



**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS
MICROBIOLÓGICAS**

**Caracterización funcional de una proteína híbrida
con actividades presuntivas de diguanilato ciclasa y
fosfodiesterasa de *Azospirillum brasilense* Sp245**

Tesis

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRO (A) EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCIÓN EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA
MICROBIANA**

PRESENTA:

IBQ. Elvia Guadalupe Gómez Vázquez

ASESOR DE TESIS:

D.C. Alberto Ramírez Mata

PUEBLA, PUE.

30 de Enero, 2017

RESUMEN

Azospirillum brasilense es una Rizobacteria Promotora del Crecimiento Vegetal (PGPR). La producción de fitohormonas, la fijación de nitrógeno, la solubilización de fosfatos y la producción de sideroforos son los principales mecanismos que promueven el crecimiento y desarrollo de una amplia variedad de plantas de interés agronómico que son inoculadas con este microorganismo. Una eficiente colonización de *A. brasilense* a las raíces de la planta hospedera es crucial para desencadenar el efecto promotor del crecimiento. Está documentado que esta bacteria persiste en su ambiente natural por su capacidad de formar biopelículas sobre las raíces de las plantas que coloniza; las cuales son comunidades de bacterias altamente estructuradas unidas a una superficie, donde las células forman una matriz extracelular que las protege de condiciones de estrés dado el ambiente competitivo que se encuentra en la rizosfera. En años recientes se determinó que el segundo mensajero di-GMPc regula la transición del estilo de vida planctónico a sésil (biopelícula) de una gran variedad de bacterias entre las que se encuentra *Azospirillum*. El di-GMPc es sintetizado a partir de dos moléculas de GTP a través de proteínas denominadas diguanilato ciclasas (DGC) las cuales poseen un dominio conservado denominado GGDEF, mientras que su degradación la llevan a cabo proteínas fosfodiesterasas (PDE) las cuales poseen un dominio también conservado denominado EAL. El genoma de *A. brasilense* Sp245 codifica para 35 proteínas presuntivas implicadas en el metabolismo del di-GMPc. Entre las que se encuentra la proteína híbrida codificada por el gen AZOBR_40216. La proteína posee un dominio PAS-PAC, un dominio GGDEF degenerado y un dominio EAL conservado en la misma cadena polipeptídica. Dado este arreglo interesante de la proteína nos surgieron las siguientes preguntas: a) ¿tendrá ambas actividades?, b) ¿o solo tendrá una de ellas? Para contestar estos cuestionamientos en este trabajo llevamos a cabo dos estrategias de estudio: a) en la primera generamos un modelo estructural *in silico* para predecir su probable función. Para tal efecto utilizamos los programas I-Tasser, VMD y Chimera, usando como molde el cristal de la proteína MorA de *Pseudomonas aeruginosa* (4RNF). b) en la segunda estrategia expresamos, purificamos y determinamos la actividad de PDE y DGC de la proteína recombinante expresada en *E. coli* BL21 con el plásmido pGEX4T-1, para medir las actividades utilizamos como sustratos el p-nitrofenilfosfato (pnpp) y GTP radioactivo, respectivamente. Datos experimentales de la actividad de PDE *in vitro* proponen que la proteína sustenta actividad de PDE ya que desdobla el pnpp el cual posee un enlace fosfodiéster análogo al que se encuentra en el di-GMPc. Mientras que, la actividad de DGC probablemente no ocurra ya que no hemos obtenido la formación del di-GMPc bajo las condiciones de ensayo.

Tales suposiciones la podemos sustentar dado a que los análisis bioinformáticos concuerdan con que el dominio EAL de la PDE está conservado, no así el dominio GGDEF el cual se encuentra degenerado a SDHAF. Datos de potenciales electrostáticos sugieren que la proteína en estudio adopta cargas principalmente positivas en contraste con la carga negativa que adoptan los dominios GGDEF funcionalmente activos.

INTRODUCCIÓN

El suelo, es el hábitat de una gran diversidad de microorganismos que pueden interactuar con las plantas, por medio de la colonización en las raíces generando efectos de manera directa e indirecta, Figura 1.

La mayoría de estas interacciones se realizan en una zona conocida como rizósfera, un centro de actividades físicas, químicas y biológicas, que rodea la arquitectura del sistema radical de una planta y que es influenciado por los exudados de la raíz (Cardon y Whitbeck, 2007).

