil-CoA para obtener PHB, catalizada mediante la enzima PHB sintasa (PhaC)

Si *A. brasilense* se encuentra en condición de exceso en la fuente de carbono la síntesis del polímero será continua, sin embargo, cuando se encuentre en condiciones de inanición el proceso de síntesis se suspende y el proceso de degradación comenzará. La degradación consta de la participación de tres enzimas: PHB depolimerasa (PhaZ), 3-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa y la acetoacetil-CoA sintetasa, codificadas por los genes *phaZ*, *bdhA* y *acsA2*, respectivamente (figura 11) (8, 34, 46), a través de los siguientes pasos:

1. Depolimerización del PHB a [R]-3-hidroxiacetil-CoA, catalizada por la enzima PHB depolimerasa (PhaZ).
2. Oxidación de [R]-3-hidroxiacetil-CoA a acetoacetato, catalizada por la enzima 3-hidroxiacetil-CoA deshidrogenasa.
3. Transferencia de un grupo CoA al acetoacetato para producir acetoacetil-CoA, catalizada por la enzima acetoacetil-CoA sintetasa.
4. Hidrolisis del acetoacetil-CoA para obtener dos moléculas de acetil-CoA, catalizada por la cetotilasa.

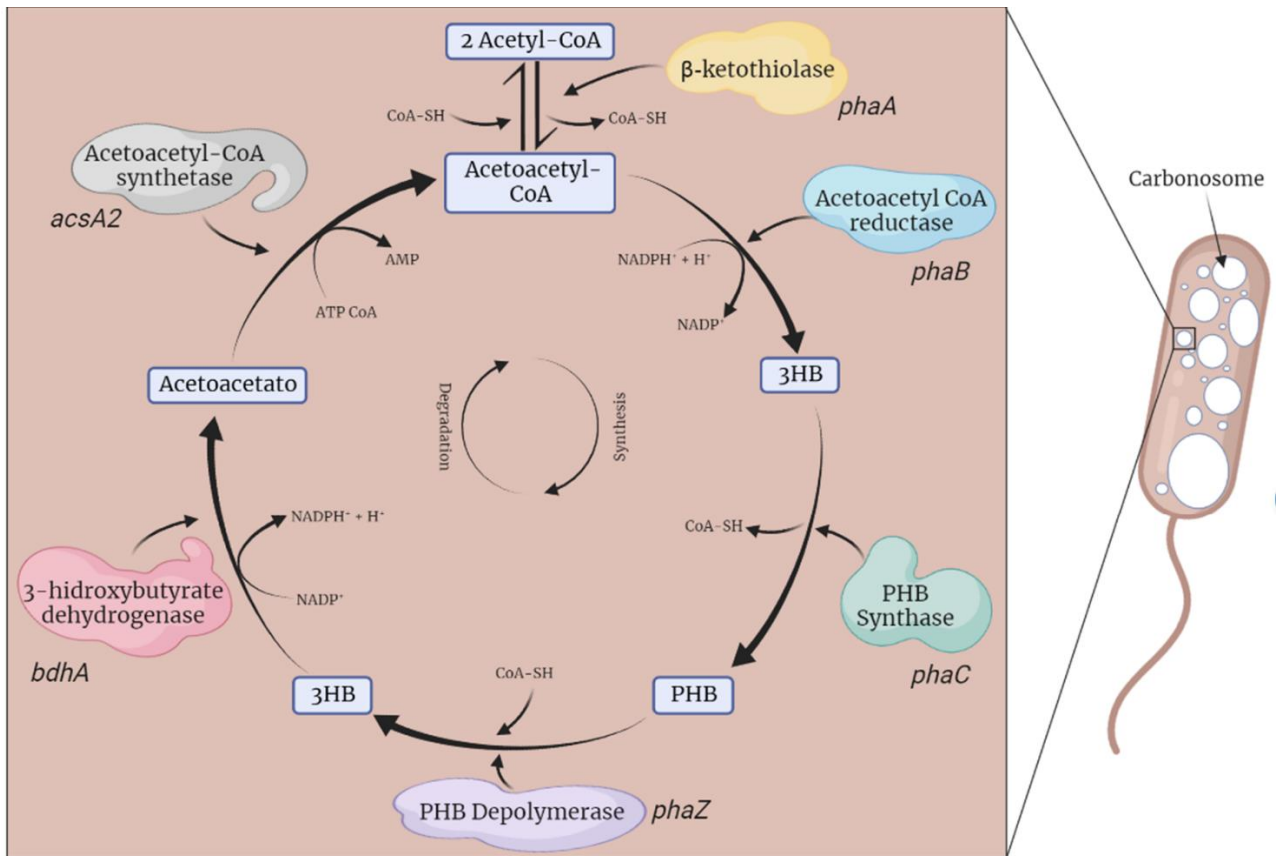


Figura 11. Biosíntesis y degradación de PHB en *Azospirillum brasilense* (Creada con Biorender.com).

Factores sigma

A. brasilense Sp7 habita en suelos y en la rizosfera de la planta, donde el ambiente que se encuentran en constantes fluctuaciones en cuanto a osmolaridad, temperatura, pH, nutrientes, especies reactivas de oxígeno y otros diversos factores abióticos, generando una gran variedad de ambientes estresantes para la bacteria (47, 48). Las bacterias tienen la capacidad de desarrollar mecanismos que les permitan adaptarse y responder ante cambios radicales en su ambiente. *A. brasilense* responde ante estas condiciones estresantes cambiando su patrón en la expresión de genes (48), por tal razón la presencia de factores sigma (factores σ) que permitan la supervivencia de la bacteria es primordial. La asociación reversible de factores sigma con la RNA polimerasa puede alterar la expresión de determinados genes causando un cambio en términos de afinidad y especificidad de la RNA polimerasa para unirse a estos genes.

En la mayoría de las bacterias hay presencia de una multiplicidad de factores sigma que se expresan para poder transcribir genes en determinadas condiciones. Los factores sigma pueden ser agrupados en dos principales familias: factores σ^{70} y σ^{54} . Esta clasificación se basa en cuanto a las similitudes en su secuencia, estructura y mecanismo de acción (49). El factor σ^{70} es conocido generalmente como factor sigma mayor o primario, mientras que el σ^{54} dirige la transcripción de una gran amplitud de genes.

La familia σ^{70} se divide en cuatro grupos filogenéticos. El grupo 1 está constituido por factores σ primarios esenciales, también considerados como “housekeeping”, los cuales son relacionados principalmente con σ^{70} de *E. coli*. El grupo 2 son factores σ primarios; sin embargo, estos son prescindibles para el crecimiento bacteriano. El grupo 3 puede subdividirse en varios grupos de acuerdo con la funcionalidad como en la esporulación, la biosíntesis de flagelo o respuesta al choque térmico. El grupo 4 es el más grande numéricamente y se encuentra constituido por factores σ de función extra citoplasmática (ECF) (47, 49, 50). Los miembros de la familia σ^{70} tienen la función de dirigir a la ARN polimerasa a elementos promotores específicos, los cuales están constituidos regularmente entre 5 y 6 pares de bases (pb) de longitud y se encuentran centrados a 10 y 35 pb río arriba (en las posiciones -10 y -35) del sitio de inicio de la transcripción (50).

Los miembros de la familia σ^{70} contienen cuatro regiones conservadas que se dividen en subregiones. Solo las regiones 2 y 4 están bien conservadas en todos los miembros de la familia σ^{70} , el reconocimiento a la región promotora -10 y -35 es otorgado por las regiones 2.4 y 4.2, respectivamente y la fusión del promotor es generada por la región 2.3 (figura 12) (50).

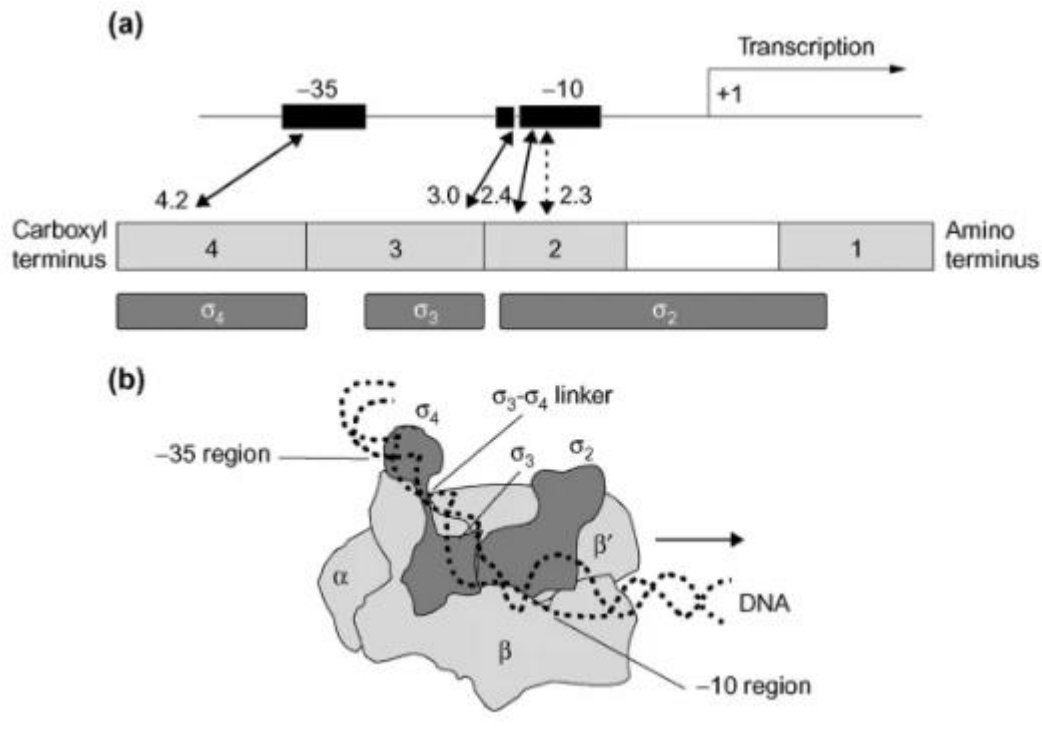


Figura 12. Características estructurales de σ^{70} de *E. coli*. a) la secuencia proteica se divide en cuatro regiones, b) un modelo de interacción de la holoenzima RNA polimerasa (consta de las subunidades β , β' , dos α), tomado de Paget y Helmann, 2003 (50).

La familia de σ^{54} , se ha separado evolutivamente de la familia σ^{70} y está distribuida ampliamente en las bacterias, sin embargo, hay filios los cuales carecen de este factor. El factor σ^{54} ha sido descrito ampliamente en la regulación del metabolismo del nitrógeno, sin embargo también participa en otros papeles de regulación como; la biosíntesis flagelar en *E. coli*, absorción de carboxilatos y metabolismo central en *Geobacter sulfurreducens*, osmotolerancia en *Listeria*, utilización de compuestos como gamma-amino butirato en *Bacillus* y bifenilo en *Ralstonia metallidurans*, adaptación al choque por frio en *Bacillus subtilis*, motilidad, formación de biopelículas, luminiscencia y colonización en *Vibrio fischeri*, entre otras. El factor σ^{54} se une a un promotor río arriba posiciones -12 y -24 del sitio de inicio de la transcripción, además de requerir la entrada de ATP de un activador asociado para iniciar la transcripción (51).

Se ha reportado que en la secuencia del genoma de *A. brasilense* Sp7 contiene genes que codifican para los factores sigma: σ^{70} (*rpoE*) σ^{54} (*rpoN*), σ^{32} (*rpoH*), σ^{24} (*rpoE*) y el factor sigma FeCl (48). El factor σ^{32} (RpoH) se ha reportado tener acción cuando la bacteria se encuentra en estrés por calor (48), mientras el factor σ^{24} (RpoE) actúa en prevenir y reparar el daño celular causado por el estrés oxidativo y foto-oxidativo (47, 52). Estos factores sigma tienen actividad en funciones extra citoplasmáticas por tal motivo se les ha designado como factores ECF sigma, tales factores pertenecen a un grupo de la familia de factor σ^{70} (50).

Estas respuestas son rápidas y transitorias, permitiendo que la bacteria logre mantener su crecimiento bajo las diversas condiciones de estrés a las que pueden causarle daño a la bacteria, de igual forma estos factores σ no se acumulan si no se encuentran en condiciones estresantes.

Planteamiento del problema

La contaminación ambiental por plásticos es una problemática que actualmente sigue sin atenderse como es debido, por este motivo la búsqueda de opciones que ayuden a reducir la utilización de plásticos de un solo uso permitirá comenzar a minimizar el empleo de estos. Una de estas opciones es el PHB, un metabolito secundario de *A. brasilense* que tienen características biodegradables y similares a los plásticos derivados de petróleo, los cuales son una de las principales fuentes de contaminación.

El PHB ha tomado gran relevancia en el área industrial y de la salud por sus aplicaciones. Por tal motivo se buscan alternativas que permitan aumentar la producción del PHB, además de estudiar cómo actúan todas las proteínas involucradas en la producción y almacenamiento de PHB.

El estudio de las fasinas de *Azospirillum brasilense* Sp7 es limitado, la importancia de comprender su funcionamiento es sustancial. Su principal función se ha visto es actuar como proteínas estructurales del carbonosoma para almacenar el PHB, no obstante, también están implicadas en la producción del PHB, por lo que es crucial su efecto que pueden tener sobre la producción.

Objetivos

General

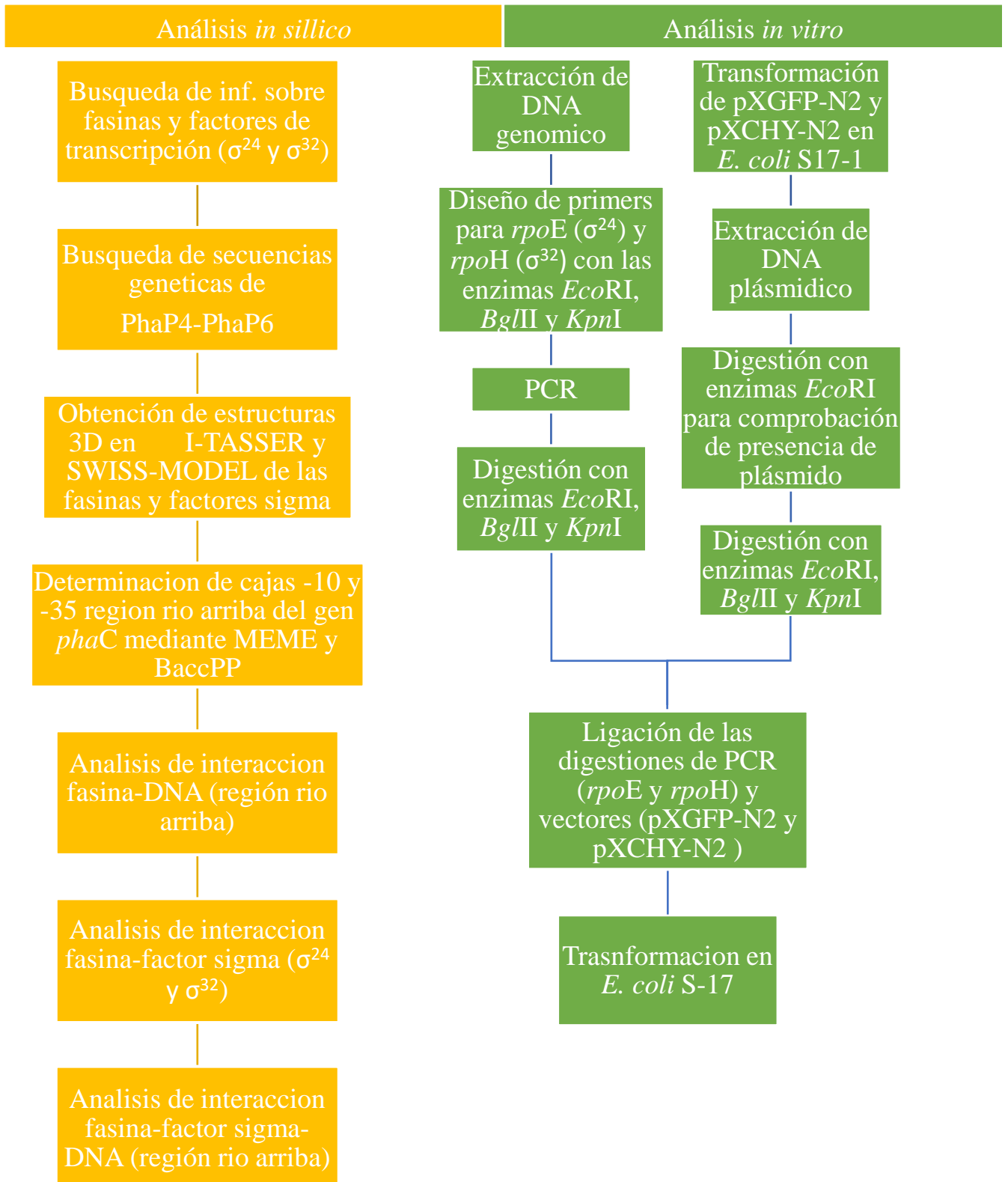
Analizar *In silico* las interacciones de las fasinas PhaP (4, 5 y 6) con DNA y factores sigma (σ^{24} y σ^{32}) y clonación de los factores sigma σ^{24} y σ^{32} de *Azospirillum brasilense* Sp7.

