

## Tesis de Posgrado

# Estudios genéticos de la biosíntesis de PHA en *Bacillus megaterium* : clonado del gen de la Beta-cetotilasa

Pettinari, María Julia

1994

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

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

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

**Cita tipo APA:**

Pettinari, María Julia. (1994). Estudios genéticos de la biosíntesis de PHA en *Bacillus megaterium* : clonado del gen de la Beta-cetotilasa. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2626\\_Pettinari.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2626_Pettinari.pdf)

**Cita tipo Chicago:**

Pettinari, María Julia. "Estudios genéticos de la biosíntesis de PHA en *Bacillus megaterium* : clonado del gen de la Beta-cetotilasa". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1994.

[http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis\\_2626\\_Pettinari.pdf](http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2626_Pettinari.pdf)

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

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TITULO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLOGICAS**

**ESTUDIOS GENETICOS DE LA BIOSINTESIS DE  
PHA EN *Bacillus megaterium*. CLONADO DEL GEN  
DE LA  $\beta$ -CETOTIOLASA.**

**LIC. MARIA JULIA PETTINARI**

**DIRECTORA: DRA. BEATRIZ S. MENDEZ**

**LUGAR DE TRABAJO: LABORATORIO DE GENETICA BACTERIANA  
DEPARTAMENTO DE QUIMICA BIOLOGICA**

**Esta tesis está dedicada ( en estricto orden cronológico)**

**A mis padres**

**A Sergio**

**A Franco**

**Al que llega en la próxima primavera.**

Deseo agradecer a la Dra. Beatriz Méndez por brindarme la posibilidad de realizar este trabajo, y por su constante apoyo y estimulación.

A Mirtha Floccari por haber compartido durante todos estos años lo bueno y lo malo de este trabajo, y por compartir conmigo su experiencia.

A Gustavo Vázquez, Nancy López, Sandra Ruzal, Adriana Cucchi, Diana Vullo, Patricia Gadaleta, Guillermo Castro, Alejandro Alice y Marina, por contribuir a que el clima de trabajo sea muy agradable, y a Gustavo además por las determinaciones de PIIB. A la Dra. Carmen Rivas por su apoyo.

A todos los que pasaron por el laboratorio en algún momento: Pablo Cueto, Rubén Benedetti, Sofía Ivanier, Gustavo Tiscornia, Fabián Palmada, Gabriel Gellon, Rolando Brawer.

A la gente de Virología, por los innumerables préstamos y consultas, a los de Inmuno y Biología Celular, a la gente de Biología Molecular, y en general a todos aquellos que me ayudaron de una manera u otra durante este trabajo, con información, material o consuelo.

A mis compañeros de cursada, ex-alumnos y otros jóvenes investigadores que diseminados por varios institutos siempre estuvieron dispuestos a prestarme una enzima, un vector, o pasarme un protocolo. En este rubro están, entre muchos otros, Alejandro Petroni y Sandra Fernández, del IIB.

A Francisca Caruso y Carmen Castro por el imprescindible y valioso trabajo que ellas realizan, y a Liliana y las secretarías del departamento por su ayuda en los trámites, siempre necesarios.

A mis padres, que siempre confiaron en mí.

A Sergio, por apoyarme y ayudarme a pesar de tantas cosas.

A Franco, por darme una razón más para todo ...

Al que llega en septiembre, por aguantar los nervios y las corridas.

A todos los que merecerían estar en esta lista, y por descabezada no los nombro.

# INDICE

	pag.
<b>INTRODUCCION</b>	<b>8</b>
<b>I. LOS POLIHIDROXIALCANOATOS</b>	<b>9</b>
I.a. El PHB, un polímero de reserva	9
I.b. Otros polihidroxicanoatos	9
I.c. Importancia biotecnológica	10
I.d. Condiciones en las que se produce la acumulación	10
I.e. Caminos biosintéticos de PHAs en diferentes microorganismos	11
I.f. Regulación de la síntesis de PHA	11
I.g. Estrategias utilizadas en el clonado de los genes PHA	13
I.h. Organización genética de los genes PHA en varias especies bacterianas	14
II <i>Bacillus megaterium</i>	17
<b>OBJETIVOS</b>	<b>18</b>
<b>MATERIALES Y METODOS</b>	<b>19</b>
<b>I. MEDIOS DE CULTIVO y BUFFERS UTILIZADOS</b>	<b>20</b>
<b>II. CEPAS BACTERIANAS PLASMIDOS Y FAGOS</b>	<b>25</b>
<b>III. PREPARACION DE CULTIVOS de <i>B.megaterium</i></b>	<b>27</b>
III.a. Cultivos exponenciales en medio líquido	27
III.b. Conservación de los cultivos	27
III.c. Preparación de pellets para mediciones enzimáticas.	28
<b>IV ENSAYOS COLORIMETRICOS PARA DETERMINAR PRESENCIA DE INCLUSIONES DE PHB</b>	<b>28</b>
IV.a. Coloración fluorescente con Azul del Nilo A (Nile Blue A)	28
IV.b. Coloración con Negro Sudán B	29
Tinción en portaobjeto	29

Tinción de colonias en placa	29
V. CUANTIFICACION DE PHB	29
V a. Cuantificación espectrofotométrica de PHB	30
V b. Cuantificación de PHB por cromatografía gaseosa	31
VI. MEDICION DE ENZIMAS DEL METABOLISMO BIOSINTETICO DE PHB	32
VI.a. Medición de $\beta$ -cetotiolasa en extractos celulares crudos	32
VI.b. Medición de acetoacetyl-CoA reductasa en extractos celulares crudos	33
VI.c. Determinación de la concentración de proteínas	35
VII. PUESTA A PUNTO DEL RASTREO DE CLONES CON ACTIVIDAD DE $\beta$ -CETOTIOLASA DE BIBLIOTECAS GENOMICAS DE <i>B.megaterium</i> EN <i>E.coli</i>	35
VIII RASTREO DE CLONES CON ACTIVIDAD DE $\beta$ -CETOTIOLASA DE BIBLIOTECAS GENOMICAS DE <i>B.megaterium</i> EN <i>E.coli</i>	36
IX. TRANSFORMACION DE PROTOPLASTOS DE LA CEPA PV447	38
IX a. Obtención de protoplastos	38
IX. b Transformación	38
X. OBTENCION DE INSERCIONES DEL TRANSPOSON Tn917 EN EL CROMOSOMA DE <i>B.megaterium</i> PV447	38
X.a. Introducción de pTV54 en <i>B.megaterium</i>	38
X.b. Eliminación del vector de transposición	39
X.b.1. Eliminación en medio líquido	39
X.b.2. Eliminación en medio sólido.	39
X.c. Rastreo de mutantes PHB entre los transpuestos	40
XI. OBTENCION DE LISADOS DEL FAGO MP13	40
XII. TITULACION DE LISADOS DEL FAGO MP13	40
XIII TRANSDUCCION DE LA CEPA UBA 30-21 A LA CEPA PV447	41
XIV EXTRACCION DE PLASMIDOS	41

XIV a. Protocolo 1 ( utilizado para extraer plásmidos de cepas de <i>B.subtilis</i> , <i>B.megaterium</i> y <i>E.coli</i> )	41
XIV.b. Protocolo 2 ( utilizado para extraer el cósmido pVK102 y sus derivados )	42
XV. EXTRACCION DE DNA GENOMICO de <i>B.megaterium</i>	44
Gradiente de CsCl	
Precipitación con etanol	
XVI. CORTE DE DNA CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y ANALISIS EN GELES DE AGAROSA	45
XVII. OBTENCION DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE PLASMIDOS PARA USAR COMO SONDAS	46
XVII.a. Sonda para Tn917	46
XVII.b. Sondas de genes <i>phb</i> de <i>A.eutrophus</i>	47
XVII.c. Sonda de $\beta$ -cetotiolasa de <i>B.megaterium</i>	49
XVIII. RECUPERACION DE LOS FRAGMENTOS DE LOS GELES DE AGAROSA	49
XIX. TRANSFERENCIA DE DNA GENOMICO A MEMBRANAS DE NYLON	50
XX. MARCADO NO RADIOACTIVO DE SONDAS CON BIOTINA	50
XXI. HIBRIDIZACION DE DNA UNIDO A MEMBRANAS DE NYLON CON SONDAS BIOTINILADAS.	51
XXI.a. Prehibridización	51
XXI b. Hibridización	51
XXI c. Lavados	51
XXI.d. Visualización	52
XXII. CLONADO DE LA REGION DE LA INSERCIÓN DE Tn917 DEL CROMOSOMA DE LA CEPA UBA 30-21 EN EL COSMIDO pVK102	52
XXII a. Digestión parcial del DNA genómico de la cepa UBA 30-21 con Xho I	52
XXII b. Fraccionamiento del DNA por peso molecular en gradiente de sacarosa	53
XXII c. Preparación del DNA del vector para la reacción de ligado	54
XXII d. Ligado	54

XXII f. Rastreo de clones conteniendo Tn <sup>017</sup>	
XXII e. Rastreo de clones con actividad de $\beta$ -cetotiolasa	
XXIII. ANALISIS DEL COSMIDO pBM112	
XXIV. SUBCLONADO DEL FRAGMENTO CON ACTIVIDAD DE $\beta$ -CETOTIOLASA	
XXIV a. Preparacion y ligado de los fragmentos a pUC19	
XXIV b. Transformación de células competentes de <i>E.coli</i> HB101 con los plásmidos recombinantes	
XXIV c. Medición de la actividad de $\beta$ -cetotiolasa de los clones	
<b>RESULTADOS</b>	<b>59</b>
<b>I. PASTREO DE GENES PHB EN UNA BIBLIOTECA GENOMICA DE <i>B.megaterium</i> EN <i>E.coli</i></b>	<b>60</b>
I a. Pastreo de un clon productor de $\beta$ -cetotiolasa	60
I b. Analisis del clon productor de $\beta$ -cetotiolasa	62
I b.1. Determinación de la actividad específica de $\beta$ -cetotiolasa	62
I b.2. Analisis del plásmido recombinante del clon UBA1-36	63
I b.2.1. Analisis con enzimas de restricción	63
I b.2.ii. Analisis de resistencias a antibióticos	65
<b>II. OBTENCION DE MUTANTES PHB POR INSERCIÓN DEL TRANSPOSON Tn<sup>017</sup> EN EL CROMOSOMA DE <i>B.megaterium</i></b>	
II a. Obtención de inserciones	68
II a.1. Transformación de <i>B.megaterium</i> PV447 con el plásmido termosensible pTV54	68
II a.2. Eliminación del plásmido	68
II a.2.i. Eliminación en medio líquido	68
II a.2.ii. Eliminación de plásmido en medio sólido	69
II b. Rastreo de mutantes deficientes en PHB	72
<b>III. CARACTERIZACION DE LA CEPA UBA30-21</b>	<b>75</b>



III a. Confirmación de la inserción	
III a.1 Resistencias a antibióticos	
III a.2 Evidencia física de la ausencia de plásmido	
III a.3 Hibridización de ADN cromosomal de UBA30-21 con una sonda de Tn <sup>917</sup>	
III b. Caracterización enzimática	
III b.1 Determinación de la actividad de $\beta$ -cetotiolasa	
III b.2 Determinación de la actividad de acetoacetyl-CoA reductasa	
III c. Cuantificación de PHB	78
III c.1 Cuantificación de PHB por el método espectrofotométrico.	78
III c.2 Cuantificación de PHB por el método cromatográfico	79
III d. Otras características fenotípicas	80
III d.1 Aspecto externo	80
III d.2 Sensibilidad de UBA30-21 al fago MPI3	80
III d.3 Búsqueda de fusiones a $\beta$ galactosidasa	82
III d.4 Crecimiento en LB y LB suplementado con hidratos de carbono	82
IV. TRANSDUCCIÓN DE UBA30-21 A PV447	86
IV a. Obtención de transductantes Em <sup>R</sup> Lm <sup>R</sup>	86
IV b. Análisis de los transductantes	86
IV b.1 Contenido de PHB estimado por tinciones	86
IV b.2 Determinación de $\beta$ -cetotiolasa	87
IV b.3 Determinación de la actividad de acetoacetyl-CoA reductasa	87
IV b.4 Cuantificación del contenido de PHB por el método de los discos (espectrofotométrico)	87
V EXPERIMENTOS DE HIBRIDIZACIÓN DE ADN GENÓMICO DE <i>B.megaterium</i> PV447 Y UBA30-21 CON SONDAS DE GENES PHB.	88
V a. Hibridizaciones con una sonda que contiene el gen de la $\beta$ -cetotiolasa de <i>B.megaterium</i>	89
V b. Hibridizaciones con sondas que contienen fragmentos de los genes <i>pha</i> de <i>Alcaligenes eutrophus</i> .	90
VI. CLONADO DE LA REGIÓN DE LA INSERCIÓN DE LA CEPA UBA30-21	92
VI a. Obtención de fragmentos de tamaño adecuado del cromosoma de UBA30-21	92
VI b. Ligado y empaquetado	93
VI c. Transfección y selección de clones con el inserto deseado	94

VI d. Analisis del clon UBA 1-37

VI d f Analisis del cósmido del clon UBA 1-37

VI e. Subclonado del gen tiolasa del cósmido del clon UBA 1-37

VI f. Analisis de la cepa UBA 1-38

VI f f. Medición de  $\beta$ -cetotiolasa y acetoacetyl-CoA reductasa

## **DISCUSION**

## **BIBLIOGRAFIA**

## **ABREVIATURAS**

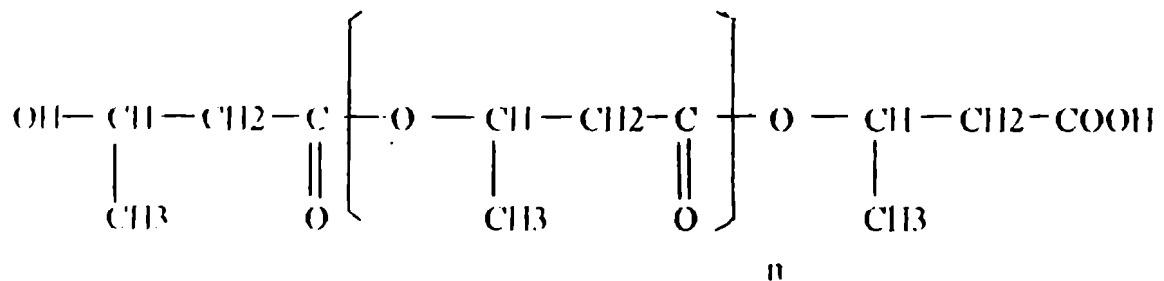
## **INTRODUCCION**

## I. LOS POLIHIDROXIALCANOATOS

### I.a. El PHB, un polímero de reserva

Los animales y plantas poseen materiales de reserva de distinta naturaleza química que los proveen de materia y energía para la realización de numerosas funciones. Estos materiales de reserva también existen en los microorganismos y los proveen endógenamente de energía y carbono para procesos específicos como el mantenimiento del pH interno, regulación osmótica y esporulación (Davies y Senior, 1973).

Uno de estos materiales de reserva, el poli-3-hidroxi-3-butanato (PHB) se encuentra como un homopolímero lineal de D(-)-3-hidroxi-3-butanato, cuya fórmula general se muestra a continuación, en diversos microorganismos.



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

### I.b. Otros polihidroxi-3-butanatos

Un rastreo intenso de microorganismos productores de PHB o poliésteres similares permitió detectar distintas unidades 3-hidroxi-3-butanatos. Hasta el presente se han descrito casi 35 diferentes ácidos saturados de cadena lineal comprendida entre 3 y 12 C; 3-hidroxi-3-butanatos no saturados de longitud de cadena entre 5 y 14 C, así como ácidos ramificados, entre otros componentes (Steinbüchel, 1991). De esta manera, además del PHB, se han descrito diferentes 3-polihidroxi-3-butanatos (PHAs).

En la mayor parte de las especies bacterianas los PHAs están localizados en gránulos que se visualizan al microscopio por tinción con los colorantes específicos Negro Sudán (Smibert y Erieg, 1981) y Azul del Nilo (Ostle y Holt, 1982).

### **I.c. Importancia biotecnológica**

Los PHAs poseen propiedades biotecnológicas de interés pues a partir de estos polímeros pueden elaborarse plásticos rígidos o flexibles. De acuerdo al número de C de las unidades que lo componen, varían las propiedades de flexibilidad y solubilidad de los plásticos y por lo tanto su aplicación comercial. El poli(3HB-co-3HV) es actualmente producido por la compañía inglesa ICI a escala industrial bajo el nombre comercial Biopol y se utiliza para la fabricación de películas y envases.

La ventaja que tienen estos materiales con respecto de los plásticos obtenidos por síntesis química, a excepción del poliláctico, es que pueden ser completamente degradado por bacterias, hongos y algas, y se producen a partir de sustratos renovables.

Por ser estos poliésteres biodegradables y carecer de toxicidad son adecuados para varias aplicaciones en el campo de la medicina. Ejemplos de estas aplicaciones son la fabricación de cápsulas para la liberación controlada de drogas, suturas quirúrgicas, vendajes y lubricantes para guantes de cirugía. (Malm et al 1992)

### **I.d. Condiciones en las que se produce la acumulación**

El PHB, así como la mayoría de los PHAs, se sintetizan y acumulan en las células si se les provee de un exceso de fuente de carbono pero se restringe la proliferación celular mediante la limitación de nutrientes esenciales para el crecimiento como nitrógeno, sulfato, fósforo, hierro, magnesio o potasio. En muchas bacterias aerobias, la síntesis de PHB también se inicia si no se puede alcanzar el máximo grado de crecimiento debido a una limitada disponibilidad de oxígeno.

En *Bacillus megaterium* la acumulación de PHB se produce en condiciones de crecimiento limitadas en nitrógeno, con exceso de fuente de carbono (Macrae y Wilkinson, 1958).

Si las condiciones ambientales cambian, permitiendo nuevamente la proliferación, o si la fuente de carbono externa se agota, los poliésteres se movilizan, proveyendo a la célula de carbono y energía.

Además de este rol, que aumenta la sobrevivencia en condiciones extremas en numerosas especies bacterianas, el biopolímero provee energía para el proceso de esporulación en *Bacillus* (Slepecky, 1961) y para la formación de cistos en *Azotobacter* (Lemoigne y Girard, 1943).

### **I.e. Caminos biosintéticos de PHAs en diferentes microorganismos**

Los caminos metabólicos de síntesis y degradación de PHB han sido analizados bioquímicamente en varios microorganismos, entre ellos *A. eutrophus* (Oeding y Schlegel, 1973).

En esta especie bacteriana, la biosíntesis de PHB consta de tres pasos. En el primer paso una  $\beta$ -cetotiolasa biosintética produce la condensación de 2 moléculas de acetil-CoA formando acetoacetil-CoA. Luego una acetoacetil-CoA reductasa NADPH dependiente reduce de manera estereoespecífica al compuesto anterior, produciendo D(-)-3-hidroxiacetil-CoA. La polimerización es entonces producida por una PHB sintasa, que transfiere el grupo acilo a un primer del polímero.

Este camino metabólico también se encontró en *Azotobacter beijerinckii* y *Zooglea ramigera*, y es el más utilizado entre los microorganismos estudiados.

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

Otro camino biosintético de PHA es el que realiza *P. oleovorans* y otras Pseudomonas que pertenecen al grupo I de homología de rRNA, que da poli-3-hidroxiácidoalcanoatos de cadena media cuando se cultiva en un medio con alcanos, alcoholes o ácidos alcanoicos como fuente de carbono. (Brand et al, 1988)

Es probable que en estas bacterias productos intermedios de la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos se deriven hacia la biosíntesis de PHA.

*P. aeruginosa* y otras Pseudomonas del grupo I, pero no *P. oleovorans* sintetizan poli-3-hidroxiácidoalcanoatos de cadena media a partir de sustratos simples como glucosa (Timm y Steinbüchel, 1990) utilizando una vía metabólica diferente.

### **I.f. Regulación de la síntesis de PHA**

La regulación de la biosíntesis de estos polímeros se ha estudiado en detalle en dos especies bacterianas. Dawes y Senior la estudiaron en *Azotobacter beijerinckii*, y Schlegel y sus colaboradores en *A. eutrophus*.

En *Azotobacter beijerinckii* se demostró que el factor iniciador de la acumulación de PHB, en células crecidas en exceso de glucosa fijando nitrógeno atmosférico es la limitación de oxígeno. (Senior et al 1972). Se observó que varias enzimas

involucradas en reacciones de oxido-reducción del metabolismo de la glucosa, era común la inhibición por  $\text{NAD(P)H}_2$ , en particular dos enzimas intervinientes en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, citrato sintetasa, inhibida por  $\text{NADH}_2$ , e isocitrato deshidrogenasa, inhibida por  $\text{NADH}_2$  y  $\text{NADPH}_2$ .

Se propuso que cuando la bacteria se halla en condiciones de oxígeno limitante, disminuía la velocidad de oxidación de  $\text{NADPH}_2$ , produciéndose acumulación de este compuesto. Esto inhibiría las enzimas del ciclo de Krebs. En este caso, el acetil-CoA no podría ser oxidado rápidamente en esta vía, por lo que se produciría su acumulación, pudiendo ser utilizado en la biosíntesis de PHB.

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

En condiciones de crecimiento no restringido, con oxígeno en exceso, se esperaría que la concentración de CoA-SH fuese alta, y la de Acetil-CoA baja, debido a la actividad de la citrato sintetasa, que libera CoA-SH y utiliza los grupos acetilo para formar citrato.

La  $\beta$ -cetotiolasa es la primera enzima en el metabolismo del PHB. Su actividad en la dirección de la condensación es inhibida por CoA-SH, y de este modo se inhibe la síntesis de polímero.

En condiciones en que se oxidara el  $\text{NADPH}_2$ , aumentaría la concentración de CoA-SH por acción de la citrato sintetasa, inhibiéndose la actividad de la  $\beta$ -cetotiolasa, y, por ende, la síntesis de PHB.

En *A. eutrophus* se ha demostrado que las tres enzimas involucradas en la biosíntesis de PHB se expresan en forma constitutiva ( Haywood et al 1988a y b), y se encuentran en condiciones de crecimiento no restrictivas, por lo que no hay indicios de que la expresión de los genes PHB se regulen a nivel transcripcional o traduccional. La regulación se produce a nivel enzimático.

La  $\beta$ -cetotiolasa de *A. eutrophus*, al igual que la de *Azotobacter beijerinckii*, es inhibida por altas concentraciones de CoA-SH.

En organismos que acumulan PHAs bajo condiciones de crecimiento limitante diferentes a la limitación en la disponibilidad de oxígeno, como *B. megaterium* en condiciones limitantes de nitrógeno, azufre y potasio, o *A. eutrophus* en condiciones de nitrógeno limitante, pueden aplicarse consideraciones similares a las hechas para *Azotobacter beijerinckii*, pues en estos casos también aumentaría la concentración de  $\text{NAD(P)H}_2$ , desencadenando el proceso ya descrito.

### **1.g. Estrategias utilizadas en el clonado de los genes PHA**

Hasta el momento se han empleado cinco diferentes estrategias para el clonado de los genes intervinientes en la biosíntesis de los PHAs en diferentes microorganismos.

**Estrategia 1 : rastreo enzimático.**

Esta estrategia de clonado se basa en la identificación, en bibliotecas genómicas, de clones que expresen la actividad de la enzima que se desea rastrear. Para ello generalmente se realizan determinaciones enzimáticas de grupos de clones, y la enzima de elección es habitualmente la  $\beta$ -cetotiolasa, que se determina de manera relativamente sencilla y sensible.

De esta manera se detectaron los genes biosintéticos del PHB en *A. eutrophus*, ya que algunos clones con actividad de  $\beta$ -cetotiolasa también contenía los genes de las otras dos enzimas involucradas en la síntesis de PHB.

**Estrategia 2: utilización de sondas homólogas de DNA.**

La utilización de esta metodología requiere la disponibilidad de fragmentos de DNA que contengan los genes de interés marcados con algún marcador genético fácilmente reconocible, y en lo posible, seleccionable, como por ejemplo un transposón. Disponiendo de mutantes PHB<sup>-</sup> generadas por inserción de un transposón, es posible clonar la región de la inserción y utilizarla luego para rastrear los genes salvajes correspondientes en una biblioteca genómica. Esta estrategia se utilizó con éxito en *A. eutrophus*.

**Estrategia 3: utilización de sondas heterólogas de DNA.**

En algunas bacterias no se han desarrollado aún técnicas que permitan el aislamiento de mutantes que contengan un marcador fácilmente detectable, por lo que no es posible obtener las sondas homólogas requeridas en la estrategia anterior. Las PHA sintasas descritas hasta el momento presentan una alta homología entre sí. Debido a esta característica es posible utilizar los genes de las PHA sintasas ya clonados como sondas heterólogas para detectar los genes de las sintasas de organismos con contenido similar de G + C. Los genes de la biosíntesis de PHA de *A. eutrophus* fueron utilizados para detectar fragmentos genómicos de las bacterias *Chromatium*



*vinosum* y *Thiocystis violacea*, que contenían los genes involucrados en la biosíntesis de PHA.

**Estrategia 4:** utilización de oligonucleótidos como sondas.

A partir del estudio de las secuencias de las PHA sintetasas se han detectado zonas altamente conservadas. En base a esos estudios se diseñó un oligonucleótido sintético de 30-mer, que se utilizó para detectar el locus PHA de *Pseudomonas aeruginosa* y otros microorganismos.

**Estrategia 5:** complementación fenotípica de mutantes PHA<sup>-</sup>.

Para poder utilizar esta estrategia es necesaria la expresión heteróloga de los genes PHA empleados en el hospedador elegido, en el cual se introduce el DNA de la especie en estudio mediante un método adecuado.

Si se cultivan las células en condiciones óptimas para la acumulación de PHAs es posible distinguir, mediante la diferente opacidad de las colonias, cepas de *A. eutrophus*, *E. coli* o *P. oleovorans* que acumulan PHAs de aquellas que no lo hacen. De esta manera se pueden identificar los clones en los cuales los genes introducidos permiten la acumulación de polímero.

Mediante esta metodología se detectaron los locus PHA de *Rhodobacter sphaeroides*, *Rhodospirillum rubrum* y *Methylobacterium extorquens*, utilizando plásmidos conjugativos como vectores y una mutante PHB<sup>-</sup> de *A. eutrophus* como hospedador.

#### **1.h. Organización genética de los genes PHA en varias especies bacterianas**

Si bien las características principales de los caminos biosintéticos de los polihidroxicanoatos en distintas especies bacterianas son conocidos desde 1960, las primeras publicaciones sobre la organización genética de los mismos son de reciente data (Schubert et al, 1988; Slater et al, 1988; Peoples y Sinskey, 1989a), y sólo se tienen datos desde el punto de vista molecular de *A. eutrophus*, *Zooglea ramigera* y *Pseudomonas oleovorans*.

En *A. eutrophus*, los genes estructurales que codifican para las tres enzimas intervinientes en el camino biosintético de PHB están ubicadas en un operón, donde el primero de los genes es el de la polimerasa, denominado *phaC*, seguido por *phaA*, correspondiente a la β-cetotiolasa, y *phaB*, que codifica para una acetoacetyl-CoA reductasa NAD(P)H dependiente.

Se localizó el sitio de iniciación de la transcripción, precedido por una región que presenta homología con la secuencia consenso de los promotores dependientes de  $\sigma 70$ , y un sitio potencial de terminación de la transcripción a continuación del gen *phaB* (Schubert et al, 1991).