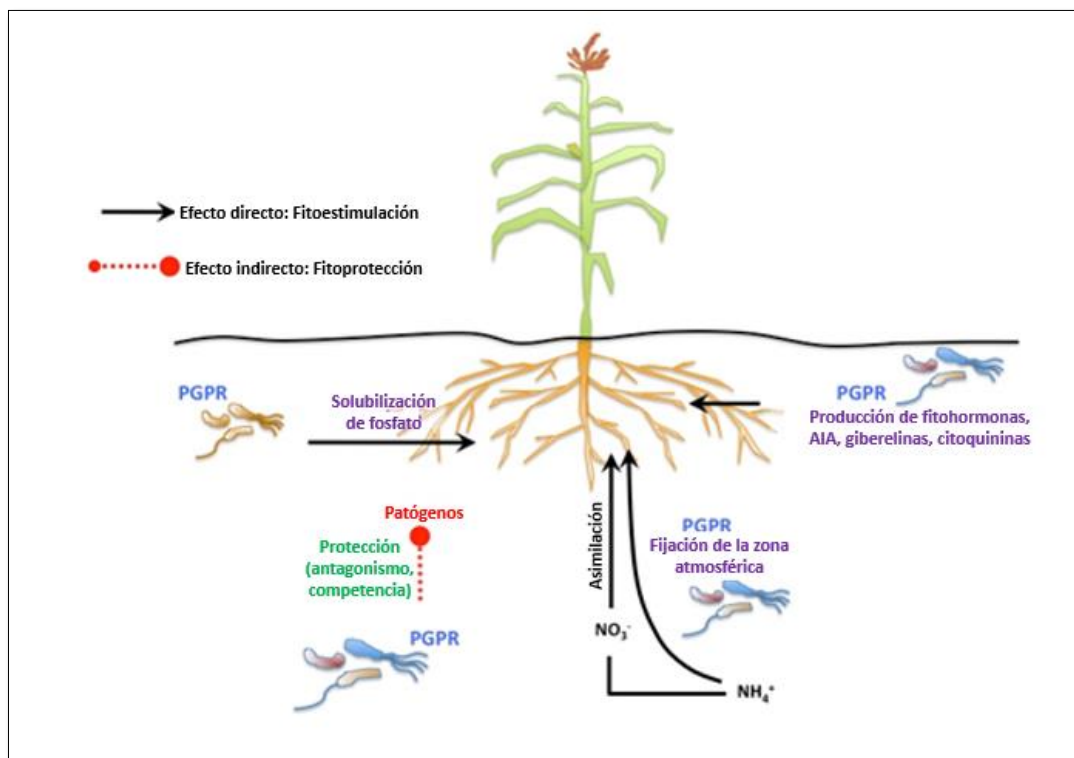


Figura 1. Interacción bacteria-planta (Prigent y Moëgne, 2016).

Las bacterias que influyen positivamente en el crecimiento de las plantas, por diferentes mecanismos: secreción de fitohormonas, suplemento de macro y micro elementos, fijación biológica del nitrógeno (diazótrofos), solubilización del fósforo, además de otros efectos indirectos; y se les denomina: Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR, por sus siglas en inglés). (Spaepen *et al.*, 2009).

A las PGPR se les han atribuido la capacidad de estimular el desarrollo de las plantas, estableciendo relaciones benéficas, que impactan especialmente a las raíces de las plantas. Figura 2.

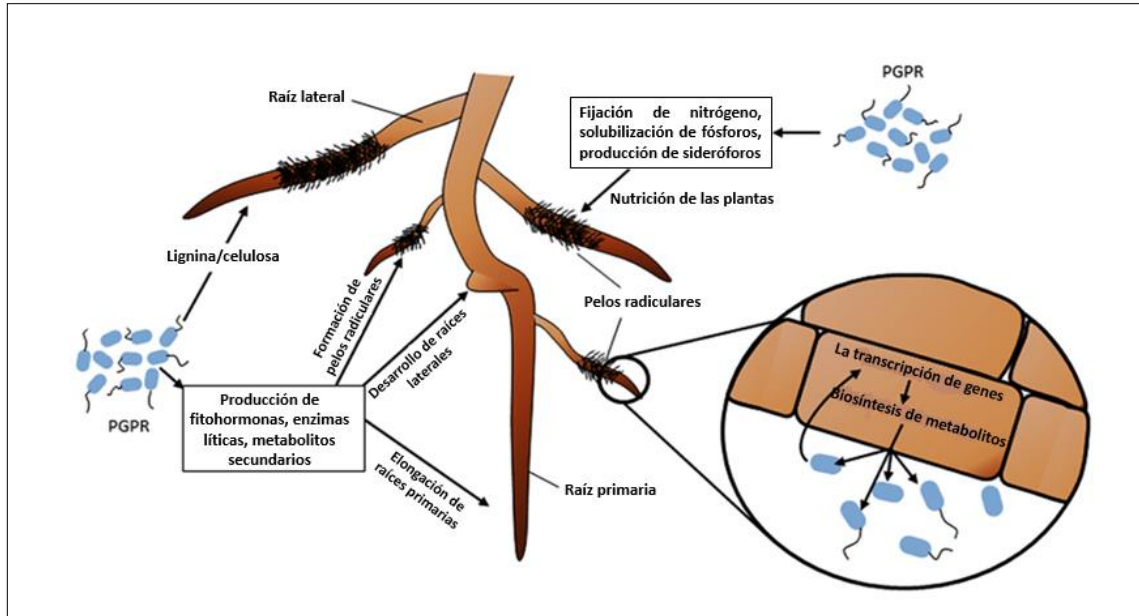


Figura 2. Impacto de PGPR sobre la estructura de la raíz de las plantas (Vacheron *et al.*, 2013).

Los géneros bacterianos que pertenecen a las PGPR, incluyen a *Rhizobium*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Burkholderia* y *Azospirillum* (De Zelicourt *et al.*, 2013).

Género *Azospirillum*

El género *Azospirillum* se ha investigado a profundidad por su capacidad promotora del crecimiento vegetal y se ha convertido en un excelente modelo para estudiar la interacción planta-microorganismo. *Azospirillum* inicialmente fue estudiado por su capacidad para fijar el nitrógeno.

En la actualidad se han descrito varias especies del género *Azospirillum*: *A. lipoferum* y *A. brasilense* (Tarrand *et al.*, 1978), *A. amazonense* (Magalhães *et al.*, 1983), *A. halopraeferens* (Reinhold *et al.*, 1987), *A. irakense* (Khammas *et al.*, 1989), *A. largimobile* (Ben Dekhil *et al.*, 1997), *A. doebereineriae* (Eckert *et al.*, 2001), *A. oryzae* (Xie y Yokota, 2005), *A. melinis* (Peng *et al.*, 2006), *A. canadense* y *A. zae* (Mehnaz, 2007) y *A. rugosum* (Young *et al.*, 2008).

La mayoría de estas especies se han aislado de raíces de plantas silvestres y de suelos de regiones templadas, subtropicales y tropicales del mundo (Gunarto *et al.*, 1999).

A. brasilense ha sido una de las primeras bacterias en ser estudiadas y empleada como inoculante. Es una α -proteobacteria, diazótrofa, Gram negativa, móvil por flagelo polar y laterales, es aislada del suelo, en las proximidades de las raíces de gramíneas, cereales y cultivos de interés agroeconómico (Loh *et al.*, 1984; Hadas y Okon, 1987).