Específicos

- ❖ Obtener y analizar la estructura tridimensional de PhaP4, PhaP5 y PhaP6 de *Azospirillum brasilense* Sp7 utilizando los servidores I-TASSER y SWISS-MODEL.
- ❖ Analizar las interacciones fasina-factor de transcripción, fasina-DNA y fasina-factor sigma-DNA, de las fasinas PhaP4, PhaP5 y PhaP6 por medio de ClusPro 2.0 y HDOCK server.
- ❖ Analizar el acoplamiento molecular ligando-receptor entre las fasinas, factores de sigma (σ^{24} y σ^{32}) y DNA por medio de Discovery Studio Visualizer.
- ❖ Obtener las construcciones plasmídicas pGFPN2-RpoE y pECHYN2-RpoH

Material y métodos

Estrategia de trabajo



Análisis bioinformáticos

Obtención de modelos tridimensionales de PhaP4, PhaP5 y PhaP6 y los factores de σ^{24} (RpoE) y σ^{32} (RpoH)

La predicción de la estructura tridimensional de las proteínas fasinias de *A. brasilense* Sp7 se realizó mediante los servidores Iterative Threading ASSEmbly Refinement (I-TASSER) (53–57) y SWISS-MODEL (58), mientras que los factores sigma fueron obtenidos mediante SWISS-MODEL. Para PhaP4, PhaP5 y PhaP6 se utilizó como plantilla la estructura cristal de PhaP de *Aeromonas hydrophila* (number PDB-5IP0), mientras para RpoE se utilizó como plantilla la estructura cristal de SigE de *Rhodobacter sphaeroides* (number PDB- 2Q1Z) y para RpoH la estructura cristal de SigA de *Mycolicibacterium smegmatis* MC2 155 (number PDB-7P5X).

Determinación de probables cajas promotoras -10 y -35 del gen *phaC*

La búsqueda de regiones promotoras se llevó a cabo con el servidor MEME Suite (59). La región evaluada constó de 236 pb, incluyendo el codón de inicio (ATG) del gen *phaC* (old_locus_tag: AMK58_06740) como punto de referencia.

Docking molecular tripartita entre PhaP4, PhaP5 y PhaP6 con factores sigma (σ^{24} y σ^{32}) y región promotora del gen *phaC*

Mediante el servidor ClusPro 2.0 (60–63) se realizó el acoplamiento molecular entre cada una de las tres fasinias (PhaP4, PhaP5 y PhaP6) con los factores sigma σ^{24} y σ^{32} , considerando a las fasinias como ligando y los factores sigma como receptor. Posteriormente, con el servidor HDOCK (64–67) se llevó a cabo el Docking molecular entre los complejos proteicos formados (Fasina-Factor de transcripción) y la región de DNA (región río arriba del gen *phaC*). El DNA fue considerado como receptor y el complejo proteico como ligando. Además, se evaluó de forma individual la unión de cada fasina y los factores σ^{24} y σ^{32} , con la región de DNA mediante el servidor Discovery Studio Visualizer (68).

Análisis experimental

Bacterias y plásmidos utilizados

Las cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este estudio se encuentran listadas en la tabla 3. *A. brasilense* Sp7 fue recuperada a partir de cultivos conservados a -70° C en glicerol (50% v/v). Se recuperaron 50 µL del cultivo para inocular tubos que contienen 5 mL de medio de cultivo Medio Mínimo K-Malato (MMKM) suplementado con el (los) antibiótico (s) de selección. Los tubos se incubaron a 32 °C y 110 rpm durante 24 hr. Posterior a esto, se analizaron muestras de 10 µL de cultivo de *A. brasilense* Sp7 y se observaron bajo el microscopio óptico. Después se resembraron 10 µL de este cultivo de *A. brasilense* en placas Petri conteniendo MMKM suplementado con los antibióticos de selección.

Las cepas de *E. coli* S17-1 se recuperaron a partir de cultivos en glicerol (50% v/v) a -70 °C. Se recuperaron 50 µL del cultivo para inocular en tubos que contienen 5 mL de medio líquido Luria Bertani (LB) suplementado con los antibióticos de selección. Los tubos se incubaron a 24 hr a 37 °C y 150 rpm.

Cepas	Características	Referencia
<i>Azospirillum brasilense</i>	Cepa silvestre	Tarrand, <i>et al.</i> 1978
<i>Escherichia coli</i> S17-1	Sm ^r , <i>recA</i> , <i>thi</i> , <i>pro</i> , <i>hsdR</i> - M+RP4:2 TcMu: Km Tn7, <i>λpir</i>	Simon, <i>et al.</i> 1983
Plásmidos	Características	Referencia
pXGFPN-2	Km ^r	Thanbichler, <i>et al.</i>
pXCHYN-2	Km ^r	Thanbichler, <i>et al.</i>
pGFPN2-RpoE	Km ^r , <i>rpoE</i>	Este estudio
pECHYN2-RpoH	Km ^r , <i>rpoH</i>	Este estudio

Tabla 3. Cepas y plásmidos utilizados en este estudio

plásmidos de *A. brasilense*. También posee el gen *mCherry* codificante para la proteína mCherry fluorescente.

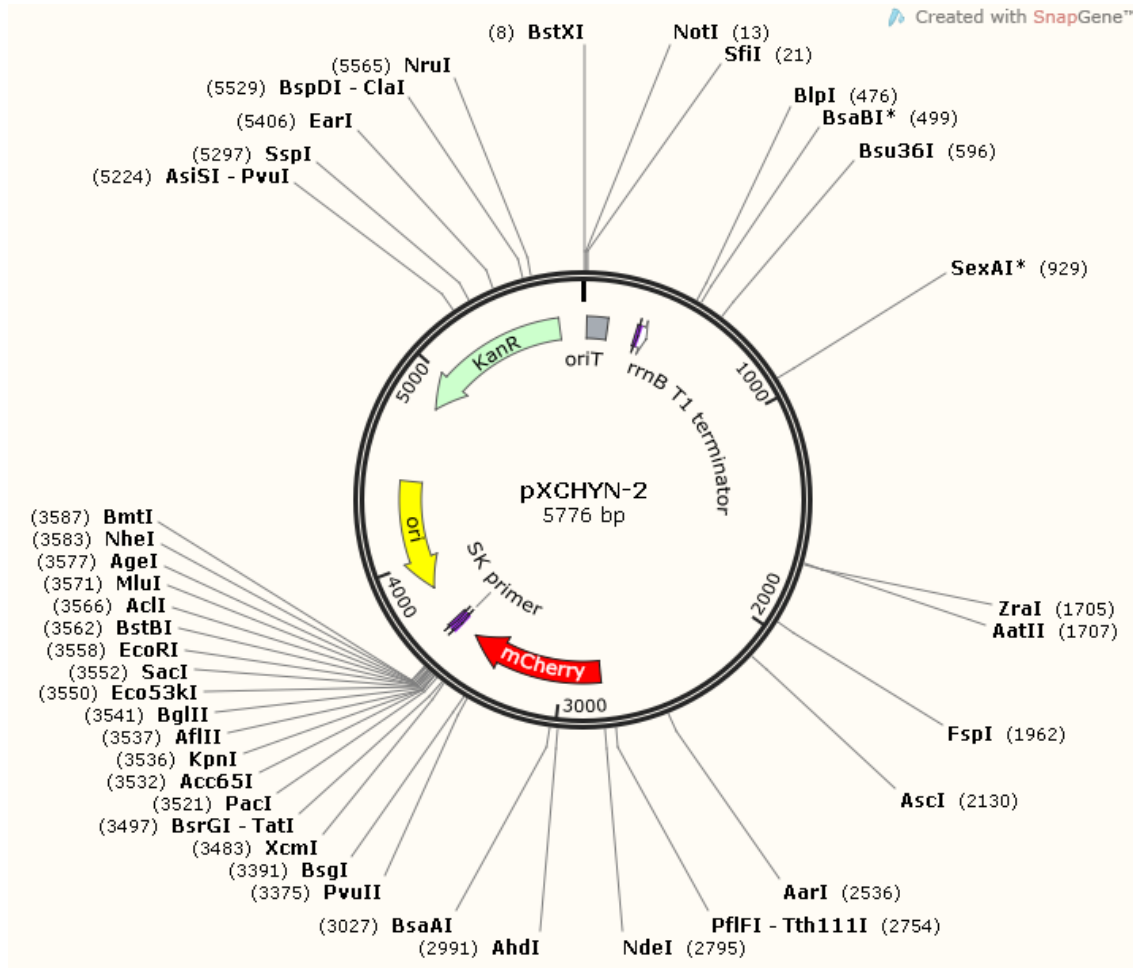


Figura 14. Estructura del vector pXCHYN-2. Tomado de SnapGene viewer

Obtención de las construcciones pGFPN2-RpoE y pCHYN2-RpoH

Los vectores resultantes de la clonación del gen *rpoH* y *rpoE* en los vectores pGFPN-2 y pCHYN-2, respectivamente. Se denominaron pGFPN2-RpoE y pCHYN2-RpoH las construcciones plasmídicas finales, las cuales se transformaron en *E. coli* S17-1.

Amplificación de los genes de *rpoH* y *rpoE*

Para la generación de la construcción plasmídica pCHYN2-RpoH, se amplificó el gen *rpoH* de *A. brasilense* Sp7 y se utilizó el par de primers S32-F-*BglII* / S32-R-*EcoRI*, mientras para la construcción plasmídica pGFPN2-RpoE se amplificó el gen

rpoE de *A. brasilense* Sp7 y se utilizó el par de primers S24-F-*KpnI* / S24-R-*EcoRI* (Tabla 4), los productos de PCR se corrieron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 %, para corroborar la amplificación de los fragmentos de interés.

Digestión de los productos de PCR y vectores

Los productos de PCR fueron doblemente digeridos con las endonucleasas de restricción *KpnI/EcoRI* para *RpoE* y *BglII/EcoRI* para *RpoH*. De igual forma, fueron digeridos los vectores con las endonucleasas correspondientes, pXGFPN-2 con *KpnI/EcoRI* y pXCHYN-2 con *BglII/EcoRI*.

Ligación y transformación en *E. coli* S17-1

Los productos de PCR y vectores digeridos con las endonucleasas anteriormente mencionadas fueron ligados utilizando la enzima T4 DNA ligasa (ThermoScientific). El producto de ligación fue utilizado para transformar células quimio competentes de *E. coli* S17-1. Las clonas transformantes obtenidas fueron analizadas, mediante extracción de DNA plasmídico y posterior digestión con las endonucleasas de restricción utilizadas anteriormente para la digestión de los productos de PCR. Con ello se corroboró la presencia de la construcción plasmídica.

Oligonucleótido	Secuencia (5' → 3')
S32-F-<i>BglII</i>	GCGGGGTA <u>AAGATCT</u> GCGACGATATCC
S32-R-<i>EcoRI</i>	GGTCGATGA <u>AATTC</u> ACCCAGCCAGCTTCTG
S24-F-<i>KpnI</i>	AGACGT <u>GGTACCC</u> AGGATCTT
S24-R-<i>EcoRI</i>	CCGTAGGA <u>AATTC</u> TTCATCGGGAG

Tabla 4. Primers utilizados para amplificar los genes de los factores σ^{24} y σ^{32} .

Resultados

Obtención de modelos tridimensionales de PhaP4, PhaP5 y PhaP6 y factores sigma σ^{24} y σ^{32}

Se realizó la obtención de modelos tridimensionales de las tres fasinas (PhaP4, PhaP5 y PhaP6) y los dos factores sigma (σ^{24} y σ^{32}) de *A. brasilense* Sp7, tomando en cuenta la metodología reportada por Martínez, *et al.* 2019.

Las estructuras tridimensionales de PhaP4, PhaP5 y PhaP6 se obtuvieron mediante el servidor I-TASSER, en las cuales se utilizó como plantilla la estructura cristalizada de la faina PhaP_{Ahy} de *Aeromonas hydrophila* (PDB 5IP0). En tanto que los factores sigma, estos se obtuvieron mediante el servidor SWISS-MODEL, en el caso del factor σ^{24} se utilizó como plantilla la estructura cristalizada de SigE de *Rhodobacter sphaeroides* (number PDB 2Q1Z) y para σ^{32} la estructura cristalizada de SigA de *Mycobacterium smegmatis* MC2 155 (number PDB 7P5X) (figura 15).

Los resultados de QMEAN se muestran favorables para PhaP5, σ^{24} y σ^{32} con un valor de -2.25, -1.84 y -1.39, respectivamente. No obstante, los valores QMEAN para PhaP4 y PhaP6 muestran una baja calidad, con valores de -7.42 y -15.25, respectivamente. Asimismo, los porcentajes de favorecimiento en los mapas de Ramachandran fueron buenos para PhaP5 con 98.82%, σ^{24} con 93.14%, σ^{32} con 93.14% y no tan favorables para PhaP4 con 78.41% y PhaP6 con 48.15% (figura 15).