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

Paralelamente se logró identificar y clonar el gen responsable de la síntesis de otra  $\beta$ -cetotiolasa, que intervendría principalmente en el catabolismo de los ácidos grasos, aunque en sistemas enzimáticos reconstituidos se mostró casi tan eficiente como la enzima biosintética en la síntesis de PHB.

En *Zoogloea ramigera* se han identificado sólo los genes que codifican para la  $\beta$ -cetotiolasa y la (NADPH) reductasa, que están organizados en un operón. Los genes están precedidos por un promotor del tipo  $\sigma 70$ , y se ha identificado un posible sitio de terminación de la transcripción a continuación de *phaB*. (Peoples y Sinskey, 1989b). Aún no se ha logrado localizar el gen de la sintasa.

En *Pseudomonas oleovorans* y *P. aeruginosa*, se identificaron tres marcos de lectura abierta (ORF) en un fragmento de DNA que complementaba una mutante de *P.putida* defectiva en la síntesis de PHA. Dos de ellos presentan un alto porcentaje de identidad en sus secuencias aminoacídicas deducidas con la PHA sintasa de *A. eutrophus*, por lo que se cree que codifican para dos polimerasas. En ambas especies otro marco de lectura abierta, intercalado entre los anteriores, probablemente codifique para una PHB depolimerasa (Huisman et al, 1991; Timm y Steinbüchel, 1991).

Recientemente, se han clonado las PHB sintasas provenientes de los microorganismos fotosintéticos *Rhodospirillum rubrum* y *Rhodobacter sphaeroides* (Hustedde et al, 1992b) y de la especie gram positiva *Rhodococcus ruber* (Pieper y Steinbüchel, 1992).

En *Chromatium vinosum* se han identificado ORFs que codifican para las distintas enzimas involucradas en el metabolismo de PHA. En esta especie se ha descrito un nuevo gen involucrado en la biosíntesis de PHB, el gen *phaE*, cuya presencia se requiere para la expresión de la actividad de PHA sintetasa. (Liebergesell et al, 1993a).

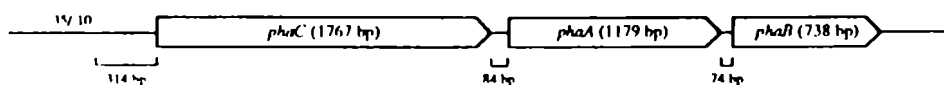
En *Thiocystis violacea* se ha clonado la región PHA, donde se encontraron cinco ORFs, entre los cuales se encuentran los genes que codifican para una  $\beta$ -cetotiolasa y

una sintasa, y un gen que presenta gran homología con el gen *phaE* de *Chromatium vinosum* (Liebergesell et al, 1993b).

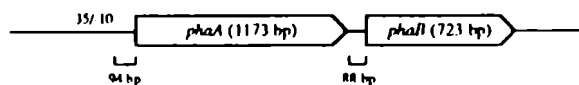
Las polimerasas de estos dos últimos microorganismos tienen un peso molecular un 35 a 40% menor que el de las polimerasas de las demás especies estudiadas. En ambos casos se observa la presencia del gen *phaE* "upstream" del gen que codifica para la sintasa, y se cree que probablemente constituyan un operón. Se podría especular que el producto de este gen cumple una función determinada en el proceso de polimerización, que las polimerasas de mayor peso molecular son capaces de cumplir por sí mismas. (Steinbüchel, 1992)

En la figura 1 se muestra la organización molecular de los genes *pha* de varias de las especies mencionadas.

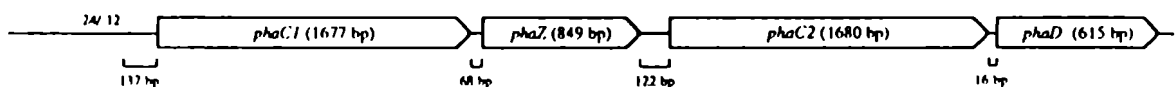
#### *Alcaligenes eutrophus*



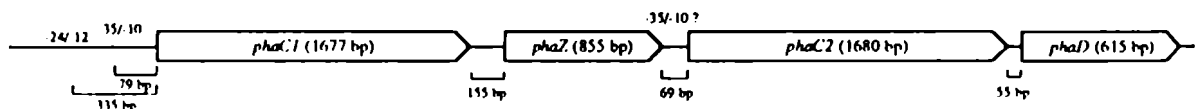
#### *Zoogloea ramigera*



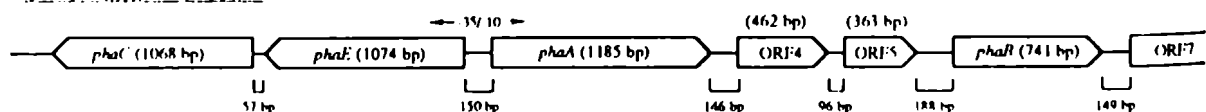
#### *Pseudomonas oleovorans*



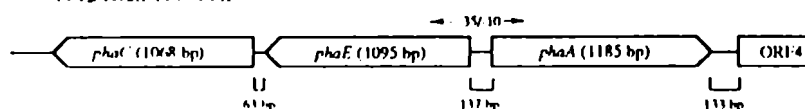
#### *Pseudomonas aeruginosa*



#### *Chromatium vinosum*



#### *Thiocystis violacea*



## ***Bacillus megaterium***

*B. megaterium* es un bacilo de gran tamaño, que alcanza entre 1.5 y 3 µm de diámetro y hasta 5 µm de longitud, que se encuentra normalmente en el suelo (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology). Ha sido utilizado en la producción industrial de varias enzimas y productos químicos, como amilasas, vitamina B<sub>12</sub>, penicilina amidasa y glucosa dehidrogenasa.

El compuesto de reserva más importante en esta especie es el PHB, que se acumula en condiciones limitantes de nitrógeno, fosfatos, azufre y potasio. El polímero actúa como fuente de energía durante el proceso de esporulación. (Slepecky, 1961)

*B. megaterium*, como la mayoría de las especies del género *Bacillus*, tiene una gran variedad de exoenzimas, que lo hacen capaz de utilizar numerosas fuentes de nutrientes en diferentes ambientes. Estas características lo hacen capaz de crecer en sustratos simples y económicos, lo que aumenta su atractivo desde el punto de vista de la utilización industrial.

En los últimos años se han desarrollado mucho los métodos genéticos que permiten realizar manipulaciones en este microorganismo.

*B. megaterium* no posee un estado de competencia natural, pero se pueden introducir una gran variedad de plásmidos en esta especie mediante transformación de protoplastos, que son fácilmente obtenidos por tratamiento con lisozima.

Se han aislado una variedad de fagos capaces de infectar a *B. megaterium*, entre los cuales el más estudiado es MP13, específico para esta especie, que se utiliza para realizar transducciones, y se ha empleado en el mapeo del genoma de este microorganismo. (Vary 1982).

El transposón Tn917, originario de *Streptococcus faecalis*, se ha introducido y ha sido capaz de transponer al azar en este microorganismo, sin el sitio preferencial en el locus *gII* que presenta en *Bacillus subtilis* (Bohall 1986). Este transposón es una herramienta de trabajo en la genética de *B. megaterium* debido a la existencia de varios derivados que posibilitan la obtención de fusiones de promotores a genes lactosa (Youngman 1987). Uno de estos derivados, el plásmido pTV54, utilizado en este trabajo de tesis, contiene los genes *lac Z* y el gen de resistencia a cloramfenicol del plásmido pC194 en tandem, sin promotor. Estas fusiones posibilitan estudios de expresión y regulación génica.

También se ha logrado transferir a esta especie el transposón conjugativo Tn916, que permite la transferencia de material genético interespecies. (Floccari y Méndez 1994)

## OBJETIVOS

Debido a sus particulares características, como su capacidad de utilizar diversas fuentes de carbono y su gran tamaño, *B. megaterium* es un microorganismo adecuado para ser utilizado en la producción industrial de PHB.

El conocimiento de la estructura y organización de los genes *pha* es indispensable para poder llevar a cabo manipulaciones genéticas que permitan variar la especificidad y afinidad de las enzimas del camino biosintético por sus correspondientes <sup>5</sup> sustratos, alterar su regulación, transferir los genes a otras bacterias en las cuales se pueda acceder a un mejor análisis de los mismos, y eventualmente lograr una mayor producción del polímero.

Para ello es necesario conocer el número de genes involucrados, la manera en que están organizados y la relación de este camino biosintético con procesos de respuestas globales.

A diferencia de lo que ocurre en *A. eutrophus*, actualmente utilizada en la producción industrial de PHA, en *B. megaterium* existen todas las herramientas genéticas necesarias para llevar a cabo este tipo de estudios. Como se indicó anteriormente, es posible transferir material genético mediante transformación de protoplastos y plásmidos conjugativos (resultados no publicados de nuestro laboratorio), existe un fago transductor generalizado para esta especie y existen mutantes auxótrofas que posibilitan el mapeo genético. Existen asimismo diversos plásmidos "shuttle" capaces de replicarse en este microorganismo y en *E. coli*, y un transposón, Tn917, que transpone dentro del genoma de *B. megaterium*.

Para cumplir con los objetivos mencionados es necesario el aislamiento y análisis molecular de genes involucrados en la síntesis de PHB en *B. megaterium*. En este trabajo se describe el clonado del gen de la  $\beta$ -cetotilasa.

## **MATERIALES Y METODOS**

## I MEDIOS DE CULTIVO y BUFFERS UTILIZADOS

Para preparar los medios de cultivo se utilizaron generalmente reactivos Merck.

### LB (por litro)

Levine 1957

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

### LBC

LB conteniendo gluconato de sodio 1% concentración final

### SNB (por litro)

English and J.C.Vary ( 1986)

#### Solución A

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

#### Solución B

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

Las soluciones A y B se autoclavaron por separado y combinaron

#### \*Sales SNB

ClK.....	1.25 %
SO <sub>4</sub> Fe.....	0.125 mM
SO <sub>4</sub> Mg.....	0.125 M
Mn Cl <sub>2</sub> .....	2.5 mM
Agua destilada c.s.p.....	.80 ml

Se autoclavó y mantuvo a 4°C

## SNA

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

## Medio Mínimo para *B. megaterium* (M2)

Lammi and Vary 1972

PO <sub>4</sub> H Na <sub>2</sub>	6 gr
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	3 gr
Citrato trisódico dihidratado	1 gr
Cl <sub>2</sub> Fe	3.6 μM
Cl <sub>2</sub> Mn	2 gr
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 gr*
agua destilada c.s.p	1 l
pH 7.2	

Luego de autoclavar se agregaron

SO <sub>4</sub> Mg	0.2 gr
Cl <sub>2</sub> Ca	0.1 mM
Glucosa.	15 gr

Para preparar medio mínimo con bajo contenido de nitrógeno se agregaron 0.2 gr de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> por litro.

## Medio Mínimo de transducción (MMT)

Callahan et al 1983

PO <sub>4</sub> H Na <sub>2</sub>	6 gr
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	3 gr
Citrato trisódico dihidratado	1 gr
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	2 gr
agua destilada c.s.p	1 l
pH 7.2	

Luego de autoclavar se agregaron

SO <sub>4</sub> Mg	0.2 gr
glucosa.	15 gr

## Medios sólidos

Se agregaron a los medios anteriormente descriptos 15 gr. de agar por cada litro de medio.



### Buffer de protoplastización para *B. megaterium* (HAF)

Fodor et al (1975)

Base Trizma	2 g
Sacarosa	68.5 g
Sales HAF*	10 ml
Agua destilada c.s.p	980 ml
pH 7.5	

Luego de autoclavar se agregaron

Mg Cl <sub>2</sub> 2M	10 ml
-----------------------	-------

\*Sales HAF

K Cl	.35 g
Na Cl	.58 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.3 g
NH <sub>4</sub> Cl	10 g
Agua destilada c.s.p	100 ml

### RHAF Medio de regeneración para *B. megaterium*

Von Tersch and Carlton (1881)

Solución A

Triptona	5 gr
Extracto de levadura	5 gr
Agua destilada c.s.p	500 ml

Solución B

Trizma base	12 g
Glucosa	2 g
Sacarosa	68.5 g
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K	0.14 g
Sales HAF*	10 ml
Agua destilada c.s.p	470 ml
pH 7.5	

Luego de autoclavar por separado y combinar, se agregaron

Mg Cl <sub>2</sub> .2 H <sub>2</sub> O	10 ml
--	-------

## ANTIBIOTICOS

Se agregaron a los medios correspondientes a las concentraciones siguientes

Ampicilina (Amp)	100 µg/ml
Cloramfenicol (Cm)	10 µg/ml
Eritromicina (Em)	
para <i>B. subtilis</i>	1 µg/ml
para <i>B. megaterium</i>	5 µg/ml
Lincomicina (Lm)	
para <i>B. subtilis</i>	50 µg/ml
para <i>B. megaterium</i>	250 µg/ml
Kanamicina (Km)	50 µg/ml
Tetraciclina (Tet)	
para <i>B. subtilis</i>	10 µg/ml
para <i>B. megaterium</i>	10 µg/ml
para <i>E. coli</i>	20-25 µg/ml

## OTROS AGREGADOS A LOS MEDIOS DE CULTIVO

5-Bromo-4-Cloro-3-Indolil-β-D-Galactopiranosido ( XGal)

solución stock: 20 mg/ml en N-N-dimetilformamida

Se conservó la solución stock a -20°C, y se utilizaron 2 µl de solución stock por ml de medio.

Isopropil-β-thiogalactopiranosido (IPTG)

solución stock: 0.01 M en agua destilada

Se conservó la solución stock a -20°C, y se utilizaron 10 µl de solución stock por ml de medio.

## BUFFERS

Para las purificaciones de ácidos nucleicos y las técnicas de biología molecular se utilizaron reactivos Sigma grado biología molecular.

**TAE Solución concentrada (50x)**

por l:

Base Trizma	242 g
Acido acético glacial	57,1 ml
EDTA 0.5M (pH=8)	100 ml

**Buffer de siembra (6x)**

0.25% (p/v) azul de bromofenol

40% (p/v) sacarosa en agua.

**SSC' (20x)**

por l:

CINa	175,3 g
Citrato de sodio dihidratado	88,2 g

pH 7.

**TE**

Tris-HCl 10 mM pH 8

EDTA 1 mM

**SOLVENTES Y ACIDOS**

Se utilizaron solventes y ácidos grado analítico de Merck, salvo el etanol utilizado para las coloraciones con negro sudán, donde se utilizó etanol marca Douglas o similar.

## II. CEPAS BACTERIANAS PLASMIDOS Y FAGOS

Cepa	Características relevantes	Referencia
<i>A. eutrophus</i>		
H16	salvaje, protótrofa	ATCC 17699
H16 PIIB-4	PIIB <sup>-</sup>	Schlegel et al 1970
<i>B. megaterium</i>		
QMB1551	salvaje	J.C.Vary 1972
PV44	p <sup>-7</sup> lac-3 lac-6	P.S.Vary and Y.P.Tao 1988
UBA30-20	PIIB <sup>-</sup>	Floccari et al 1991
UBA30-21	PIIBA PIIB leaky zef1::Tn917	Este trabajo
<i>B. subtilis</i>		
PY334	trp C2 ilv-S / pTV54	Youngman P. 1979
<i>E. coli</i>		
H13101	hsdS20 (rβ <sup>-</sup> mβ <sup>-</sup> ) recA1 supE44 lacY1 proΛ2 ara14 galK2 xyl5 mtl1 rpsL20	Bolivar and Backman 1979
UBA1-36	H13101 / pBME3	Este trabajo
UBA1-37	H13101 / pBM142	Este trabajo
UBA1-38	H13101 / pMBS6	Este trabajo ,

## Plásmidos

pTV54	Tet <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup> Em <sup>R</sup> Lm <sup>R</sup> Tn917- <i>lac</i> replicación termosensible	Slater et al 1988
pHV33	Amp <sup>R</sup> Tet <sup>R</sup> Cm <sup>R</sup> shuttle <i>Bacillus- E.coli</i>	Primrose and Ehrlich (1981).
pBM13	Tet <sup>R</sup> pHV33 que contiene un inserto con el gen de la $\beta$ -cetotiolasa de <i>B.megaterium</i>	Este trabajo
pVK102	cósmido Km <sup>R</sup> Tet <sup>R</sup>	Knauf and Nester 1982
pBM142	pVK102 con un inserto de 25 kb del genoma de <i>B.megaterium</i> UBA30-21 con actividad de $\beta$ -cetotiolasa, Cm <sup>R</sup>	Este trabajo
pUC19	Amp <sup>R</sup>	Yanisch-Perron 1985
pBMS6	pUC19 con un inserto de 6 kb proveniente de pBM142 con actividad de $\beta$ -cetotiolasa	Este trabajo

## Bacteriófagos

---

M13

Vary et al 1982

### III. PREPARACION DE CULTIVOS de *B.megaterium*

#### III.a.Cultivos exponenciales en medio líquido

Para preparar cultivos exponenciales se utilizó el siguiente procedimiento.

A partir de un glicerolado se sembró haciendo estrias cruzadas con un ansa, de manera de tener crecimiento uniforme, una placa de LB que se incubó a 32°C overnight. En los casos de cepas con genes de resistencia, se utilizaron placas a las que se agregaron los antibióticos correspondientes .

Al día siguiente se inundó la placa con aproximadamente 3 ml de medio líquido, y se resuspendieron con rastrillo las colonias crecidas. Esta suspensión se homogeneizó con vortex y se utilizó como inóculo de un cultivo en medio líquido de manera tal que la  $DO_{600nm}$  inicial fuese  $\leq 0.1$ . Luego se incubaron los cultivos con agitación hasta obtener el crecimiento deseado.

#### III.b.Conservación de los cultivos

Las cepas de *B.megaterium* se conservaron congeladas con glicerol o como suspensiones de esporas en agua destilada.

Glicerolados: se agregó glicerol a un cultivo líquido hasta una concentración de 15% a 20% final y se guardaron a -20 o -70°C en tubos de vidrio con tapa a rosca o en tubos Eppendorf.

Para tomar una alícuota de un cultivo congelado no es necesario descongelarlo completamente, puede tomarse una muestra introduciendo directamente en el tubo un ansa caliente, provocando el descongelamiento de una pequeña parte del glicerolado que se utiliza como inóculo.

Suspensión de esporas: se resuspendió una colonia de una placa de SNA, medio en el que *B.megaterium* esporula eficientemente, incubada al menos durante 48 hs para asegurar una buena cantidad de esporas, en 0.5 ml de agua destilada estéril con 0.2 mg/ml de lisozima (Sigma) . Luego de incubar la suspensión 30 minutos a 37°C , se lavó tres veces centrifugando y resuspendiendo el precipitado en agua destilada estéril. La suspensión se conservó a 4°C.

### **III.c. Preparación de pellets para mediciones enzimáticas.**

Para preparar los pellets para realizar las mediciones enzimáticas se utilizaron cultivos en fase exponencial (DO 600 nm aprox. 0.6).

Los pellets se conservaron a -20 °C hasta el momento de ser utilizados.

## **IV. ENSAYOS COLORIMÉTRICOS PARA DETERMINAR PRESENCIA DE INCLUSIONES DE PHB**

### **IV.a. Coloración fluorescente con Azul del Nilo A (Nile Blue A)**

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

#### **Procedimiento**

Se coloreó con una solución acuosa al 1% de Azul del Nilo A (Sigma) un extendido de células, sumergiendo el portaobjeto en jarritos "coplin" con el colorante a 55°C durante 10 min.

Luego de eliminar con agua corriente el exceso de colorante se lavó con solución acuosa de ácido acético al 8 % durante 1 minuto y se dejó secar.

Se observó el preparado rehidratado y cubierto con cubreobjeto al microscopio bajo una longitud de onda de 460 nm.

Los gránulos de PHB se observaron como partículas fluorescentes de color naranja brillante.

#### **IV.b. Coloración con Negro Sudán B**

Schlegel et al. 1970.

##### **Tinción en portaobjeto**

Se cubrió con una solución de **Negro Sudán B (Sigma)** al 0.3 % en alcohol 70 % un extendido de células por 10 minutos a temperatura ambiente.

Luego de decolorar con xilol se cubrió con safranina 0.5 % , 1 minuto y se lavó con agua corriente.

Los gránulos de PHB se observaron al microscopio de color azul oscuro, dentro de las células teñidas de color rosa con safranina.

##### **Tinción de colonias en placa**

Se cubrieron las colonias con una solución de **Negro Sudán B** al 0.02 % en alcohol 96 % durante 20 minutos.

Luego de remover el colorante se lavaron con 10 ml de etanol 96% por 1 minuto.

Las colonias de células ricas en PHB, mantuvieron el colorante y se vieron azul oscuras. Las colonias deficientes en PHB, se vieron de color gris pálido por haber perdido el colorante.

#### **V. CUANTIFICACION DE PHB**

La cuantificación se realizó mediante un método espectrofotométrico y uno cromatográfico.

Ambos métodos se basan en la descomposición del polímero y la posterior conversión del  $\beta$ -hidroxibutirato en compuestos cuya concentración en la muestra se cuantifica.

El método espectrofotométrico, que se realiza utilizando filtros de lana de vidrio como soporte, se basa en la conversión del  $\beta$ -hidroxibutirato en ácido crotonico, cuya determinación se realiza midiendo la absorbancia a 235 nm.

Para la determinación cromatográfica, la muestra acidificada se somete a metanólisis para formar el ester metílico del  $\beta$ -hidroxibutirato, que luego se determina por cromatografía gaseosa.



## V.a. CUANTIFICACION ESPECTROFOTOMETRICA DE PHIB

Ward y Dawes; 1973

El PHIB y otros PHAs pueden ser extraídos de los microorganismos que los producen por hidrocarburos clorados como el cloroformo.

Se trató un disco de fibra de vidrio impregnado con una muestra de cultivo primero con hipoclorito de sodio para degradar la mayor parte de los compuestos orgánicos, y luego con cloroformo, quedando el PHIB adherido al disco. Luego se deshidrató el polímero en presencia de ácido sulfúrico a ácidos insaturados 2,3, (en el caso del PHIB, ácido crotonico), cuya concentración se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia del pico característico (para el ácido crotonico es 235 nm), por comparación de áreas entre los picos obtenidos en la muestra y picos obtenidos con soluciones de concentraciones conocidas.

### A Preparación de los discos

Se utilizaron filtros de fibra de vidrio de 2 cm de diámetro, Whatman GF/G.

Los filtros se colocaron dentro de un recipiente con  $H_2SO_4$  puro sumergido en un baño de agua hirviendo. Se usaron 100 ml de ácido para 50 discos, reemplazando el ácido usado por nuevo a los 40 y 80 minutos. Luego de 2 hs., se decantó el ácido y se lavaron los filtros varias veces con agua destilada, dos veces con etanol y luego con éter etílico, y se secaron a temperatura ambiente. Los discos así preparados se guardaron hasta el momento de usar.

### B Armado de los filtros

Se montaron los filtros atravesándolos con dos alfileres de acero recubiertos con capilares de vidrio, pinchados en un soporte.

### C Preparación de las muestras

Se utilizaron cultivos en fase exponencial tardía, crecidos a 32°C en medio LBG. Se tomaron muestras de 1 ml, se sedimentaron las células por centrifugación en una microcentrífuga y se lavaron los pellets con solución fisiológica. Posteriormente, se los secó en estufa a 55°C hasta peso seco constante.

Las muestras secadas se resuspendieron en 0.1 ml de solución fisiológica y 0.1 ml hipoclorito de sodio, se colocó la suspensión bacteriana en los discos montados sobre el soporte y se secaron de 5 a 10 minutos a 80°C.

Luego se agregaron 0.2 ml de hipoclorito de sodio 10%, se incubaron a 37°C durante 1 hora y se secaron de 5 a 10 minutos a 80°C.

Se agregó varias veces 0.1 ml de cloroformo caliente (50-60°C), para fijar el PHB al disco, y se dejó secar.

Los discos se sacaron del soporte y se sumergieron en hipoclorito de sodio dentro de un vaso de precipitado a 37°C 1 hora. Luego se lavaron sucesivamente dos veces con agua destilada, etanol, acetona y eter dietílico y se secaron a temperatura ambiente

Cada filtro se colocó en un tubo de ensayo limpio agregando 5 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado, se incubaron en baño de agua hirviendo durante 10 minutos y se dejaron enfriar.

Por último se midió la absorbancia de la suspensión a 235 nm contra un blanco de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado.

Para cuantificar la cantidad de polímero presente en las muestras se realizó una curva patrón determinando la absorbancia obtenida al utilizar soluciones de cantidades conocidas de polímero disueltas en cloroformo caliente y aplicadas a los filtros

## **V.6. CUANTIFICACION DE PHB POR CROMATOGRAFIA GASEOSA**

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

Se prepararon pellets de cultivos de las cepas a analizar de la misma forma que para la determinación espectrofotométrica de PHB. Los pellets fueron luego liofilizados.

A las muestras preparadas de esta forma se les agregó 1ml de una solución de 15% de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado en metanol y luego 1ml de cloroformo. Esta mezcla se incubó durante 140 minutos a 100°C, se agregaron 0.5 ml de agua destilada y se mezcló bien agitándose vigorosamente durante 20 segundos. Se dejó en reposo hasta que se separaron las fases y se pasó la fase orgánica a otro tubo, que se guardó a -20°C hasta el momento de la corrida cromatográfica.

Este tratamiento degrada completamente el biopolímero formándose ésteres del ácido 3-hidroxibutírico. (Braunegg et al; 1978)

### **B Análisis por cromatografía gaseosa**

Los productos de la metanólisis fueron analizados por separación isotérmica en columna de vidrio de 1.80 m rellena con 10% Carbowax 20M-TPA en Chromosorb W-AW de malla 80/100.

Se utilizó un cromatógrafo Gow-Mac serie 550, equipado con ionizador de llama. Como gas transportador se empleó nitrógeno a un flujo de 20 ml/min, siendo las temperaturas del inyector, columna y detector 180°C, 150°C y 210°C respectivamente. Los datos fueron analizados mediante un integrador Spectraphysics. La cuantificación se realizó por comparación de las áreas de los picos obtenidos en las muestras y en soluciones patrón de concentraciones conocidas.

## **VI. MEDICION DE ENZIMAS DEL METABOLISMO BIOSINTETICO DE PHB**

### **VI.a. MEDICION DE $\beta$ -CETOTIOLASA EN EXTRACTOS CELULARES CRUDOS**

Stern, Joseph H. (1955)

La enzima  $\beta$ -cetotiolasa cataliza en forma reversible la reacción de condensación de dos moléculas de Acetilcoenzima A (acetil-S-CoA) para formar Acetoacetilcoenzima A (acetoacetil-S-CoA) y coenzima A (CoA-SH).



El ensayo enzimático se basa en la propiedad de los acetoacetil tioesteres, como el acetoacetil-S-CoA, de exhibir una absorbancia característica en el rango de 280 a 320 m $\mu$  a pH alcalino, debido a la formación de un enolato, favorecida en presencia de iones Mg<sup>++</sup>. Al clivarse el acetoacetil-S-CoA por acción de la enzima, disminuye la absorbancia de la muestra en forma proporcional.

#### **A Preparación del extracto crudo**

Se utilizaron pellets provenientes de la centrifugación de 10 ml de cultivos exponenciales de las cepas crecidas en LB o LBG.