Un efecto característico en plantas inoculadas con *Azospirillum* es el incremento en la longitud y número de raíces laterales, además de un mayor número de pelos radiculares, entre otros. Para que la bacteria promueva el efecto benéfico es necesaria una colonización exitosa, la cual se inicia con interacción con la planta, por medio de quimiotaxis hacia los compuestos que se encuentran en los exudados radiculares.

La quimiotaxis bacteriana guía a células móviles en gradientes de atrayentes y repelentes, una vez que se establece la asociación con la planta, una serie de modificaciones permiten el cambio del estilo de vida de la bacteria: de móvil a sésil, facilitando la formación de pequeños agregados en la superficie de la raíz (colonización), para que posteriormente formen consorcios de microorganismos dentro de una matriz polimérica, conocido como biopelícula.

La regulación de esta forma de vida, depende de una molécula muy importante denominada di-GMPc (Alexandre *et al.*, 2000, Baca y Xiqui *et al.*, 2010).

Di-GMPc: molécula de señalización

El segundo mensajero, 3´5´guanosín-monofosfato-cíclico (di-GMPc), es una molécula de señalización intracelular que coordina la "transición de estilo de vida de la bacteria" de móvil a sésil (formación de biopelícula) y posterior dispersión de la biopelícula. El di-GMPc está implicado en la regulación de varias funciones bacterianas: la adhesión a las superficies, la agregación y la formación de biopelículas, virulencia de patógenos bacterianos de animales y plantas. Figura 3.

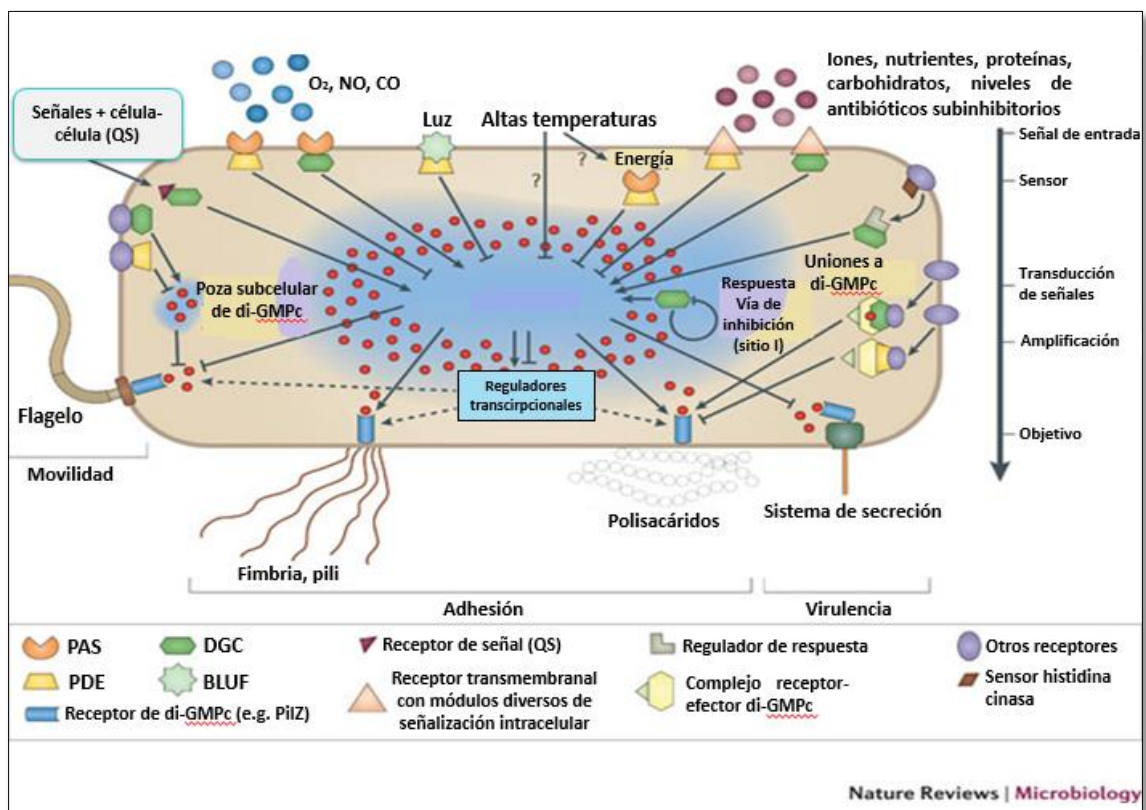


Figura 3. Cascada de la regulación bacteriana por di-GMPc (McDougald *et al.*, 2012).

El segundo mensajero interviene en mecanismos de regulación a través de la unión a diversos receptores o efectores que incluyen pequeños dominios: PilZ, factores de transcripción y riboswitches. Por lo tanto, la regulación puede ocurrir a nivel transcripcional, post-transcripcional o post-traducciona (Ryan, 2013).

El metabolismo del Di-GMPc

El nivel celular del di-GMPc está regulado por enzimas que se encargan de la síntesis y la degradación (Ryan, 2013). Tres dominios están implicados en estos procesos: el dominio GGDEF cataliza la síntesis del di-GMPc a partir de dos moléculas de GTP, mientras que los dominios EAL y HD-GYP hidrolizan al di-GMPc, para obtener como primer producto pGpG lineal o dos moléculas de GMP, como se muestra en la Figura 4.