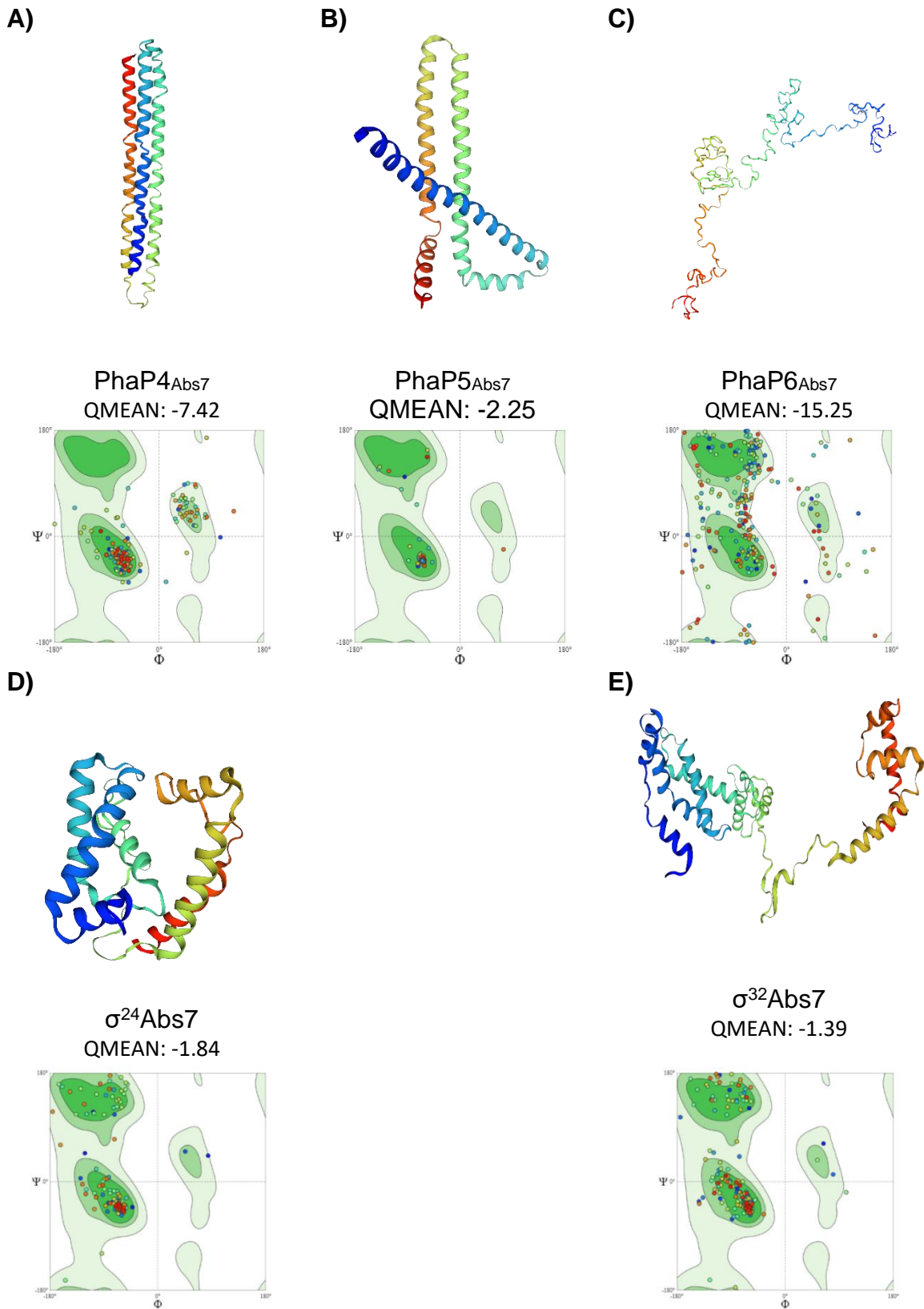


Figura 15. Modelos tridimensionales de fasinas y factores sigma de *A. brasilense* Sp7.

A) PhaP4_{Abs7}, B) PhaP5_{Abs7}, C) PhaP6_{Abs7}, D) σ^{24} _{Abs7}, E) σ^{32} _{Abs7}.

Determinación de probables cajas promotoras -10 y -35 del gen *phaC*

El servidor MEME suite fue utilizado para determinar las probables cajas promotoras del gen *phaC*. Se tomó la región río arriba del gen *phaC* correspondiente a 233 pb, el número de pb elegidos corresponde a una región intergénica de genes divergentes, el gen *phaC* y el gen AMK58_RS06755. Sin embargo, se aumentó el codón de inicio del gen *phaC* como punto de referencia para localizar visualmente con mayor facilidad las probables cajas -10 y -35. El servidor realizó una lectura de 5' → 3', por tal motivo, la selección de las cajas probables fue en base a aquellos que se encontraran cerca de las posiciones canónicas -10 y -35. Los motivos cercanos a estas posiciones fueron, para la caja -10 con la secuencia ACCGCAC ubicándose en la posición 225 a 231, mientras que, la caja -35 tiene la secuencia CCTAAA ubicándose en la posición 200 a 205 (Figura 16). Además, se usó el servidor BacPP para ver la probabilidad de unión de los factores σ^{24} y σ^{32} a la región río arriba del gen *phaC*, teniendo como porcentaje máximo encontrado para σ^{24} del 20% y para σ^{32} del 71% (Anexo III).

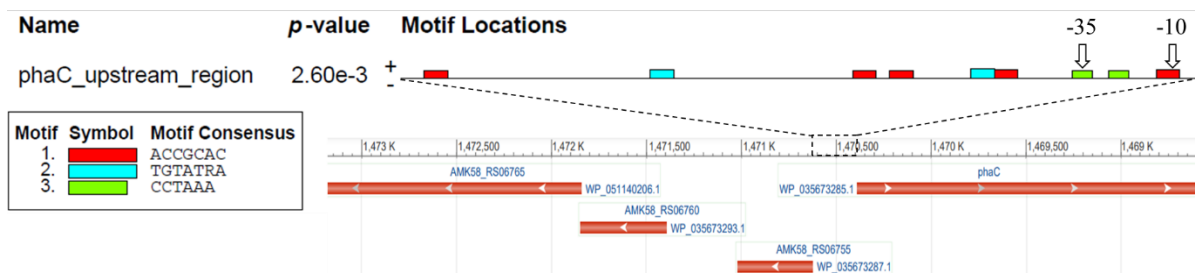


Figura 16. Cajas probables -10 y -35 del gen *phaC*, determinadas mediante MEME Suite y contexto genético del gen *phaC* (Consultado de NCBI el día 1 de mayo del 2021).

Docking molecular tripartita entre PhaP4, PhaP5 y PhaP6 con factores sigma y región promotora del gen *phaC*

El docking molecular se hizo con el servidor ClusPro 2.0 para interacciones proteína- proteína, entre cada una de las tres fasinias (PhaP4, PhaP5 y PhaP6) con los dos factores sigma (σ^{24} y σ^{32}). Mientras, el servidor HDock fue utilizado para

interacciones proteína-DNA, esto llevándolo a cabo entre el complejo proteico formado entre la fasina y el factor sigma con DNA (región río arriba del gen *phaC*). Además, se analizó su interacción de forma individual (sea fasina o factor sigma) con la región de DNA. El análisis de interacción entre el DNA con fasinas y factores sigma, se hizo con la finalidad de poder visualizar y comparar el cambio generado cuando interaccionan tanto de manera individual, así como en un complejo proteico fasina-factor sigma. El docking molecular se inició con el servidor ClusPro 2.0, se obtuvieron seis complejos proteicos conformados entre cada una de las tres fasinas y con cada uno de los dos factores sigma. Los complejos obtenidos se denominaron: PhaP4- σ^{24} , PhaP5- σ^{24} , PhaP6- σ^{24} , PhaP4- σ^{32} , PhaP5- σ^{32} y PhaP6- σ^{32} (Figura 17). En el docking molecular las fasinas fueron considerados como ligando, mientras los factores sigma como receptor.

Los resultados obtenidos muestran que las tres fasinas se unieron cerca de la región C-terminal de σ^{24} y de σ^{32} . PhaP4 se une tanto en la región N-terminal como en la C-terminal de σ^{24} , lográndose ver como una “tapa” por cubrir la cavidad que se observa en σ^{24} (Figura 17A), los principales tipos de enlaces son de cargas atractivas (Tabla 5). No obstante, PhaP5 y PhaP6 mostraron internalizarse en esta cavidad, atravesándolo por completo. PhaP5 ingreso por medio de su lado N-terminal, formando un tapón al unirse con σ^{24} (Figura 17C), los principales tipos de enlaces son enlaces alkyl, cargas atractivas y puentes de hidrogeno (Tabla 6). PhaP6 de la misma manera ingresa por medio de su lado N-terminal; sin embargo, esta interacción se observa similar a un hilo insertado en una el ovillo de una aguja (Figura 17E), los principales tipos de enlaces son enlaces alkyl, cargas atractivas y puentes de hidrogeno (Tabla 7). En el caso del factor σ^{32} , las tres fasinas interaccionan entre la región C-terminal y N-terminal del factor sigma (Figura 17B, 17D, 17F), en PhaP4 los principales tipos de interacción son puentes de hidrogeno, enlaces alkyl, Pi-alkyl y cargas atractivas (Tabla 5). Para PhaP5 las interacciones principales son de tipo enlace alkyl y Pi-Alkyl (Tabla 6), mientras que para PhaP6 los tipos de interacción son principalmente Pi-alkyl y puentes de hidrogeno (Tabla 7).

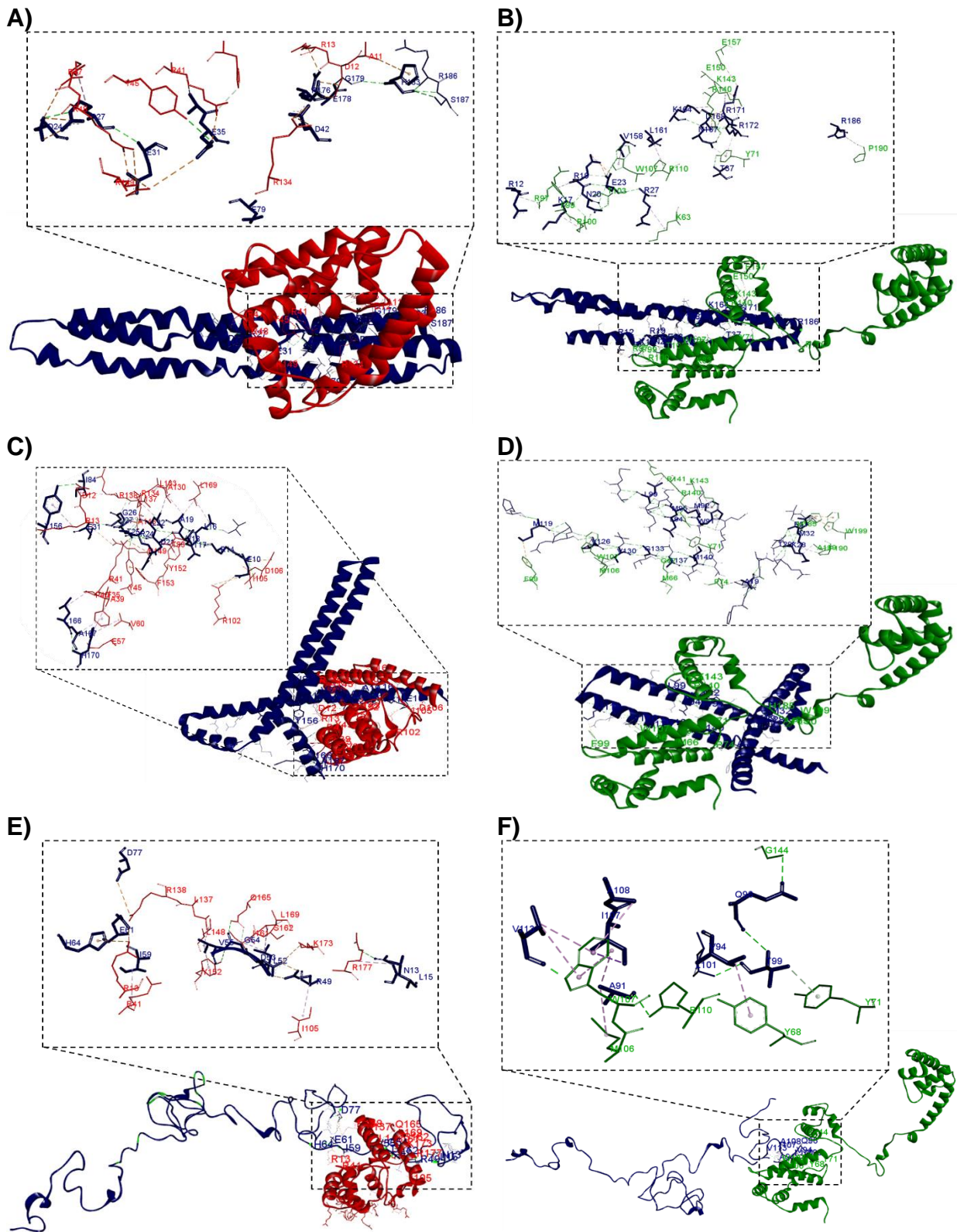


Figura 17. Complejos proteicos fasina-factor sigma. **A)** PhaP4- σ^{24} , **B)** PhaP4- σ^{32} , **C)** PhaP5- σ^{24} , **D)** PhaP5- σ^{32} , **E)** PhaP6- σ^{24} y **F)** PhaP6- σ^{32} , obtenidos por ClusPro 2.0 server y visualizados mediante Biovia Discovery Studio.

PhaP4- σ^{24}				PhaP4- σ^{32}			
De	a	Distancia (Å)	Tipo	De	a	Distancia (Å)	Tipo
RpoE: ARG48	PhaP4:GLU31	2.22553	PS	RpoH: ARG140	PhaP4: ASP168	2.87103	PS
RpoE: ARG149	PhaP4:GLU31	2.76729	PS	RpoH: LYS143	PhaP4: ASP168	5.36336	CA
RpoE: ARG13	PhaP4:GLU178	4.45228	CA	PhaP4:ARG171	RpoH: GLU150	4.4535	CA
RpoE: ARG41	PhaP4: GLU35	2.57586	CA	PhaP4:ARG171	RpoH: GLU157	4.77334	CA
RpoE: ARG41	PhaP4: GLU35	5.17537	CA	RpoH: TYR71	PhaP4: THR37	3.22951	PH
RpoE: ARG47	PhaP4: ASP24	4.82796	CA	RpoH: ARG100	PhaP4: LYS17	3.0752	PH
RpoE: ARG48	PhaP4: GLU31	4.53638	CA	RpoH: THR103	PhaP4: ASN20	3.24992	PH
RpoE: ARG134	PhaP4: ASP42	3.89326	CA	RpoH: TRP107	PhaP4: GLU23	3.1577	PH
RpoE: ARG134	PhaP4: ASP42	5.58141	CA	RpoH: ARG140	PhaP4:ASN167	2.61899	PH
RpoE: ARG138	PhaP4: GLU79	5.13469	CA	RpoH: ARG140	PhaP4:ASN167	2.62419	PH
RpoE: ARG149	PhaP4: GLU31	3.84794	CA	PhaP4: ARG12	RpoH: ARG97	3.60055	ECH
PhaP4:ARG176	RpoE: ASP12	3.0258	CA	PhaP4:ARG186	RpoH: PRO190	3.40181	ECH
PhaP4:ARG176	RpoE: ASP12	4.44732	CA	PhaP4:ASN167	RpoH: TYR71	2.91365	Pi-Do
RpoE: TYR45	PhaP4: GLU35	3.06594	PH	RpoH: ARG100	PhaP4: LYS17	3.90181	Ak
RpoE: HIS37	PhaP4: ALA34	3.30282	ECH	RpoH: ARG110	PhaP4: LEU161	5.20443	Ak
PhaP4: ARG27	RpoE: ALA44	3.45302	ECH	RpoH: ARG140	PhaP4: LYS164	5.42538	Ak
RpoE: ALA11	PhaP4: HIS183	4.9208	Pi-C	PhaP4: ARG27	RpoH: LYS63	5.41225	Ak
RpoE: ARG47	PhaP4: ARG27	4.79665	Ak	PhaP4:ARG171	RpoH: LYS143	4.15469	Ak
PhaP4: ALA34	RpoE: ARG41	3.64454	Ak	RpoH: TYR71	PhaP4:ARG172	4.76363	Pi-Al
				RpoH: PHE99	PhaP4: ARG19	4.95512	Pi-Al
				RpoH: TRP107	PhaP4:VAL158	5.294	Pi-Al

Tabla 5. Interacciones entre PhaP4 con σ^{24} y σ^{32} . Tipos de interacciones: Puente Salino (PS), Cargas Atractivas (CA), Puente de Hidrogeno (PH), Enlace Carbono-Hidrogeno (ECH), Alkyl (Ak), Pi-Donor (Pi-Do), Pi-Cation (Pi-C), Pi-Alkyl (Pi-Al).