El pellet se lavó con agua destilada estéril y luego se resuspendió en 1 ml de buffer de reacción : Tris-HCl 10 mM, Mg Cl<sub>2</sub> 40 mM, DTT (Sigma) 1 mM.

Las células se rompieron por ultrasonido utilizando un desintegrador ultrasónico (Soniprep 150 MSE), con una punta de 9.5 mm.

Para ello se sometió la muestra sumergida en hielo a 2 pulsos de 15 segundos cada uno (amplitud aproximada: 10 micrones ). Luego se centrifugaron las muestras en frío

a 10.000 rpm , transfiriéndose el sobrenadante a un tubo limpio que se conservó en hielo hasta el momento de la determinación .

### **B Determinación de la actividad de $\beta$ -cetotiolasa**

Se colocaron en tubos de vidrio limpios las siguiente soluciones:

	MUESTRA	BLANCO
Buffer de reacción	1.5 ml	1.5 ml
Acetoacetil-S-CoA 8 mM	10 $\mu$ l	-
Extracto crudo	10 $\mu$ l	-
Agua destilada	1.43 ml	1.44 ml

Se incubaron 2 minutos a 30°C y se midió la absorbancia a 303 nm (inicial)  
Luego se agregó

CoA-SH 3.44 mM	50 $\mu$ l	50 $\mu$ l
----------------	------------	------------

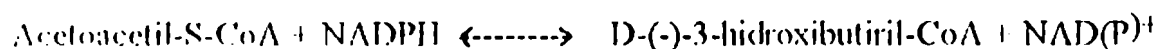
Inmediatamente se midió la absorbancia a 303 nm, y se continuó midiendo a intervalos de unos 15 a 30 segundos , durante un total de 5 minutos o hasta observar estabilización de la absorbancia.

Las unidades de enzima se calcularon considerando que 1 unidad causa una disminución de 0.01 en la absorbancia a 303 nm por minuto a 25°C.

El acetoacetil-S-CoA y la coenzima A se adquirieron en Sigma.

### **VI.B. MEDICION DE ACETOACETIL-CoA REDUCTASA EN EXTRACTOS CELULARES CRUDOS**

La enzima Acetoacetil-CoA reductasa cataliza en forma reversible la reacción de oxidación-reducción de Acetoacetilcoenzima A (Acetoacetil-S-CoA) y NADPH para formar D-(-)-3-hidroxi-butiril-CoA .



Este método es una modificación del método descrito por Lynen and Wieland (1955), propuesta por Schubert et al (1988).

En el ensayo utilizado se determina la velocidad de desaparición del NADPH. Este presenta un pico de absorbancia a 340 nm, cuyo valor disminuye proporcionalmente al oxidarse a NADP.

#### **A Preparación del extracto crudo**

Se utilizaron pellets provenientes de la centrifugación de 100 ml de cultivos de las cepas crecidas en LB ( cuyos extractos crudos contenían aproximadamente 5 mg proteína /ml).

Los pellets se conservaron a -20°C hasta el momento de ser utilizados.

Para sonicar las muestras se resuspendieron en buffer fosfato de potasio 100 mM, pH 7. ( Schubert 1988) al que se agregaron DTT 1 mM, EDTA 1 mM, y PMSF 1 mM para evitar la oxidación y la acción de proteasas presentes en la muestra.(Peoples and Sinskey 1989a)

Las células se rompieron por ultrasonido utilizando un desintegrador ultrasónico (Soniprep 150 MSE), con una punta de 9.5 mm.

Para ello se sometió la muestra sumergida en hielo a 2 pulsos de 15 segundos cada uno (amplitud aproximada: 10 micrones ). Luego se centrifugaron las muestras en frío a 100.000 g durante 1 h ( se utilizó un rotor Beckman SW55 Ti a 38000 rpm), completando el volumen de muestra a 5 ml con aceite mineral.

La suspensión clarificada obtenida se transfirió a un tubo limpio, que se conservó en hielo hasta el momento de la determinación .

#### **B Determinación de la actividad de Acetoacetyl-CoA reductasa**

La mezcla de reacción utilizada contenía los siguientes componentes:

Tris-HCl 100 mM pH 7.8	.98 ml
NADPH 25 MM	2.5 µl
Extracto crudo	10 a 20 µl

Se midió la absorbancia a 340 nm contra un blanco de buffer Tris-HCl 100 mM hasta observar la estabilización de la lectura, y luego se comenzó la reacción mediante el agregado de

Acetoacetil-S-CoA 8 mM

10  $\mu$ l

Inmediatamente se midió la absorbancia a 340 nm, y se continuó midiendo a intervalos de unos 15 a 30 segundos, durante un total de 5 minutos o hasta observar estabilización de la absorbancia.

Las unidades de enzima se calcularon considerando que 1 unidad causa una disminución de 0.001 en la absorbancia a 340 nm por minuto a 20°C.

Todos los reactivos utilizados se adquirieron en Sigma.

#### **Vlc. DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE PROTEINAS**

Se realizó según el método de Bradford modificado, o el método de Lowry.

##### **Método de Bradford (Bradford, 1976)**

Entre 50 y 150  $\mu$ l de extracto crudo se incubaron por 15 minutos con 0.5 ml de reactivo de Bradford y agua destilada hasta completar 1ml. La cantidad de proteínas se estimó de acuerdo a una curva de calibración hecha con BSA (Sigma fracción V).

##### **Método de Lowry (Lowry, 1951) (Folin, 1927)**

Se utilizaron entre 10 y 100  $\mu$ l de extracto crudo, a los que se agregó agua destilada para completar 0.5 ml, y los reactivos empleados para este ensayo, utilizando un volumen final de 3.25 ml.

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

#### **VII. PUESTA A PUNTO DEL RASTREO DE CLONES CON ACTIVIDAD DE $\beta$ -CETOTIOLASA DE BIBLIOTECAS GENOMICAS DE *B.megaterium* EN *E.coli***

En los rastreos por actividad enzimática de bibliotecas genómicas, normalmente no se hacen ensayos individuales sino que se procesan los clones por grupos. Se analizó la

posibilidad de aumentar la cantidad de clones por grupo que se utiliza habitualmente, para disminuir el tiempo empleado en el rastreo.

Se mezclaron células de *B. megaterium* y *E. coli*, utilizando distintas proporciones de cultivos congelados cuya cantidad de células por ml se había determinado previamente, y se procesaron las mezclas para medir la actividad enzimática de manera idéntica a la utilizada para los cultivos de una sola cepa.

#### VIII. RASTREO DE CLONES CON ACTIVIDAD DE $\beta$ -CETOTIOLASA DE BIBLIOTECAS GENÓMICAS DE *B. megaterium* EN *E. coli*

Se disponía de bibliotecas genómicas obtenidas por digestión del cromosoma de *B. megaterium* con las enzimas de restricción Pst I y BamH I, y posterior ligado de los fragmentos obtenidos con el plásmido pHV33 cortado con las mismas enzimas.

Dichas bibliotecas fueron gentilmente facilitadas por la Dra. Patricia Vary de la Universidad de Illinois, E.E.U.U.

Para el rastreo se utilizaron las bibliotecas obtenidas por digestión con la enzima PstI, que se describen a continuación.

Biblioteca	clones Tet <sup>R</sup>	clones Tet <sup>R</sup> Amp <sup>S</sup>	% inserción
BMp33-17	3155	2841	90
BMp33-20	3760	3283	90
BMp33-21	3381	3014	89

Se hicieron diluciones seriadas de cada una de las bibliotecas genómicas que se deseaban rastrear, y se sembraron en placas de LB tetraciclina 20  $\mu$ g/ml para realizar el recuento de células.

Una vez tituladas, se sembraron alícuotas de las bibliotecas en placas del mismo medio de manera de obtener aproximadamente 100 colonias.

En cada caso se sembró un número de placas que permitiera obtener un número de colonias entre 20 y 50 % mayor al número de clones total de cada biblioteca.

Se hicieron réplicas con terciopelo de todas las placas, se resuspendieron las colonias de cada una, y las suspensiones se centrifugaron y se procesaron para medir la actividad de  $\beta$ -cetotiolasa.

Al detectar una muestra con actividad enzimática, se buscó la réplica de la placa correspondiente, y se procesaron las colonias en grupos de 10.

Finalmente se realizaron cultivos individuales de cada una de las colonias integrantes del grupo que presentaba actividad, para identificar el clon productor de  $\beta$ -cetotiolasa.

## IX. TRANSFORMACION DE PROTOPLASTOS DE LA CEPA PV447

### IX.a. OBTENCION DE PROTOPLASTOS

Un cultivo overnight de la cepa en placa de medio RHAF se utilizó como inóculo para un cultivo exponencial en el mismo medio líquido.

Diluciones seriadas al décimo del mismo se sembraron en medio SNA para hacer el recuento de células totales, y luego se centrifugaron 10 ml del cultivo resuspendiendo las células en 0.8 ml de buffer HAF con el agregado de lisozima 200 µg/ml. Luego de incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente se diluyó la mezcla agregando 4 ml de RHAF.

Se sembraron alícuotas de la suspensión de protoplastos en medio selectivo para el control de sensibilidad a antibióticos; en medio SNA, para determinar la cantidad de células no protoplastizadas, y por último se sembraron diluciones en medio de regeneración, para determinar la eficiencia de protoplastización.

### IX.b. TRANSFORMACION

Se incubaron 0.5 ml de los protoplastos obtenidos en el paso anterior con 50 a 100 µl de DNA plasmídico disuelto en buffer TE y 1.5 ml de PEG (PM=8000) (Sigma) 30% en HAF durante 4 minutos a 37°C, y luego se diluyeron agregando 4 ml de RHAF.

La suspensión se centrifugó, resuspendiendo el pellet en 1 ml de RHAF, que se incubó durante 2 hs a 37°C con agitación. Se sembraron alícuotas de la suspensión directamente en medio RHAF con el agregado de antibióticos.

Para la transformación con el plásmido pTV54 se utilizó como medio selectivo RHAF tetraciclina 10 µg/ml

## X. OBTENCION DE INSERCIONES DEL TRANSPOSON Tn917 EN EL CROMOSOMA DE *B.megaterium* PV447

### X.a. Introducción de pTV54 en *B.megaterium*

Como vector de transposición se utilizó el plásmido pTV54, que se introdujo en *B.megaterium* mediante transformación de protoplastos.

Se transformó la cepa PV447 con una preparación de este plásmido, seleccionando los transformantes en LB tetraciclina.

Los transformantes se reestriaron dos veces en el mismo medio y se utilizaron para inocular cultivos en medio líquido. A partir de estos cultivos se realizaron extracciones de plásmido que se analizaron por electroforesis en geles de agarosa.



## **X.b. Eliminación del vector de transposición**

Para eliminar el plásmido pTV54 se utilizaron dos métodos basados en la pérdida del plásmido por crecimiento a temperatura restrictiva: sucesivas incubaciones en medio líquido, y réplicas en medio sólido. Ambos métodos son adaptaciones de un protocolo diseñado para eliminar el plásmido pTV1 de *B.subtilis*.(Youngman P., 1987)(Bohall N., 1986)

### **X.b.1. Eliminación en medio líquido**

Se sembró una placa de LB conteniendo tetraciclina, lincomicina y eritromicina (LB ELT) con un "glicerolado" de *B.megaterium* PV447 transformado con pTV54, que se incubó durante toda la noche a 30°C. Esta placa se utilizó como inóculo para un cultivo de 25 ml en medio LB con los mismos antibióticos, que se incubó a 30°C con agitación hasta una D.O.<sub>600nm</sub> = 0.7. Se agregaron 2.5 ml de este cultivo a 50 ml de LB con eritromicina y lincomicina (LBEL), que se incubaron a 44°C durante 4 hs. Finalmente se utilizaron 10 ml de este cultivo para inocular 100 ml del mismo medio, que se incubaron durante toda la noche a 44°C.

De cada uno de los cultivos se tomaron muestras que se utilizaron para medir la D.O.<sub>600nm</sub> y hacer recuentos de células.

Se realizaron diluciones seriadas al décimo de las muestras, que se sembraron en LB, para determinar el número de células totales, y en LB tetraciclina (LBT) y LBEL, para calcular la proporción de células con plásmido y con transposón respectivamente.

### **X.b.2. Eliminación en medio sólido.**

Se preparó un cultivo exponencial (D.O.<sub>600nm</sub> = 0.7) en LBELT de la misma manera que para la eliminación en medio líquido. Este cultivo se congeló a -20°C con el agregado de glicerol 15%. Se hicieron diluciones del cultivo congelado, que se sembraron en placas de LBEL, incubadas a 43°C, para determinar la cantidad de inóculo necesaria para obtener el número de colonias deseado. Se sembraron 300 placas de LBEL con una cantidad de cultivo tal que permitiera obtener unas 400 colonias por placa, y se incubaron a 43°C durante 48 hs.

Se hicieron réplicas con terciopelo de todas las placas a placas del mismo medio, que se incubaron en las mismas condiciones. Paralelamente se hicieron réplicas de 15 de las placas iniciales a LBEL y LBELT, que se incubaron a 43°C, para calcular el porcentaje de pérdida de plásmido.

### **X.c. Rastreo de mutantes PHB entre los transpuestos**

Se tiñeron mediante coloración de negro sudán las réplicas de las placas originales, y se pasaron las colonias que dieron coloración más clara a placas de LBEL, que se incubaron a 32°C. Muchas de las colonias transferidas no crecieron. En estos casos se buscaron las colonias correspondientes en las placas originales, y se transfirieron a nuevas placas de LBEL.

Estas colonias se sembraron por réplicas en LBEL y a MM con bajo contenido de N suplementado con glucosa. Todas las placas fueron incubadas a 32°C, y luego de ser teñidas con negro sudán se transfirieron las colonias que dieron coloración más clara, nuevamente a LBEL, y se incubaron 48 hs a 32°C.

Para finalizar la caracterización del contenido de PHB por tinciones se hicieron coloraciones de negro sudán en portaobjetos de todas las colonias crecidas en esta placa.

Para asegurar la pérdida del plásmido se hicieron nuevos pasajes de las colonias con inserciones que aparentemente producían poco PHB en placas de LBEL a 43°C, y se confirmó la pérdida del plásmido por ausencia de crecimiento en réplicas a placas con tetraciclina.

## **XI. OBTENCION DE LISADOS DEL FAGO MP13**

Las cepas utilizadas para la infección fueron crecidas en SNB a 32°C con agitación fuerte, hasta alcanzar la fase exponencial.

Para obtener un lisado se tomaron alícuotas de 2 ml de cultivo a los que se agregaron 0.2 ml de diluciones decimales de un lisado de fago MP13 proveniente de la infección de la cepa PV447. Las suspensiones de fagos y bacterias se incubaron a 32°C con agitación lenta (45 RPM) durante la noche (16 a 18 hs). Se eliminaron las bacterias de los lisados por filtración a través de filtros Milipore (poro 0.45 µm). Los lisados obtenidos se titularon y se conservaron a 4°C con el agregado de glicerol 7% p/v. (Vary; 1979)

## **XII. TITULACION DE LISADOS DEL FAGO MP13**

Los lisados de fago obtenidos se titularon por el método de gotas en placas utilizando la cepa PV447 crecida hasta llegar a fase exponencial en medio SNB como bacteria sensible.

Para ello se sembraron gotas de 5  $\mu$ l de diluciones seriadas al décimo del lisado sobre un césped de bacterias sensibles, se incubaron las placas en estufa a 32°C durante toda la noche y se contaron las playas de lisis en el lugar donde se depositó cada gota. Finalmente se calculó el título de la suspensión de fago teniendo en cuenta el volumen y la dilución de la suspensión sembrada en cada gota que permitía contar el número de playas de lisis.

### XIII. TRANSDUCCION DE LA CEPA UBA 30-21 A LA CEPA PV447

Se creció la cepa receptora hasta la fase exponencial en medio mínimo de transducción (MMT).

El lisado transductor, un lisado obtenido por infección de la cepa UBA 30-21 de título  $10^9$ , se trató con luz ultravioleta a una intensidad de 5.2 Joule/m<sup>2</sup> por s, durante 15 segundos.

Se mezclaron en un tubo de ensayo 0.3 ml del cultivo de la cepa receptora con 0.3 ml de una dilución al décimo del lisado tratado en la forma descrita para obtener una multiplicidad de infección de aproximadamente 1. Se dejó adsorber el fago durante 10 minutos a temperatura ambiente y luego se plaqueó la mezcla en el medio de selección: placas de MMT suplementadas con los antibióticos eritromicina (5  $\mu$ g/ml) y lincomicina (250  $\mu$ g/ml). Se incubaron las placas a 32°C en estufa. Los transductantes comenzaron a aparecer a las 24 hs y se contaron luego de 3 días .

(Vary, 1979)

Alternativamente se sembraron juntos directamente sobre la placa de medio selectivo los 0.3 ml de cultivo y de suspensión de fago , y luego se procedió como se indicó anteriormente.

### XIV. EXTRACCION DE PLASMIDOS

Se utilizaron protocolos basados en el método de Birnboim y Doly.

XIV.a. PROTOCOLO 1 ( utilizado para extraer plásmidos de cepas de *B.subtilis*, *B.megaterium* y *E.coli* )

Para las especies de *Bacillus* los pellets provinieron de cultivos exponenciales y de cultivos overnight para *E.coli*. Los mismos se conservaron a -20°C hasta el momento de ser utilizados.

El siguiente protocolo tiene las cantidades de reactivos para un pellet proveniente de 5 ml de cultivo. Para obtener mayores cantidades de DNA se utilizaron pellets provenientes de 50 hasta 500 ml de cultivo, aumentando las cantidades de reactivos proporcionalmente.

Un pellet de 5 ml de cultivo se resuspendió en 200 µl de solución I (sacarosa 20%, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM pH 7.5) con el agregado de lisozima 200 µg/ml, y se incubó a 37°C durante 30 minutos.

Luego de dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente se agregaron 400 µl de solución II ( NaOH 0.2 N, SDS 1% ), se incubó 5 minutos en hielo, se agregaron 300 µl de solución III ( AcOK 3M pH 4.5-4.8 ) , se incubó nuevamente en hielo 15 minutos, y se centrifugó a 11000-12000 g durante 10 minutos.

Se pasó el sobrenadante a un tubo limpio, se agregaron 600 µl de isopropanol y se incubó a -20 °C durante 1 a 2 hs

Se centrifugó de la misma manera que antes, descartando el sobrenadante. El pellet bien escurrido se resuspendió en 200 µl de buffer TE, y se agregaron 6 µl de AcONa 3M pH 6 y 400 µl de etanol absoluto. La mezcla se incubó desde 2 hs a toda la noche a -20°C y luego se centrifugó nuevamente en las condiciones antes descriptas.

Alternativamente se hizo un tratamiento para eliminar el RNA antes de agregar el AcONa y el etanol.

El pellet obtenido se resuspendió finalmente en 10 a 20 µl de buffer TE.

Para eliminar el RNA se incubó el DNA resuspendido en buffer TE luego de la precipitación con isopropanol con RNasa A con una concentración final de 50 µg/ml a 37°C durante 30 minutos.

Para eliminar la RNasa y las demás proteínas presentes en la preparación se hizo una extracción con fenol:cloroformo:isoamílico 25:24:1 (el fenol saturado con Tris HCl pH 8), y luego con cloroformo:isoamílico 24:1.

Luego se precipitó la fase acuosa agregando AcONa y etanol como se indica anteriormente.

#### XIV.b. PROTOCOLO 2 (utilizado para extraer el cósmido pVK102 y sus derivados)

A partir de una placa de 24 hs se hizo un cultivo overnight de *E.coli* conteniendo el cósmido en LB con antibióticos, y éste a su vez se utilizó para inocular 1 litro del mismo medio que se incubó overnight.

El cultivo se centrifugó a 3000 rpm y el pellet obtenido se resuspendió en 36 ml de solución I ( glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8, EDTA 10 mM ), a los que se

agregaron 4 ml de lisozima a una concentración de 4 mg/ml disuelta en la misma solución. La mezcla se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Seguidamente se agregaron 80 ml de solución II ( NaOH 0.2 N, SDS 1% ), se mezcló por inversión y se incubó en hielo durante 10 minutos.

Luego se incorporaron 40 ml de solución de AcONa 3M pH 4.8 fría, mezclando por inversión y se dejó reposar en hielo al menos durante 15 minutos.

Se centrifugó la mezcla a 12000 rpm durante 30 minutos y se filtró el sobrenadante utilizando un trozo de gasa estéril.

A partir de aquí se utilizaron dos variantes.

Variante A: se utilizó para las extracciones de cósmido utilizadas para los análisis de restricción y la visualización en geles.

Variante B: se utilizó para extraer el cósmido pVK102 para ser utilizado en experimentos de clonado.

### **Variante A**

Al sobrenadante obtenido anteriormente se agregaron 0.7 volúmenes de isopropanol a  $-20^{\circ}\text{C}$ , que se mezclaron por inversión.

Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos, y se centrifugó a 10.000 rpm a temperatura ambiente durante 30 minutos.

El pellet obtenido se dejó secar al aire y se resuspendió en 10 a 20 ml de buffer TE.

Se extrajo la muestra una vez con un volumen de fenol ácido ( fenol saturado con AcONa 50 mM pH 4 ) y una vez con un volumen de cloroformo isoamílico 24:1.

Dos volúmenes de etanol absoluto se agregaron a la fase acuosa, se incubó 2 hs a  $-20^{\circ}\text{C}$  o 15 minutos a  $-70^{\circ}\text{C}$  y se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 minutos.

El pellet obtenido se escurrió, se lavó con etanol 70%, se secó y se resuspendió en 2 ml de buffer TE.

Para eliminar el RNA se incubó la muestra resuspendida en TE durante 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  con RNAsa concentración final 50  $\mu\text{g/ml}$ . Se conservó la preparación a 4 grados

### **Variante B**

Se extrajo el sobrenadante obtenido anteriormente una vez con un volumen de fenol ácido ( fenol saturado con AcONa 50 mM pH 4 ) y una vez con un volumen de cloroformo isoamílico 24:1. La fase acuosa se precipitó agregando 0.7 volúmenes de isopropanol a  $-20^{\circ}\text{C}$ , que se mezclaron por inversión. Se dejó reposar a temperatura ambiente durante 15 minutos, y se centrifugó a 10.000 rpm a temperatura ambiente durante 30 minutos.

El pellet obtenido se resuspendió en 7 ml de TE conteniendo NaCl 100 mM, y se pasó por una columna de Sepharosa CL 4B (Pharmacia) equilibrada con el mismo buffer. Se recogieron fracciones de 1 ml.

Se analizaron las fracciones mediante electroforesis en gel de agarosa 0.8% en buffer TAE, y se eligieron las fracciones con mayor contenido plasmídico, que se incubaron 2 hs a 37°C con el agregado de RNAsa 50 µg/ml. Se conservó la preparación a 4 grados.

## **XV. EXTRACCION DE DNA GENOMICO de *B.megaterium***

Hull et al 1981

Se centrifugó un cultivo exponencial crecido en 1 litro de LB, el pellet se lavó con TE, y se resuspendió en 10 ml de solución I ( sacarosa 25%, Tris-HCl 50 mM pH 8, EDTA 1 mM ) en hielo. Se agregaron 0.25 ml de lisozima a una concentración de 40 mg/ml en solución I , y luego de 5 minutos se adicionaron secuencialmente: 50 µl de :  
proteínasa K 20 mg/ml recién preparada, 2 ml de EDTA 0.5 M y 1.25 ml de Sarkosyl 10%, mezclando bien luego de cada agregado. Se dejó la mezcla en hielo hasta completar la lisis (unas 2 hs), se cubrió el tubo con papel de aluminio y se incubó a 50°C durante toda la noche.

A partir de aquí se trató la muestra de dos maneras diferentes: se centrifugó en un gradiente de CsCl, para obtener DNA de alto peso molecular para el clonado en pVK102, o se precipitó con etanol luego de extraer las proteínas con fenol.

### **Gradiente de CsCl**

A 5.42 ml de muestra se le agregaron 88.26 g de CsCl y 70 ml de TE. Se ajustó el índice de refracción, agregando buffer o sal según correspondiese, a 1.394.

Se centrifugó la mezcla en el rotor vertical Sorvall TV865B a 52.000 rpm durante 20 hs, y se recogió con una punta de micropipeta de 1 ml con el extremo cortado una banda difusa cercana al fondo del tubo. El material así obtenido se dializó durante toda la noche contra 500 ml de buffer TE, y luego se cambió el buffer, dializando 48hs más, esta vez utilizando 1 litro de buffer. El peso molecular del DNA se analizó en geles de agarosa 0.4%, y se conservó a 4°C.

### **Precipitación con etanol**

Se extrajo la muestra con un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico 25:24:1 (el fenol saturado con Tris HCl pH 8), y luego con 1 volumen de cloroformo:isoamílico 24:1.

Luego se agregaron a la fase acuosa 2 volúmenes de etanol absoluto, depositados suavemente sobre la superficie, de modo que quedasen 2 fases. Se tomó el DNA de la interfase enrollándolo suavemente en una varilla de vidrio estéril. Posteriormente se lavó el DNA enrollado en la varilla dejándole caer etanol 70%, se dejó secar y se resuspendió el DNA sumergiendo la varilla en un tubo Eppendorf con 1 ml de buffer TE a 4°C. durante toda la noche.

## **XVI. CORTE DE DNA CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN Y ANALISIS EN GELES DE AGAROSA**

Se utilizaron enzimas de restricción de varios fabricantes, principalmente GIBCO BRL, Boehringer y Sigma.

Se digirió el DNA con la/s enzima/s de restricción adecuada/s según las indicaciones del fabricante, aumentando el tiempo de incubación en los casos en que se utilizó gran cantidad de DNA hasta toda la noche.

El DNA digerido se corrió en geles de agarosa en TAE, utilizando el mismo buffer para la corrida.

Para las corridas de fragmentos pequeños y plásmidos sin cortar la concentración de agarosa utilizada en los geles fue de entre 0.8 y 1% , y las condiciones de corrida utilizadas fueron de 75 a 100 volts durante 3 a 4 hs.

Para fragmentos grandes, cósmidos y DNA cromosomal se utilizaron geles de agarosa 0.4%, corridos durante toda la noche a 15 mA, o durante 5 hs a una intensidad de corriente de 25 a 30 mA.

Como patrones de peso molecular se utilizó DNA del fago lambda cortado con HindIII, DNA del fago T4 y fragmentos de restricción de fago lambda de alto peso molecular (48.5 a 8.3 kb) ( GIBCO BRL).

Una vez finalizada la corrida electroforética, los geles se tificaron por inmersión en una solución de EtBr (Sigma) 50 µg/ml durante 20 a 30 minutos a temperatura ambiente. El DNA se observó en un transiluminador de luz ultravioleta de 320 nm (Photodyne), y los geles se fotografiaron utilizando una cámara polaroid con filtro rojo y película blanco y negro (Polaroid 667)

## XVII. OBTENCION DE FRAGMENTOS DE DNA A PARTIR DE PLASMIDOS PARA USAR COMO SONDAS

Para los experimentos de hibridización se utilizaron sondas que hibridizaran con el transposón Tn917 y con los genes *phb*.

### XVII.a. Sonda para Tn917

Se utilizó un fragmento de 900 bases obtenido por digestión del plásmido pTV54, que se muestra en la figura 2 con la enzima HindIII.