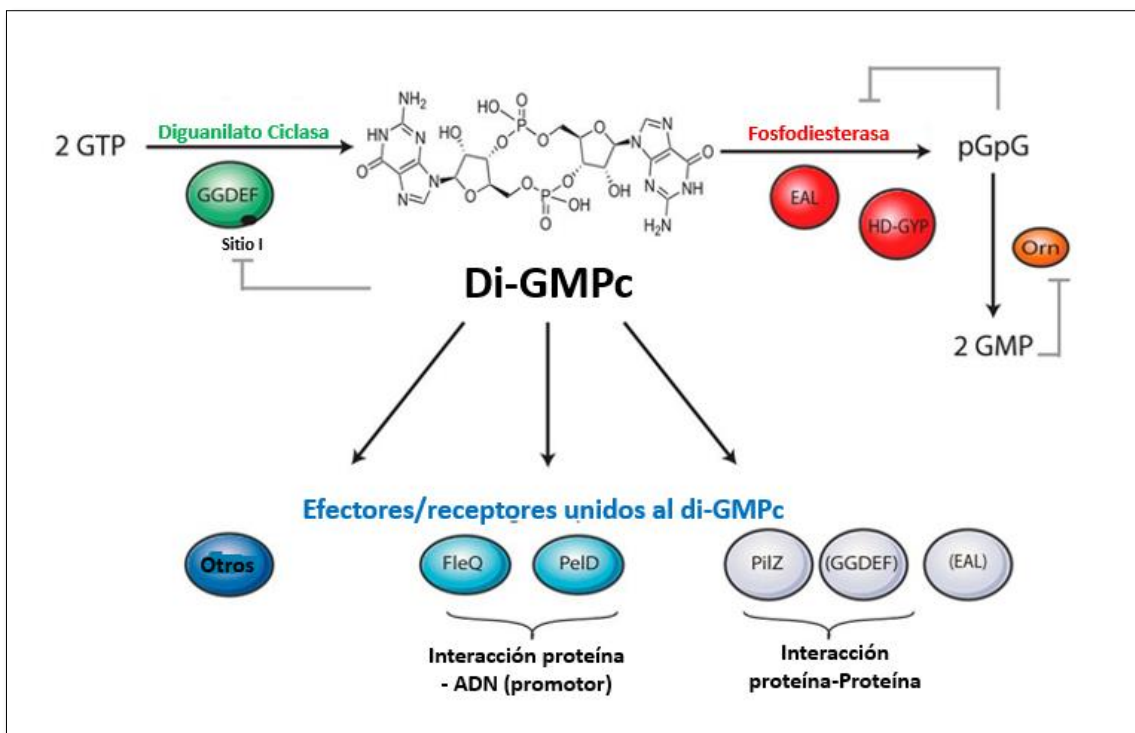


Figura 4. Esquema del metabolismo del di-GMPc (Valentini y Filloux, 2016).

Estudios genómicos han demostrado que se pueden encontrar 3 tipos de proteínas (dominio GGDEF o EAL y dominio híbrido), que están en asociación con otros dominios sensores y receptores: PAS, GAF, REC, CACHE, CHASE, MHYT, HAMP y NIT (Galperin *et al.*, 2001(A); Galperin *et al.*, 2001(B); Gilles, 2001; Lyer *et al.*, 2003; Shu, *et al.*, 2003; Ulrich *et al.*, 2005; Zhulin, *et al.*, 2003) que permiten la detección de señales intracelulares y ambientales hacia los dominios que regulan los niveles de di-GMPc.

a) El dominio GGDEF: síntesis del di-GMPc

La diguanilato ciclasa (DGC) se caracteriza por poseer una secuencia de aminoácidos conservada "**GGD/EEF**" (Gly-Gly-Asp/Glu-Glu-Phe) denominada sitio activo, que está conformado del sitio A1 y el sitio activo 2 (DxxxxNxxxxD). El dominio GGDEF consta de aproximadamente 170 residuos de aminoácidos. Los primeros dos residuos (Gly) de este motivo están implicados en la unión de GTP, mientras que el cuarto residuo (Glu) está implicado en la coordinación de iones metálicos. El tercer aminoácido del motivo (Asp/Glu) es indispensable para la catálisis y también tiene un papel en la coordinación del metal (Römling, 2013).

El motivo catalítico GGDEF está implicado en la unión de dos moléculas de GTP, y posteriormente sintetizar el di-GMPc, esta reacción necesita de cofactores, como son los cationes de Mg^{2+} .

Estas proteínas contienen un motivo, cinco aminoácidos río arriba del sitio activo (RxxDxxxRxGGDEF) denominado sitio de inhibición (Sitio-I), donde se produce la inhibición por producto de la enzima. La unión de c-di-GMP en el sitio-I impide la formación de dímeros DGC enzimáticamente activas. (Chen *et al.*, 2012).

Las proteínas con dominios GGDEF, como lo es la proteína PleD de *Caulobacter crescentus* (YP_002517919), que actúa como un regulador de respuesta para la transición de células móviles a sésiles, permitiendo adherirse a la superficie, demostrando su actividad de diguanilato ciclasa (Hecht y Newton, 1995).

b) El dominio EAL: hidrólisis del di-GMPc

Las fosfodiesterasas (PDE) se caracterizan por poseer la secuencia de aminoácidos conservada "**EAL**" (Glu-Ala-Leu) y consta de aproximadamente 250 residuos de aminoácidos, donde el residuo Glu está directamente implicado con la coordinación de uno de los metales, lo que explica que este aminoácido sea fundamental para la actividad catalítica de la enzima. La actividad de las proteínas con dominio EAL depende de los cationes (Mn^{2+} o Mg^{2+}), donde los metales coordinan dos moléculas de agua, uno de ellos está implicado en un ataque hidrolítico sobre el enlace fosfodiéster del di-GMPc y la actividad catalítica que es fuertemente inhibida por Ca^{2+} (Römling, 2013). Estos cofactores también pueden interactuar con un segundo motivo conservado río abajo del motivo EAL, denominado "Loop 6" (lazo 6), (DDFGTG-YSS) que permiten la dimerización del dominio (Phippen *et al.*, 2014).

El residuo de glutamato (E) del motivo EAL es esencial. Mientras que, un cambio de residuo de alanina (A) en tirosina o valina (ETL y EVL) mantienen la actividad enzimática (Valentini y Filloux, 2016).