PhaP5- σ^{24}				PhaP5- σ^{32}			
De	a	Distancia (Å)	Tipo	De	a	Distancia (Å)	Tipo
RpoE: ARG102	PhaP5: GLU10	3.01904	PS	RpoH: GLY67	PhaP5:GLY133	2.84557	ECH
RpoE: ARG41	PhaP5: ASP21	4.70744	CA	RpoH: LYS143	PhaP5: TRP91	3.59106	PH
RpoE: ARG102	PhaP5: GLU10	5.5723	CA	PhaP5: GLU31	RpoH: HIS185	3.55436	Pi-An
RpoE: ARG149	PhaP5: GLU31	5.13033	CA	PhaP5: GLU31	RpoH: TRP199	4.42901	Pi-An
PhaP5: ARG14	RpoE: ASP106	4.40469	CA	PhaP5: GLU31	RpoH: TRP199	4.53731	Pi-An
RpoE: TYR45	PhaP5: THR25	2.85913	PH	PhaP5:MET119	RpoH: PHE99	4.83679	Pi-S
RpoE: THR83	PhaP5: VAL18	3.23416	PH	RpoH: ARG140	PhaP5: MET95	4.31571	Ak
RpoE: TYR152	PhaP5: LEU16	2.63482	PH	RpoH: ARG141	PhaP5: LEU99	4.42883	Ak
PhaP5: ARG14	RpoE: ASP106	3.17386	PH	RpoH: LYS143	PhaP5: MET95	4.57513	Ak
PhaP5: THR17	RpoE: TYR152	2.71357	ECH	RpoH: ALA189	PhaP5: LYS28	3.50468	Ak
PhaP5: GLY26	RpoE: ARG134	3.71695	ECH	RpoH: PRO190	PhaP5: MET32	4.66816	Ak
PhaP5: HIS170	RpoE: GLU57	2.45977	ECH	PhaP5: ALA19	RpoH: PRO74	4.8393	Ak
PhaP5: ARG24	RpoE: TYR45	3.34693	PI-C	PhaP5:VAL130	RpoH: MET106	5.48977	Ak
PhaP5: ARG24	RpoE: PH53	4.17697	Pi-Do	PhaP5:ALA137	RpoH: MET66	4.70968	Ak
RpoE: PRO40	PhaP5: LEU166	4.42788	Ak	RpoH: TYR71	PhaP5: LEU94	5.3398	Pi-Ak
RpoE: ALA130	PhaP5: LEU22	5.28997	Ak	RpoH: TYR71	PhaP5:MET140	5.44561	Pi-Ak
RpoE: ARG134	PhaP5: LEU22	4.67323	Ak	RpoH: TRP107	PhaP5:VAL126	4.58625	Pi-Ak
RpoE: ARG138	PhaP5: ILE84	5.49199	Ak	RpoH: TRP107	PhaP5:VAL126	5.08185	Pi-Ak
RpoE: ALA145	PhaP5: VAL27	3.44362	Ak	PhaP5: TRP91	RpoH: LYS143	4.50994	Pi-Ak
RpoE: LEU169	PhaP5: LEU16	4.95426	Ak				
PhaP5: ALA19	RpoE: LEU133	4.23359	Ak				
PhaP5: ALA19	RpoE: LEU169	4.41576	Ak				
PhaP5: ARG24	RpoE: LEU137	5.27631	Ak				
PhaP5: VAL27	RpoE: LEU137	4.32894	Ak				
RpoE: PHE35	PhaP5:ALA167	4.07235	Pi-Al				
PhaP5:TYR156	RpoE: ARG13	5.03274	Pi-Al				
PhaP5: HIS170	RpoE: ALA39	5.05351	Pi-Al				
PhaP5: HIS170	RpoE: VAL60	5.33727	Pi-Al				

Tabla 6. Interacciones entre PhaP5 con σ^{24} y σ^{32} . Tipos de interacciones: Puente Salino (PS), Cargas Atractivas (CA), Puente de Hidrogeno (PH), Enlace Carbono-Hidrogeno (ECH), Alkyl (Ak), Pi-Donor (Pi-Do), Pi-Cation (Pi-C), Pi-Alkyl (Pi-Al), Pi-Anion (Pi-An), Pi-Sulfur (Pi-S).

PhaP6- σ^{24}				PhaP6- σ^{32}			
De	a	Distancia (Å)	Tipo	De	a	Distancia (Å)	Tipo
RpoE: ARG13	PhaP6: GLU61	4.31003	CA	RpoH: ARG110	PhaP6: ALA91	2.58396	PH
RpoE: ARG138	PhaP6: ASP77	5.36266	CA	RpoH: GLY144	PhaP6: GLN96	2.79393	PH
RpoE: LYS173	PhaP6: ASP53	5.25135	CA	PhaP6: THR99	RpoH: TYR71	3.61713	PH
RpoE: GLN165	PhaP6: GLY54	3.01973	PH	PhaP6: ILE107	RpoH: TRP107	3.57002	Pi-Si
RpoE: ARG177	PhaP6: ASN13	3.32678	PH	PhaP6: ALA91	RpoH: MET106	5.24561	Ak
PhaP6: VAL55	RpoE: TYR152	3.03279	PH	RpoH: TYR68	PhaP6: VAL94	4.93881	Pi-Al
PhaP6: GLY54	RpoE: GLN165	3.57994	ECH	RpoH: TRP107	PhaP6: ILE107	5.20417	Pi-Al
RpoE: ARG13	PhaP6: HIS64	4.27124	PI-C	RpoH: TRP107	PhaP6: VAL113	5.44281	Pi-Al
RpoE: ARG41	PhaP6: ILE59	4.25204	Ak	RpoH: TRP107	PhaP6: ALA108	5.0522	Pi-Al
RpoE: IL61	PhaP6: LEU52	5.07871	Ak	RpoH: TRP107	PhaP6: VAL113	4.7654	Pi-Al
RpoE: LEU169	PhaP6: LEU52	5.13144	Ak				
RpoE: ARG177	PhaP6: LEU15	5.44271	Ak				
PhaP6: ARG49	RpoE: IL105	5.43857	Ak				
PhaP6: VAL55	RpoE: LEU148	4.99614	Ak				
RpoE: TYR152	PhaP6: VAL55	5.00853	Pi-Al				

Tabla 7. Interacciones entre PhaP6 con σ^{24} y σ^{32} . Tipos de interacciones: Puente Salino (PS), Cargas Atractivas (CA), Puente de Hidrogeno (PH), Enlace Carbono-Hidrogeno (ECH), Alkyl (Ak), Pi-Cation (Pi-C), Pi-Alkyl (Pi-Al), Pi-Sigma (Pi-Si).

Posteriormente con cada uno de los complejos proteicos formados se realizó un docking molecular proteína-DNA con la región río arriba del gen *phaC*. Tras realizar el acoplamiento molecular entre el complejo proteico y la región de DNA, se observó que PhaP4- σ^{24} se une en la cadena directa con; A198, y en la cadena complementaria con; G272, G273, A281 y G282 (Figura 18A) (Tabla 8). PhaP5- σ^{24} se une en la cadena directa con; C201, A203, A204, A205, y en la cadena complementaria con; G262, C263, G264, G266, T267, G272 (Figura 18C) (Tabla 9). PhaP6- σ^{24} se une en la cadena directa con; A204 y A205, y en la cadena complementaria con; C263, G264, A265, G266, T267 y A271 (Figura 18E) (Tabla 10). Los tres complejos PhaP4- σ^{24} PhaP5- σ^{24} y PhaP6- σ^{24} mantuvieron su unión cerca de la caja -35, comportamiento visto también de forma individual para cada fasina con unión al DNA (Figura 18). En el caso de los complejos de las fasinas con σ^{32} , PhaP4- σ^{32} , se unió cerca de la caja -10, donde se une en la cadena directa con A216, C227, G228, C229, C231, mientras en la cadena complementaria con T239, T240, G242, A260, G261 (Figura 18B) (Tabla 8). Los complejos PhaP5- σ^{32} y PhaP6- σ^{32} se unieron cerca de la caja -35. PhaP5- σ^{32} se une a la cadena directa con C191, G199, C200, C211, C212, T213, A214, A215, mientras en la cadena complementaria se une con C256, A278, G279 (Figura 18D) (Tabla 9). En tanto A PhaP6- σ^{32} , ésta se une a la cadena directa con A204, A205, A206, C207, T208, G210, mientras en la cadena complementaria se une con T257, G261, C263, G264, A265 (Figura 18F) (Tabla 10).

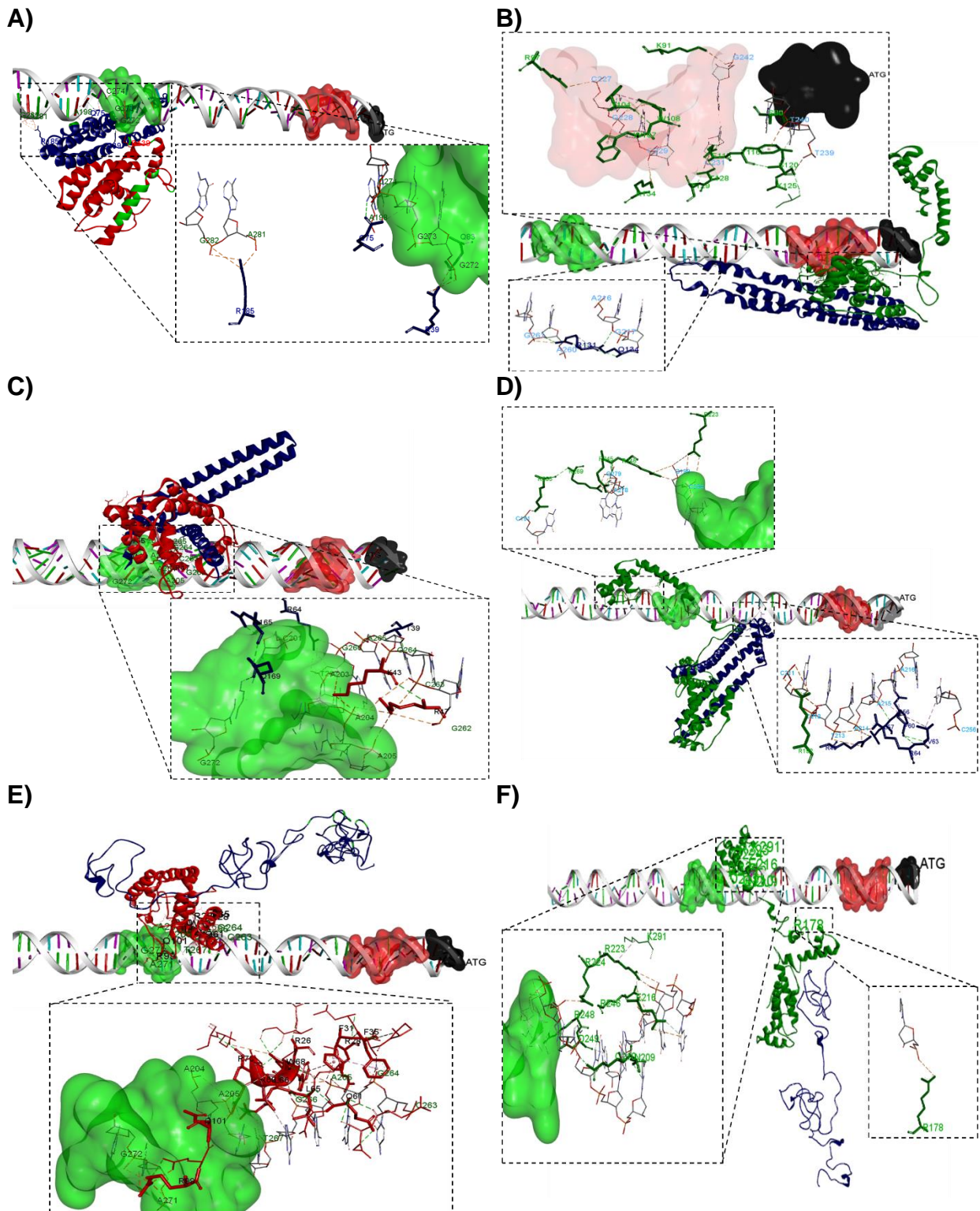


Figura 18. Interacciones entre los complejos proteicos fasina-factor sigma con DNA. **A)** PhaP4- σ^{24} -DNA, **B)** PhaP4- σ^{32} -DNA, **C)** PhaP5- σ^{24} -DNA, **D)** PhaP5- σ^{32} -DNA, **E)** PhaP6- σ^{24} -DNA y **F)** PhaP6- σ^{32} , modelos visualizados mediante Biovia Discovery Studio.

Finalmente, se llevó a cabo el acoplamiento individual entre cada una de las tres fasinas (PhaP4, PhaP5 y PhaP6) y los factores sigma con la región río arriba del gen *phaC*, este procedimiento se realizó con el servidor HDOCK. Dicho servidor permite el acoplamiento molecular entre regiones grandes de DNA y proteínas.

El DNA fue considerado como receptor, mientras las fasinas y los factores sigma como ligando. PhaP4 con el DNA se une cerca de la caja -10, teniendo interacciones con los nucleótidos de la cadena directa A219, G220, A222 y C231, mientras en la cadena complementaria se une con C246, T248, T257 (Figura 19A) (Tabla 8). PhaP5 y PhaP6 se unen a los nucleótidos cercanos a la caja -35. PhaP5 interacciona en la cadena directa con A199, A204, A205 y A206, mientras en la cadena complementaria se une a C263, G266, T267, T268, T276 y C277 (Figura 19C) (Tabla 9). PhaP6 interacciona en la cadena directa con G196, A197, A198, G199 y A206, mientras en la cadena complementaria con; G272, G273, C274, A281, G282 (Figura 19E) (Tabla 10).

En adición a la evaluación de interacciones individuales de los factores sigma, el factor σ^{24} se unió cerca de la caja -35, interaccionando en la cadena directa con G196, C200 y C207, mientras en la cadena complementaria con T269, T270, A271, G272 y G273 (Figura 19B) (Tabla 11) y el factor σ^{32} se unió cerca de las cajas -10 y -35, interaccionando en la cadena directa con A206, C207, A221, A222, G223, mientras en la cadena complementaria con G246, G247, G262, C263, G272, G273, C274 (Figura 19D) (Tabla 11).