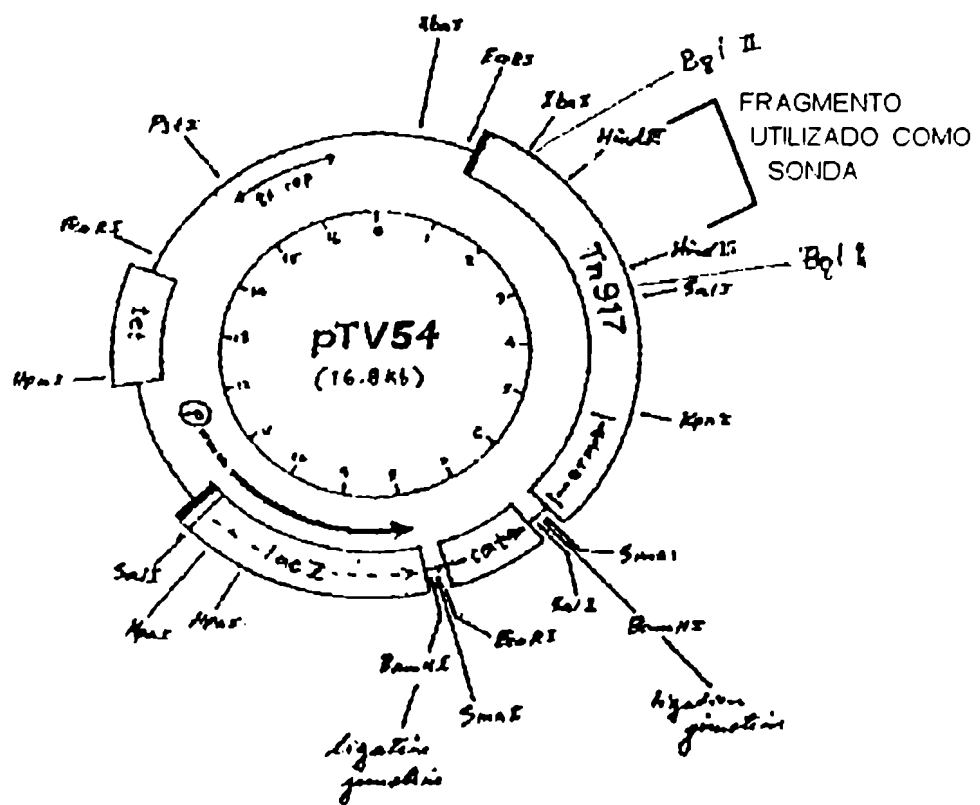


FIGURA 2



### XVII.b. Sondas de genes *phb* de *A. eutrophus*

Se utilizaron diferentes fragmentos de plásmidos que contienen los genes *phb* de *A. eutrophus*:

El plásmido pTZ18U, que se muestra en la figura 3, contiene las tres enzimas del camino metabólico.

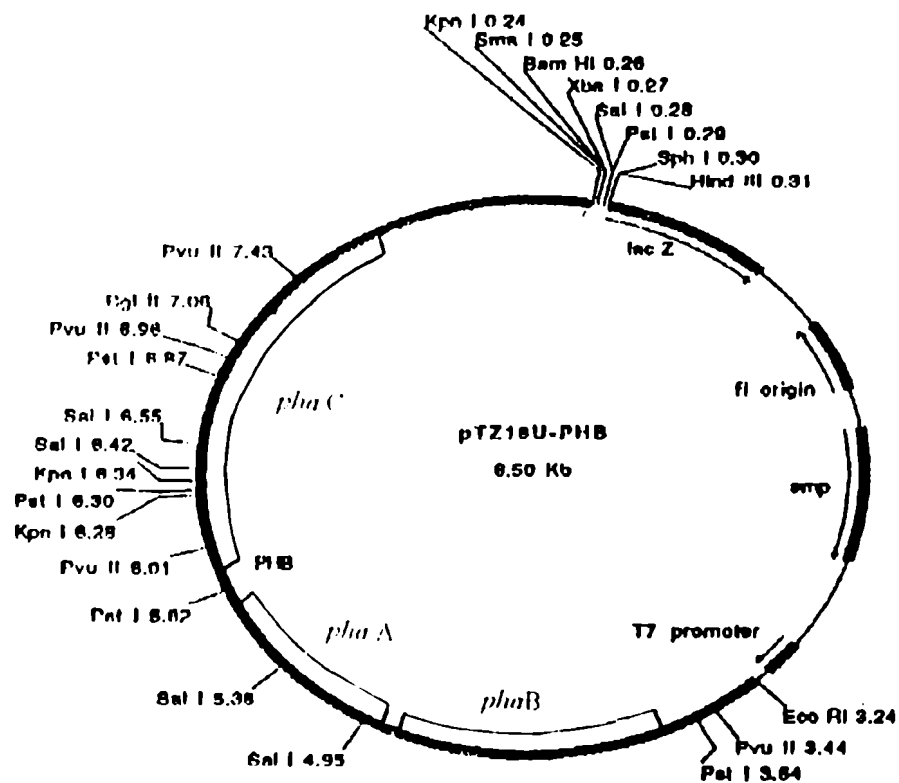


Figura 3

Los plásmidos pSK2696 y pSK2660 son vectores bluescript (figura 4A) a los que se les han insertado diferentes fragmentos de esta región.

En la figura 4 se muestran los fragmentos insertos en estos plásmidos.

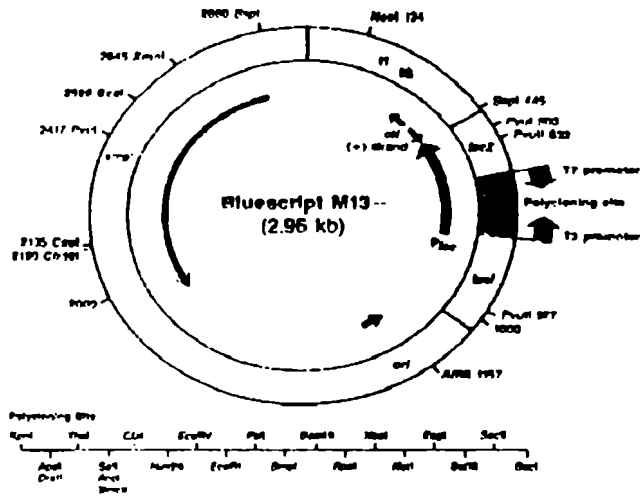


FIGURA 4A

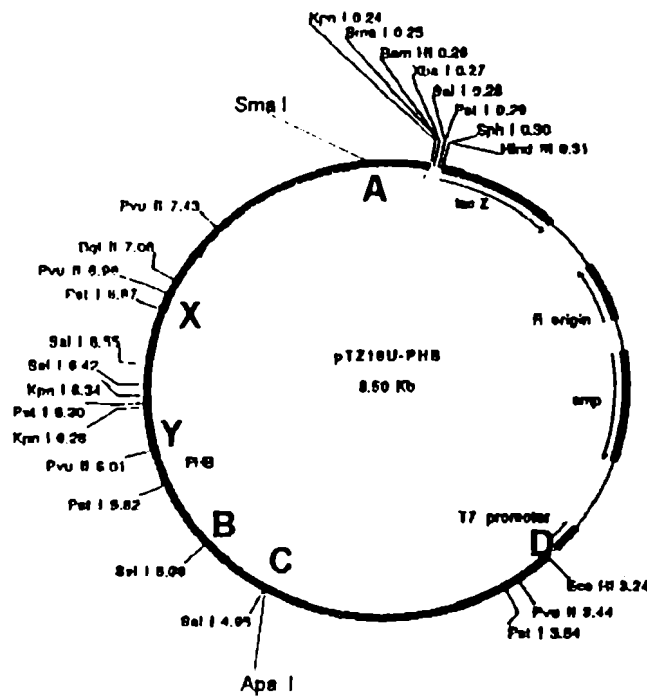


FIGURA 4B

Plásmido pSK2696 : es un vector bluescript que lleva inserto un fragmento Sma I Apa I de 3.5 kb señalado en la figura en el plásmido pTZ18U-PHB (figura 4B) entre las letras A y C.

Plásmido pSK 2660: es un vector bluescript que lleva inserto un fragmento Sal I EcoR I de 2.1 kb señalado en la figura entre las letras B y D en la figura correspondiente al plásmido pTZ18U.-PHB (figura 4 B).

Los fragmentos utilizados fueron:

i) Un fragmento de 5.5 kb del plásmido pTZ18U-PIIB obtenido por corte con BamHI y EcoRI, que contiene las tres enzimas del camino metabólico del PIIB. ( figura 3 )

ii) Un fragmento de 3.5 kb del plásmido pSK2696 digerido con ApaI y BamHI, que contiene el gen de la polimerasa y una parte del gen de la  $\beta$ -cetotiolasa. ( figura 4, fragmento A-C )

iii) Un fragmento de 950 bases obtenido por digestión con PvuII del mismo plásmido, que contiene una parte del gen de la polimerasa. ( figura 4, fragmento X-Y )

iv) Un fragmento de 2.1 kb del plásmido pSK2660 cortado con ApaI y EcoRI, que contiene el gen de la reductasa y parte del gen de la  $\beta$ -cetotiolasa. ( figura 4, fragmento B-D )

#### **XVII.c. Sonda de $\beta$ -cetotiolasa de *B.megaterium***

Se utilizó un fragmento de entre 3.3 y 3.5 kb obtenido por digestión con las enzimas PstI y ClaI del plásmido pBMe3, que contiene el gen de la  $\beta$ -cetotiolasa de *B.megaterium*. La elección y descripción de este fragmento se discute en resultados.

#### **XVIII. RECUPERACION DE LOS FRAGMENTOS DE LOS GELES DE AGAROSA**

Para eluir fragmentos de DNA de un gel, se localizaron las bandas a eluir luego de la electroforesis, se cortaron trozos pequeños del gel conteniendo los fragmentos de DNA desecados, y se colocaron dentro de tubos eppendorf con un orificio en la punta, intercalando unas hebras de lana de vidrio entre el orificio y el trocito de gel para impedir el paso de la agarosa. Estos tubos con los fragmentos de gel se colocaron dentro de tubos vacíos, y se centrifugaron juntos a 11.000 rpm durante 30 minutos en un rotor Beckman JA20. El líquido contenido en la agarosa, con el DNA disuelto, pasó a los tubos inferiores, y el DNA se recuperó precipitándolo con 2 volúmenes de etanol.

## **XIX. TRANSFERENCIA DE DNA GENOMICO A MEMBRANAS DE NYLON** Southern E.(1975)

Las muestras de DNA a analizar se cortaron con las enzimas de restricción adecuadas y se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa de 11 x 14 cm. Una vez finalizada la corrida se desnaturalizó el DNA del gel sumergiéndolo en 400 ml de una solución de NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M, durante 40 minutos con agitación muy suave, y luego se renaturalizó repitiendo el tratamiento con una solución de NaCl 1.5 M, Tris-HCl 1M pH 8.

Una vez realizado este procedimiento, se armó el sistema de transferencia de la manera que se describe a continuación.

Dentro de una fuente de vidrio de poca profundidad se colocó una placa de vidrio de tamaño mayor que el gel a transferir, apoyada sobre tapas de cajas de Petri para separarla del fondo. Sobre la placa de vidrio se colocaron varios trozos de papel de filtro Whatman #1 o similar más largos que la placa, de manera que los extremos del papel tocaran el fondo de la fuente. Sobre los trozos de papel de filtro se apoyó el gel, con los pocillos de siembra hacia abajo, y sobre éste un trozo de membrana de nylon (Sigma N° N-1264) cortada del mismo tamaño que el gel, tomando la precaución de eliminar las burbujas entre el papel y el gel, y entre éste y la membrana. Luego se colocaron varios trozos de papel de filtro sobre la membrana, una pila de servilletas de papel, y por último una placa de vidrio y un recipiente con 1 litro de agua para mantener la pila bien compacta.

Se colocó el buffer de transferencia, SSC 20X, en la fuente de vidrio hasta una altura de 1 cm, se selló el espacio entre la placa inferior de vidrio y el borde de la fuente con película de polietileno para minimizar la evaporación del buffer, y se dejó transferir por capilaridad durante toda la noche a temperatura ambiente.

Una vez finalizada la transferencia se desarmó el sistema, sin despegar la membrana del gel, se marcó con un lápiz la ubicación de los pocillos de siembra sobre la membrana, se desprendió el gel y se lavó la membrana durante 10 minutos en 200 ml de SSC con agitación lenta. Finalmente se fijó el DNA a la membrana homeándola entre papeles de filtro a 80°C durante 2 hs.

## **XX. MARCADO NO RADIOACTIVO DE SONDAS CON BIOTINA**

Se utilizó un sistema de incorporación de nucleótidos biotinilados por "nick translation" : Bionick Labeling System (GIBCO BRL).

Este sistema utiliza la DNA polimerasa I para incorporar deoxiadenosina trifosfato biotinilada al DNA. Se marcó la sonda siguiendo las indicaciones del fabricante, y luego se purificó mediante dos precipitaciones sucesivas con 1/10 volumen de

AcONa 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto, incubando en cada caso la mezcla a -70°C durante 15 minutos o a -20°C durante dos horas o toda la noche.

Las sondas marcadas se resuspendieron en 5 a 20 µl de buffer TE y se conservaron a -20°C hasta el momento de ser utilizadas.

## **XXI. HIBRIDIZACION DE DNA UNIDO A MEMBRANAS DE NYLON CON SONDAS RIODINILADAS.**

### **XXI.a. Prehibridización**

Las membranas de Nylon con el DNA se colocaron dentro de una bolsita de nylon, y se agregaron aproximadamente 0.1 ml por cm<sup>2</sup> de membrana de solución de prehibridización:

PO <sub>4</sub> Na <sub>2</sub>	0.26 M pH7
SDS	7%
EDTA	1 mM
BSA	1%

La bolsita se selló por calor y se incubó a 45°C con agitación suave durante la noche.

### **XXI.b. Hibridización**

Al finalizar la prehibridización se abrieron las bolsitas, se pusieron las membranas en bolsitas nuevas a las que se agregó aproximadamente la misma cantidad de solución de prehibridización que en B. DNA de esperma de salmón (100 µg/ml), y luego la sonda marcada (100 ng/ml).

Ambos DNAs fueron previamente desnaturalizados calentándolos 5 minutos a 100°C y poniéndolos rápidamente en hielo.

Las bolsitas se sellaron por calor eliminando posibles burbujas y se incubaron a 45°C con agitación lenta durante la noche.

### **XXI.c. Lavados**

Luego de la hibridización se lavaron las membranas para eliminar la sonda no unida al DNA blanco en forma específica. Para ello se realizaron los siguientes lavados, utilizando aproximadamente 10 ml de solución por cm<sup>2</sup> de membrana:

SSC 2x SDS 0.1% 3 minutos a temperatura ambiente, 2 veces  
SSC 0.2x SDS 0.1% 3 minutos a temperatura ambiente, 2 veces  
SSC 1.6x SDS 0.1% 15 minutos a 50°C , 2 veces

Por ultimo se enjuagaron con SSC 2X, y se procedió a la visualización o se secaron las membranas en los casos en que se procesaron más tarde.

#### **XXI.d. Visualización**

Se revelaron las membranas hibridizadas utilizando un kit de revelado de sondas biotiniladas, Bluegene (BRL), siguiendo las instrucciones del fabricante. Durante el revelado, se unió un conjugado de streptavidina-fosfatasa alcalina a la biotina, unida a su vez al DNA, y luego se colocaron las membranas en una solución con los sustratos nitroblue tetrazolium (NBT) y 5-bromo-4-cloro-3-indolylfosfato (BCIP), que por acción de la fosfatasa forman sustancias de color azul violáceo, quedando coloreadas las zonas de la membrana donde se ha unido el DNA biotinilado.

### **XXII. CLONADO DE LA REGION DE LA INSERCIÓN DE Tn917 DEL CROMOSOMA DE LA CEPA UBA 30-21 EN EL COSMIDO pVK102**

#### **XXII.a. Digestión parcial del DNA genómico de la cepa UBA 30-21 con Xho I**

Para generar fragmentos de alto peso molecular del cromosoma de esta cepa se hicieron ensayos para determinar las condiciones de restricción que produjeran mayor cantidad de fragmentos de entre 20 y 25 kb de peso molecular.

Se prepararon diluciones seriadas al medio de la enzima XhoI en el buffer de conservación indicado por el fabricante, que se conservaron a -20°C.

Se prepararon mezclas de reacción con cada una de las diluciones de enzima, utilizando 1 µl de DNA cromosomal preparado según indicado anteriormente y purificado en gradiente de CsCl y 5 µl de la dilución de enzima, en un volumen final de 50 µl. Las mezclas se incubaron a 37°C durante toda la noche, y se analizaron alícuotas de 30 µl de cada una en geles de agarosa 0.4%. Se eligió una dilución de enzima que contenía 1 unidad en 1.024 ml, y originaba una gran mayoría de fragmentos de más de 20 kb.

Se digirieron 500 µl de la preparación de DNA conservando las proporciones utilizadas en las pruebas de restricción y se verificó la misma mediante electroforesis en un gel de agarosa 0.4% .

Se extrajo la mezcla de reacción con un volumen de fenol:cloroformo:isoamilico 25:24:1, se precipitó por agregado de AcONa y etanol como se describe anteriormente, y se resuspendió en 600 µl de agua destilada estéril a 4°C durante toda la noche.

#### **XII.b. Fraccionamiento del DNA por peso molecular en gradiente de sacarosa**

Se sembró el DNA obtenido en el paso anterior en un gradiente de sacarosa de 10 a 20% preparada en un buffer NaCl 1M, Tris-HCl 20 mM pH 8, EDTA 5 mM.

Se utilizaron tubos de 17 ml, que se llenaron con 14 ml de gradiente preparado colocando 7.5 ml de solución de sacarosa 10% y 7.5 ml de solución 40% en los vasos comunicantes de un formador de gradiente.

Se sembraron 200 µl de suspensión de DNA sobre la superficie de la sacarosa en cada tubo, y se centrifugó a 23°C durante 24 hs a 26.000 rpm en un rotor Sorvall AH 627

Se tomaron fracciones del gradiente de 1 ml, por aspiración del líquido del fondo del tubo con un capilar, se juntaron las fracciones correspondientes de los distintos tubos, y se analizaron alícuotas de las fracciones en un gel de agarosa 0.4%.

Se mezclaron las 5 primeras fracciones, que contenían fragmentos mayores de 12 kb, se diluyó la muestra con un volumen de agua bidestilada estéril, se agregaron 2 volúmenes y medio de etanol absoluto y se precipitó a -20°C toda la noche. Luego se centrifugó a 10000 rpm durante 15 minutos en un rotor Beckman JA14, y se resuspendió el pellet en 1 ml de Tris-HCl, 10 mM, EDTA 0.1 mM. Por comparación con 100 ng de DNA de fago lambda en un gel de agarosa se calculó la concentración del DNA fraccionado, obteniéndose un valor de entre 50 y 100 ng/µl. Para aumentar la concentración de la muestra se reprecipitó, y el precipitado se resuspendió en 100 µl de TE.

### **XVII.c. Preparación del DNA del vector para la reacción de ligado**

Se hizo una extracción del DNA del cósmido pVK102 (figura 5) como se describió anteriormente, y se digirieron 30 µg de muestra utilizando 50 unidades de enzima XhoI en un volumen final de 500 µl durante 5 hs.

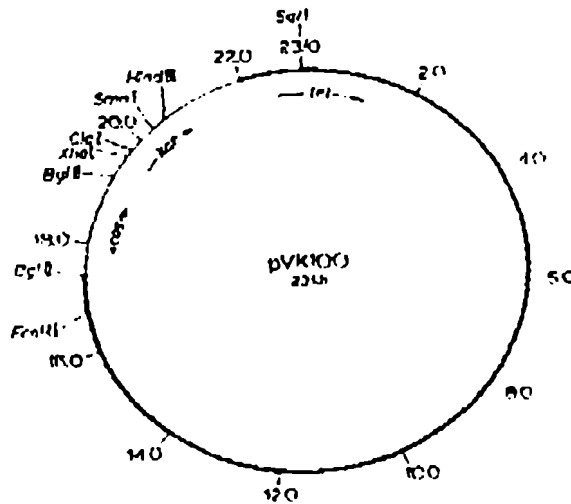


FIGURA 5

Luego de verificar la restricción en un gel de agarosa se extrajo la muestra con fenol:cloroformo:isoamílico, cloroformo:isoamílico, se precipitó con AcONa y etanol y se resuspendió en 90 µl de TE.

### **XVII.d. Ligado**

Se cuantificaron las preparaciones de DNA cromosomal cortado y fraccionado y del vector cortado por comparación de la intensidad de fluorescencia con una cantidad conocida de fago lambda en un gel de agarosa, calculándose una cantidad de alrededor de 200 ng/µl para ambas muestras. Se prepararon 3 mezclas de ligado con diferentes proporciones de ambos DNA, en un volumen final de 20 µl, utilizando en cada mezcla 3 unidades de DNA ligasa del fago T4 (Boehringer Mannheim) y 2 µl de buffer de enzima. No se utilizó PEG en las mezclas de ligado.

	ligado 1	ligado 2	ligado 3
DNA genómico	13.5 µl	6.5 µl	1.5 µl
DNA pVK102	5 µl	7.5 µl	13.5 µl



Las mezclas de ligado se incubaron durante 17 hs. a 16.5 °C y luego se sembraron alícuotas de cada una en un gel de agarosa 0.4% para observar el resultado de la reacción.

#### **XXII.e. Empaquetamiento de las mezclas de ligado.**

Se empaquetaron 10 µl de las mezclas de ligado 1 y 2 utilizando un sistema de empaquetamiento "in vitro" de fago lambda ( GIBCO BRL. ), siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema contiene dos extractos con diferentes partes de la cápside de lambda, que al ser mezcladas con un ADN de tamaño apropiado que contiene los sitios cos de reconocimiento, permite obtener el ADN recombinante empaquetado.

Las muestras se titularon de la manera indicada en el sistema, infectando la cepa receptora y seleccionando colonias resistentes a tetraciclina (20 µg/ml), salvo que se utilizó como hospedadora la cepa de *E.coli* HB101 en lugar de la cepa provista.

#### **XXII.f. Rastreo de clones conteniendo Tn917**

Se hicieron infecciones de la cepa HB101 de *E.coli* con las mezclas de ligado empaquetadas previamente tituladas de manera de obtener entre 100 y 200 colonias Tet<sup>R</sup> por placa.

Se resuspendieron las colonias crecidas en cada placa y se guardaron las suspensiones a -20°C con glicerol.

Se titularon las suspensiones en LB tetraciclina, y se sembraron alícuotas en placas de LB tetraciclina Cm (20 y 10 µg/ml respectivamente).

Los clones Cm<sup>R</sup> se reestriaron en el mismo medio y se conservaron a -20°C con glicerol.

#### **XXII.g. Rastreo de clones con actividad de β-cetotilasa**

Se prepararon cultivos de 10 ml en LB tetraciclina Cm de 18 clones Cm<sup>R</sup> obtenidos, y de *E.coli* HB101 y *B.megaterium* PV447 en LB y se determinó la actividad de β-cetotilasa de todas las muestras.

### **XXIII. ANALISIS DEL COSMIDO pBM142**

Se extrajo el cósmido pBM142 de la cepa UBA1-37 como se describió anteriormente, y digirió con diferentes enzimas de restricción y se analizaron los resultados en geles de agarosa.

### **XXIV. SUBCLONADO DEL FRAGMENTO CON ACTIVIDAD DE $\beta$ -GALACTOSIDASA**

#### **XXIV.a. Preparación y ligado de los fragmentos a pUC19**

Se digirió el cósmido pBM142 con la enzima EcoRI, se extrajo la muestra con fenol-cloroformo:isoamílico, cloroformo:isoamílico, se precipitó con AcONa y etanol y se resuspendió en 20  $\mu$ l de TE.

Se sembró la muestra en un gel de agarosa 0.4% y se eluyeron fragmentos de 9, 6 y 4 kb de la manera indicada previamente.

Se hicieron mezclas de ligado de cada uno de los fragmentos eluidos con el plásmido pUC19 (Boehringer Mannheim) cortado con EcoRI, que se incubaron durante toda la noche a 17°C.

Se verificó la reacción de ligado mediante electroforesis.

#### **XXIV.b. Transformación de células competentes de *E.coli* HB101 con los plásmidos recombinantes**

Para obtener las células competentes se recolectaron por centrifugación en frío las células de 40 ml de un cultivo exponencial (D.O. 550nm = 0.6) en LB de la cepa HB101, y se resuspendieron en 20 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM frío, y luego de incubarlas en hielo durante 30 minutos, se centrifugaron en las mismas condiciones utilizadas, y se resuspendieron en 4 ml de la solución de CaCl<sub>2</sub> fría. Las células se mantuvieron en hielo hasta el momento de ser transformadas.

Se agregaron 300  $\mu$ l de las células preparadas de esta manera a 5  $\mu$ l de la mezcla de ligado mezclada con 45  $\mu$ l de TE, y se incubó la preparación durante 40 minutos en hielo, 3 minutos a 42°C y 10 minutos a temperatura ambiente.

Se diluyó la muestra con 1 ml de LB, se incubó 30 minutos a 37°C y se plaquearon alicuotas de 0.2 ml en placas de LB con el agregado de XGal, IPTG y Amp(100  $\mu$ g/ml). Las placas se incubaron 24 hs. a 37°C.

Se reestriaron las colonias más claras en el mismo medio, y en medio sin IPTG.

Se hicieron extracciones de plásmido a partir de cultivos de 10 ml de las colonias reestriadas. Los plásmidos extraídos se cortaron con la enzima *EcoRI* y se corrieron en un gel de agarosa junto con las preparaciones sin cortar.

#### **XXIV.c. Medición de la actividad de $\beta$ -cetotilasa de los clones**

Se hicieron cultivos en LB (con antibióticos para las cepas con resistencias) de 10 ml de las cepas a determinar, y se realizó la medición como se describió anteriormente.

## **RESULTADOS**

## **I. RASTREO DE GENES PHB EN UNA BIBLIOTECA GENOMICA DE *B.megaterium* EN *E.coli***

Uno de los enfoques utilizados para el estudio de los genes *phb* de *B.megaterium* fue el de rastrearlos en una biblioteca genómica construida utilizando el plásmido "shuttle" pHV33 en la cepa HB101 de *E.coli*. La modalidad de rastreo elegida fue la detección de clones que presentaban actividad de una de las enzimas del camino biosintético del polímero.

### **1.a.RASTREO DE UN CLON PRODUCTOR DE $\beta$ -CETOTIOLASA**

En varias especies bacterianas estudiadas se han hallado los genes *phb* agrupados en clusters, por lo se pensó que un rastreo para el gen de una de las enzimas de la vía biosintética podría dar como resultado la detección de otros genes de la misma.

La  $\beta$ -cetotiolasa, que cataliza la reacción de condensación de dos moléculas de Acetil-CoA para formar Acetoacetyl-CoA, es la enzima del camino metabólico del PHB cuya actividad es más fácil de determinar.

Existe un método de ensayo para esta enzima sensible y rápido. Por otra parte, en condiciones no inducidas la  $\beta$ -cetotiolasa propia de *E.coli*, el hospedador de clonado elegido, no presenta actividad detectable.

Por estas razones fue la enzima de elección para el rastreo enzimático de bibliotecas genómicas de *B.megaterium* en *E.coli*, obtenidas por corte del genoma con la enzima PstI, y ligado de los fragmentos con el vector pHV33. Estas bibliotecas, descritas en materiales y métodos, involucraban un gran número de clones.