Las proteínas con dominios EAL, como la proteína RocR de *Pseudomonas aeruginosa* (NP_252636), que es un regulador de respuesta se encarga de la degradación del di-GMPc demostrando su actividad catalítica. (Chen et al., 2012).

c) Proteínas híbridas: dominio GGDEF-EAL

Las proteínas híbridas son aquellas que contienen ambos dominios (DGC-PDE) en la misma secuencia aminoácida.

La actividad de dichas proteínas, se clasifica de acuerdo a datos obtenidos de proteínas que se han estudiado bioquímicamente.

- I. Que ambos dominios son enzimáticamente activos, por lo cual son regulados de manera diferente por señales ambientales y/o intracelulares provocando que en un momento determinado, una de las actividades prevalezca. Como es el caso de una proteína citoplasmática de *Mycobacterium smegmatis* (proteína citoplasmática MSDGC-1), que tiene una arquitectura de dominio GAF-GGDEF-EAL, se ha demostrado que tanto puede sintetizar e hidrolizar di-GMPc *in vitro* (Gomelsky et al., 2011).
- II. Propone que uno de los dos dominios sea enzimáticamente activo y el otro inactivo, donde este dominio sin actividad desarrolle nuevas funciones. La proteína CC3396 de *C. crescentus* que tiene una arquitectura con dominios GGDEF-EAL donde el dominio GGDEF contiene un sitio A parcialmente degenerado (GEDEF), carece de actividad DGC. En lugar de ello, este dominio es capaz de unirse a GTP y en respuesta, activa al dominio PDE (Christen et al., 2005).
- III. Que ambos dominios son enzimáticamente inactivos, por lo tanto, pueden actuar como receptores de di-GMPc.

Los dominios GGDEF y EAL permiten la formulación de reglas generales, para distinguir los dominios conservados que pueden ser enzimáticamente activos o inactivos con dominios degenerados (Römling, 2013).

Antecedentes directos

Minjárez-Sáenz en 2015 realizó un análisis bioinformático en el genoma de *A. brasilense* Sp245, con la búsqueda de genes por homología que codifican para proteínas con dominios GGDEF, EAL y HD-GYP; y encontró un total de 40 proteínas, de las cuales eran un total de 25 proteínas de dominio único, donde: 20 son de dominio GGDEF, 5 de dominio EAL y 5 de HD-GYP. Mientras que, las 10 restantes son proteínas con dominios híbridos (GGDEF/EAL; GGDEF/HD-GYP).

Por lo tanto, con el fin de estudiar proteínas que sintetizan y degradan al di-GMPc, en nuestro modelo de estudio *A. brasilense*, destacó el interés de estudiar y caracterizar una proteína híbrida denominada CCD03171.

Esta codificada por el gen AZOBR_p410089, ya que contiene un dominio MHYT con 7 segmentos transmembranales, un dominio conservado PAS/PAC, un dominio GGDEF parcialmente degenerado, a causa del cambio de una serina por una glicina (SGDEF), además, que en el sitio inhibitorio (RxxD) se identificó una prolina en lugar de una arginina (PxxD) y un dominio EAL conservado.

Demostrando con los ensayos fenotípicos y bioinformáticos del gen que codifica para la proteína CCD03171, tiene ambas funciones, atribuidos a las diferentes circunstancias a las que se enfrenta la bacteria.

Estos antecedentes nos generaron expectativas para evaluar un gen que codificara a una proteína híbrida, con un dominio degenerado, o bien ambos dominios, es por ello que se decidió caracterizar el gen AZOBR_40216 con un dominio DGC degenerado y un dominio EAL conservado, para poder tener una respuestas para estas preguntas: ¿Esta proteína tiene una sola actividad?, ¿tiene ambas actividades? O simplemente ¿no tiene actividad?

HIPÓTESIS

El gen AZOBR_40216 que codifica para una proteína híbrida que tiene dominios PAS/PAC, GGDEF degenerado y EAL conservado, únicamente presenta actividad de fosfodiesterasa.

JUSTIFICACIÓN

Estudios previos describen al segundo mensajero di-GMPc bacteriano que regula diferentes vías de señalización, propiciando consigo diversas funciones como: modificación de la superficie celular, formación de biopelículas, movilidad y virulencia, entre otros procesos; que han sido estudiados en organismos bacterianos. Estos mecanismos de regulación no han sido ampliamente estudiados en *A. brasilense*, por lo que, es de gran interés conocer específicamente cada una de las funciones en las que está implicado el di-GMPc, para ampliar el conocimiento de su contribución a la interacción que establece la bacteria con la planta, debido a que *A. brasilense*, es una rizobacteria promotora de crecimiento vegetal (PGPR), interacción que se lleva a cabo en un ambiente altamente competitivo.