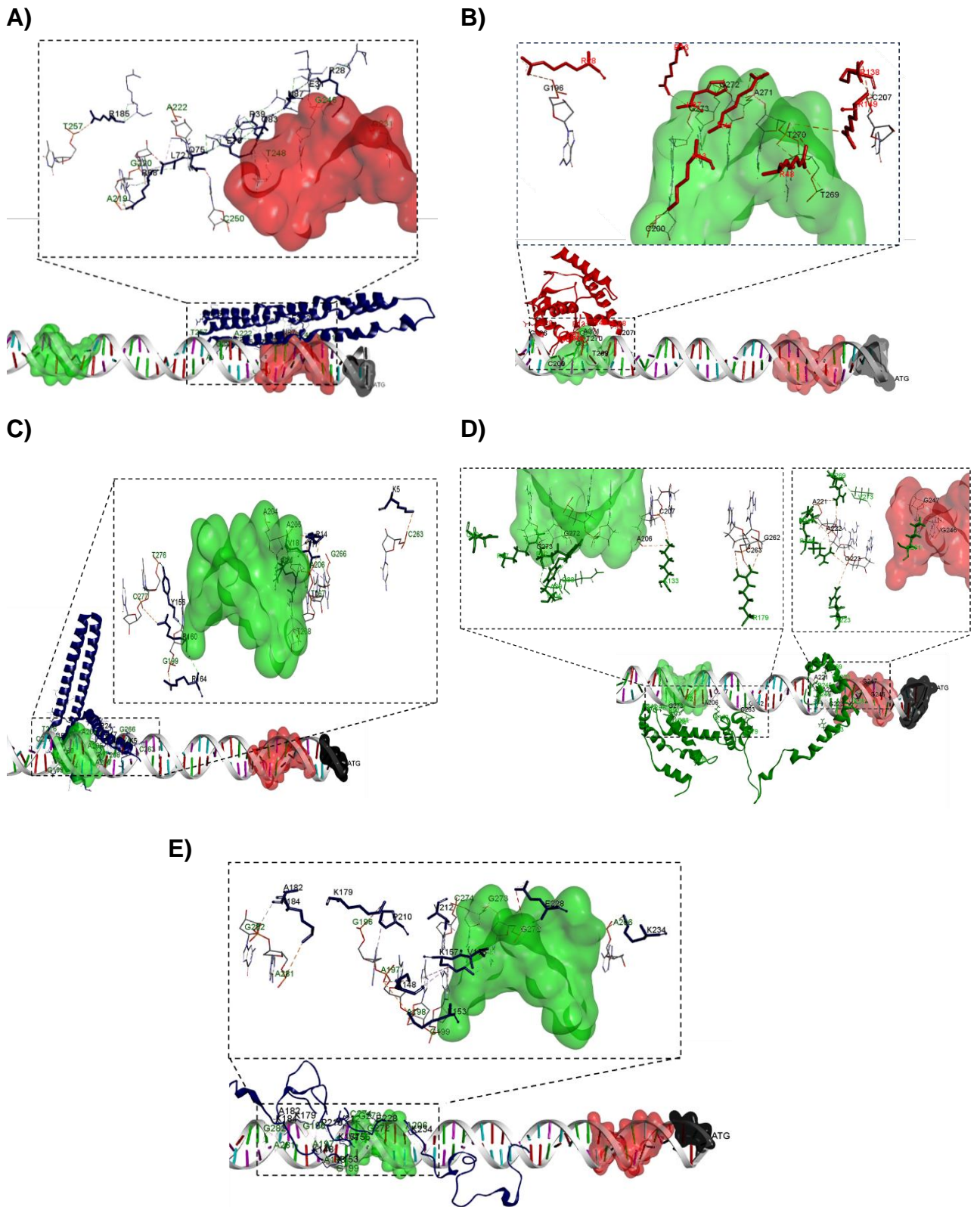


Figura 19. Interacciones entre fasina/factor sigma con DNA. **A)** PhaP4-DNA, **B)** σ^{32} -DNA, **C)** PhaP5-DNA, **D)** σ^{24} -DNA y **F)** PhaP6-DNA, modelos visualizados mediante Biovia Discovery Studio.

PhaP4-DNA				PhaP4-RpoE-DNA				PhaP4-RpoH-DNA			
De	a	Distan- cia (Å)	Tipo	De	a	Distan- cia (Å)	Tipo	De	a	Distan- cia (Å)	Tipo
PhaP4:ARG39	DNA: T248	2.23978	PS	RpoE: ARG138	DNA: G272	3.0027	PS	RpoH: ARG97	DNA: C227	3.4826	PS
PhaP4:ARG68	DNA: A219	3.30933	PS	PhaP4: ARG39	DNA: G272	2.79074	PS	RpoH: LYS125	DNA: T239	3.64176	PS
PhaP4:ARG28	DNA: C231	5.16721	CA	PhaP4:ARG185	DNA: A281	3.91104	PS	PhaP4:ARG131	DNA: G261	3.12729	PS
PhaP4:ARG28	DNA: G246	4.74723	CA	PhaP4: ARG39	DNA: G272	4.06289	CA	RpoH: LYS91	DNA: G242	4.06564	CA
PhaP4:ARG39	DNA: T248	3.47862	CA	PhaP4:ARG185	DNA: G282	5.17605	CA	RpoH: LYS134	DNA: C229	4.26774	CA
PhaP4:ARG68	DNA: A219	5.48961	CA	PhaP4:ARG185	DNA: G282	4.17579	CA	DNA: C231	RpoH:GLU115	3.25636	PH
PhaP4:ARG185	DNA: T257	4.52701	CA	DNA: A198	PhaP4:GLN75	3.26956	PH	RpoH: SER80	DNA: T240	2.97679	PH
DNA: A222	PhaP4:GLN75	2.55783	PH	PhaP4: GLN83	DNA: G272	3.19431	PH	RpoH: TRP108	DNA: G228	2.66686	PH
PhaP4:GLN83	DNA: T248	3.0976	PH	PhaP4: GLN75	DNA: G273	3.88842	Pi-Do	RpoH: THR12	DNA: C231	2.68816	PH
DNA: T248	PhaP4:GLU79	3.53546	ECH					RpoH: THR129	DNA: C231	2.97565	PH
PhaP4:ASN87	DNA: G246	3.10186	ECH					PhaP4:ARG131	DNA: A260	3.34332	PH
DNA: G220	PhaP4:LEU72	5.3103	Pi-Al					PhaP4:GLN134	DNA: A216	3.35887	PH
								DNA: C227	RpoH:TYR104	3.52267	ECH
								DNA: T239	RpoH: SER120	3.61211	ECH
								RpoH: LYS134	DNA: C229	3.46661	ECH
								DNA: G228	RpoH: TRP107	4.17179	Pi-An
								DNA: G228	RpoH: TRP108	3.24067	Pi-An
								DNA: T240	RpoH: YR116	3.38069	Pi-An

Tabla 8. Interacciones entre PhaP4 y complejos proteicos con DNA. Tipos de interacciones: Puente Salino (PS), Cargas Atractivas (CA), Puente de Hidrogeno (PH), Enlace Carbono-Hidrogeno (ECH), Pi-Donor (Pi-Do), Pi-Alkyl (Pi-Al), Pi-Anion (Pi-An).

PhaP5-DNA				PhaP5-RpoE-DNA				PhaP5-RpoH-DNA			
De	a	Distancia (Å)	Tipo	De	a	Distancia (Å)	Tipo	De	a	Distancia (Å)	Tipo
PhaP5:ARG164	DNA: G199	2.95001	PS	PhaP5:ARG64	DNA: G30	2.75377	PS	RpoH: ARG192	DNA: C211	2.35103	PS
PhaP5:LYS5	DNA: C263	3.35106	CA	PhaP5:ARG64	DNA: T31	3.33319	PS	RpoH: ARG245	DNA: A278	2.27407	PS
PhaP5:ARG14	DNA: A205	3.44654	CA	RpoE: LYS43	DNA: A23	4.71422	CA	RpoH: ARG192	DNA: C212	4.89596	CA
PhaP5:ARG14	DNA: A206	5.52875	CA	RpoE: LYS43	DNA: A24	5.04603	CA	RpoH: ARG192	DNA: C211	5.31494	CA
PhaP5:ARG14	DNA: A206	3.43647	CA	RpoE: ARG47	DNA: A24	4.27921	CA	RpoH: ARG223	DNA: G199	5.39413	CA
PhaP5:ARG24	DNA: T267	3.30147	CA	RpoE: ARG47	DNA: A25	4.90945	CA	RpoH: ARG223	DNA: C200	5.58999	CA
PhaP5:ARG24	DNA: T268	4.41773	CA	RpoE: ARG47	DNA: G26	4.67074	CA	RpoH: ARG223	DNA: C200	4.574	CA
PhaP5:ARG160	DNA: C277	5.36977	CA	RpoE: ARG47	DNA: C27	4.29451	CA	RpoH: ARG245	DNA: A278	4.61364	CA
DNA: A204	PhaP5:ASP21	3.36524	PH	RpoE: ARG47	DNA: A24	2.93771	CA	RpoH: ARG246	DNA: C200	4.89596	CA
PhaP5:THR17	DNA: G266	2.99581	PH	RpoE: ARG47	DNA: C27	4.21852	CA	RpoH: ARG246	DNA: G199	5.39014	CA
PhaP5:ARG24	DNA: T267	2.28854	PH	PhaP5: ARG64	DNA: T31	5.14642	CA	RpoH: ARG265	DNA: C191	5.08599	CA
PhaP5:TYR156	DNA: T276	2.38204	PH	DNA: G36	PhaP5:GLN169	2.71365	PH	RpoH: ARG269	DNA: A278	4.56876	CA
PhaP5:ARG14	DNA: A205	2.99863	ECH	PhaP5: THR39	DNA: G28	2.90795	PH	RpoH: ARG269	DNA: G279	2.77041	CA
PhaP5:THR17	DNA: G266	3.71643	Pi-Si	PhaP5: ARG64	DNA: G30	3.27778	PH	RpoH: ARG269	DNA: G279	5.31567	CA
DNA: A205	PhaP5:ARG14	5.08213	Pi-Al	PhaP5:ARG165	DNA: C21	2.90015	PH	PhaP5: ARG43	DNA: T213	5.56515	CA
DNA: A205	PhaP5:VAL18	5.17671	Pi-Al					PhaP5: ARG43	DNA: A214	2.90191	CA
								PhaP5: ARG43	DNA: A214	5.50043	CA
								PhaP5: ARG64	DNA: T213	5.1569	CA
								PhaP5: LEU57	DNA: A215	2.47478	PH

		DNA: A215	PhaP5: ASP56	2.53158	ECH
		RpoH: VAL273	DNA: G279	2.84523	ECH
		DNA: A214	PhaP5: PRO60	5.3959	Pi-Al
		DNA: A215	PhaP5: PRO60	4.8743	Pi-Al
		DNA: C256	PhaP5: VAL63	5.10184	Pi-Al

Tabla 9. Interacciones entre PhaP5 y complejos proteicos con DNA. Tipos de interacciones: Puente Salino (PS), Cargas Atractivas (CA), Puente de Hidrogeno (PH), Enlace Carbono-Hidrogeno (ECH), Pi-Alkyl (Pi-Al).

PhaP6-DNA				PhaP6-RpoE-DNA				PhaP6-RpoH-DNA			
De	a	Distancia (Å)	Tipo	De	a	Distancia (Å)	Tipo	De	a	Distancia (Å)	Tipo
PhaP6:ARG73	PhaP6:ASP77	2.72349	PS	RpoE: ARG9	DNA: A271	3.5854	PS	RpoH:ARG223	DNA: C263	2.4121	PS
PhaP6:LYS148	DNA: A197	4.50037	CA	RpoE: ARG26	DNA: G266	5.41673	CA	RpoH:ARG224	DNA: C207	2.57294	PS
PhaP6:LYS153	DNA: A197	5.06063	CA	RpoE: ARG28	DNA: A265	4.51049	CA	RpoH:ARG246	DNA: G264	3.30776	PS
PhaP6:LYS153	DNA: A198	3.7468	CA	RpoE: ARG70	DNA: A204	5.31474	CA	RpoH:ARG178	DNA: T257	4.94827	CA
PhaP6:LYS179	DNA: G196	4.7961	CA	RpoE: ARG70	DNA: A205	5.03014	CA	RpoH:ARG223	DNA: C263	4.24109	CA
PhaP6:LYS184	DNA: A281	4.25956	CA	RpoE: ARG99	DNA: G272	4.74028	CA	RpoH:ARG223	DNA: G264	5.48901	CA
PhaP6:LYS234	DNA: A206	3.07842	CA	RpoE: ARG99	DNA: G272	3.18952	CA	RpoH:ARG246	DNA: G264	5.48474	CA
PhaP6:LYS157	DNA: G272	3.39816	PH	RpoE: ARG69	DNA: T267	2.92423	PH	RpoH:ARG248	DNA: A204	3.04359	CA
PhaP6:GLU228	DNA: G272	3.28126	PH	RpoE: ARG99	DNA: G272	3.38196	PH	DNA: A205	RpoH:ASP249	2.44171	PH
DNA: G282	PhaP6:ALA182	3.21481	ECH	DNA: A205	RpoE:GLN101	2.3885	ECH	DNA: A206	RpoH:ASP249	2.2635	PH
PhaP6:LYS153	DNA: A198	3.66344	ECH	DNA: C263	RpoE: GLN61	3.72107	ECH	RpoH:ASN209	DNA: G210	3.12529	PH
DNA: G196	PhaP6:PRO210	5.03498	Pi-Al	RpoE: ARG70	DNA: A204	2.88057	Pi-C	RpoH:ASN209	DNA: G210	3.33223	PH
DNA: A198	PhaP6:LYS157	4.20957	Pi-Al	DNA: G264	RpoE: PHE35	3.02548	Pi-An	RpoH:GLN210	DNA: T208	2.51763	PH
DNA: A198	PhaP6:LYS157	5.03606	Pi-Al	DNA: A265	RpoE: PHE31	3.81763	Pi-An	DNA: G261	RpoH:GLU216	2.94406	ECH
DNA: G199	PhaP6:LYS157	5.42068	Pi-Al	DNA: A265	RpoE: TRP68	3.04726	Pi-An	DNA: A265	RpoH:ASP249	3.59466	ECH
DNA: G272	PhaP6:VAL156	5.19778	Pi-Al	DNA: A265	RpoE: TRP68	3.27175	Pi-An	RpoH:GLU216	DNA: G261	4.86475	Pi-An
DNA: G273	PhaP6:VAL212	4.91484	Pi-Al	DNA: A205	RpoE: LEU66	5.36029	Pi-Al				
DNA: C274	PhaP6:VAL212	4.96401	Pi-Al	DNA: A265	RpoE: LEU65	5.06397	Pi-Al				
				DNA: G266	RpoE: ARG69	5.44227	Pi-Al				

Tabla 10. Interacciones de PhaP6 y complejos proteicos con DNA. Tipos de interacciones: Puente Salino (PS), Cargas Atractivas (CA), Puente de Hidrogeno (PH), Enlace Carbono-Hidrogeno (ECH), Pi-Alkyl (Pi-Al), Pi-Anion (Pi-An).