Para rastrear un gran número de clones, normalmente no se hacen ensayos individuales sino que se agrupan varios clones juntos. Para facilitar y hacer más rápido el rastreo se buscó la manera de analizar el mayor número posible de clones a la vez. Tal como se describe en materiales y métodos, se realizaron ensayos enzimáticos de mezclas de *B.megaterium* y *E.coli*, utilizando distintas proporciones de células de una y otra cepa, y se encontró que se podía detectar la actividad de la enzima producida por *B.megaterium* en un extracto que contenía aproximadamente 1 célula de este organismo por cada 100 células de *E.coli*. (figura 6)

Extrapolando estos resultados se supuso que sería posible detectar un clon productor de  $\beta$ -cetotiolasa en un extracto crudo obtenido por sonicación de una mezcla de 100 clones.

Se midió la actividad enzimática de grupos de clones obtenidos resuspendiendo las colonias crecidas en placas de Petri de la manera descrita en materiales y métodos.

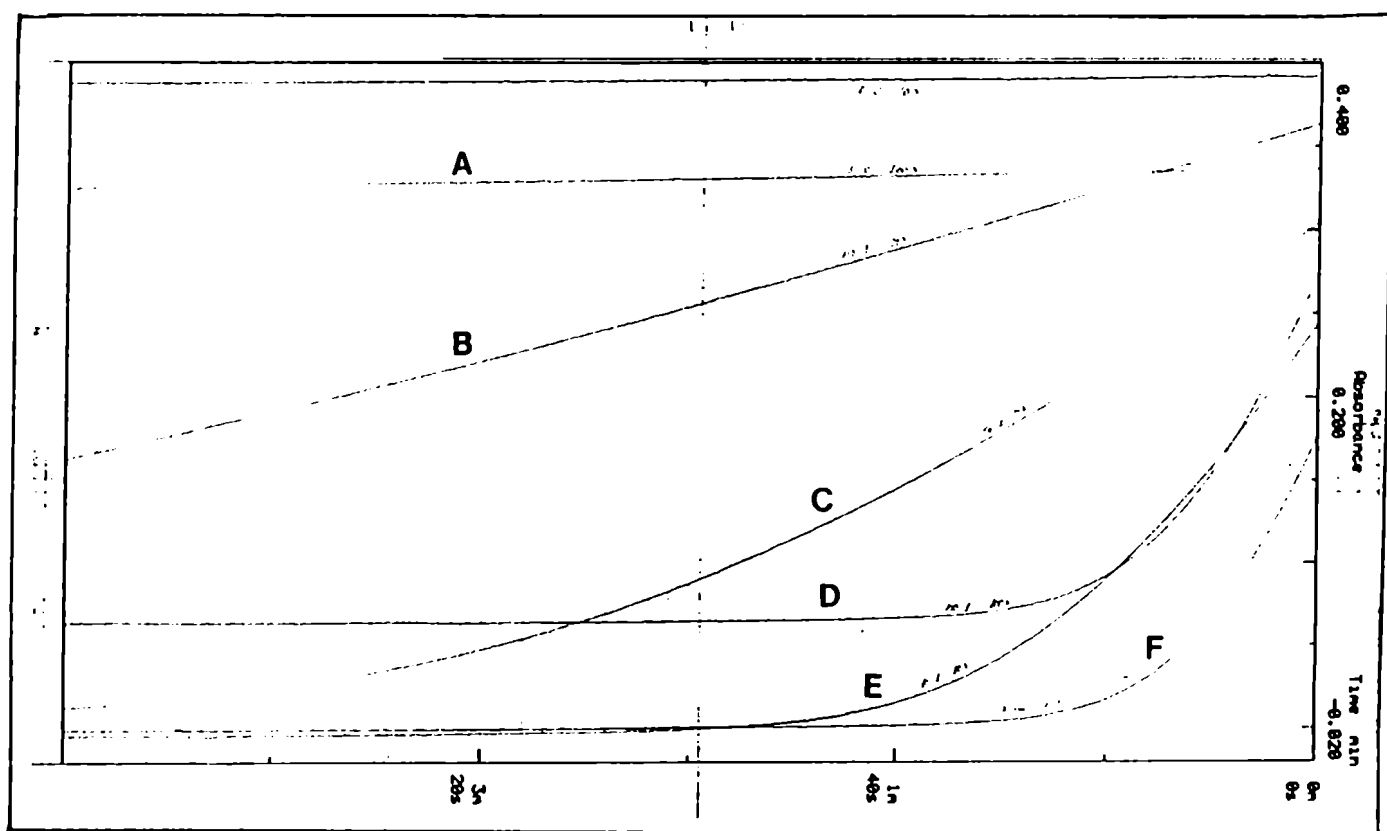
En la primer biblioteca analizada, compuesta por 3155 clones, se utilizaron resuspendidos de 35 placas con aproximadamente 500 colonias cada una.

En este caso no se observó ningún grupo de clones con actividad enzimática, probablemente debido al número excesivo de clones por grupo.

Para analizar la segunda, de 3760 clones, se utilizaron 37 placas con un promedio de 76 colonias cada una. En este experimento se utilizaron placas de medio LB con tetraciclina al que se agregó 1 % de gluconato de sodio.

En la suspensión obtenida a partir de una de las placas de esta biblioteca se detectó una leve actividad de  $\beta$ -cetotiolasa, por lo que se repitió el ensayo utilizando grupos de 9 clones procedentes de la misma placa, identificando el grupo que presentaba actividad enzimática.

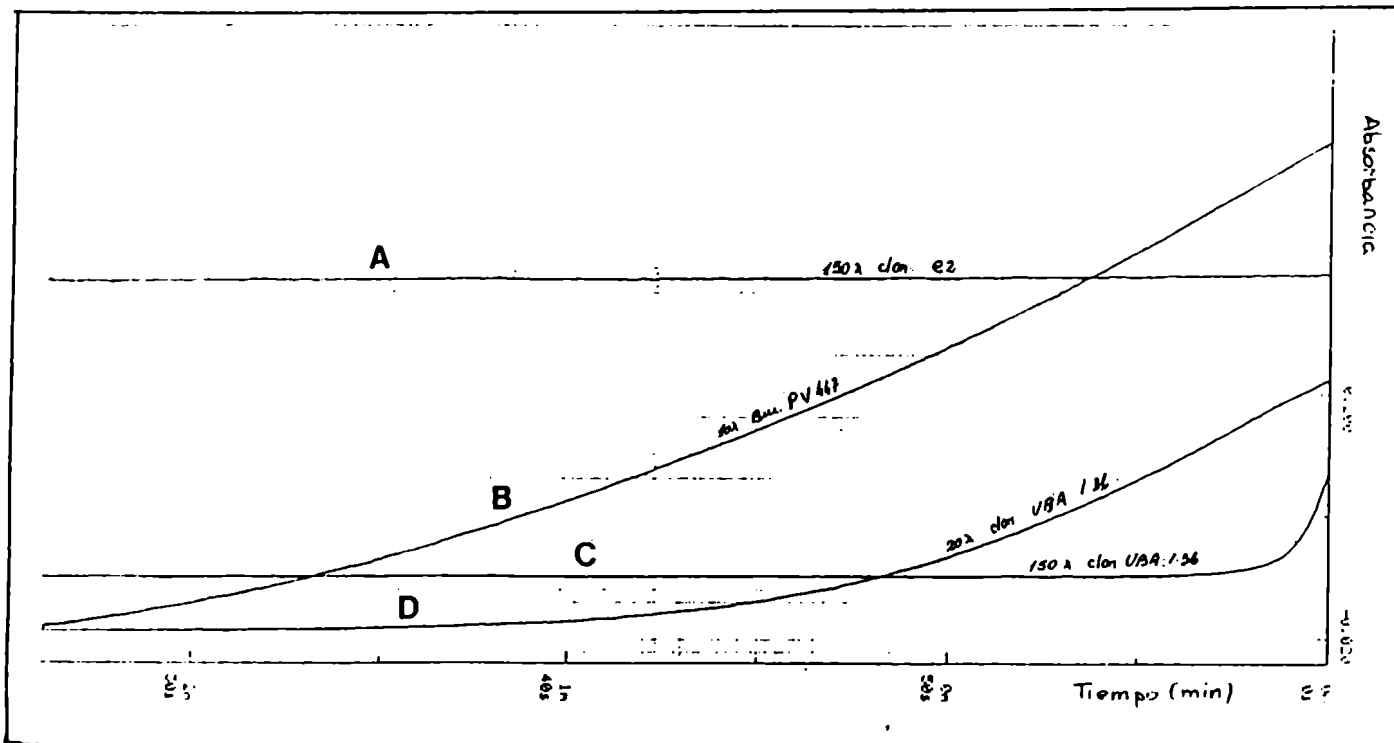
Por último se midió individualmente la actividad a todos los clones de este grupo, obteniéndose el clon productor de  $\beta$ -cetotiolasa, que se denominó UBA1-36.(figura 7)



Curvas de actividad de  $\beta$ -cetotiolasa

- A: *E. coli* HM101 (100  $\mu$ l)    F: *B. megaterium* PV117
- B: *E. coli* - *B. megaterium* 100:1 (10  $\mu$ l)
- C: *E. coli* - *B. megaterium* 50:1 (10  $\mu$ l)
- D: *E. coli* - *B. megaterium* 100:1 (100  $\mu$ l)
- E: *E. coli* - *B. megaterium* 10:1 (10  $\mu$ l)

FIGURA 6



**Figura 7**  
Curvas de actividad de  $\beta$ -cetotiolasa

- A: clon e2 de la biblioteca genómica (150  $\mu$ l)
- B: *B.megaterium* PV447 (10  $\mu$ l)
- C: clon UBA1-36 (150  $\mu$ l)
- D: clon UBA1-36 (20  $\mu$ l)

## I.b. ANALISIS DEL CLON PRODUCTOR DE $\beta$ -CETOTIOLASA

### I.b.1. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA DE $\beta$ -CETOTIOLASA

Se determinó la actividad específica de  $\beta$ -cetotiolasa de cultivos de la cepa UBA1-36 y de la cepa PV447 en LB líquido, obteniéndose para la cepa recombinante un valor del 74% de la actividad de la cepa PV447.(tabla 1 )

TABLA I

CEPA	ACT. ESP. RELATIVA DE $\beta$ -CETOTIOLASA*
<i>B. megaterium</i> PV447	1
<i>E. coli</i> UBA1-36	.74
<i>E. coli</i> HB101	ND

ND no se detectó actividad

\* Activ. especif.  $\beta$ -cetotiolasa de la cepa medida/ activ. especif. de la cepa PV447

## 1.b.2. ANALISIS DEL PLASMIDO RECOMBINANTE DEL CLON UBA1-36

Para analizar el inserto se extrajeron mediante el método de Birboim y Doly el plásmido del clon UBA1-36, denominado pBMe3, y el plásmido pHV33 sin inserto, obtenido de un clon de la biblioteca genómica que conservaba intacta su resistencia a ampicilina. Los plásmidos se corrieron en un gel de agarosa 0.8% en buffer TAE. En la figura 3 se observa que el plásmido pBMe3 corrió menos que el plásmido pHV33, indicando probablemente una diferencia de tamaño producida por la inserción del fragmento de ADN genómico.

### 1.b.2.i. ANALISIS CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

Se trató el plásmido pBMe3 con la enzima PstI esperando obtener el fragmento correspondiente al inserto de ADN genómico de *B. megaterium*, pero al observar el resultado de la restricción en un gel de agarosa, que se muestra en la figura 9, sólo se encontró una banda, de tamaño comprendido entre 8 y 9 kilobases, tamaño muy similar al del plásmido pHV33 original.

A partir de los resultados obtenidos se resolvió analizar en el plásmido recombinante la presencia y ubicación de los sitios de restricción que se hallaban en el vector originalmente.

Para ello se hicieron incubaciones con varias enzimas que tenían sitios de restricción en el plásmido pHV33, cuyos resultados se resumen en la tabla. Se observó que varias de ellas no cortaban el plásmido pBMe3, y en el caso de enzimas con más de un sitio de restricción, se encontró que cortaban en algunos sitios y no en otros.

Los resultados de las restricciones realizadas con las enzimas PstI, BamHI, EcoRI y HindIII se muestran en la figura 8.





Muestras sembradas

A:  $\lambda$  Hind III

B: pBMe3 sin cortar

C: pBMe3 Pst I

D: pBMe3 Pst I EcoR I

E: pBMe3 Pst I BamH I

F: pBMe3 Pst I Hind III

FIGURA 8

Entre las enzimas que se utilizaron se encontraron alteraciones en los sitios de corte de EcoR I, Hind III, Cla I, Pvu I y Nru I, y la aparición de sitios de restricción para las enzimas Sst I y Sph I que no se hallaban en el vector original, por lo que presumiblemente se hallen dentro del inserto.

8/5-

Al tratar el plásmido pBMe3 con la enzima BamH I se obtuvo una sola banda, y al cortar con esta enzima y Pst I simultáneamente se observaron 2 fragmentos, indicando un sitio de corte para cada una. Como el plásmido original pHV33 contenía un sitio de corte para BamH I, y pBMe3 aparentemente tenía un sitio de restricción para PstI, se supuso que el plásmido recombinante tenía un sólo sitio de corte para Pst I y otro para BamH I (posiblemente el sitio BamHI que se encontraba originalmente en el plásmido pHV33). Se realizaron numerosas restricciones con diferentes enzimas de restricción, en forma individual o de a pares, cuyos resultados se resumen en la tabla 2.

TABLA 2

ENZIMA DE RESTRICCION	# DE SITIOS DE CORTE PARA LAS ENZIMAS ESPECIFICADAS EN LOS PLASMIDOS			
	pBR322	pC194	pHV33	pBMe3
Apa I	0	0	0	0
BamHI	1	0	1	1
Bgl II	0	0	0	0
Cla I	1	2	3	1
EcoR I	1	0	1	0
Hind III	1	1	1	0
Epn I	0	0	0	0
Nru I	1	1	1	0
Pst I	1	0	1	1
Pvu I	1	0	1	0
Pvu II	1	1	2	2
Sma I	0	0	0	0
Sph I	1	0	1	2
Sst I	0	0	0	1

#### 1.6.2.ii. ANALISIS DE RESISTENCIAS A ANTIBIOTICOS

En base a los resultados obtenidos, se pensó que la desaparición de varios sitios de restricción podía deberse a la delección de un fragmento del plásmido original. La región donde se habría producido dicha delección es la zona del plásmido pHV33 donde se halla el gen de resistencia a cloramfenicol, cuyos sitios de restricción están ausentes en pBMe3.

Se verificó la resistencia a este antibiótico de las cepas que contienen a los plásmidos pHV33 y pBMe3 respectivamente. Se observó que el plásmido pBMe3 no confiere resistencia a cloramfenicol, mientras que el plásmido pHV33 sí. ( tabla 3)

TABLA 3

RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS EN LB AGAR

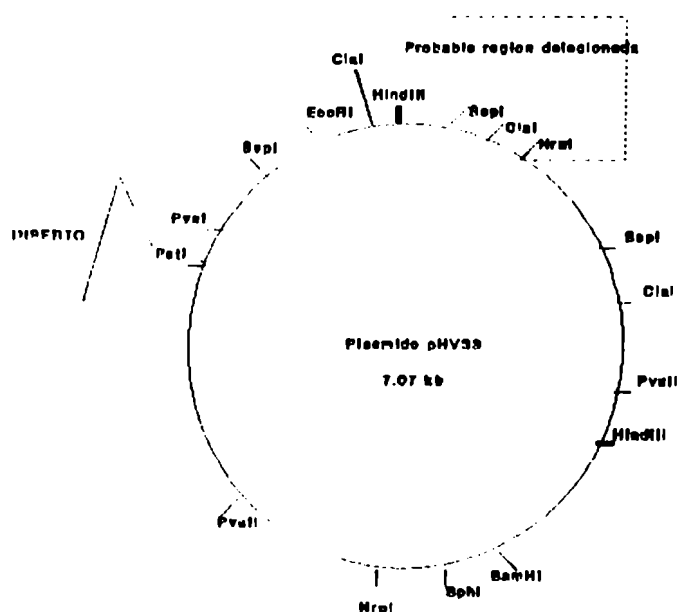
PLASMIDO RESISTENCIAS\*

pHV33 ampicilina , tetraciclina, cloramfenicol

pBMe3 ampicilina , tetraciclina

\* ampicilina 25 µg/ml, tetraciclina 25 µg/ml, cloramfenicol 10 µg/ml

De estos datos se concluyó que en el plásmido pBMe3 se produjo una deleción que eliminó el gen de resistencia a cloramfenicol y varios sitios de restricción, entre ellos sitios de corte para EcoR I, Hind III, Cla I, Pst I, Nru I y Pvu I, y que contiene un inserto que contiene sitios de restricción para las enzimas Sst I y Sph I.(figura 9 )



sobre el esquema del plasmido pHV33 se indica la region donde se encuentran los sitios de restricción que no se hallan en pBMe3 y la localización del inserto

FIGURA 9

Se supuso que de los dos sitios Pst I que deberían haber quedando flanqueando al inserto, el sitio más próximo al gen de resistencia a cloramfenicol fue delecionado junto con la región que contenía los sitios de restricción desaparecidos mencionados anteriormente.

En base a esta suposición se utilizó un fragmento Pst I Cla I de aproximadamente 3.5 kb que se supone contiene a la mencionada delección como sonda del gen de la  $\beta$ -cetotiolasa para experimentos de hibridización.( figura 10 )

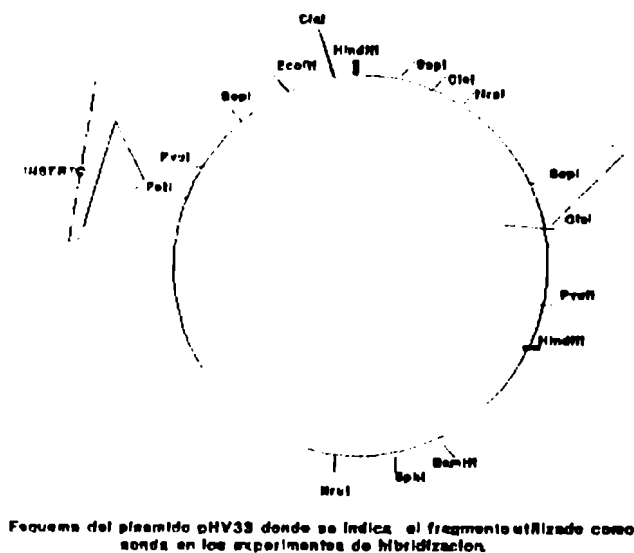


FIGURA 10

## II. OBTENCION DE MUTANTES PHB POR INSERCIÓN DEL TRANSPOSON Tn917 EN EL CROMOSOMA DE *B.megaterium*

El primer enfoque utilizado para el estudio de los genes PHB de *B.megaterium* fue la obtención de mutantes PHB por inserción del transposón Tn917.

Se utilizó la cepa PV447, una cepa lac- que no contiene plásmidos, para la mutagénesis por transposición.

El transposón Tn917 se inserta al azar en el cromosoma de *B.megaterium* (Bohall 1986), sin lugares preferenciales de inserción, como ocurre en el caso de *B.subtilis*, donde más del 90% de las inserciones están ubicadas en el locus glutamato

Considerando este dato y asumiendo que en el cromosoma de *B.megaterium* hay entre 5 y  $10 \times 10^3$  genes, como en *B.subtilis* (Youngman 1985), serían necesarias entre 1 y  $5 \times 10^4$  inserciones para obtener un banco de inserciones donde existiera la posibilidad de hallar una inserción en cualquier gen cromosomal. Dado que la frecuencia de inserción del transposón es del orden de  $10^4$  sería necesario partir de una población de  $10^8$  células para tener la probabilidad de obtener inserciones en los genes phb.

## I.a. OBTENCION DE INSERCIONES

### II.a.1. TRANSFORMACION DE *B.megaterium* PV447 CON EL PLASMIDO TERMOSENSIBLE pTV54

El plásmido pTV54 se transfirió a la cepa de *B.megaterium* PV447 por el método de transformación de protoplastos. Luego de la transformación se obtuvieron alrededor de 300 transformantes en placas de selección directa. Algunas de las transformantes se pasaron a placas de SNB tetraciclina, y luego se cultivaron en medio líquido para realizar extracciones de plásmido.

Se realizaron extracciones de plásmido de 15 transformantes, observándose en todos los casos la presencia de plásmidos en el gel de agarosa. En algunos casos se observaron bandas de plásmido idénticas a las de pTV54, y en otros bandas desplazadas hacia abajo, indicando posibles modificaciones del plásmido original ocurridas en *B.megaterium*.

Se eligió para seguir trabajando el transformante número 15, cuyo plásmido presentaba una movilidad electroforética similar a la del pTV54 extraído de *B.subtilis*.

### II.a.2. ELIMINACION DEL PLASMIDO

Para aislar inserciones en el cromosoma de la cepa PV447 fue preciso eliminar el plásmido pTV54 de la cepa transformada, haciéndola crecer a temperatura restrictiva hasta su eliminación.

En *Bacillus subtilis* se utilizan para este propósito temperaturas de 48 a 50°C, pero en *Bacillus megaterium* debieron utilizarse temperaturas menores debido a su dificultad para crecer a altas temperaturas.

Tal como se describe en materiales y métodos, primero se utilizó un método de pérdida de plásmido por sucesivos crecimientos en medio líquido, y luego un método de pérdida de plásmido en medio sólido. En todos los casos se utilizó el transformante número 15.

#### i) Eliminación en medio líquido

Durante los experimentos realizados se observó que el crecimiento obtenido a temperatura restrictiva (44°C) en medio líquido con antibióticos era muy lento, y

luego de dos pasajes sucesivos no se llegaba a un orden de diferencia entre el número de células con plásmido y el de células sin plásmido, por lo que resultaba bastante probable que todas las células con el transposón inserto en el cromosoma obtenidas provinieran de la división de unas pocas células donde ocurrió la transposición. La lentitud en el crecimiento se debe también a la dificultad de *B. megaterium* de crecer a altas temperaturas, ya que su temperatura óptima de crecimiento es de 30 a 32°C.

Esto, por supuesto, hace al sistema inadecuado para lograr la obtención de un "pool" de inserciones independientes distribuidas en todo el cromosoma, entre las cuales podrían haber inserciones en o cercanas a los genes *phb*.

#### ii) Eliminación de plásmido en medio sólido

Luego de realizar varios experimentos preliminares para determinar la efectividad de la pérdida de plásmido en medio sólido, se decidió probar su eliminación mediante dos ciclos sucesivos de crecimiento en LB agar suplementado con eritromicina y lincomicina a 43°C, temperatura a la cual se obtenía un crecimiento satisfactorio en dicho medio.

Se realizaron varios experimentos de este tipo con resultados similares, y se decidió hacer un experimento a gran escala para obtener un número suficientemente grande de inserciones.

En este experimento ( experimento B) que se esquematiza en la figura 11, se sembraron 300 placas de LB suplementado con eritromicina y lincomicina con diluciones de un cultivo preparado de la manera descrita en materiales y métodos. Las placas se incubaron a 43°C durante 48 hs ( primer ciclo de crecimiento a 43°C). En 300 placas, el número de colonias obtenido fue de aproximadamente 316000.

Se hicieron réplicas con terciopelo de las 300 placas, que se incubaron a 43°C durante 3 días ( segundo ciclo de crecimiento a 43°C).

Debido al gran tamaño de la población analizada , para determinar el porcentaje de colonias que crecieron luego del segundo pasaje y el porcentaje de pérdida del plásmido se analizó una muestra de aproximadamente 5000 colonias. Los datos obtenidos a partir de esta muestra se utilizaron para calcular los números correspondientes al total de las colonias.

Para ello se tomó una muestra de placas al azar, que se replicaron a LB eritromicina lincomicina tetraciclina (LBELT) y LB eritromicina lincomicina (LBEL), y se incubaron a 43°C. De 4836 colonias en las placas que se utilizaron para las réplicas, crecieron 856 colonias en LBEL y 481 en LBELT, por lo tanto el 17.7 % de las colonias analizadas crecieron luego del segundo pasaje a 43°C. De estas colonias, el 43.8% no creció en las placas con tetraciclina.

Estos resultados son similares a los obtenidos en otros experimentos de pérdida de plásmido realizados anteriormente en condiciones similares.

Según estos datos se calcularon las cantidades totales de colonias  $Em^R Lm^R Tet^S$  (colonias que contenían inserciones cromosomales) luego del segundo ciclo de crecimiento a  $43^\circ C$ .

## Esquema del experimento B

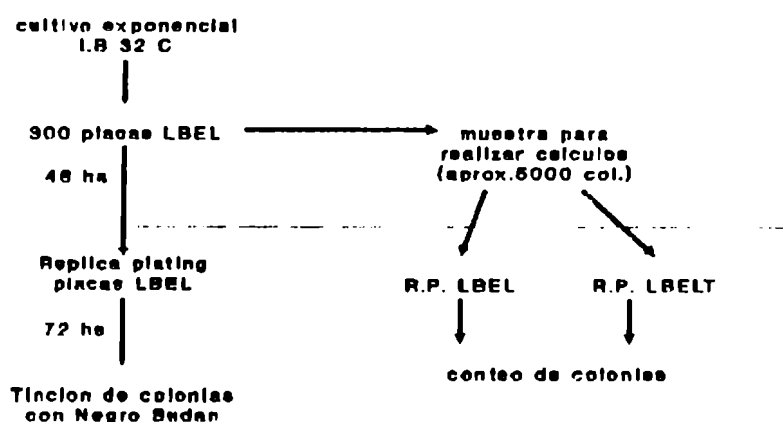


figura 11

Se observó que aproximadamente la mitad de las colonias que luego de los dos ciclos de incubación a  $43^\circ C$  conservaron las resistencias a los antibióticos codificados en el transposón carecían de la resistencia a tetraciclina, codificada en el plásmido, indicando la ausencia de este último.

En estas colonias los genes de resistencia a eritromicina lincomicina, y por ende el transposón, se hallaban insertos en el cromosoma.

Las inserciones obtenidas en este experimento se denominaron inserciones B. Estas colonias provienen de un plaqueo donde se obtuvieron colonias aisladas, lo que permite asegurar cierto grado de independencia.

## RESUMEN EXPERIMENTO B

### Primer ciclo de crecimiento a 43°C

-----  
Número aproximado de colonias Em<sup>R</sup> Lm<sup>R</sup> : 316000

**Cálculo del porcentaje de colonias Em<sup>R</sup> Lm<sup>R</sup> Tet<sup>S</sup>  
(colonias con inserciones) luego del segundo ciclo de crecimiento a 43°C.**

-----  
Número de colonias originales = 4836

Número de colonias Em<sup>R</sup> Lm<sup>R</sup> = 856

Porcentaje de colonias Em<sup>R</sup> Lm<sup>R</sup> = 17.7%

Número de colonias Em<sup>R</sup> Lm<sup>R</sup> Tet<sup>R</sup> = 481

Número de colonias Em<sup>R</sup> Lm<sup>R</sup> Tet<sup>S</sup> = 375

Porcentaje de colonias Em<sup>R</sup> Lm<sup>R</sup> Tet<sup>S</sup> = 43.8 %

Número total calculado de colonias Em<sup>R</sup> Lm<sup>R</sup> : 53700

**Número total calculado de colonias con inserciones: 23500**

## **II.B. RASTREO DE MUTANTES DEFICIENTES EN PIIB**

Se tiñeron mediante coloración de negro sudán las 300 réplicas de las placas originales del experimento B. Se pasaron 68 colonias que dieron coloración más clara a placas de LB eritromicina lincomicina que se incubaron a 32°C. Muchas de las colonias transferidas no crecieron en las réplicas, por lo que se buscaron las colonias correspondientes de las placas originales, con las cuales se repitió el procedimiento.