OBJETIVOS

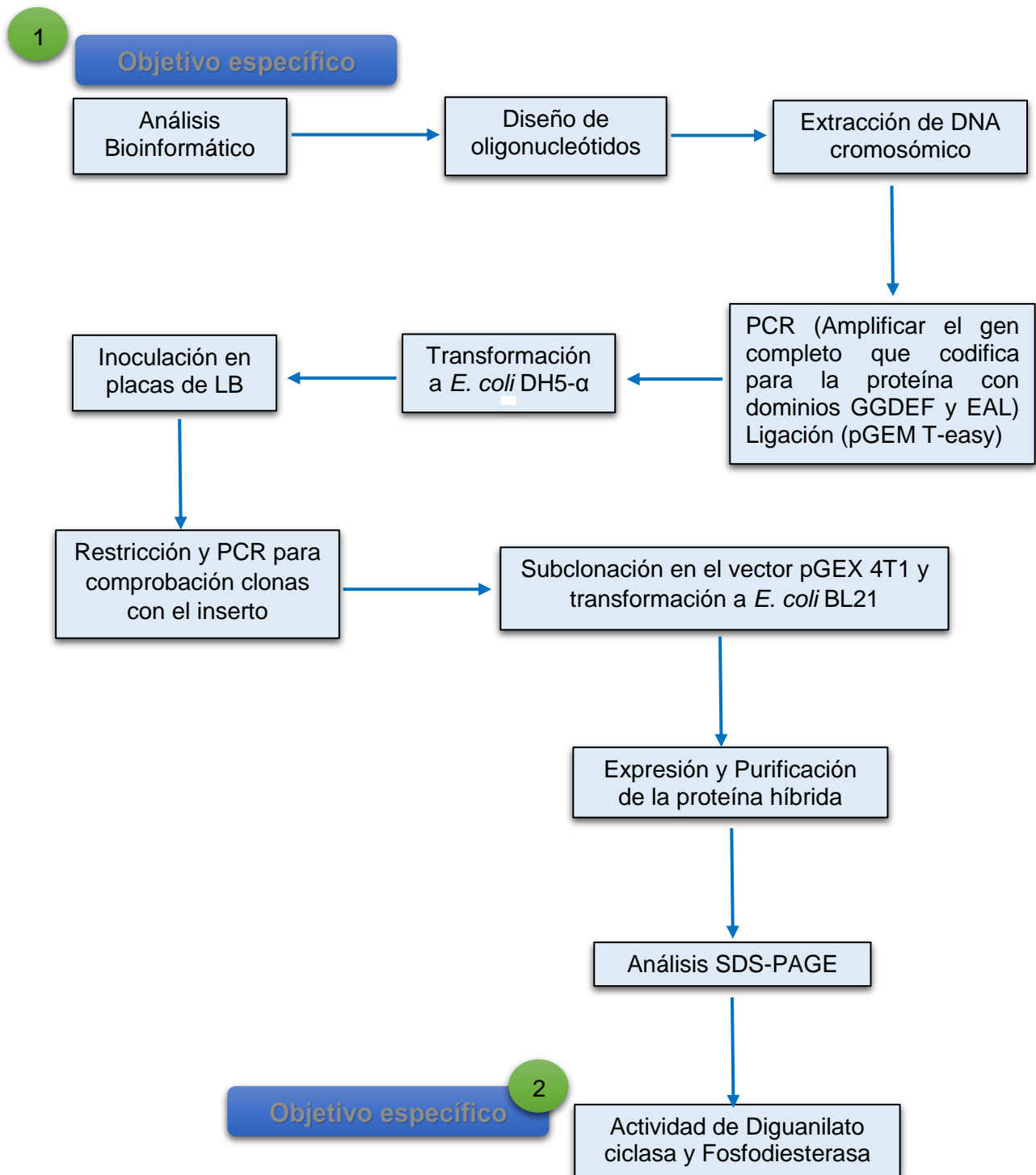
Objetivos General

Caracterizar funcionalmente una proteína híbrida con actividades presuntivas de Diguanilato ciclasa y Fosfodiesterasa de *A. brasilense* Sp245.

Objetivos Específicos

- Expresar y purificar la proteína híbrida con dominios GGDEF degenerado y EAL conservado de *A. brasilense*.
- Determinar la actividad de la proteína híbrida con dominios diguanilato ciclasa y fosfodiesterasa de *A. brasilense* Sp245.

ESQUEMA DE TRABAJO



MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Cepas y plásmidos	Referencia
<i>A. brasilense</i> Sp245	(Baldani <i>et al.</i> , 1986)
<i>E. coli</i> DH5- α	Bethesda Research Laboratories
<i>E. coli</i> BL21	(Wood, 1966)
pGEM T-easy	Promega
pGEX 4T1	(Kaelin <i>et al.</i> , 1992)

Análisis de secuencia y estructuras 3D de la proteína híbrida

Se utilizaron diferentes herramientas bioinformáticas “online”, para poder caracterizar y predecir la función y estructura *in silico* de la proteína en estudio, y comprobar *in vitro* la hipótesis descrita, los programas empleados fueron los siguientes:

- **Ncbi** (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/13107579>): base de datos gratuita del Centro Nacional de Información Biotecnológica o *National Center for Biotechnology Information* (NCBI), almacena y actualiza información bioinformática para el análisis de secuencias de ADN, ARN y proteínas.
- **Translate tool** (http://web.expasy.org/cgi-bin/translate/dna_aa): es una herramienta que permite la traducción de nucleótidos (ADN / ARN) de secuencia usando como base la secuencia de aminoácidos de una proteína.
- **ExPASy** (<https://www.expasy.org/>), es un Sistema Experto de Análisis de Proteínas o *Expert Protein Analysis System*, ya que es programa de proteómica del Instituto Suizo de Bioinformática (*Swiss Institute of Bioinformatics, SIB*).
- **Prosite** (<http://prosite.expasy.org/>): es una base de datos de familias y dominios de proteínas creada por Bairoch A. (1988). Consiste en entradas que describen dominios, familias y sitios funcionales de secuencias de aminoácidos que han sido verificados por un equipo del Instituto Suizo de Bioinformática. Esta base se encarga de identificar las posibles funciones de las proteínas recientemente descubiertas y de analizar aquellas ya

conocidas, pero con actividades previamente desconocidas. PROSITE ofrece herramientas para el análisis de secuencias de proteínas y detección de motivos de proteínas.

- **Phobius** (<http://phobius.sbc.su.se/>): es un servidor que busca y analiza regiones transmembranales y/o péptidos señal, a partir de una secuencia de aminoácidos de una proteína.
- **Clustal Omega** (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>): es un programa informático para el alineamiento de secuencias múltiples de proteínas.
- **I-Tasser** (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>): es un servidor bioinformático (Iterative Threading ASSEmbly Refinement) que predice el modelo tridimensional de estructuras proteicas, a partir de una secuencia de aminoácidos. Este servidor detecta plantillas homólogas de la estructura por medio de Protein Data Bank- **PDB** (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) por una técnica de reconocimiento denominada “threading”.