De	a	Distancia (Å)	Tipo	De	a	Distancia (Å)	Tipo
RpoE: ARG13	DNA: G273	3.32936	PS	RpoH: ARG97	DNA: G273	2.33954	PS
RpoE: ARG41	DNA: A271	3.15123	PS	RpoH: ARG245	DNA: A221	3.20457	PS
RpoE: ARG48	DNA: T269	3.37264	PS	RpoH: ARG246	DNA: A222	3.85472	PS
RpoE: ARG28	DNA: G196	4.43905	CA	RpoH: ARG97	DNA: G272	5.26325	CA
RpoE: ARG41	DNA: A271	5.17468	CA	RpoH: LYS133	DNA: A206	4.93599	CA
RpoE: LYS43	DNA: C200	4.31802	CA	RpoH: LYS133	DNA: C207	4.93524	CA
RpoE: ARG48	DNA: T270	4.24938	CA	RpoH: ARG179	DNA: G262	4.52053	CA
RpoE: ARG48	DNA: T270	4.17605	CA	RpoH: ARG179	DNA: C263	5.17116	CA
RpoE: ARG138	DNA: C207	4.03437	CA	RpoH: ARG179	DNA: C263	4.92389	CA
RpoE: ARG138	DNA: C207	2.26509	CA	RpoH: ARG223	DNA: G223	5.13872	CA
RpoE: ARG149	DNA: T270	5.52794	CA	RpoH: ARG245	DNA: A222	5.44265	CA
RpoE: HIS37	DNA: G272	3.24814	PH	RpoH: ARG246	DNA: G223	4.19206	CA
DNA: C207	RpoE: ARG138	3.65323	ECH	RpoH: ARG269	DNA: A221	3.97448	CA
RpoE: HIS37	DNA: A271	2.69741	ECH	RpoH: ARG269	DNA: A222	4.86214	CA
RpoE: ARG41	DNA: A271	3.22071	ECH	RpoH: LYS281	DNA: G246	3.96491	CA
				RpoH: LYS281	DNA: G247	4.23289	CA
				RpoH: GLN42	DNA: C274	3.11707	PH
				DNA: G273	RpoH: ARG92	2.64294	ECH
				RpoH: ARG246	DNA: A222	3.32226	ECH
				DNA: G273	RpoH: TYR104	4.92749	Pi-An
				DNA: A222	RpoH: PHE76	4.66394	Pi-Pi

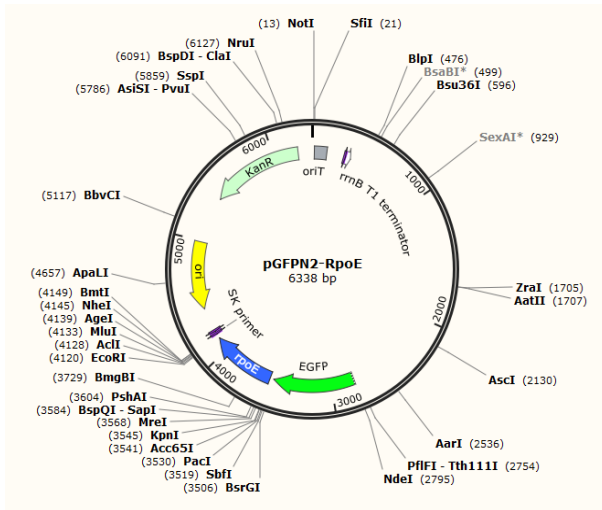
Tabla 11. Interacciones entre los factores sigma con DNA. Tipos de interacciones: Puente Salino (PS), Cargas Atractivas (CA), Puente de Hidrogeno (PH), Enlace Carbono-Hidrogeno (ECH), Pi-Alkyl (Pi-Al), Pi-Anion (Pi-An), apilamiento Pi-Pi (Pi-Pi).

Obtención de las construcciones pGFPN2-RpoE y pCHYN2-RpoH

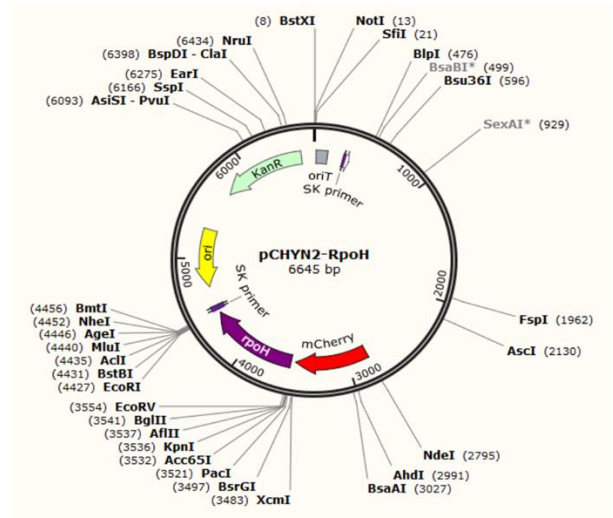
Los genes *rpoE* (σ^{24}) de 573 pb y *rpoH* (σ^{32}) de 882 pb de los factores sigma fueron amplificados por PCR (Figura 22, C1 y C2) y clonados en los vectores pGFPN2 y pCHYN2, respectivamente (Figura 22, C6 y C7). Las construcciones obtenidas se denominaron pGFPN2-RpoE pCHYN2-RpoH.

Para la construcción pGFPN2-RpoE la amplificación del gen *rpoE* fue clonado en los sitios *KpnI/EcoRI* del vector pXGFPN-2 de 5785 pb, la clonación del gen resultó en una construcción con un tamaño de 6338 pb (Figura 20A). En cuanto a la construcción pCHYN2-RpoH, se amplificó el gen *rpoH* y se clonó en los sitios *BglII/EcoRI* del vector pXCHYN-2 de 5776 pb. La clonación del gen *rpoH* resultó en una construcción con un tamaño de 6645 pb (Figura 20B). Asimismo, se corrieron en gel de agarosa al 1% las construcciones obtenidas, donde se observó el peso aproximado correcto para las construcciones, con un peso de ~ 6.64 kb para pGFPN2-RpoH y ~ 6.33 kb para pCHYN2-RpoE (Figura 21, C2 y C3), . De la misma manera para corroborar una correcta clonación se llevó a cabo una doble digestión utilizando las enzimas de restricción que se usaron para clonar en cada vector, y se corrió en gel de agarosa al 1%, en este se obtuvieron dos bandas la banda inferior corresponde al tamaño del producto de PCR, con un tamaño aproximadamente de 0.57 kb para σ^{24} y 0.88 kb para σ^{32} , mientras la banda superior corresponde al vector, con un tamaño aproximado de 5.7 kb para ambos vectores(Figura 22, C4 y C5).

A)



B)



20. Plásmidos clonados con los genes *rpoE* y *rpoH*. pGFPN2-RpoE (A) y pCHYN2-RpoH (B).

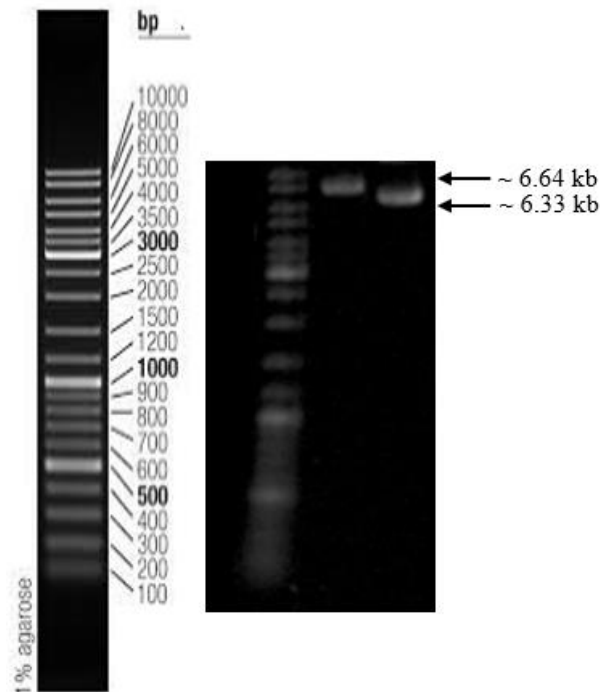


Figura 21. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Marcador de peso molecular (C1), plásmido pGFPN2-RpoH (C2) y plásmido pCHYN2-RpoE (C3).

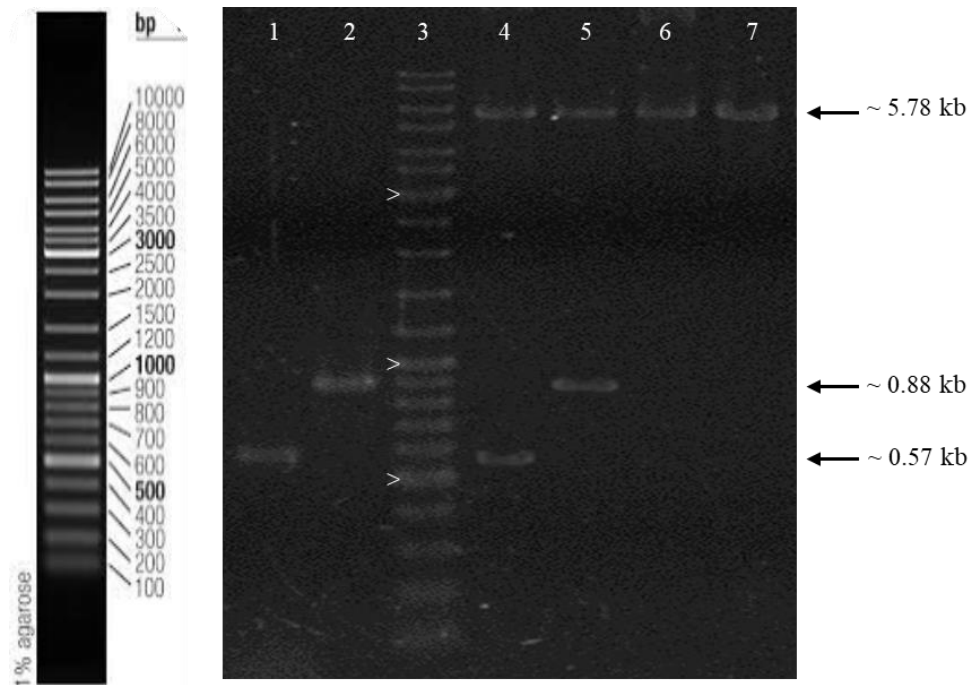


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1%. Amplificación por PCR del gen *rpoE* (C1), amplificación del gen *rpoH* (C2), marcador de peso molecular (C3), doble digestión del plasmido pCHYN2-RpoE (C4), doble digestión del plasmido pGFPN2-RpoH (C5), plasmido pCHYN2 (C6), plasmido pGFPN2 (C7).

Discusión

Una de las características de las bacterias es su gran capacidad de poder adaptarse con gran rapidez a las diferentes condiciones ambientales en las que se encuentre presente. Por ello, el desarrollo de mecanismos es imprescindible para llevar a cabo esta adecuación ambiental y responder ante estas fluctuaciones ambientales (48). Una respuesta ante estas situaciones es la regulación de su expresión genética (40, 69). En *A. brasilense* Sp7 la regulación genética puede ser mediada por factores sigma, siendo estos factores, los reguladores clave en la expresión genética debido a que permiten dirigir la unión específica de la secuencia RNAP (Reconocimiento por la ARN polimerasa) al nivel de las cajas promotoras, en donde se lleva a cabo la unión con la cadena de ADN (69, 70). La presencia de estos factores sigma alternativos como lo son los factores σ^{32} y σ^{24} , le permiten a *A. brasilense* lidiar contra el estrés por calor y reparar el daño celular causado por el estrés oxidativo y foto-oxidativo, respectivamente (47, 48, 52, 71).

Actualmente la predicción, búsqueda y reconocimiento de sitios de transcripción para cada bacteria de forma *in silico* es un desafío, dado a la gran diversidad de secuencias genómicas albergadas en las bases de datos (59, 69). El análisis bioinformático para la determinación de las probables cajas -10 y -35 para los factores sigma es importante dado que la información es limitada para los factores σ^{24} y σ^{32} de *A. brasilense* Sp7. No obstante, la continua adquisición y actualización de softwares permiten que estas investigaciones se vayan simplificando y con ello perfeccionando la obtención de resultados.

El conocer los sitios de unión de los factores sigma y posterior unión de la RNA polimerasa para dar inicio al proceso de transcripción es primordial. Sin embargo, estos motivos llegan a ser escasamente conservados y difieren entre los diferentes factores sigma que los reconoce (59, 69, 72). A pesar de ello hay motivos canónicos que se han caracterizado bien para las regiones -10 y -35 en *E. coli* para los factores σ^{70} , σ^{54} , σ^{28} y σ^{32} , teniendo para este ultimo la secuencia CCCTTGAA 13-15 pb CCCGATNT. Sin embargo, los motivos reconocidos por σ^{24} y σ^{28} no se han informado por la baja conservación de estos motivos (69). Con ello se observó que se obtuvieron resultados similares en la detección de motivo en la secuencia, donde se detectaron dos cajas probables río arriba del gen *phaC* guiándose en los motivos canónicos, la caja -10 con la secuencia ACCGCAC y la caja -35 con la secuencia CCTAAA. Además, estas secuencias de las cajas se encuentran normalmente en cercanía a los genes que regulan y en regiones intergénicas, en la cual pueden tener una distancia que puede variar de entre 20 a 200 pares de bases río arriba del sitio de inicio de la transcripción (72).

Las fasininas tienen un papel fundamental en la estabilización del granulo de PHB, otorgado por sus propiedades anfífilas (3, 19, 28), pero no hay suficientes estudios que permitan el análisis *in silico* sobre como estas fasininas podrían interactuar con otras proteínas y el DNA. Hay reportes en *Pseudomonas aeruginosa* en donde la fasinina PhaP promueve y activa la síntesis de PHB, donde existe la posibilidad de actuar como regulador transcripcional de *phaC* (73). Información similar se notificó

para *Synechocystis* sp y *A. caviae* (74, 75). En algunos microorganismos las fasinias pueden unirse al DNA, como en *A. hydrophila*, *P. putida* y *R. eutropha*. En *A. hydrophila* se ha visto que la sobreexpresión de *phaP* condujo también al incremento en la expresión de *phaC* (76). En *R. eutropha*, la fasinia PhaM se encuentra implicada en la unión de gránulos de PHB a la región nucleoide en bacterias. En *Pseudomonas*, la región C-terminal de la fasinia PhaF en *P. putida*, se une al ADN donde se ha demostrado que esta fasinia participa en el control de la expresión de los genes *phaC1* y *phal* (37, 38).

Tras la obtención de los resultados del docking molecular se observó que las fasinias interaccionan con regiones de gran relevancia de los factores sigma para la unión y reconocimiento de las regiones promotoras del gen *phaC*. En el factor σ^{24} la región 2.3 (aa 68-87) interviene en la unión a la RNA polimerasa, la región 2.4 (aa 88-101) reconoce la caja -10 y la región 4.2 (aa 158-191) está involucrada en la unión a la caja -35 (52). Mientras en el factor σ^{32} , la región 2.1 (aa 45-67), 2.2 (aa 68-87), y 3.2 (aa 199-218) participan en la unión al núcleo ¿?de quien de la RNA POLIMERASA?, la región 2.3 (aa 88-108) interviene en la apertura de la cadena ADN, la región 2.4 (aa 109-131) en el reconocimiento de la caja -10, la región 3.1 (aa 142-195) en la unión al ADN y la región 4.2 (aa 252-279) en el reconocimiento de la caja -35 (48). En el docking molecular proteína-proteína, se obtuvo que las fasinias PhaP4 se une principalmente a la región 2.1 del factor σ^{24} , mientras que en el factor σ^{32} se une a la región 2.3 y 3.1. PhaP5 se une a la región 4.1, 2.1, 2.2 y 2.3 del factor σ^{24} , mientras en el factor σ^{32} interacciona con la región 2.1, 2.2, 2.3 2.4, y 3.1, y PhaP6 se une a la región 2.1, 2.2 y 4.1 y 4.2 del factor σ^{24} , mientras que en el factor σ^{32} se une a la región 2.2, 2.3, 2.4 y 3.1.