A partir de estas placas, las colonias se transfirieron por réplicas a placas de LB eritromicina lincomicina y de MM con bajo contenido de nitrógeno suplementado con glucosa y se incubaron a 32°C.



Se tiñeron las colonias con negro sudán, y se transfirieron 34 colonias que dieron coloración más clara nuevamente a una placa de LB eritromicina lincomicina, que se incubaron 48 hs a 32°C.

A partir de esta placa se hicieron coloraciones de negro sudán en portaobjetos de todas las colonias, observándose una cantidad de gránulos variable. En algunos preparados se observaron muchos gránulos presentes en todas las células del preparado, en otros, algunas células con pocos gránulos y otras con muchos, y en los de menor contenido, algunas células contenían pocos gránulos y otras ninguno.

De todas las colonias observadas, la colonia número 5 era la de menor contenido de gránulos teñidos con negro sudán, y además era la que presentaba la coloración más clara en la tinción en placa, como se observa en las figuras 12 y 13. . Esta colonia se denominó B5.

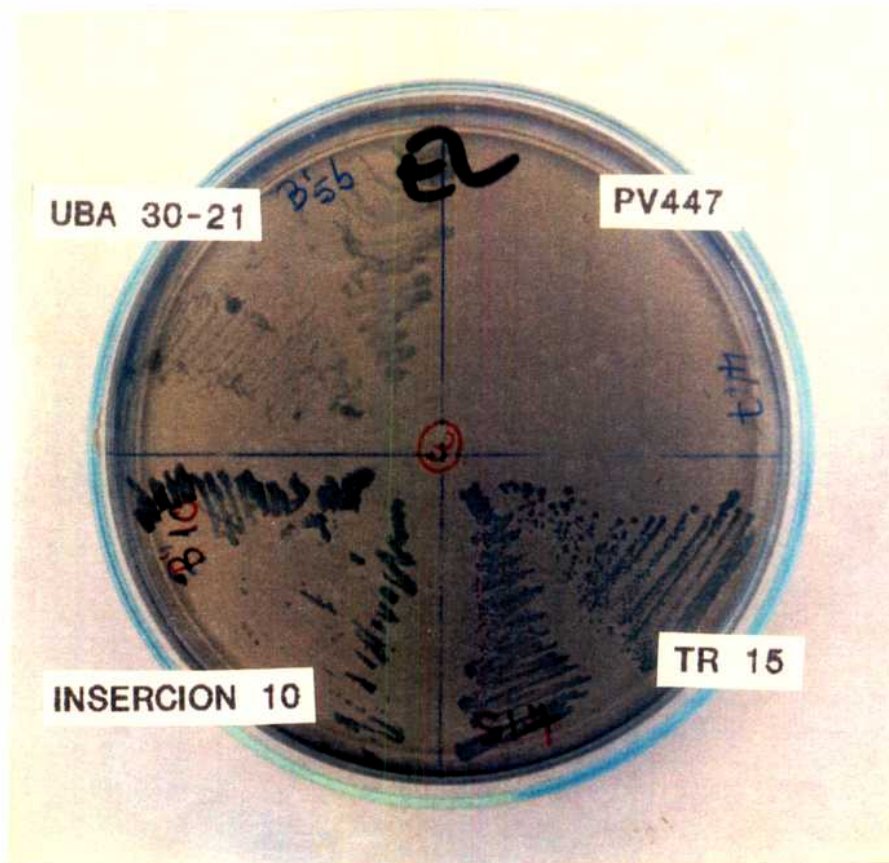
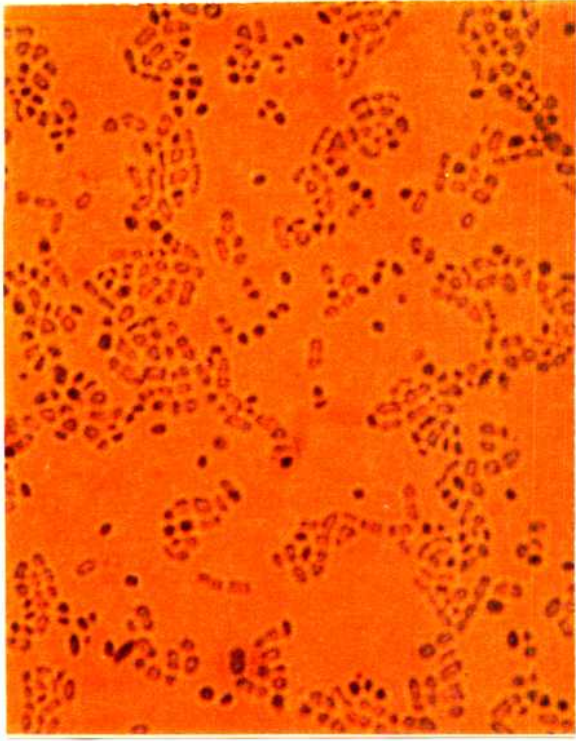
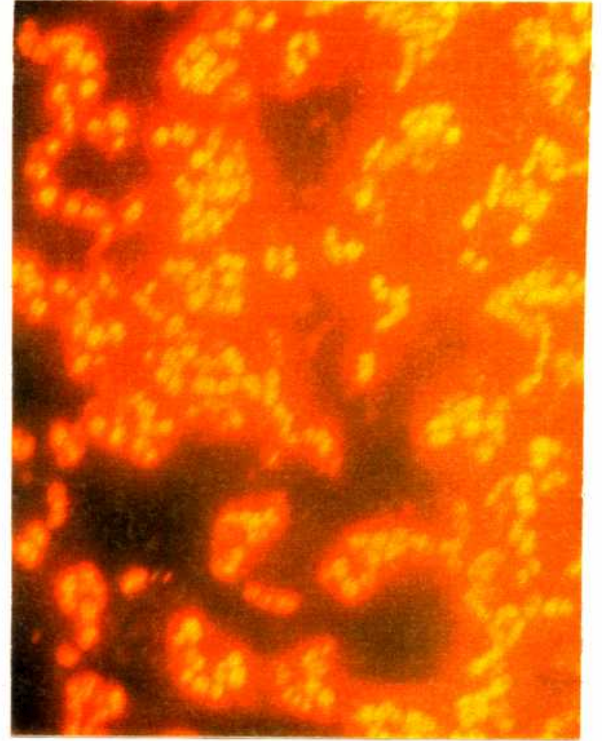


Figura 12  
Tinción de Negro Sudán en placa



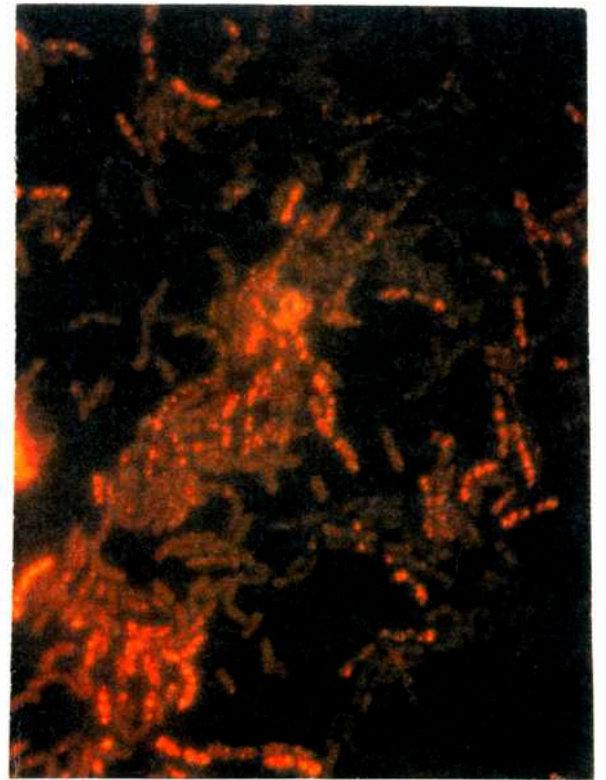
A



B



C



D

Figura 13  
Tinción de Azul del Nilo

Los preparados teñidos se muestran vistos con luz visible y luego con luz ultravioleta, en la cual los gránulos de PHB fluorescen.

A: PV447 (luz visible)      B: PV447 (luz ultravioleta)  
C: UBA30-21 (luz visible)      D: UBA30-21 (luz ultravioleta)

Para asegurar la pérdida del plásmido se hicieron nuevos pasajes de las inserciones B que aparentemente producían poco PHB en placas de LB eritromicina lincomicina a 43°C, y se confirmó la pérdida del plásmido por ausencia de crecimiento en réplicas a placas con tetraciclina. A las inserciones B de coloración más clara con negro sudán cuya pérdida del plásmido se verificó de esta manera se denominaron inserciones B', y por lo tanto la colonia B5 sin plásmido se denominó UBA30-21.

### III. CARACTERIZACION DE LA CEPA UBA30-21

#### III.a. CONFIRMACION DE LA INSERCIÓN

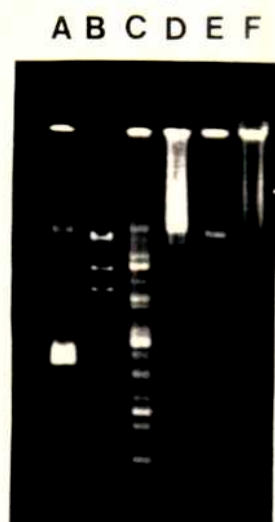
##### III.a.1 RESISTENCIAS A ANTIBIOTICOS

Además de verificar que la cepa UBA30-21 posee resistencia a los antibióticos eritromicina y lincomicina, se verificó también la resistencia al antibiótico cloramfenicol, confirmando la inserción del transposón en fase con algún promotor cromosomal, ya que el gen que codifica para la resistencia a Cm presente en Tn917 no tiene promotor.

La ausencia de resistencia a la tetraciclina indicaría la ausencia del plásmido vector pTV54.

##### III.a.2 EVIDENCIA FISICA DE LA AUSENCIA DE PLASMIDO

Se realizó una extracción de plásmidos de un cultivo de la cepa UBA30-21 y de la cepa PV447 transformada con el plásmido ( transformante # 15), observándose la presencia de pTV54 en la transformante, y la ausencia del mismo en UBA30-21. ( fig 14)



#### Muestras sembradas

A: plásmido pBC16

B:  $\lambda$  Hind III

C: cepa con múltiples plásmidos

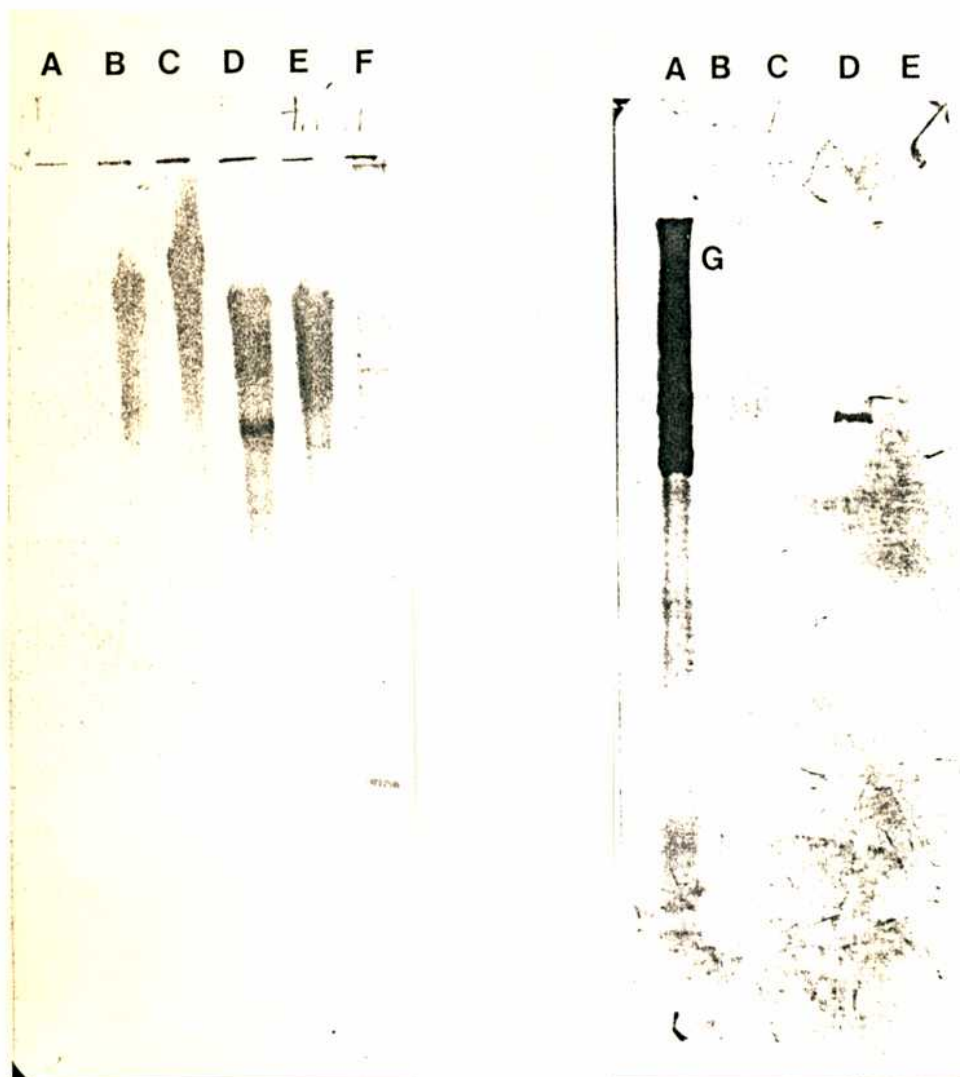
D : extracción de plásmido del transformante # 15

E: pTV54

F : extracción de plásmido de la cepa UBA 30-21

### III.a.3 HIBRIDIZACION DE ADN CROMOSOMAL DE UBA30-21 CON UNA SONDA DE Tn917

Utilizando como sonda un fragmento de Tn917 de aproximadamente una kilobase obtenido por corte del plásmido pTV54 con la enzima Hind III marcado con biotina, se hicieron hibridaciones con el ADN genómico de las cepas UBA30-21 y PV447 cortado con diversas enzimas de restricción empleando la técnica de Southern. En todos los casos se observó hibridación con bandas de ADN cromosomal de UBA30-21, y en ningún caso se observó hibridación con el genoma de PV447. En la figura 15 se muestran los resultados de dos de estos experimentos.



#### Membrana I

A: pBMe3; B: PV447 EcoR I;  
C: PV447 Hind III; D: UBA30-21 EcoR I;  
E: UBA30-21 Hind III; F: pTV54 Hind III

#### Membrana II

A: pTV54; B: PV447 PstI; C: PV447 XhoI;  
D: UBA30-21 PstI; E: UBA30-21 XhoI

Figura 15

Experimentos de Southern blotting de DNA genómico de las cepas PV447 y UBA30-21 utilizando una sonda para el transposón Tn917.

## III.B. CARACTERIZACION ENZIMATICA

### III.B.1 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE $\beta$ -CETOTIOLASA

Se realizaron mediciones de la actividad de la enzima  $\beta$ -cetotiolasa en extractos crudos obtenidos por sonicación de las cepas UBA30-21 y PV447 crecidas en medio LB solo o con el agregado de gluconato de sodio, y de la concentración total de proteínas presente en la muestra, calculándose la actividad específica de la enzima. Los resultados se muestran en la tabla 4.

En todos los casos se observó que la actividad de esta enzima era menor en la cepa UBA30-21 que en la cepa PV447.

TABLA 4

cepa	medio de cultivo	actividad	específica
PV447	LB	1750 u/mg	prot
UBA30-21	LB	1252 u/mg	prot
UBA30-21	LBG	1161 u/mg	prot

### III.B.2 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE ACETOACETIL-CoA REDUCTASA

Se realizaron mediciones de la actividad de la enzima acetoacetil CoA reductasa en extractos crudos obtenidos por sonicación de las cepas UBA30-21 y PV447 crecidas en medio LB, cuyos resultados se muestran en la tabla 5 .

TABLA 5

cepa	actividad específica
PV447	1540 u/mg prot
UBA30-21	200 u/mg prot

Se observó en la cepa UBA30-21 una actividad enzimática del 13% de la de obtenida para la cepa PV447.

### III.c. CUANTIFICACION DE PHB

La cantidad de gránulos de PHB se analizó primero por coloraciones, ya sea coloración de colonias mediante tinción de negro sudán o por observación al microscopio óptico de preparados teñidos con negro sudán o azul del Nilo.

En todos los cultivos analizados se observó una menor cantidad de gránulos en la cepa UBA30-21, y en algunos cultivos en LB o SNB, especialmente en estadios tempranos del crecimiento, no se observaban gránulos en la cepa UBA30-21 pero sí en PV447.

La cuantificación se realizó mediante un método espectrofotométrico y uno cromatográfico.

Se hicieron determinaciones con ambos métodos para cultivos de UBA30-21 y PV447 en diferentes etapas del crecimiento en diferentes medios. En todos los casos se observó menor contenido de PHB en la cepa UBA30-21, no pudiéndose detectar PHB en los cultivos de esta última realizados en LB solo o en SNB.

#### III.c.1 CUANTIFICACION DE PHB POR EL METODO ESPECTROFOTOMETRICO

Se utilizaron pellets de 2 ml de cultivos de 8 a 10 hs, crecidos en diferentes medios de cultivo, secados en estufa hasta que se mantuviera el peso constante.

Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 6.

TABLA 6

-----  
 Porcentaje de PHB / peso seco  
 -----

	LB	LBG	SNB
PV447	5.1%	4.4%	5.2%
UBA30-21	ND	1.32%	ND

-----  
 ND no se detectó PHB

### III.c.2 CUANTIFICACION DE PHB POR EL METODO CROMATOGRAFICO

Se utilizaron cultivos de distintas etapas del crecimiento liofilizados.

Las cantidades de PHB se determinaron por comparación de áreas de los valores obtenidos utilizando concentraciones conocidas con los medidos en las muestras .

TABLA 7

-----  
 Porcentaje de PHB / peso seco  
 -----

	PV447		UBA30-21	
	LB	LBG	LB	LBG
3 hs	ND	ND	ND	ND
6 hs	2%	3%	ND	ND
8 hs	4.3%	13%	ND	2.6%
24 hs	4%	10%	ND	3%
48 hs	3%	3.2%	ND	2.4%

-----  
 LBG LB suplementado con 1% de gluconato de sodio.

ND no se detectó PHB

En ambos tipos de determinaciones los resultados fueron coincidentes. La cepa UBA30-21 no acumuló cantidades detectables de PHB en los medios LB y SNB, aún

luego de 48 hs. de incubación, y en medio LBG, en el que acumula PIB, las cantidades acumuladas representan un 20 o 30% de los valores obtenidos para la cepa salvaje.

### **III.d. OTRAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS**

Además de las características directamente relacionadas a la inserción buscada, se observaron otras particularidades de la cepa UBA30-21.

#### **III.d.1 ASPECTO EXTERNO**

Al crecer en medio sólido, las colonias presentan aspecto más mucoso que las de la cepa PV447.

Al centrifugar cultivos crecidos en medio líquido, la obtención del pellet se dificulta mucho, ya que no se forma un pellet compacto, sino que es de consistencia mucosa, no queda bien adherido al fondo del tubo y se desintegra muy fácilmente. Esta característica se observa sobre todo en cultivos de fase exponencial tardía o estacionaria.

#### **III.d.2 SENSIBILIDAD DE UBA30-21 AL FAGO MP13**

Al intentar obtener lisados del fago MP13, que replica en *B.megaterium*, en la cepa UBA30-21 se tuvieron inicialmente grandes dificultades, ya que la cepa mostraba sensibilidad al fago, que formaba placas de lisis normales sobre un césped de UBA30-21 crecido en placas de SNB, pero no se obtenían lisados de MP13 al realizar infecciones en medio líquido en las condiciones utilizadas normalmente. Finalmente se logró obtener un lisado por infección en medio líquido usando un cultivo muy poco crecido.

En base a estos resultados se hicieron infecciones de cultivos en medio líquido de la cepa en distintas etapas del crecimiento. Se obtuvieron lisados de MP13 con títulos comparables a los obtenidos en otras cepas de *B.megaterium* sólo cuando se utilizaban cultivos poco crecidos.

Para verificar estos resultados se realizaron infecciones con MP13 de cultivos en SNB líquido de la cepa UBA30-21 en distintas fases de crecimiento, y se titularon los lisados obtenidos, cuyos resultados se muestran en la tabla 8.



Para ver si este efecto se debía al estado fisiológico de las células o a la relación entre el número de fagos y de bacterias, se concentró mediante centrifugación un cultivo de UBA30-21 poco crecido (D.O.600nm = 0.1 ), de manera de obtener una concentración de células similar a la de un cultivo en fase exponencial tardía, en la que no se lograba obtener un lisado del fago MP13.

Se infectaron muestras del cultivo concentrado y sin concentrar, se incubaron y se cosechó el sobrenadante, que luego se tituló sobre la cepa PV447.

En la tabla 9 se muestran los resultados obtenidos. El título obtenido en ambos casos fue similar, indicando que las diferencias observadas en cultivos de diferentes densidades se deben al estado fisiológico de las células y no a la relación fagos/bacterias.

TABLA 8

D.O.600 nm	Título del lisado obtenido *
------------	------------------------------

Experimento # 1

0.06	$1 \times 10^9$ ufp/ml
0.12	$1 \times 10^2$ ufp/ml
0.5	$1 \times 10^2$ ufp/ml

Experimento # 2

0.078	$1 \times 10^9$ ufp/ml
0.352	$10^4$ ufp/ml
0.588	$10^4$ ufp/ml

\* Titulado con el método de las gotitas sobre césped de PV447.

FABLA 9

---

Cultivo	Título del lisado obtenido *
sin concentrar	$3 \times 10^8$ ufp/ml
concentrado 10 veces	$3 \times 10^8$ ufp/ml

---

\* Titulado con el método de las gotitas sobre césped de PV447.

### III.d.3. BUSQUEDA DE FUSIONES A $\beta$ -GALACTOSIDASA

Dado que el transposón utilizado permitía realizar fusiones de promotores al gen *lacZ*, se buscaron entre las inserciones aquellas que expresaran  $\beta$ -galactosidasa, indicando la inserción del transposón en fase con un promotor cromosomal.

Se sembraron colonias obtenidas de los distintos experimentos de inserción en MM suplementado con glucosa y Xgal, con alto y con bajo contenido de N, que se incubaron a 32°C. Se observaron varias colonias con distintas intensidades de coloración azul, indicando posibles inserciones en las cuales el gen *lacZ* del transposón se hallaría en fase con algún promotor cromosomal, entre ellas la colonia UBA30-21

### III.d.4. CRECIMIENTO EN LB Y LB SUPLEMENTADO CON HIDRATOS DE CARBONO

Al crecer la cepa UBA30-21 en medio LB líquido se observó que el crecimiento se detenía mucho antes que en un cultivo similar de la cepa PV447. Esta diferencia en el estado de crecimiento no se observaba al crecer las cepas en medio mínimo líquido. Como el medio mínimo contiene 1% de glucosa, se decidió probar el crecimiento de la cepa UBA30-21 en LB suplementado con glucosa, y se observó un crecimiento similar al obtenido para la cepa PV447 en LB con o sin glucosa.

Se hicieron cultivos de la cepa UBA30-21 en LB y LB suplementado con 1% de diferentes hidratos de carbono, a los que se les midió la densidad óptica a diferentes tiempos para monitorear el crecimiento. Los resultados se muestran en la tabla 10.

Los resultados obtenidos con todos los hidratos de carbono ensayados demostraron que la cepa UBA30-21 alcanza mayores densidades ópticas en medio LB suplementado. De todos los hidratos de carbono ensayados, el mayor grado de crecimiento se obtuvo con el agregado de gluconato de sodio.

Para analizar la posibilidad de que el limitado crecimiento de la cepa UBA30-21 en LB solo se debiera únicamente a un mayor requerimiento de hidratos de carbono, y no a otros factores, como la limitación de algún otro nutriente o la acumulación de alguna sustancia inhibitoria del crecimiento, se realizaron curvas de crecimiento en diferentes condiciones.

Se hicieron cultivos de las cepas UBA30-21 y PV447 en LB , LB con el agregado de gluconato de sodio 1% , y por último LB al que se le agregó gluconato 1% una vez que el crecimiento se había detenido. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 11.

TABLA 10

CRECIMIENTO DE UBA30-21 EN LB O LB SUPLEMENTADO CON HIDRATOS DE CARBONO

H de C	Tiempo de crecimiento				
	1h	3h	5 h	7 h	24 h
ninguno	0.059	0.271	0.492	0.490	0.528
glucosa	0.046	0.277	0.728	1.035	1.080
gluconato	0.047	0.281	1.156	2.365	1.988
fructosa	0.052	0.297	0.900	1.345	1.192
xilosa	0.045	0.242	0.656	1.280	1.248
glicerol	0.056	0.333	1.168	1.500	1.296
sacarosa	0.047	0.295	0.792	1.05	1.024

Los valores corresponden a la D.O. 600 nm

TABLA 11

Experimento 1

Análisis del crecimiento de la cepa UBA30-21 en medio LB y LB al que se agregó gluconato de sodio durante el crecimiento.

---

Tiempo	D.O. 600 nm		
	PV447	UBA30-21	
	LB	LB	LB sup*
4 hs	2.4	1.36	1.32
5 hs	3.28	2.0	2.32
6 hs	4.00	2.4	3.12
7 hs	4.48	2.24	3.92
8 hs	4.4	2.24	4.2
24 hs	5.2	2.4	4.6

---

\* LB al que se agregó gluconato 1% a las 4 hs de crecimiento.

## Experimento 2

Análisis del crecimiento de la cepa UBA30-21 en medio LB y LB al que se agregó gluconato de sodio a diferentes tiempos.

Tiempo de crecimiento	D.O. 600 nm					
	PV447			UBA30-21		
	LB	LBG	LBsup	LB	LBG	LBsup
0 hs	.27	.24	.27	.18	.15	.18
5.5 hs	4.4	5.6	4.08	1.92	4.4	2.0
6 hs	4.6	6.0	4.6	2.0	4.8	2.08
24 hs	5.9	7.5	6.5	1.8	5.8	4.6

LBG = LB + gluconato 1%

LBsup = LB al que se agregó gluconato 1% a las 6 hs de crecimiento.

Los resultados obtenidos muestran que el agregado de hidratos de carbono permite obtener con la cepa UBA30-21 cultivos con un crecimiento similar a la cepa PV447. En los experimentos realizados con LB con el agregado de gluconato puede observarse que éste promueve el crecimiento de la cepa UBA30-21, duplicando la densidad óptica final aún cuando se agrega una vez que ya se ha alcanzado el plateau, mientras que el efecto producido en cultivos de la cepa PV447 es marcadamente menos significativo.

#### IV. TRANSDUCCION DE UBA30-21 A PV447

A fin de mapear la inserción de Tn917 en el cromosoma de UBA30-21 se hicieron ensayos de cotransducción.

Utilizando lisados del fago transductor generalizado MP13 obtenidos por infección de la cepa UBA30-21 se realizaron experimentos de transducción a la cepa PV447, seleccionando transductantes resistentes a los antibióticos codificados en el transposón, para analizar luego en los mismos la aparición de las características observadas en la cepa UBA30-21.