Actualmente, I-Tasser se emplea para las predicciones de funciones de proteínas basadas en estructura, lo que proporciona anotaciones como: sitios de unión a ligando, tipos de estructura, entre otros; haciendo coincidir estructuralmente los modelos de la proteína evaluada con las proteínas conocidas en las bases de datos (con cierta función), por medio de un “C-score” (denominado como la mejor puntuación y confiabilidad, que va de un rango de -5 a 2), “TM-score y RMSD” (estos valores van de acuerdo al “c-score” y son los límites para los alineamientos con proteínas homólogas).

- **Swiss model** (<https://swissmodel.expasy.org/>): es un servidor web que está dedicado al modelado de estructuras 3D de proteínas por homología, evaluando completamente la secuencia y de manera instantánea los dominios que conforman a la proteína.

Comprende de cuatro pasos principales que están implicadas en la construcción de un modelo de homología de una proteína estructuralmente determinada:

1. Identificación de la plantilla estructural (Proteína caracterizada y almacenada en una base de datos).
2. Alineamiento de la secuencia proteica a evaluar y la de la plantilla.
3. La construcción de modelos y minimización de la energía.
4. Evaluación de la calidad del modelo, con ayuda de un potencial estadístico de fuerza media.

- **Phyre2** (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>): **Protein Homology/AnalogY Recognition Engine**, es un programa “online” gratuito que tiene el servicio de predecir estructuras tridimensionales de proteínas. De la misma forma, que otros ordenadores moleculares, que tienen la capacidad de reconocer homología con plantillas de PDB, sin olvidar, que tiene la capacidad de producir información de una manera rápida en cuestión de 30 a 180 minutos dependiendo de la secuencia a analizar, con respecto a otras bases de datos.
- **VMD** (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/vmd>): (Visual Molecular Dynamics) es un programa de modelamiento molecular y visualización de estructuras. Esta herramienta sirve para ver y analizar los resultados de las simulaciones de dinámica molecular, modelado de moléculas, secuencias, que permiten desarrollar diferentes tipos de reproducción, colores, gráficos y etc.
- **CHIMERA** (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>): Es un programa que permite la visualización interactiva y análisis de estructuras moleculares, además desarrolla mapas de densidad, ensamblajes moleculares, alineamientos de secuencias, acoplamientos, mediciones de trayectorias y conformaciones.

Diseño de oligonucleótidos

Se realizó un análisis bioinformático de la secuencia del gen AZOBR_40216, y se diseñaron los oligonucleótidos con sitios de restricción *EcoRI* y *XhoI* flanqueando el gen, con los iniciadores delanteros después del ATG (codón de inicio) y los iniciadores reversos hasta antes del TGA (Codón de paro).

	Notación del oligonucleótido	Secuencias	Sitios de restricción	Longitud del oligonucleótido	Contenido de GC %	Tm (°C)
Delantero con sitio de corte	pGEX40216F	AATTGAATTC AAGCCGG ACCCTCACCTCGCC	<i>EcoRI</i>	21	71.42	72
Reverse con sitio de corte	pGEX40216R	ATATCTCGAGGCGCGG CACCTGCCAGGGCAG	<i>XhoI</i>	21	80.95	76

Clonación del gen AZOBR_40216

Se cultivó *A. brasilense* Sp245 en medio mínimo k-malato durante 18 h a 30 °C y 150 rpm, posteriormente se realizó la extracción de ADN genómico por el método de CTAB de Sambrook (1989).

El gen AZOBR_40216 se amplificó con las siguientes condiciones:

Reactivo	Volumen (µL)
H ₂ O	10.2
DMSO	1
10x PCR Buffer(-Mg)	2
50mM MgCl ₂	0.6
10mMdNTP	4
Forward	0.5
Reverse	0.5
DNA	1
Taq DNA Polimerasa	0.2

Etapas	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	1x	95°C	5 min
Alineamiento	30x	95°C	30 seg
		71.5°C	30 seg
		72°C	2 min
Extensión	1x	72°C	7 min
Extensión final		4°C	∞

El producto de PCR se purificó por medio del kit DNA (DNA clean & Concentrator-ZYMO research) y se clonó en el vector pGEM T-easy, posteriormente se transformó en células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α , que se crecieron en placas con medio Luria Bertani (LB) a 37 °C por 16 h. Se seleccionaron las clonas por resistencia a Amp (ampicilina) 100 μ g/mL.

Subclonación en el vector pGEX 4T1

Las clonas seleccionadas anteriormente se cultivaron en medio LB líquido a 37 °C por 16 h, suplementado con Ap a 100 μ g/mL, a las clonas se le realizó la extracción de DNA plasmídico (Sambrook, *et al.*, 1989) se verificó la construcción por análisis de cortes de restricción y PCR.

Inmediatamente, se extrajo el gen AZOBR_40216 por medio de los sitios de restricción flanqueantes y se subclonó en el vector de expresión de pGEX 4T1. Se transformó en células competentes de *E. coli* BL21 en medio LB con Ap 100 μ g/mL a 37 °C por 16 h, se evaluaron las clonas por restricción y PCR.

Ensayo de expresión de proteína recombinante

Se realizó un precultivo de 16 h de incubación en medio LB con Ap (100 μ g/ml). Se inocularon 5 matraces de 20 mL de medio LB/Ap (100 μ g/mL) con 1 mL de precultivo cada uno (dilución 1:20) y se incubaron a 30 °C con agitación de 150 rpm hasta llegar a una D.O._{595nm} de 0.5 - 0.6. Una vez alcanzada la D.O. se indujo con una concentración 0.1mM de IPTG durante 4 h a 25 °C, se centrifugó el cultivo en alícuotas de 10 mL a 3,000 RPM por 10 min para separar la pastilla del sobrenadante (se almacenó a -80 °C).