No obstante, cuando las fasinias interaccionan con los factores sigma y se hizo el docking molecular proteína-DNA, mostro un cambio significativo en los aminoácidos de los factores σ que participan en el reconocimiento de las cajas -10 y -35. Cuando se encuentra el complejo proteico PhaP4- σ^{24} en unión con la región rio arriba del gen *phaC*, la única región del factor σ^{24} que tiene interacción es la 4.1, con PhaP5- σ^{24} , la región del factor σ^{24} que interacciona es la 2.1, mientras que con el complejo

PhaP6- σ^{24} , las regiones que interaccionan del factor σ^{24} son la 2.1, 2.2, y 2.3 y 2.4, en los tres casos todos los complejos entre las fasinas y σ^{24} se unieron cerca de la caja -35. No obstante, con el complejo PhaP4- σ^{32} , la regiones de σ^{32} que tienen interacción con la región río arriba de phaC son la 2.2, 2.3, y 2.4, en el complejo PhaP5- σ^{32} , las regiones de σ^{32} que interaccionan son la 3.1, 4.1 y 4.2, por último en el complejo PhaP6- σ^{32} , las regiones de σ^{32} que tienen interacción con la 3.1, 3.2 y 4.1, en este caso solo los complejos PhaP5- σ^{32} y PhaP6- σ^{32} se unieron cerca de la caja -35, y solamente PhaP4- σ^{32} se unió a la caja -10. El detectar que las fasinas se unen a región importantes de los factores sigma puede ser indicador de que estas puedan estar bloqueando la posible unión de la RNA polimerasa o incluso impedir la correcta unión del factor de transcripción, ya que se observó la unión a las regiones 2.4 y 4.2 de los factores sigma en el caso de los complejos PhaP6- σ^{24} , PhaP5- σ^{32} y PhaP6- σ^{32} , mientras en el caso de los complejos PhaP4- σ^{24} , PhaP5- σ^{24} y PhaP4- σ^{32} podrían promover la correcta transcripción del gen, esto al no tener contacto las fasinas con las regiones involucradas en la detección de las cajas -10 y -35. Aunado a lo anterior el desplazamiento de su unión original a las cajas -10 y -35 pueden ser factores que podrían generar el bloqueo o activación de la transcripción del gen *phaC*. Asimismo, el tipo de interacción que presentan estas uniones de tipo: puente salino, puente de hidrogeno y cargas atractivas principalmente, ayudan a los complejos proteicos a estabilizarse en la unión al ADN, así como en su variante de encontrarse la fasina o factor sigma de forma individual en su unión con el DNA.

Por último, el clonar los factores sigma en los vectores permitirá en estudios posteriores realizar análisis *in vitro* que permitan dilucidar estas interacciones encontradas.

Conclusiones

- PhaP4 estando en complejo con el factor sigma se unen en la región -35 con el factor σ^{24} y la región -10 con σ^{32} .
- PhaP5 estando en complejo con el factor sigma (σ^{24} o σ^{32}) en ambos casos se unen a la región -35.
- PhaP6 estando en complejo con el factor sigma (σ^{24} o σ^{32}) el único que interacciona con el ADN son los factores sigma y en ambos casos se unen a la región -35.
- Se amplificaron y clonaron los genes *rpoE* y *rpoH* en los vectores

Perspectiva

La unión de fasinas a regiones promotoras de proteínas participantes en la producción de PHB podría ser un punto clave en la transcripción del gen *phaC*, además de su interacción y asociación con los factores σ^{24} y σ^{32} que intervienen en la regulación genética de *A. brasilense* Sp7. Sin embargo, es necesario realizar más análisis para conocer si este efecto puede ser para el bloqueo o activación de la transcripción.

Bibliografía

1. MacLeod M, Arp HPH, Tekman MB, Jahnke A. 2021. The global threat from plastic pollution. *Science* 373:61–65.
2. Monteiro RCP, Ivar Do Sul JA, Costa MF. 2018. Plastic pollution in islands of the Atlantic Ocean. *Environ Pollut* 238:103–110.
3. Martínez-Martínez M de los A, 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 Express* 9:155.
4. Bonartsev AP, Bonartseva GA, Reshetov IV, Shaitan KV, Kirpichnikov MP. 2019. Application of Polyhydroxyalkanoates in Medicine and the Biological Activity of Natural Poly(3-Hydroxybutyrate). *Acta Naturae* 11:4–16.
5. Pulingam T, Appaturi JN, Parumasivam T, Ahmad A, Sudesh K. 2022. Biomedical applications of polyhydroxyalkanoate in tissue engineering. *Polymers* 14:2141.
6. Martínez MDLÁM, Urzúa LS, Carrillo YA, Ramírez MB, Morales LJM. 2023. Polyhydroxybutyrate metabolism in *azospirillum brasilense* and its applications, a Review. *Polymers* 15:3027.
7. 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.
8. Müller-Santos M, Koskimäki JJ, Alves LPS, de Souza EM, Jendrossek D, Pirttilä AM. 2021. The protective role of PHB and its degradation products against stress situations in bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 45:fuaa058.

9. 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.
10. Cáceres EAR. 1982. Improved Medium for Isolation of *Azospirillum* spp. *Appl Environ Microbiol* 44:990–991.
11. Bible AN, Khalsa-Moyers GK, Mukherjee T, Green CS, Mishra P, Purcell A, Aksenova A, Hurst GB, Alexandre G. 2015. Metabolic adaptations of *Azospirillum brasilense* to oxygen stress by cell-to-cell clumping and flocculation. *Appl Environ Microbiol* 81:8346–8357.
12. Fibach-Paldi S, Burdman S, Okon Y. 2012. Key physiological properties contributing to rhizosphere adaptation and plant growth promotion abilities of *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett* 326:99–108.
13. Joe MM, Benson A, Walitang DI, Sa T. 2022. Development of ACCd producer *A. brasilense* mutant and the effect of inoculation on red pepper plants. *3 Biotech* 12:252.
14. de-Bashan LE, Hernandez J-P, Bashan Y. 2012. The potential contribution of plant growth-promoting bacteria to reduce environmental degradation – A comprehensive evaluation. *Appl Soil Ecol* 61:171–189.
15. Khatami K, Perez-Zabaleta M, Owusu-Agyeman I, Cetecioglu Z. 2021. Waste to bioplastics: How close are we to sustainable polyhydroxyalkanoates production? *Waste Manag* 119:374–388.
16. McAdam B, Brennan Fournet M, McDonald P, Mojicevic M. 2020. Production of polyhydroxybutyrate (phb) and factors impacting its chemical and mechanical characteristics. *Polymers* 12:2908.
17. Koller M, Salerno A, Dias M, Reiterer A, Braunegg G. 2010. Modern biotechnological polymer synthesis: a review. *Food Technol Biotechnol* 48:255–269.

18. Prados E, Maicas S. 2016. Bacterial production of hydroxyalkanoates (PHA). *Univers J Microbiol Res* 4:23–30.
19. Maestro B, Sanz JM. 2017. Polyhydroxyalkanoate-associated phasins as phylogenetically heterogeneous, multipurpose proteins. *Microb Biotechnol* 10:1323–1337.
20. Lemos Delgado AC, Mina Cordoba A. 2015. Polihidroxicanoatos (PHA's) producidos por bacterias y su posible aplicación a nivel industrial. *Inf Téc* 79:83.
21. Shrivastav A, Kim H-Y, Kim Y-R. 2013. Advances in the applications of polyhydroxyalkanoate nanoparticles for novel drug delivery system. *BioMed Res Int* 2013:1–12.
22. Chen G-Q, Jiang X-R, Guo Y. 2016. Synthetic biology of microbes synthesizing polyhydroxyalkanoates (PHA). *Synth Syst Biotechnol* 1:236–242.
23. Rao U, Sridhar R, Sehgal PK. 2010. Biosynthesis and biocompatibility of poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) produced by *Cupriavidus necator* from spent palm oil. *Biochem Eng J* 49:13–20.
24. Sn B, G S. 2016. Need for bioplastics and role of biopolymer PHB: a short review. *J Pet Environ Biotechnol* 07.
25. Chen S, Liu Q, Wang H, Zhu B, Yu F, Chen G-Q, Inoue Y. 2009. Polymorphic crystallization of fractionated microbial medium-chain-length polyhydroxyalkanoates. *Polymer* 50:4378–4388.
26. Rodriguez-Contreras A. 2019. Recent advances in the use of polyhydroxyalkanoates in biomedicine. *Bioengineering* 6:82.
27. Jendrossek D, Pfeiffer D. 2014. New insights in the formation of polyhydroxyalkanoate granules (carbonosomes) and novel functions of poly(3-hydroxybutyrate): A simple molecule with multiple functions. *Environ Microbiol* 16:2357–2373.

28. Pötter M, Steinbüchel A. 2005. Poly(3-hydroxybutyrate) Granule-Associated Proteins: impacts on poly(3-hydroxybutyrate) synthesis and degradation. *Biomacromolecules* 6:552–560.
29. Parlane NA, Gupta SK, Rubio-Reyes P, Chen S, Gonzalez-Miro M, Wedlock DN, Rehm BHA. 2017. Self-Assembled protein-coated polyhydroxyalkanoate beads: properties and biomedical applications. *ACS Biomater Sci Eng* 3:3043–3057.
30. Grage K, Jahns AC, Parlane N, Palanisamy R, Rasiah IA, Atwood JA, Rehm BHA. 2009. Bacterial polyhydroxyalkanoate granules: biogenesis, structure, and potential use as nano-/micro-beads in biotechnological and biomedical applications. *Biomacromolecules* 10:660–669.
31. Sznajder A, Pfeiffer D, Jendrossek D. 2015. Comparative proteome analysis reveals four novel polyhydroxybutyrate (phb) granule-associated proteins in *Ralstonia eutropha* H16. *Appl Environ Microbiol* 81:1847–1858.
32. Kim J, Kim Y-J, Choi SY, Lee SY, Kim K-J. 2017. Crystal structure of *Ralstonia eutropha* polyhydroxyalkanoate synthase C-terminal domain and reaction mechanisms. *Biotechnol J* 12:1600648.
33. Mezzolla V, D’Urso O, Poltronieri P. 2018. Role of PhaC Type I and Type II enzymes during PHA biosynthesis. *Polymers* 10:910.
34. Kadouri D, Jurkevitch E, Okon Y. 2003. Poly γ -hydroxybutyrate depolymerase (PhaZ) in *Azospirillum brasilense* and characterization of a *phaZ* mutant. *Arch Microbiol* 180:309–318.
35. Numata K, Abe H, Iwata T. 2009. Biodegradability of poly(hydroxyalkanoate) materials. *Materials* 2:1104–1126.
36. Mezzina MP, Pettinari MJ. 2016. Phasins, multifaceted polyhydroxyalkanoate granule-associated proteins. *Appl Environ Microbiol* 82:5060–5067.

37. Maestro B, Galán B, Alfonso C, Rivas G, Prieto MA, Sanz JM. 2013. A new family of intrinsically disordered proteins: structural characterization of the major phasin PhaF from *Pseudomonas putida* KT2440. PLoS ONE 8:e56904.
38. 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: PhaF role in PHA granule location and segregation. Mol Microbiol 79:402–418.
39. Mitra R, Xu T, Chen G, Xiang H, Han J. 2022. An updated overview on the regulatory circuits of polyhydroxyalkanoates synthesis. Microb Biotechnol 15:1446–1470.
40. Quelas JI, Mesa S, Mongiardini EJ, Jendrossek D, Lodeiro AR. 2016. Regulation of polyhydroxybutyrate synthesis in the soil bacterium *Bradyrhizobium diazoefficiens*. Appl Environ Microbiol 82:4299–4308.
41. Pfeiffer D, Jendrossek D. 2013. Development of a transferable bimolecular fluorescence complementation system for the investigation of interactions between poly(3-hydroxybutyrate) granule-associated proteins in gram-negative bacteria. Appl Environ Microbiol 79:2989–2999.
42. Tugarova AV, Dyatlova YA, Kenzhegulov OA, Kamnev AA. 2021. Poly-3-hydroxybutyrate synthesis by different *Azospirillum brasilense* strains under varying nitrogen deficiency: A comparative in-situ FTIR spectroscopic analysis. Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc 252:119458.
43. Vlaeminck E, Uitterhaegen E, Quataert K, Delmulle T, De Winter K, Soetaert WK. 2022. Industrial side streams as sustainable substrates for microbial production of poly(3-hydroxybutyrate) (PHB). World J Microbiol Biotechnol 38:238.

44. Sagong H-Y, Son HF, Choi SY, Lee SY, Kim K-J. 2018. Structural insights into polyhydroxyalkanoates biosynthesis. *Trends Biochem Sci* 43:790–805.
45. 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.
46. Altaee N, El-Hiti GA, Fahdil A, Sudesh K, Yousif E. 2016. Biodegradation of different formulations of polyhydroxybutyrate films in soil. *SpringerPlus* 5:762.
47. Gupta N, Kumar S, Mishra MN, Tripathi AK. 2013. A constitutively expressed pair of *rpoE2*–*chrR2* in *Azospirillum brasilense* Sp7 is required for survival under antibiotic and oxidative stress. *Microbiology* 159:205–218.
48. Rai AK, Singh S, Dwivedi SK, Srivastava A, Pandey P, Kumar S, Singh BN, Tripathi AK. 2018. Catalase expression in *Azospirillum brasilense* sp7 is regulated by a network consisting of OxyR and two RpoH paralogs and including an RpoE1→RpoH5 regulatory cascade. *Appl Environ Microbiol* 84:e01787-18.
49. Mishra MN, Kumar S, Gupta N, Kaur S, Gupta A, Tripathi AK. 2011. An extracytoplasmic function sigma factor cotranscribed with its cognate anti-sigma factor confers tolerance to NaCl, ethanol and methylene blue in *Azospirillum brasilense* Sp7. *Microbiology* 157:988–999.
50. Paget MS, Helmann JD. 2003. The σ 70 family of sigma factors. *Genome Biol* 4:203.
51. Francke C, Groot Kormelink T, Hagemeyer Y, Overmars L, Sluijter V, Moezelaar R, Siezen RJ. 2011. Comparative analyses imply that the enigmatic sigma factor 54 is a central controller of the bacterial exterior. *BMC Genomics* 12:385.
52. Gupta N, Gupta A, Kumar S, Mishra R, Singh C, Tripathi AK. 2014. Cross-Talk between cognate and noncognate RpoE sigma factors and Zn²⁺-binding anti-

sigma factors regulates photooxidative stress response in *Azospirillum brasilense*. *Antioxid Redox Signal* 20:42–59.

53. Zheng W, Zhang C, Li Y, Pearce R, Bell EW, Zhang Y. 2021. Folding non-homologous proteins by coupling deep-learning contact maps with I-TASSER assembly simulations. *Cell Rep Methods* 1:100014.
54. Roy A, Kucukural A, Zhang Y. 2010. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. *Nat Protoc* 5:725–738.
55. Yang J, Zhang Y. 2015. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res* 43:W174–W181.
56. 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.
57. Zhang Y. 2008. I-TASSER server for protein 3D structure prediction. *BMC Bioinformatics* 9:40.
58. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, de Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R, Schwede T. 2018. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res* 46:W296–W303.
59. Bailey TL, Johnson J, Grant CE, Noble WS. 2015. The MEME Suite. *Nucleic Acids Res* 43:W39–W49.
60. Desta IT, Porter KA, Xia B, Kozakov D, Vajda S. 2020. Performance and Its Limits in Rigid Body Protein-Protein Docking. *Structure* 28:1071-1081.e3.
61. Vajda S, Yueh C, Beglov D, Bohnuud T, Mottarella SE, Xia B, Hall DR, Kozakov D. 2017. New additions to the C lus P ro server motivated by CAPRI. *Proteins Struct Funct Bioinforma* 85:435–444.