##### IV.a. OBTENCION DE TRANSDUCTANTES $Em^R Lm^R$

Utilizando un lisado del fago MP13 realizado en UBA30-21 con un título de  $2 \times 10^8$  ufp/ml se realizaron experimentos de transducción a la cepa PV447 en medio MMTEL sólido. Se utilizaron suspensiones de fago irradiadas con luz ultravioleta durante distintos intervalos de tiempo o sin irradiar.

Se obtuvieron 35 transductantes al utilizar la suspensión de fago sin irradiar.

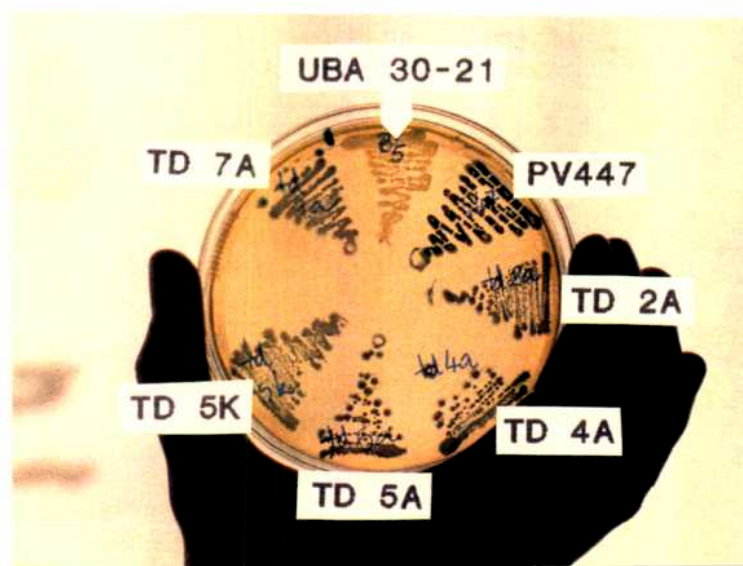
La frecuencia de transducción fue de entre  $2$  y  $6 \times 10^{-7}$  transductantes/ufp, valor similar a los descriptos en la literatura para otros marcadores.

##### IV.b. ANALISIS DE LOS TRANSDUCTANTES

###### IV.b.1. CONTENIDO DE PIB ESTIMADO POR TINCIONES

Las transductantes  $Em^R Lm^R$  obtenidas se reestriaron en medio LB con ambos antibióticos y se tñeron con negro sudán. En general se observó que las transductantes adquirirían un color más claro que la PV447, pero más oscuro que la UBA30-21. ( figura 16)

Al realizar la tinción de negro sudán en portaobjetos, se observó en los transductantes una cantidad de gránulos similar a la de la cepa PV447.



#### IV.b.2. DETERMINACION DE $\beta$ -CETOTIOLASA

Se midió la actividad de  $\beta$ -cetotiolasa de algunos transductantes elegidos al azar, y se observó en todos los casos menor actividad que en la cepa PV447.

TABLA 12

cepa	actividad de $\beta$ -cetotiolasa u/mg prot
PV447	1701
PV447	1976
UBA30-21	1123
Transd 2a	664
Transd 4a	918
Transd 5a	238
Transd 5k	949

#### IV.b.3. DETERMINACION DE ACETOACETIL-CoA REDUCTASA

Se midió la actividad de acetoacetyl-CoA reductasa de dos transductantes y se observó en ambos casos menor actividad que en la cepa PV447, aunque mayor que la de la cepa UBA30-21.

#### IV.b.4. CUANTIFICACION DEL CONTENIDO DE PHB POR EL METODO DE LOS DISCOS (ESPECTROFOTOMETRICO) (Ward y Dawes; 1973)

Se utilizaron cultivos exponenciales ( 8 hs de crecimiento) crecidos en distintos medios. Las muestras se secaron en estufa de 60°C hasta peso constante.

Las cantidades de ácido crotonico se determinaron refiriendo los valores obtenidos a una curva de calibración. Los resultados se muestran en la tabla 13.

TABLA 13

Contenido de PHB de los transductantes ( método espectrofotométrico)

-----  
 Porcentaje de PHB / peso seco  
 -----

CEPA	LB	LBG
PV447	5.1	4.4
UBA 30-20	ND	ND
UBA 30-21	ND	1.32
transd 2a	1.36	2.1
transd 5a	.78	1.97
transd 4d	2.02	4.6
transd 5k	2.19	4.48

-----  
 LBG = LB suplementado con 1% de gluconato de sodio.

ND = no se detectó PHB

En la tabla se observa que la mitad de los transductantes acumularon cantidades de polímero similares a las de la cepa salvaje, mientras que las otras acumularon cantidades menores, aunque mayores que las de la cepa UBA 30-21 en medio LBG. Además, en estos casos hubo producción de polímero en medio LB, a diferencia de la cepa mutante, que no produce cantidades detectables de PHB en este medio.

#### V. EXPERIMENTOS DE HIBRIDIZACION DE ADN GENOMICO DE *B.megaterium* PV447 Y UBA30-21 CON SONDAS DE GENES PHB.

Uno de los aspectos encarados en la caracterización de la inserción de Tn917 en *B.megaterium* fue el análisis de su ADN cromosómico mediante la técnica de Southern blotting, utilizando una sonda de Tn917 y diferentes sondas de genes PHB, marcadas con biotina.

Si la inserción de Tn917 en la cepa UBA30-21 está ligada a los genes PHB, se esperaba encontrar algún fragmento de restricción de su ADN genómico que hibridizara conjuntamente con la sonda del transposón y con una sonda específica para los genes PHB.



Como sondas de genes PHB se utilizaron fragmentos de ADN correspondientes a genes PHB de *Alcaligenes eutrophus* y el fragmento con actividad tiolasa aislado del banco de genes de *B.megaterium* en *E.coli*.

En la mayoría de los experimentos realizados no fue posible observar una banda de ADN genómico de la cepa UBA30-21 que hibridizara simultáneamente con las sondas del transposón y los genes PHB, debido probablemente a que las enzimas de restricción utilizadas tenían sitio de corte entre el fragmento de transposón utilizado como sonda y los genes PHB.

#### **V.a. HIBRIDIZACIONES CON UNA SONDA QUE CONTIENE EL GEN DE LA $\beta$ -CETOTIOLASA DE *B.megaterium* .**

Del plásmido pBMe3, que contiene al gen de la  $\beta$ -cetotilasa de *B.megaterium* clonado en el vector pHV33 en *E.coli*, se extrajo un fragmento PstI ClaI de aproximadamente 3.5 kb, que se utilizó como sonda para el gen de la  $\beta$ -cetotilasa.

En experimentos en los que se utilizó como sonda el fragmento PstI-ClaI del plásmido pBMe3, que contendría la  $\beta$ -cetotilasa de *B.megaterium*, se observó hibridización con bandas de diferente peso molecular de los ADNs genómicos de las cepas PV447 y UBA30-21 digeridos con las enzimas EcoRI, HindIII y PstI. (figura 17 )

Este resultado indica que existen diferencias entre los sitios de restricción alrededor del gen tiolasa de las dos cepas, que suponemos se deben a la presencia del transposón Tn917, cuya inserción en la zona adyacente al gen  $\beta$ -cetotilasa produce las modificaciones observadas.

**Figura 17**  
Experimento de Southern blotting de DNA genómico de las cepas PV447 y UBA30-21 utilizando una sonda para la  $\beta$ -cetotiolasa de *B. megaterium*.

A: pBMe3; B: PV447 EcoR I;  
C: PV447 Hind III; D: UBA30-21 EcoR I;  
E: UBA30-21 Hind III; F: pTV54 Hind III

**A B C D E F**

—  
—  
—

## V.b. HIBRIDIZACIONES CON SONDAS QUE CONTIENEN FRAGMENTOS DE LOS GEN PIIB DE *Alcaligenes eutrophus* .

Debido a la gran diferencia en el contenido de G+C % de ambos organismos, existe baja probabilidad teórica de que exista entre los genes homología suficiente para que hibridicen entre sí, pero como se ha descrito un alto grado de homología entre los genes PIIB de diferentes especies, de manera especial entre las sintetasas, se probaron las sondas de los genes de *A.eutrophus* considerando la posibilidad de que hubiera homología suficiente entre los genes PIIB de estas dos especies.

Los plásmidos utilizados para obtener las sondas de genes PIIB de *A.eutrophus*, descritas en materiales y métodos, son el plásmido pTZ18U-PIIB, que contiene los 3 genes PIIB clonados en el vector pTZ18U, pSK2696 , que contiene un fragmento de 3.5 kb que abarca el gen de la polimerasa y una parte del gen  $\beta$ -cetotiolasa clonados en el vector Bluescript, y pSK2660, que contiene un fragmento de 2.1 kb con parte del gen  $\beta$ -cetotiolasa y el gen de la reductasa insertos en el mismo vector. No se detectó hibridización con el DNA genómico de las cepas PV447 y UBA30-21 de *B.megaterium* en experimentos de Southern blotting al utilizar como sonda un fragmento que contiene los genes PIIB de *A.eutrophus* clonados en el plásmido pTZ18U.

Al utilizar una sonda que contiene los genes de la tiolasa y la reductasa, obtenida del plásmido pSK2660, no se obtuvo hibridización.

Sólo se observó una señal débil en uno de los experimentos que se muestra en la figura 18, en que se utilizó como sonda un fragmento de aproximadamente 1 kb de la polimerasa de *A.eutrophus* obtenida del plásmido pSK2696 cortado con PvuII, que corresponde a una zona altamente conservada en distintas polimerasas estudiadas hasta el momento.

En el experimento que se muestra en la figura 18 se utilizaron los ADNs genómicos cortados con ApaI.

Figura 18  
Experimento de Southern blotting de DNA genómico de las cepas PV447 y UBA30-21  
utilizando una sonda para la PHA sintetasa de *A. eutrophus*.

A: pBMe3  
B: PV447 Apa I  
C: UBA30-21 Apa I



## **VI. CLONADO DE LA REGION DE LA INSERCIÓN DE LA CEPA UBA30-21**

Dado nuestro objetivo de aislar los genes *phb* de esta especie se decidió clonar la región del cromosoma de la cepa UBA30-21 donde se encuentra la inserción de Tn917

Debido al gran tamaño del transposón Tn917 ( 17 Kb ) se decidió utilizar un vector que permitiera clonar insertos de 20 kb o más, para poder obtener un inserto que contenga al transposón y los genes adyacentes.

Se decidió utilizar el cósmido pVK102, que contiene los sitios *cos* del fago lambda, permitiendo el empaquetado de los cósmidos recombinantes para su posterior transfección a *E.coli*, y que además tiene el origen de transferencia del plásmido conjugativo RP4, que brinda la posibilidad de transferencia por conjugación a la mutante PHB-4 para realizar el análisis funcional de los genes clonados.

### **VI. a. OBTENCIÓN DE FRAGMENTOS DE TAMAÑO ADECUADO DEL CROMOSOMA DE UBA30-21**

La enzima de restricción que se utilizó para el clonado debía reunir, preferentemente, ciertas características, como tener un sitio de corte dentro de algún gen de resistencia a antibiótico del vector, tener pocos sitios de corte en el cromosoma *de B.megaterium*, y no cortar dentro del transposón, ni entre éste y el gen  $\beta$ -cetotiofasa, para poder obtener un fragmento que contuviera la región entera.

Se decidió utilizar la enzima XhoI, que aparentemente reunía estas condiciones, para el clonado.

Para clonar exitosamente en el vector elegido fue necesario partir de una preparación de ADN genómico de alto peso molecular, que se obtuvo por el método de lisis con sarkosyl y centrifugación en gradiente de CsCl como se indica en materiales y métodos.

Luego se optimizaron las condiciones de restricción para obtener una mayoría de fragmentos de alrededor de 20 Kb. Se realizaron restricciones parciales utilizando mezclas de reacción con diferentes concentraciones de enzima y se analizaron los resultados en geles de agarosa 0.4%.

Se incubó el ADN cromosomal de UBA30-21 con una dilución de la enzima XhoI en las condiciones previamente establecidas, se verificó el resultado de la restricción

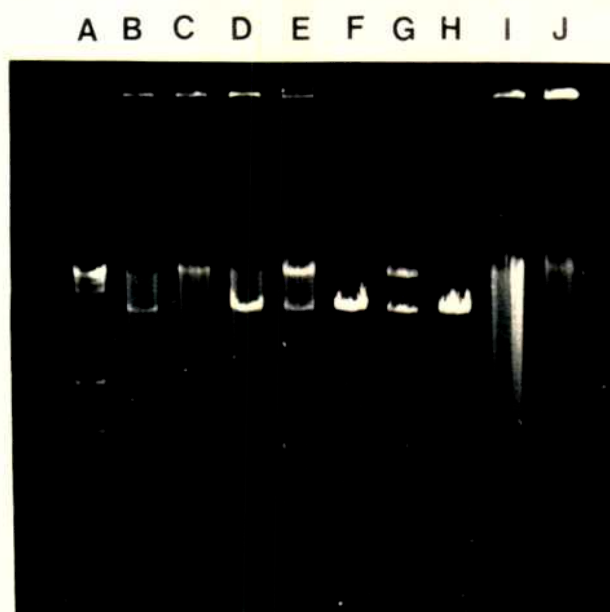
corriendo una alícuota en un gel de agarosa 0.4%, y luego se fraccionaron los fragmentos de ADN cortados según su tamaño utilizando un gradiente de sacarosa. Se precipitaron juntas las fracciones del gradiente que contenían fragmentos de más de 12 kilobases, y se utilizaron para el clonado.

#### VI. b. LIGADO Y EMPAQUETADO

En la figura 19 se muestra el resultado de diferentes reacciones de ligado utilizando varias relaciones de vector cortado a fragmentos de ADN genómico.

En los geles donde se sembraron las mezclas de ligado se observó que al aumentar la proporción de ADN del vector quedaba parte de éste sin ligar, y se pensó que probablemente gran parte del ADN de alto peso molecular que se observaba en el gel fueran concatémeros de vector, ya que éste no se trató para evitar el religado.

Se empaquetaron las dos mezclas con mayor proporción de ADN genómico, en las que parecía haber mayor proporción de ADN concatemerizado, utilizando un kit de empaquetado in vitro de fago lambda.



A: marcador de  $\lambda$  de alto PM , B: mezcla de ligado 1, C: mezcla 1 ligada,  
D: mezcla de ligado 2, E: mezcla 2 ligada, F: mezcla de ligado 3,  
G : mezcla 3 ligada , H: pVK102 cortado con Xho I,  
I: DNA genómico de la cepa UBA30-21 cortado con Xho I .

Figura 19

## FIGURA 19

### VI. c. TRANSECCION Y SELECCION DE CLONES CON EL INSERTO DESEADO

Se eligió como hospedador de clonado la cepa de *E. coli* HB101, porque existen reportes de la existencia de un efecto nocivo de la presencia de la región de resistencia a eritromicina de Tn917 en muchas cepas de *E. coli*, que aparentemente no afectan a la cepa HB101.(Youngman 1987)

Se titularon las mezclas de empaquetado, obteniéndose  $2.38 \times 10^4$  ufc/ml para la mezcla 1 y  $9.75 \times 10^5$  para la mezcla 2.

Se transfeció la cepa hospedadora con cantidades adecuadas de cada una de las mezclas como para obtener unas 100 o 200 colonias tetraciclina<sup>R</sup> por placa, que luego se resuspendieron y guardaron a -20°C con glicerol 15 % hasta el momento de ser analizadas.

Para rastrear los clones que tuvieran el transposón se seleccionaron aquellos resistentes a Cloramfenicol.

Se obtuvieron 10 clones a partir de la mezcla 1, y 8 a partir de la mezcla 2.

Luego se midió la actividad de B- cetotiolasa de los clones Cm<sup>R</sup> para detectar aquellos que tuvieran el gen para esta enzima en el inserto.

De 18 clones Cm<sup>R</sup> seleccionados, sólo dos, provenientes de la mezcla de ligado 1, presentaron actividad de B-cetotiolasa

Como ambos provenían de la misma placa resuspendida, es probable que se trate del mismo clon, por lo tanto se eligió uno de ellos, que presentó una actividad levemente mayor. Este clon se denominó UBA 1-37.

### VI.d. ANALISIS DEL CLON UBA 1-37

#### VI.d.I. ANALISIS DEL COSMIDO DEL CLON UBA 1-37

En la figura 20 se observa un gel de agarosa donde se sembraron los productos de restricción del cósmido del clon UBA 1-37, denominado pBM142, con diferentes enzimas de restricción.

Al cortar con la enzima XhoI se observaron dos bandas, la correspondiente al vector pVE102, de 23 Kb, y una de aproximadamente 25 kb, correspondiente al inserto.

A:  $\lambda$  Hind III, B: pBM142 Xho I, C: pVK102 Xho I, D: pBM142 EcoR I,  
E: pBM142 EcoR I Xho I, F: marcador de  $\lambda$  de alto PM,  
G: pBM142 Xho I Pst I.

Figura 20

#### VI.e. SUBCLONADO DEL GEN TIOLASA DEL COSMIDO pBM142

En la figura 20 se observa que al cortar el inserto con la enzima EcoRI se obtuvieron 4 fragmentos, cuyos tamaños eran aproximadamente 9; 6; 4 y 3,5 kb.

Al cortar el plásmido con la enzima EcoRI se obtenían solamente los tres fragmentos menores, pero al utilizar EcoRI y XhoI simultáneamente se observaba además la aparición del fragmento de 3,5 kb.

Estos resultados indican que los fragmentos de 9; 6 y 4 kb tienen ambos extremos cortados con EcoRI, mientras que el menor tiene un extremo cortado con Xho I, y por lo tanto es uno de los extremos del inserto.

Se subclonaron los tres fragmentos más grandes en el sitio EcoRI del plásmido vector pUC19, utilizando nuevamente la cepa HB101 de *E.coli*.

La elección de la cepa se basó en la posibilidad de que estuviera presente en los fragmentos clonados el gen de resistencia a eritromicina, cuya presencia no es tolerada por la mayoría de las cepas de *E.coli*, entre ellas las que se utilizan para clonado. Por este motivo no se pudo utilizar una de las cepas que normalmente se



emplean con vectores que tienen un sistema de detección de insertos por complementación.

Esto generó ciertas dificultades en la detección de clones recombinantes, ya que aparentemente la cepa utilizada no tiene un fenotipo claramente Lac<sup>+</sup>, y por lo tanto no se podían distinguir claramente los clones en los cuales el gen para la β-galactosidas del pUC19 estaba inactivado por la presencia del inserto en placas de LB conteniendo Xgal e IPTG, según lo indicado para el vector utilizado.

Se resuspendieron las colonias obtenidas del subclonado de cada fragmento para seguir analizándolas.

Al sembrar diluciones de estos resuspendidos en placas de LB conteniendo Xgal pero sin IPTG, se veían colonias con distintas tonalidades de azul. Las más claras se reestiraron en el mismo medio, y se eligieron nuevamente las más claras.

Paralelamente se sembraron gotas del resuspendido en placas de LB con Cloramfenicol, para seleccionar clones que contuvieran el gen de resistencia a este antibiótico. Solamente se obtuvieron clones Cm<sup>R</sup> para clones de los fragmentos de 9 y 4 kb.

Se hicieron extracciones de plásmido de colonias claras de cada uno de los fragmentos y de las colonias Cm<sup>R</sup>.

En algunos de los casos se pudieron extraer los plásmidos, que en la mayoría de los casos tenían el tamaño de pUC19, indicando ausencia de inserto.

Se cortaron los plásmidos que parecían tener inserto con la enzima EcoRI, y al correr los digestos en geles de agarosa se observó claramente el inserto de uno de los plásmidos obtenidos del subclonado del fragmento de 6 kb. Se denominó a ese plásmido recombinante pBMS6

La cepa que contiene dicho plásmido se denominó UBA1-38.

## **VLE. ANALISIS DE LA CEPA UBA1-38**

### **VLE.1. MEDICION DE β-CETOTIOLASA Y ACETOACETILCoA REDUCTASA**

Se realizó el ensayo para la β-cetotiolasa en un cultivo overnight de la cepa UBA1-38, detectándose actividad de esta enzima, lo que indica la presencia del gen en el inserto. La actividad específica de esta cepa es similar a la de la cepa UBA1-37. (tabla 14)

Paralelamente se realizaron determinaciones de la actividad de AcetocetilCoA reductasa de las cepas de *E.coli* con los plásmidos recombinantes. No se detectó actividad de esta enzima en ninguno de ellos.

TABLA II

ACTIVIDAD DE B-CETOTIOLASA DE LOS CLONES OBTENIDOS

CEPA	ACT.ESP./ACT.ESP.PV447
PV117	1
UBA30-21	.78
UBA1-37	.36
UBA1-38	.275

---

\* Promedio de dos mediciones (de dos extractos crudos del mismo cultivo)

## DISCUSSION

Con la finalidad de clonar los genes *pha* de *B.megaterium* se utilizaron dos estrategias de rastreo diferentes, que permitieron aislar los locus génicos para la  $\beta$ -cetotiolasa de la cepa PV447 y de la mutante de inserción UBA30-21, utilizando distintos vectores de clonado y *E.coli* como hospedador.

Este es el primer trabajo de clonado de una  $\beta$ -cetotiolasa de bacterias gram positivas. Una de las estrategias utilizadas estrategia para aislar genes *pha* fue el rastreo de clones con actividad enzimática en una biblioteca genómica de *B.megaterium* en *E.coli*, y la segunda fue la obtención de inserciones de un transposón dentro de genes *pha*, o cercanas a los mismos.

Para obtener el banco de inserciones se utilizó un derivado del transposón Tn917, que se encuentra en el plásmido pTV54.

Durante los ensayos realizados para la obtención de estas inserciones en *B.megaterium* se encontraron grandes dificultades para eliminar el plásmido vector, que fue originalmente diseñado para su utilización en *B.subtilis*, capaz de crecer a temperaturas cercanas a los 50°C. En los protocolos utilizados en este microorganismo, el vector se elimina a 42°C, temperatura a la cual *B.subtilis* replica normalmente.

En *B.megaterium* se debieron utilizar temperaturas relativamente bajas pues esta especie crece normalmente entre 30 y 32°C, y su viabilidad disminuye a temperaturas mayores de 37°C.

Estas dificultades, unidas a la baja velocidad de crecimiento a las temperaturas utilizadas, condujeron a la obtención de cultivos de bajo número de células luego de incubaciones de 48h a la temperatura no permisiva. De esta manera la población obtenida no aseguraba la cantidad de eventos independientes necesaria para obtener inserciones en los genes *pha*.

Por estos motivos se realizaron los experimentos de obtención de inserciones y eliminación de plásmido en medio sólido.

Luego de los ciclos de crecimiento en medio sólido a temperatura restrictiva, muchas de las células de los cultivos finales aún tenían el plásmido. Sin embargo, el número de células que mantenían las resistencias a antibiótico codificadas por el transposón habiendo perdido la resistencia a tetraciclina, codificada en el plásmido, era suficientemente grande como para comenzar la búsqueda de inserciones en los genes *pha*.

Para detectar estas inserciones se rastrearon células con menores cantidades de PIIB, o carentes del mismo, mediante tinciones con el colorante Negro Sudán.

El método de rastreo por tinciones presenta ciertas dificultades, pues da falsos negativos, por lo que fue necesario repicar las posibles colonias PHB negativas y teñirlas en varias ocasiones, tanto en placa como en preparaciones para microscopio, para cerciorarse de la constancia del fenotipo, con lo que es probable que no se hayan detectado todas las colonias con menor contenido de PHB que se originaron en el experimento.

Luego de analizar 23500 inserciones mediante tinciones en placa con el colorante Negro Sudán se aisló la cepa UBA30-21, que presentaba menor contenido de PHB que la cepa salvaje.

En experimentos similares de mutagénesis en *A. eutrophus* mediante inserción del transposón Tn5. (Schubert et al 1988) se obtuvieron dos mutantes luego de analizar 35000 inserciones, utilizando un método de rastreo basado en el aspecto de las colonias. En *A. eutrophus* las colonias que no acumulan PHB se ven traslúcidas, a diferencia de las salvajes, de aspecto más opaco, con lo que es posible distinguir colonias con diferente contenido de PHB sin necesidad de teñirlas con un colorante específico.

Al determinarse la actividad de  $\beta$ -cetotiolasa y de la acetoacetylCoA reductasa de la cepa UBA30-21, se encontró que ésta era significativamente menor a la de la cepa salvaje.

Dado que la cepa mutante no alcanza en medio LB el crecimiento máximo (cuantificado mediante la determinación de la absorbancia a 600 nm), característico de la cepa salvaje, se pensó que la baja actividad enzimática detectada podría deberse a que las condiciones de crecimiento no eran las óptimas. Se realizaron mediciones de esta enzima de cultivos de la cepa UBA30-21 en medio suplementado con gluconato, en el cual crece de manera similar a la cepa salvaje, y se obtuvieron los mismos niveles de actividad enzimática que los obtenidos en cultivos crecidos en LB, por lo que se descartó la hipótesis.

En experimentos de cotransducción, se observó que en la cepa UBA30-21 el transposón está ligado a la mutación que produce una disminución en la actividad de  $\beta$ -cetotiolasa.

Paralelamente, en los experimentos de clonado, se logró clonar una  $\beta$ -cetotiolasa adyacente al transposón capaz de expresar actividad en *E. coli*. A partir de este resultado se deduce que esta enzima mantiene su actividad, aunque no es posible determinar en base a estos datos si en forma parcial o total, ya que aunque el clon que contiene la  $\beta$ -cetotiolasa de la cepa salvaje presenta mayor actividad enzimática

que los clones que contienen la enzima de la cepa mutante, los sistemas utilizados para el clonado son diferentes.

Al estar los genes clonados en vectores distintos es difícil evaluar si las diferencias en el nivel de expresión de las enzimas en *E. coli* se deben a factores propios de la región clonada o a otras variables, como número de copias del vector u otros factores que afecten la expresión de los genes clonados, como secuencias promotoras de los vectores.

Por otra parte, debido a la existencia de más de una  $\beta$ -cetotiolasa en otras bacterias estudiadas, como *A. eutrophus* y *Zooglea ramigera*, en las que se han detectado la presencia de isoenzimas para la  $\beta$ -cetotiolasa y la acetoacetil-CoA reductasa (Haywood et al. 1988a y b), existe la posibilidad de que se hayan clonado enzimas correspondientes a dos locus génicos diferentes. Esta última posibilidad, sin embargo, es poco probable, pues los resultados obtenidos en los experimentos de hibridación indicarían que se trata en ambos casos del mismo locus génico.

En experimentos preliminares en que se determinó la actividad de acetoacetil-CoA reductasa de los transductantes  $\text{Im}^R \text{Im}^R$  se obtuvieron valores inferiores a los de la cepa salvaje, indicando que la disminución en la actividad de esta enzima cotransduce con el *tn*. Sin embargo, en ninguno de los clones obtenidos se detectó actividad de reductasa, por lo que suponemos que el gen que codifica para dicha enzima no se encuentra en los fragmentos clonados, aunque en el caso del fragmento de DNA proveniente de la mutante de inserción, es probable que éste esté inactivado, pudiendo deberse la escasa actividad de esta enzima detectada en UBA30-21 a una isoenzima cuyo gen estaría situado en un locus diferente.

En la mayoría de los microorganismos en que se han identificado los genes responsables para la síntesis de PHA, éstos se encuentran agrupados, y en algunos casos formando una unidad de regulación (Steinbüchel et al 1992).