62. Kozakov D, Hall DR, Xia B, Porter KA, Padhorny D, Yueh C, Beglov D, Vajda S. 2017. The ClusPro web server for protein–protein docking. *Nat Protoc* 12:255–278.
63. Kozakov D, Beglov D, Bohnuud T, Mottarella SE, Xia B, Hall DR, Vajda S. 2013. How good is automated protein docking?: Automated Protein Docking. *Proteins Struct Funct Bioinforma* 81:2159–2166.
64. 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.
65. 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.
66. 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 Clustal Omega. *Mol Syst Biol* 7:539.
67. Berman HM. 2000. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* 28:235–242.
68. BIOVIA., Dassault Systèmes, [Discovery Studio Visualizer], [Software version 4.5], San Diego: Dassault Systèmes, [2022]
69. De Avila E Silva S, Echeverrigaray S, Gerhardt GJL. 2011. BacPP: Bacterial promoter prediction—A tool for accurate sigma-factor specific assignment in enterobacteria. *J Theor Biol* 287:92–99.
70. Hochschild A, Dove SL. 1998. Protein–Protein contacts that activate and repress prokaryotic transcription. *Cell* 92:597–600.
71. Kumar S, Rai AK, Mishra MN, Shukla M, Singh PK, Tripathi AK. 2012. RpoH2 sigma factor controls the photooxidative stress response in a non-

- photosynthetic rhizobacterium, *Azospirillum brasilense* Sp7. *Microbiology* 158:2891–2902.
72. García Ordaz DM. 2011. Identificación de secuencias reguladoras mediante agrupamiento. Tesis de Maestría. INAOE, Puebla.
73. Qi Q, Steinbüchel A, Rehm BHA. 2000. In vitro synthesis of poly(3-hydroxydecanoate): purification and enzymatic characterization of type II polyhydroxyalkanoate synthases PhaC1 and PhaC2 from *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 54:37–43.
74. Hauf W, Watzer B, Roos N, Klotz A, Forchhammer K. 2015. Photoautotrophic polyhydroxybutyrate granule formation is regulated by cyanobacterial phasin PhaP in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *Appl Environ Microbiol* 81:4411–4422.
75. Ushimaru K, Motoda Y, Numata K, Tsuge T. 2014. Phasin proteins activate *Aeromonas caviae* polyhydroxyalkanoate (PHA) synthase but not *Ralstonia eutropha* PHA synthase. *Appl Environ Microbiol* 80:2867–2873.
76. Tian S-J, Lai W-J, Zheng Z, Wang H-X, Chen G-Q. 2005. Effect of over-expression of phasin gene from *Aeromonas hydrophila* on biosynthesis of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyhexanoate. *FEMS Microbiol Lett* 244:19–25.

Anexos

Anexo I

Técnicas de laboratorio

Preparación de medios de cultivo

Medio Luria Bertani (LB)

- Reactivos para 1 L de medio LB
 - Extracto de levadura 5 g
 - NaCl 10 g
 - Peptona de caseína 10 g
- Agua Aforar a 1 L
- Ajustar pH 7.0 con NaOH. Si se requiere medio sólido agregar 15 g de Agar.
- Esterilizar a 15 lb durante 20 min.

Medio Mínimo K-Malato (MMKM)

- Preparar soluciones stock de sales y oligoelementos

Sales para MMKM

- CaCl₂ 0.7%
- FeCl₃ 1%
- NaMoO₄ 0.5%
- NH₄Cl 20%

Oligoelementos

- MnSO₄ 2.5 g
- ZnSO₄ 0.7 g
- CoSO₄ 0.14 g
- CuSO₄ 0.125 g
- H₃BO₃ 0.03 g

- Agua aforar a 100 mL
- Preparar la base K- Malato

Base K – Malato

- KH_2PO_4 0.87 g
- K_2HPO_4 1.67 g
- MgSO_4 0.29 g
- NaCl 0.48 g
- Acido Málico 4.5326 g
- Agua Aforar a 950 mL
- Ajustar pH 6.9 con KOH. Si se requiere medio sólido agregar 15 g de Agar.
- Esterilizar sales, oligoelementos y base K-Malato por separado 5 lb durante 30 min.
- Una vez esterilizadas las sales, los oligoelementos y la base K-Malato agregar 10 mL de cada una de las sales (CaCl_2 , FeCl_3 , NaMoO_4 y NH_4Cl) y de la solución stock de oligoelementos a 950 mL de Base K-Malato.

Extracción de DNA genómico de *A. brasilense* (Cheng y Chiang, 2006)

- Inocular por estriado 10 μl del cultivo en glicerol de *A. brasilense* Sp7 en una placa Petri conteniendo medio de cultivo sólido MMKM o RC suplementado con el antibiótico de selección.
- Incubar la placa Petri durante 48 – 72 hr a 32 °C.
- Inocular una colonia en un matraz de 125 mL conteniendo 25 mL de medio de cultivo líquido MMKM suplementado con antibiótico.
- Incubar 24 hr a 32 °C y 150 rpm. Centrifugar (8000 rpm x 10 min) 10 mL de cultivo en un tubo eppendorf de 1.5 mL y descartar el sobrenadante.
- Lavar el paquete celular con 400 μl de buffer STE (Anexo II).
- Repetir una vez más.
- Resuspender el paquete celular en 200 μl de buffer TE (Anexo II).
- Agregar 100 μl de Fenol saturado con Tris (pH 8) (Anexo II).
- Agitar vigorosamente en vórtex durante 60 seg.
- Centrifugar a 13000 rpm durante 10 min a 4 °C.
- Se obtendrán una fase orgánica (fenol y/o cloroformo), una interfase blanca (detritos celulares) y una fase acuosa (ácidos nucleicos).

- Recuperar la fase acuosa en un tubo eppendorf de 1.5 mL y agregar 40 μ l de buffer TE.
- Adicionar 100 μ l de cloroformo, mezclar vigorosamente en vórtex y centrifugar a 13000 rpm durante 5 min a 4 °C.
Repetir los dos pasos anteriores hasta que la interfase blanca no esté presente (aproximadamente 3 – 4 veces).
- Separar la fase acuosa en tubo eppendorf nuevo.
- Agregar 5 μ l de RNasa H (10 mg/mL) e incubar a 37 °C durante 10 min.
- Agregar 100 μ l de cloroformo, mezclar vigorosamente y centrifugar a 13000 rpm durante 5 min a 4 °C.
- Transferir 150 μ l de la fase acuosa a un tubo eppendorf.
- Evaluar la pureza y rendimiento.
- Almacenar a -20 °C.

Protocolo de amplificación mediante PCR (ThermoScientific)

Mezcla de reacción para 20 μ L:

Buffer <i>Pfu</i> DNA polimerasa recombinante 10X	2 μL
MgSO₄ 25 mM	1.6 μ L
dNTP 2 mM cada uno	2 μ L
Oligonucleótido delantero	1 μ M
Oligonucleótido reverso	1 μ M
DNA molde	0.5 μ M
DMSO	1 μ L
<i>Pfu</i> DNA recombinante (2.5 U/ mL)	0.5 U
Agua Pisa estéril	cbp 20 μ L

- Mezclar suavemente y centrifugar 5 seg
- Colocar los tubos en el termociclador y ajustar los parámetros

Desnaturalización inicial: 94°C durante 5 min

25- 30 ciclos { Desnaturalización: 94 °C durante 30 seg
 Hibridación: 55 °C (σ^{24}) y 63 °C (σ^{32}) 30 seg
 Extensión: 72 °C, 2 min por kb

Extensión final: 72 °C durante 5 min

- Una vez finalizado el proceso, se correrá la muestra en una electroforesis en gel de agarosa al 1%.
- Visualizar con la luz UV después de haber teñido el gel con bromuro de etidio

Electroforesis en gel de agarosa

- Calcular la concentración de agarosa requerida con bases en la siguiente tabla:

% de agarosa	Rango (Kb)	Aplicación
0.3	60 a 50	Evaluación de la integridad YAC
0.5	30 a 1	Visualización de construcciones artificiales
0.7	12 a 0.8	Evaluación de la integridad de
1	10 a 0.5	Evaluación de la integridad de DNA genómico
1.2	7 a 0.3	Visualizar productos PCR entre 100 y 2000 pb
1.5	4 a 0.2	Evaluación de la integridad de RNA y propósito general

2	3 a 0.1	Tamizaje de productos de PCR pequeños entre 50 y 200 pb
3	< 0.1	Visualización de STRs, tamizaje de productos pequeños entre 50 y 200 pb

- Pesar la agarosa y disolver en el volumen correspondiente de buffer TAE 1X calentando por lapsos en horno de microondas
- Una vez disuelta la agarosa, esperar a que enfríe hasta aproximadamente 50 °C
- Colocar el peine en la cámara electroforética y vierta la agarosa disuelta.
- Permitir la solidificación del 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).

Protocolo de digestión de DNA con endonucleasas de restricción (modificado de ThermoScientific)

- Mezcla de reacción para 10 µL.

Buffer 10X específico de enzima o para doble digestión	1 μ L
Enzima de restricción 1 (10 U/ μ L)	1 μ L
Enzima de restricción 2 (10 U/ μ L)	1 μ L
DNA	0.5 – 1 μ g/ μ L
Agua PISA estéril	Cbp 10 μ L

- Mezclar suavemente y centrifugar 5 seg.
- Incubar a 37 °C durante 8 – 16 h.
- Inactivar la (s) enzima (s) de restricción a 65 u 80 °C durante 10 min.

Protocolo de ligación de fragmentos de DNA de extremos cohesivos en vector de clonación/expresión (modificado de ThermoScientific)

- Mezcla de reacción para 10 μ L.

Buffer 10X T4 DNA ligase	1 μ L
Vector de clonación/expresión lineal	25 ng
DNA para clonar	3:1 o 5:1 (relación molar inserto: vector)
PEG 4000 50%	0.5 μ L
ATP 10 mM	0.5 μ L
T4 DNA ligasa	1 U Weiss
Agua PISA estéril	cbp 10 μ L

- Incubar la mezcla de reacción durante 8 hr a 16 °C.
- Usar 5 μ L de la mezcla para transformar 50-100 μ L de células químiocompetentes

Protocolo de elaboración de células químiocompetentes (Ramírez, 2013)

- Estriar una colonia de la cepa *E. coli* S17-1 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. Incubar de 12 a 24 hr a 37 °C y 200 rpm.
- A partir del pre-cultivo anterior, inocular, a una D.O._{600 nm} de 0.1, 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 D.O._{600 nm} de 0.5 - 0.6 (aproximadamente de 5 – 7 hr).

- Mantener el cultivo en hielo 20 min.
- Obtener el paquete celular de 10 mL de cultivo centrifugando a 4 °C durante 1 min a 8000 rpm muestras de 1 mL en tubos eppendorf de 1.5 mL. 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)

- Agregar 1 µg de la construcción plasmídica en 100 µL de células químiocompetentes (*E. coli* S17-1) cuidadosamente descongeladas.
- Resuspender levemente.
- Incubar las células en hielo durante 30 min.
- Aplicar choque térmico a 42 °C durante 45-90 seg.
- Mantener en hielo durante 2 min.
- Agregar 250 µl de medio líquido LB precalentado a 42 °C.
- Incubar las células a 37 °C y 200 rpm durante 1:30-2:00 hr 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 hr a 37 °C.
- Analizar las clonas obtenidas.

Extracción y purificación de DNA plasmídico (Sambrook, 1998).

- 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 hr 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.
- Re suspender 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 seg.
- 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 vórtex.
- Centrifugar a 4 °C durante 5 min a 12,000 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 µL de una solución de RNasa H (40 µg/mL).
- Incubar a 37 °C durante 30 min.
- Analizar pureza y rendimiento.

Quantificación espectrofotométrica de ácidos nucleicos.

- Diluir 10 µL de DNA o RNA en 990 µL de agua PISA estéril.
- Calibrar el espectrofotómetro con 1 mL de agua PISA estéril.
- Leer la D.O._{260 nm}
- Obtener la concentración de ADN (1 D.O. 260 nm = 50 µg/mL) = o ARN (1 D.O._{260 nm} = 40 µg/mL).

Ejemplo

$$D.O_{260 \text{ nm}} \text{ ADN} = 0.789$$

$$\text{ADN } (\mu\text{g/mL}) = (D.O_{.600 \text{ nm}}) (\text{Factor de dilución} - 1000/10-) (50 \mu\text{g/mL})$$

$$\text{ADN } (\mu\text{g/mL}) = (0.789) (100) (50)$$

$$\text{ADN } (\mu\text{g/mL}) = 3945 \mu\text{g/mL} = 3.9 \mu\text{g/ } \mu\text{L}$$

$$D.O_{260 \text{ nm}} \text{ ARN} = 0.447$$

$$\text{ARN } (\mu\text{g/mL}) = (D.O_{.600 \text{ nm}}) (\text{Factor de dilución}) (40 \mu\text{g/mL})$$

$$\text{ARN } (\mu\text{g/mL}) = (0.447) (100) (40)$$

$$\text{ARN } (\mu\text{g/mL}) = 1788 \mu\text{g/mL} = 1.7 \mu\text{g/ } \mu\text{L}$$

Anexo II.

Preparación de soluciones

Preparación de antibióticos

- **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 μm . Almacenar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Concentración de trabajo 100 $\mu\text{g/mL}$.
- **Estreptomicina (20 mg/mL):** pesar 20 mg de sulfato de estreptomicina y disolver en 1 mL de agua tridestilada estéril. Esterilizar por filtración usando filtros de 0.22 μm . Almacenar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Concentración de trabajo 20 $\mu\text{g/mL}$.
- **Kanamicina (50 mg/mL):** pesar 50 mg de kanamicina y disolver en 1 mL de agua tridestilada estéril. Esterilizar por filtración usando filtros de 0.22 μm . Almacenar a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Concentración de trabajo 50 $\mu\text{g/mL}$.

Preparación de soluciones para extracción de DNA

Buffer PBS 1X

- NaCl 137 mM
- KCl 2.7 mM
- Na_2HPO_4 10 mM
- KH_2PO_4 1.8 mM

Buffer TE

- Tris 10 mM
- EDTA 1 mM
- Ajustar a pH 8 con HCl.

Buffer STE

- NaCl 100 mM,
- Tris 10 mM
- EDTA 1 mM

Ajustar a pH 8 con HCl.

Preparación de fenol Tris-HCl saturado (pH 8.0) 25 mL

Fundir 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 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 equivalente a 8.0. Almacenar el fenol en un frasco ámbar a 4 °C adicionando 1M de Tris-HCl pH 8.0.

Preparación de RNAsa H (10 mg/mL)

Disolver en agitación 20 mg del enzima en 10 ml de agua tridestilada, calentar a 90 °C durante 10 m para inactivar DNAsas. Alicuotar y guardar a - 20 °C. Concentración de trabajo 10 µg/mL

Soluciones para electroforesis en gel de agarosa

Buffer TAE 50 X pH 8.0

- Tris base 242 g
- Ác. acético glacial 57.1 mL
- EDTA 37.2 mL
- Agua cbp 1 L

Buffer de carga 6X

- Azul de bromofenol 0.25%
- Xilene Cyanol 0.25%
- Glicerol 30%
- Agua cbp 10 mL

Marcador 1 Kb plus

- DNA ladder 10 µL
- Buffer de carga 6X 10 µL
- Agua 40 µL

Soluciones para Miniprep

Solución I

- Glucosa 50 mM
- Tris-HCl 25 mM
- EDTA 10 mM

Solución II

- SDS 1%
- NaOH 0.2 N

Solución III

- Ác. Acético 11.5 mL
- Acetato de Potasio 5M 60 mL
- Agua 28.5 mL

Anexo III

Busqueda de motivos promotores para los factores σ^{24} y σ^{32} mediante BacPP.

Positions	Dna	S24	S32	
143	223	CGACCGAACAGACTTCCGGCAGGCACTGTATAAACCGCACAACTCCCTCCTGAAGCCTAAAACCTCGCCTAAAGAAGAAG	20	71
144	224	GACCGAACAGACTTCCGGCAGGCACTGTATAAACCGCACAACTCCCTCCTGAAGCCTAAAACCTCGCCTAAAGAAGAAGG	0	66
145	225	ACCGAACAGACTTCCGGCAGGCACTGTATAAACCGCACAACTCCCTCCTGAAGCCTAAAACCTCGCCTAAAGAAGAAGGA	15	69
152	232	AGACTTCCGGCAGGCACTGTATAAACCGCACAACTCCCTCCTGAAGCCTAAAACCTCGCCTAAAGAAGAAGGACCGCAC	20	0