Una posible explicación de la baja actividad de  $\beta$ -cetotiolasa y Acetoacetil-CoA-reductasa de la cepa mutante, es que los genes que codifican para estas enzimas se encuentran en un operón, "downstream" con respecto de la inserción, por lo que se observa un efecto polar del transposón sobre ambos genes. Paralelamente, los valores de actividad de Acetoacetil-CoA-reductasa marcadamente disminuidos observados en la cepa UBA30-21 podrían sugerir que el transposón se insertó en el gen correspondiente, inactivándolo.

En este último caso, la escasa actividad detectada podría deberse a la presencia de isoenzimas, y la función de esta enzima en la biosíntesis de PHB podría estar suplida

por dichas isoenzimas, o por un camino alternativo para obtener D-(-)-3-hidroxi-butiril-CoA a partir de acetoacetyl-CoA, como en el caso de *Rhodospirillum rubrum*, en el cual esta transformación se lleva a cabo mediante una acetoacetyl-CoA NADH dependiente y dos enolil-CoA hidratasas. Esta última vía es aparentemente también utilizada en *A. entrophus* como camino alternativo, pues se ha encontrado que mutantes de acetoacetyl-CoA NADPH dependiente, la enzima que normalmente interviene en la biosíntesis de PHA, son capaces de sintetizar el polímero. (Liebergesell 1993b).

La cepa mutante UBA30-21 de *B. megaterium* produce un 30% de la cantidad de PHB producida por la cepa salvaje en medio LBG.

Este resultado indicaría que la cepa mutante tiene una PHA sintasa activa, ya que aunque en cantidades reducidas, acumula gránulos de PHB.

La disminución en la cantidad de polímero podría deberse, al menos en parte, a la menor actividad de las enzimas  $\beta$ -cetotiolasa y reductasa.

Debido a la dificultad en realizar un ensayo de actividad de PHA sintasa, que involucra la síntesis de sustratos marcados radiactivamente y sólo se realiza en la actualidad en tres laboratorios, aún no nos es posible saber si la actividad de esta enzima también está disminuida. En una publicación aparecida en el momento de redacción de esta tesis (Valentin and Steinbüchel 1994) se describe un método espectrofotométrico para determinar la actividad de esta enzima, lo que nos posibilitaría en el futuro completar los datos obtenidos con los valores de actividad de la PHA sintasa en las cepas estudiadas.

En los experimentos de transducción se observó que aunque todos los transductantes analizados tenían menor actividad de  $\beta$ -cetotiolasa y reductasa, algunos producían bajas cantidades de polímero, aunque mayores que las producidas por la cepa UBA30-21, pero otros acumulaban niveles cercanos a los de la cepa salvaje.

Estos resultados podrían indicar que la disminución en la cantidad de PHB no se debe únicamente a la menor actividad de estas enzimas, es decir, podría existir una segunda mutación, probablemente no ligada a la inserción, que causara la disminución en la cantidad de PHB de la cepa UBA 30-21.

Si existen isoenzimas en *B. megaterium* de  $\beta$ -cetotiolasa y acetoacetyl-CoA reductasa, como en *A. entrophus* y *Z. ramigera*, o más de una PHA sintasa, como en el caso de *Pseudomonas aeruginosa* y *P. oleovorans*, un fragmento de DNA transductor proveniente de la cepa UBA30-21 conteniendo el gen de estas enzimas podría, en el caso que la homología entre las secuencias fuera suficiente, recombinar con

diferentes locus génicos en distintos sitios del cromosoma de las células receptoras, dando como resultado transductantes con diferentes fenotipos.

En el caso de que existiera más de una PHA sintetasa en *B. megaterium*, podría suponerse que la cepa UBA30-21 tiene una mutación en una polimerasa no ligada a la inserción, explicando así la gran disminución en la cantidad de PHB acumulado, que no se observó en los transductantes analizados, en los que se seleccionó para el transposón.

Entre las mutantes en la biosíntesis de PHB de *A. eutrophus*, tanto las obtenidas por inserción de transposones o tratamiento con otros agentes mutagénicos como las mutantes espontáneas, las únicas que no producen cantidades detectables de polímero son las mutantes de PHA sintasa. Las mutantes de esta enzima obtenidas por transposición, además, tienen en general menores actividades de  $\beta$ -cetotiolasa y Acetoacetil-CoA-reductasa. Esta característica puede deberse al efecto polar de las inserciones, ya que en este microorganismo los genes que codifican para estas tres enzimas se hallan en un operón. No se han encontrado mutantes sin actividad de  $\beta$ -cetotiolasa o Acetoacetil-CoA-reductasa en *A. eutrophus*, probablemente debido a que mutaciones de este tipo serían letales para la célula, ya que estas enzimas intervienen también en otros procesos esenciales del metabolismo celular, como la síntesis de quinonas y la biosíntesis de los isoprenoides, precursores de los lípidos de membrana (Horbach 1993).

Además de las características mencionadas con respecto de la actividad de estas enzimas y el contenido de PHB, la cepa UBA30-21 presenta otras particularidades, entre las cuales su comportamiento frente al fago MP13 es la más interesante. La sola disminución en la cantidad de polímero no afecta el comportamiento de las células frente al fago, pues se ha observado que la cepa UBA30-20, que no acumula cantidades detectables de PHB, se comporta de la misma manera que la cepa salvaje cuando se la infecta con MP13.

Podría asociarse esta propiedad de la cepa UBA30-21 con la mayor mucosidad de sus colonias, que estaría indicando alteraciones en su superficie, modificando la sensibilidad a MP13.

Mediante experimentos de hibridización del DNA genómico de las cepas UBA30-21 y PV447, se pudo corroborar la inserción del transposón en el genoma de la cepa mutante.

Al utilizar sondas heterólogas de genes *pha* provenientes de secuencias clonadas de *A. eutrophus*, no se obtuvo hibridización en el caso de los genes para la  $\beta$ -cetotiolasa



y la reductasa, y sólo se observó una señal de hibridización débil al emplear un fragmento de la polimerasa de esta especie, correspondiente a una zona altamente conservada entre las polimerasas de diferentes microorganismos. Estos resultados indicarían que la homología entre los genes de *B. megaterium* (G+C<sup>o</sup>: 37.6-37.3) y *A. entrophus* (G+C<sup>o</sup>: 66) no es suficiente para que hibridicen entre sí, salvo probablemente en el caso de la polimerasa.

Dado que ambos microorganismos difieren bastante en su contenido de G + C, no es sorprendente que los genes para estas enzimas presenten escasa homología. En el caso de las polimerasas, como las que se han secuenciado hasta el momento presentan una gran homología entre sí, es posible que a pesar de las diferencias en el contenido de G + C de estas bacterias, ésta sea suficiente para lograr hibridización en las condiciones adecuadas, explicando así la señal observada.

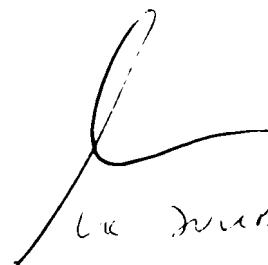
Esta particular homología se ha observado entre polimerasas de especies pertenecientes a diversos géneros bacterianos, inclusive entre las de las especies gram negativas (la mayoría de las enzimas estudiadas) y la de la única especie gram positiva cuya secuencia del gen de la sintasa se conoce, *Rhodococcus ruber*. La polimerasa de esta especie gram positiva, además, permitió restaurar la producción de PHB en una mutante de polimerasa de *A. entrophus*, demostrando que la enzima de *Rhodococcus ruber* es capaz de complementar a la mutante de la especie gram negativa.

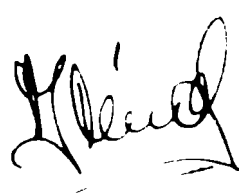
Cuando se utilizó la sonda de β-cetotiolasa del genoma de la cepa PV447, se encontró que hibridizaba con fragmentos de diferentes tamaños de los DNAs de las cepas PV447 y UBA30-21. Como se observó en los experimentos de cotransducción y de clonado que la inserción del transposón Tn917 se halla muy cercana al gen de la β-cetotiolasa, la diferencia en los tamaños de los fragmentos se debe posiblemente a modificaciones en los sitios de restricción próximos al gen de la β-cetotiolasa de la cepa mutante producidas por la inserción.

Paralelamente, los resultados obtenidos en los experimentos de hibridización con esta sonda indicarían que el gen para la β-cetotiolasa de la cepa PV447 clonada es el mismo que se encuentra en la proximidad de la inserción de Tn917. Además, en el caso de que existiera otra β-cetotiolasa en *B. megaterium*, su secuencia no tendría homología suficiente con la de la enzima clonada, ya que se observó un solo fragmento genómico que hibridizaba con la sonda, tanto en el genoma de la cepa salvaje como el de la mutante.

La β-cetotiolasa, que cataliza la primera reacción de la biosíntesis de PHB, tiene un rol dominante en la regulación de este proceso, pues responde a las concentraciones citoplasmáticas de acetil-CoA y CoA-SH, iniciando la síntesis de PHB en condiciones de concentración alta de acetil-CoA y baja de CoA-SH.

En todos los casos estudiados hasta el momento la regulación del proceso de biosíntesis de PHAs es a nivel enzimático, ya que no se ha detectado regulación a nivel transcripcional (Haywood et al 1988 a y b). Debido a esto, el papel regulatorio de la  $\beta$ -cetotiolasa es de fundamental importancia, siendo esta enzima un blanco adecuado para realizar modificaciones tendientes a aumentar la producción del polímero. Para ello el locus génico de la  $\beta$ -cetotiolasa de la cepa UBA30-21 se subclonó en pUC19 de manera de obtener un fragmento de menor tamaño. Su análisis por secuenciación necesario para los objetivos mencionados se está realizando en el laboratorio.

  
Lic. María Fernanda



## **BIBLIOGRAFIA**

- Anderson A. y Dawes E. (1990). Bacterial Polyhydroxyalkanoates. *Microbiol. Rev.* 54:451-472
- \* Ballard D., Holmes P. y Senior P. (1987). Formation of polymers of  $\beta$ -hydroxybutyric acid in bacterial cells and a comparison of the morphology of growth with the formation of polyethylene in the solid state . *Recent advances in Mechanistic and synthetic aspects of polymerization.* 215:293-314; Reidel Publishing Co., Lancaster, U.K.,
- \* Barnard G., Sanders J. (1988); *FEBS* 231:16-18
- \* Bohall N., Vary P. (1986)  
Transposition of Tn917 in *Bacillus megaterium*. *Journal of Bacteriology.* 167: 716-718.
- \* Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the protein-dye binding . *Anal. Biochem.* 72:248-254
- \* Brand H., Gross A., Lenz R. y Fuller R. (1988). *Pseudomonas oleovorans* as a source of poly( $\beta$ -hydroxyalkanoates) for potential applications as biodegradable polyesters. *Appl. Env. Microbiol.* 54:1977-1982
- \* Braunegg G., Somleitner y Lafferty R. (1978). A rapid gas Chromatographic method for the determination of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in microbial biomass. *European J. Appl. Microbial. Biotechnol.*; 6:29-37
- \* Brown B., Carlton B.( 1980). Plasmid Mediated Transformation in *Bacillus megaterium* . *Journal of Bacteriology.* 142: 508-512
- \* Callahan J.P., Crawford I.P., Hess G.F. and Vary P.S. (1983). Cotransductional mapping of the *trp-lus* region of *R. megaterium* . *J. Bacteriol.* (1983) 1455-1458
- \* Dawes E. and Senior P. (1973). The role and regulation of energy reserve polymers in microorganisms. *Adv. Microbiol. Physiol.* 14:135-266
- \* Doi Y., Segawa A. y Kunioka M. (1990). Biosynthesis and characterization of poly (3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate) in *Alcaligenes eutrophus*. *Int. J. Biol. Macromol.* 12:106-111

- \* English J.D. and Vary P.S. (1986). Isolation of recombination defective and UV sensitive mutants of *Bacillus megaterium*. *J.Bacteriol* 165: 155-160
- \* Findlay R. y White D. (1983). Polymeric  $\beta$ -hydroxyalcanoates from environmental samples and *Bacillus megaterium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:71-78
- \* Floccari M., Tiscornia G, Palmada F. y Méndez B.(1991). Enriquecimiento en mutantes de *Bacillus megaterium* deficientes en la síntesis de poli-(3-hidroxi-butirato). *Rev. Arg. Microbiol.*; 23:14-25
- \* Floccari,M.E. Y Méndez,B.S. Conjugal transfer of the streptococcal transposons Tn916 Y Tn919 into *Bacillus megaterium*. (enviado a publicación a *J.Applied Microbiology and Biotechnology*) 1994.
- \* Fodor et al 1975, *J.Bacteriol* 121:390
- \* Folin,L.; Ciocalteu,V. (1927). *J.Biol.Chem.* 73:637
- \* Friedrich B., Hogrefe C. and Schlegel H.G. (1981). Naturally occurring transfer of hydrogen-oxidizing ability between strains of *A.eutrophus*. *J.Bacteriol.* vol 147 n°1 198-205
- \* Fukui T., Yoshimoto A., Matsumoto M, Hosokawa S., Saito T., Nishikawa H. y Tomita K. (1976). Enzymatic synthesis of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate in *Zooglea ramigera*. *Arch.Microbiol.* 110:149-156
- \* Griebel R., Smith Z. y Merrick J. (1968). Metabolism of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. I Purification, composition, and properties of native poly- $\beta$ -hydroxybutyrate granules from *Bacillus megaterium*. *Biochemistry* 7:3676-3681
- \* Griebel R., Merrick J. (1971). Metabolism of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate: effect of mild alkaline extraction on native poly- $\beta$ -hydroxybutyrate granules. *J. Bacteriol.*108:782-789
- \* Haywood, G.W; Anderson,A.J.; Chu,L. and Dawes,E.A. (1988a). Characterization of two  $\beta$ -ketothiolases possessing differing substrate specificities in the polyhydroxyalcanoate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. *FFMS Microbiol.Lett.* 52: 91-96
- \* Haywood, G.W; Anderson,A.J.; Chu,L. and Dawes,E.A. (1988b).

The role of NADH and NAD(P)H -linked acetoacetyl-CoA reductases in the poly-3-hydroxybutyrate synthesizing organism *Alcaligenes eutrophus*. FEMS Microbiol.Lett. 52: 259-264

\* Haywood G., Anderson A. y Dawes E. (1989). The importance of PHB-synthase substrate specificity in polyhydroxyalkanoate synthesis by *Alcaligenes eutrophus*. FEMS Microbiol. Lett. 57:1-6

\* Haywood G., Anderson A., Ewing D., y Dawes E. (1990). Accumulation of polyhydroxyalkanoate from simple carbohydrate substrates by *Pseudomonas* SP strain NCIMB 40135. App. Environ. Microbiol. 56:3354-3359

\* Horbach,S.; Salm,H. and Welle, R. (1993). Isoprenoid biosynthesis in bacteria: Two different pathways? FEMS Microbiol.Lett. 111: 135-140

\* Huisman G., Wonink E., Meima R., Kazemier B., Tepstra P. y Witholt B. (1991). Metabolism of Poly(3-hydroxyalkanoates) by *Pseudomonas oleovorans*: identification and sequences of genes and function of the encoded proteins in the synthesis and degradation of PHA. J. Biol. Chem. 266:2191-2198

\* Huisman G., Wonink E., Koning G., Preusting H. y Witholt B. (1992). Synthesis of Poly(3-hydroxyalkanoates) by mutant and recombinant *Pseudomonas* strains. Appl.Microbiol. Biotechnol.; 38:1-5

\* Husted E., Steinbüchel A. y Schlegel H. (1992). Cloning of poly(3-hydroxybutyric acid) synthase genes of *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodospirillum rubrum* and heterologous expression in *Alcaligenes eutrophus*. FEMS Microbiol. Lett. 93: 285-290

\* Holmes P. (1985). Applications of PHB - a microbially produced biodegradable thermoplastic. Phys. Technol.16:32-36

\* Holmes P. (1988). Biologically produced (R)-3-hydroxyalkanoate polymers and copolymers. p1-65 Developments in crystalline polymers, Elsevier Applied Science Publishers, London

\* Janes,B.; Hollar,J. and Dennis,D. (1990). Molecular Characterization of the poly-β-hydroxybutyrate biosynthetic pathway of *A.eutrophus* H16. In Novel Biodegradable Microbial Polymers (ed. Dawes, E.A.) pp 175-190 Kluwer, Dordrecht

- \* Knauf V.C. and Nester E.W. (1982). Wide range cloning vectors : a Cosmid clone bank of an *Agrobacterium* Ti plasmid. *Plasmid* 8, 45-54
- \* Lach,D.A.et al.(1990). *J.gen.Microbiol.*136:545-553.
- \* Lammi C.J. and J.C. Vary. (1972) Deoxyribonucleic acid synthesis during outgrowth of *Bacillus megaterium* QMB1551 spores. p 277-282 in H.O.Halvorson and L.L.Campbell (ed) *Spores V*. ASM Washington D.C.
- \* Lemoigne M. (1926). Products of dehydration and of polymerization of  $\beta$ -hydroxybutyric acid. *Bull. Soc. Chem. Biol.* 8:770-782
- \* Lemoigne M. and Girard H. (1943). Reserves lipidiques  $\beta$ -hydroxybutyriques chez *Azotobacter chroococum*. *C. r. hebdl Séanc. Acad. Sci* 217:557-558
- \* Levine M. (1957). Mutations in the temperate phage P22 and lysogeny in *Salmonella*. *Virology* 3: 22-41
- \* Liebergesell M., Schmidt B. y Steinbüchel A. (1993a). Isolation and identification of granule-associated proteins relevant for poly(3-hydroxyalkanoic acid) biosynthesis in *Chromatium vinosum* D. *FEMS Microbiol.Lett.* 99:227-232
- \* Liebergesell M., y Steinbüchel A. (1993b). Cloning and molecular analysis of the poly(3-hydroxybutyric acid) biosynthetic genes of *Thiocystis violacea*. *Appl.Microbiol.Biotechnol.* 38: 493-501
- \* Lowry,O.H.; Rosebrough,N.J.; Farr,L. and Randall,R.J. (1951). *J.Biol.Chem.* 193:265-275
- \* Lundgren D., Pfister R. y Merrick J. (1964). Structure of poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid) granules. *J.Gen.Microbiol.* 34:441-446
- \* Lundgren R. et al (1965). *J. Bacteriol.* 89:245-251
- \* Lynen,F. and Wieland,O. (1955)  $\beta$ -Ketoreductase. *Methods in Enzymology Vol 1* : 566-573 . Academic Press Publishers. New York.
- \* Macrae R. y Wilkinson, J. (1958). Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism in washed suspensions of *Bacillus cereus* and *Bacillus megaterium*. *J.Gen.Microbiol.* 66:210-222

- \* Malm T., Bowald S., Bylock A. and Busch C. 1992. Prevention of postoperative pericardial adhesions by closure of the pericardium with absorbable polymer patches. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*. 104: 600-607
- \* Mas J., Pedrós-Alió C. y Guerrero R. (1985). Mathematical model for determining the effects of intracytoplasmatic inclusions on volumen and density of microorganisms. *J. Bacteriol.* 164:749-756
- \* Moskowitz G. y Merrick J. (1969). Metabolism of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. II Enzymatic synthesis fo D(-)- $\beta$ -hydroxybutyryl coenzyme A by enoyl hydrase from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry*, N. Y. 8:2748-2755
- \* Odelle H. (1975). *Bacterial Metabolism*. 2da edición p.400; Academic Press New York
- \* Oeding V. y Schlegel H. (1973).  $\beta$ -Ketothiolase from *Hydrogenomonas entrophus* H16 and its significance in the regulation of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate metabolism. *Biochem. J.* 134:239-249
- \* Ostle A. y Holt J. (1982). Nile Blue as a fluorescent stain for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. *Appl. Env. Microbiol.*44:238-241
- \* Peoples, O.P. y Sinskey, A.J. (1989a). Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes entrophus* H16. Characterization of the genes encoding  $\beta$ -ketothiolase and acetoacetyl-CoA reductase. *J. Biol. Chem.* 264:15293-15297
- \* Peoples, O.P. y Sinskey, A.J. (1989b). Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate (PHB) biosynthesis in *Alcaligenes entrophus* H16. Identification and characterization of the PHB polymerase gene (phb C); *J. Biol. Chem.* 264:15298-15303
- \* Peoples, O.P. y Sinskey, A.J. (1989c). *Mol. Microbiol.* 153: 101-104
- \* Peoples, O.P. y Sinskey, A.J. (1989d). *Mol. Microbiol.* 3: 349-357
- \* Perkins J.B., and Youngman P. (1986). Construcion and properties of Tn917-*lac*, a transposon derivative that mediates transcriptional gene fusions in *Bacillus subtilis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol.83: 140-144
- \* Pettinari M. y Méndez B. (1990). Detección de genes que codifican para la síntesis de poli- $\beta$ -hidroxibutirato (PHB) en *Bacillus megaterium* mediante Tn917 *lac*. Reunión



Annual de la Sociedad Argentina de Investigación Bioquímica. Mar del Plata 25-27 de noviembre 1990

\* Pieper U., Steinbüchel A. (1992). Identification, cloning and sequence analysis of the poly(3-hydroxyalkanoic acid) synthase gene of the Gram-positive bacterium *Rhodococcus ruber*. FEMS Microbiol. Lett. 96:73-80

\* Pries A., Priefert H., Krüger N. y Steinbüchel A. (1991). Identification and characterization of two gene loci relevant for the phenotype "PHB leaky" in *Alcaligenes eutrophus* which exhibit homologies to ptsH and ptsI of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 173:5843-5853

\* Reusch R. y Sadoff H. (1988). Putative structure and functions of a poly- $\beta$ -hydroxybutyrate/calcium polyphosphate channel in bacterial plasma membranes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4176-4180

\* Reusch R. (1989). Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate/calcium polyphosphate complexes in eukaryotic membranes. Proc. Soc. Ex. Biol. Mod. 191:377-381

\* Schubert, P.; Steinbüchel A.; Schlegel, H. (1988). Cloning of the *Alcaligenes eutrophus* Genes for the synthesis of poly- $\beta$ -Hydroxybutyric acid (PHB) and Synthesis of PHB in *Escherichia coli*. (1988); J. Bacteriol. 170:5837-5847

\* Schubert et al (1991); J. Bacteriol. 173: 168-174

\* Schlegel H., Lafferty R. y Krauss I. (1970). The isolation of mutants not accumulating poly- $\beta$ -hydroxybutyrate acid. Arch. Microbiol. 71:283-294

\* Senior, P.J. and Dawes, E.A. (1973). The Regulation of Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate Metabolism in *Azotobacter beijerinckii*. Biochem. J. 134:225-238

\* Slater S., Voige W., y Dennis D. (1988). Cloning and expression in *Escherichia coli* of the *Alcaligenes eutrophus* H16 poly- $\beta$ -hydroxybutyrate biosynthetic pathway. J. Bacteriol. 170:4431-4436

\* Slepecky R. y Law J. (1961). Synthesis and degradation of poly- $\beta$ -hydroxybutyric acid in connection with sporulation of *Bacillus megaterium*. J. Bacteriol. 82:37-42

\* Smibert R. y Krieg N. (1981). Manual of methods for general microbiology p 409-413. American Society for Microbiology, Washington D.C.

- \* Slepecky R., Law J. (1961). *J. Bacteriol.* 82:37-42
- \* Steinbüchel A., Schubert P. (1989). Expression of the *Alcaligenes eutrophus* poly( $\beta$ -hydroxybutyric acid)- synthetic pathway in *Pseudomonas* sp. *Arch. Microbiol.*153:101-104
- \* Steinbüchel A. (1991). Polyhydroxyalkanoic acids. *Biomaterials: Novel Materials from Biological Sources* .p123-213; Macmillan Press, London.
- \* Steinbüchel A., Hustede E., Liebergesell M., Pieper U., Timm A., y Valentin H. (1992). Molecular Basis for biosynthesis and accumulation of polyhydroxyalkanoic acids in bacteria. *International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates. FEMS Microbiology Reviews*; p217-231
- \* Stern J.; *Methods in Enzymology* (1955). Vol I, 573-584
- \* Tao, Vary P. (1991). Isolation and characterization of a sporulation *lacZ* fusion mutants of *B. megaterium* . *J. of Gen. Microbiol.*137:797-806
- \* Timm A. y Steinbüchel A. (1990). Formation of polyesters consisting of medium-chain-length 3-hydroxyalkanoic acids from gluconate by *Pseudomonas aeruginosa* and other fluorescent pseudomonads. *App. Environ. Microbiol.* 56:3360-3367
- \* Valentin, H.E.; Steinbüchel, A. (1994). Application of enzymatically synthesized short-chain-length hydroxy fatty acid coenzyme A thioesters for assay of polyhydroxyalkanoic acid synthases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 699-709
- \* Vary J.C. (1972). Spore germination of *Bacillus megaterium* QMB1551 mutants. *J. Bacteriol.* 112: 640-642
- \* Vary, P. (1979) . Transduction in *Bacillus megaterium* . *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 88: 1119-1124.
- \* Vary P. y Halsey W. (1980). Host-Range and Partial Characterization of Several New Bacteriophages for *Bacillus megaterium* QM B1551. *J. gen. Virol.* 51:137-146
- \* Vary P., Garbe J., Franzen M. y Frampton E. (1982). MP13, a Generalized Transducing Bacteriophage for *Bacillus megaterium*. *J. of Bacteriol.* 149:1112-1119

- \* Vary P. and Y.P.Tao (1988). Development of genetic methods in *Bacillus megaterium*. en Genetics and Biotechnology of Bacilli, vol 2. Canesan and Hoch. Academic Press
- \* Vary P. (1992). Biology of Bacilli: Applications to Industry. Butterworth-Heinemann, Boston,USA.
- \* Von Tersch and Carlton 1881, J.Bacteriol. 155:866
- \* Ward A. y Dawes E. (1973). A disk assay for poly- $\beta$ -hydroxybutyrate. Analyt. Biochem. 52:607-613
- \* Wilkinson J. (1959). The problem of energy-storage compounds in bacteria. Exp. Cell. Res Suppl 7:114-132
- \* Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985). Gene 33: 103-119
- \* Youngman P., Perkins J.B., and Losick R.(1983). Genetic transposition and insertional mutagenesis in *Bacillus subtilis* with *Streptococcus faecalis* transposon Tn917. Proc.Natl.Acad.Sci. USA 80: 2305-2309
- \* Youngman P., Perkins J.B., and Losick R.(1984). A novel method for the rapid cloning in *Escherichia.coli* of *Bacillus subtilis* chromosomal DNA adjacent to Tn917 insertions. Mol.Gen.Genet. (1984) 195: 424-433
- \* Youngman P., Perkins J.B., and Losick R.(1984). Construction of a cloning site near one end of Tn917 into which foreign DNA may be inserted without affecting transposition in *Bacillus subtilis* or expression of the transposon borne *erm* gene. Plasmid 12, 1-9
- \* Youngman P.(1987). Plasmid vectors for recovering and exploiting Tn917 transpositions in Bacillus and other gram positive bacteria . del libro Plasmids: a practical approach. K.Hardy ed. IRL Press, Oxford.
- \* Zeph L.R., Xiaoyan Lin, and Stotzky G (1991). Comparison of three nonradiative and a radioactive DNA probe for the detection of target DNA by DNA hibridization. Current Microbiology 22: 79-84