La pastilla de cada alícuota se resuspendió en 7 mL de solución de lisis, posteriormente se sonicaron en tres rondas de 30 seg a 60 Hertz y tres rondas de 30 seg a 80 Hertz, se centrifugaron las alícuotas a 3000 rpm durante 20 min y se separaron los sobrenadantes (proteína soluble), se verificó la expresión y obtención de la proteína de interés en un gel SDS-PAGE.

Purificación por cromatografía de afinidad a glutation

El sobrenadante anterior se hizo interaccionar con la resina de agarosa previamente equilibrada por 1.5 h, para constatar la unión de ésta a la resina, posteriormente se adicionó a la columna de cromatografía, y se obtuvo el filtrado de extracto total de proteínas sin afinidad al glutation (no absorbido).

Posteriormente se realizó lavados con la solución reguladora de equilibrio a la resina hasta obtener D.O._{595nm} = 0, lo cual sugiere la eliminación de proteínas inespecíficas adheridas a la columna, se obtuvieron fracciones de 3 mL; por

consiguiente se recolectaron de 15 a 20 fracciones de 500 μ L de proteínas eluidas con glutatión reducido.

Al término del ensayo se recolectan las eluciones para dializar la muestra, y se concentró con sacarosa.

Ensayo de Fosfodiesterasa

5 μ g de proteína híbrida fueron incubados con bis-*p*-nitrofenil fosfato (–bis-pNPP) a una concentración de 1.5 mM. El ensayo se desarrolló a 37 °C durante 3 h en un tampón de análisis (50mM de tris-HCl, 1mM de MgCl₂, pH 8.0) y la liberación del *p*-nitrofenol -pNP- fue cuantificada a 405nm.

Ensayo de Diguanilato ciclasa

Se inició la reacción con la adición 33.3 nM [α -³³P]-GTP y se incubó a 30°C, usando 15 μ g de proteína en un buffer de reacción (50 mM de Tris-HCl pH 7.8, 250 mM NaCl, 25 mM KCl y 10 mM MgCl₂). Se recolectan alícuotas de 90 min, y para detener la reacción se le agrega un volumen 0.5 M EDTA. Al producto de la reacción se separa el sobrenadante centrifugando a 16000 x g por 2 min. Posteriormente, se llevó a cabo la cromatografía de capa fina para evaluar y analizar el producto de la reacción.

RESULTADOS

Análisis bioinformático

Se realizó una búsqueda bioinformática, evaluando al gen AZOBR_40216 de *A. brasilense* Sp245:

- En NCBI se determinó el producto de la traducción del gen en estudio mostrando una longitud de 1.7 kb, que codifica para una proteína que contiene los dominios revelados: PAS/GGDEF/EAL.
- Translate Tool se realizó la traducción de la secuencia de nucleótidos a aminoácidos, para poder comprobar en el software en línea “prosite y Phobius” la arquitectura estructural de la proteína citoplasmática confirmando una probable proteína híbrida de 582 aminoácidos de longitud contiene los siguientes dominios: en el N-terminal tiene un dominio PAS/PAC y un dominio diguanilato ciclasa y en el C-terminal tiene un dominio fosfodiesterasa (figura 5).

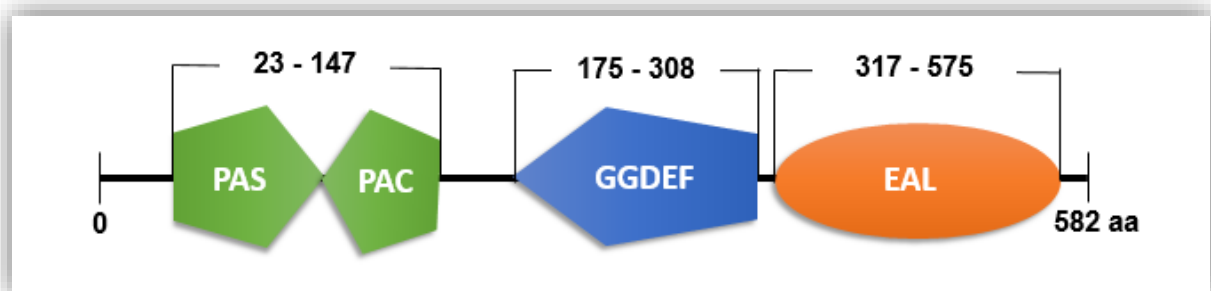


Figura 5.- Arquitectura estructural de la proteína híbrida (Elaborado en Prosite).

- Clustal Omega, permitió comparar el dominio DGC con proteínas ya cristalizadas, caracterizadas y evaluadas, como: **PleD** de *C. crescentus* - YP_002517919 (Hecht y Newton, 1995) y **WspR** de *P. aeruginosa* - Q3SJE6 (Malone *et al.*, 2007) y el dominio PDE con **RocR** de *P. aeruginosa* - NP_252636 (Chen *et al.*, 2012), por medio de alineamientos de secuencias de estas proteínas.

Como se muestra en la figura 6, el alineamiento del dominio GGDEF determino que el sitio activo 1 (GGDEF) se encuentra degenerado a (SDHAF), mientras que en el sitio activo 2 (DxxxxNxxxxD) hay una variación de aminoácidos de asparagina por arginina y de aspártico por asparagina, de igual manera en el sitio de inhibición hay un cambio de arginina por una glicina, demostrando que el dominio DGC está ampliamente degenerado.

Mientras que el dominio PDE se encuentra conservado el motivo EAL, los sitios de unión a di-GMPc, el de unión a metal y el lazo 6 (DDFG(T/A)GYSS) que permite la dimerización del dominio

fosfodiesterasa, aun teniendo el cambio, de una treonina por una alanina, este cambio es permisible en el motivo, que es descrito por Rao *et al.*, (2008); Rao *et al.*, (2009) y Römbling, (2009).

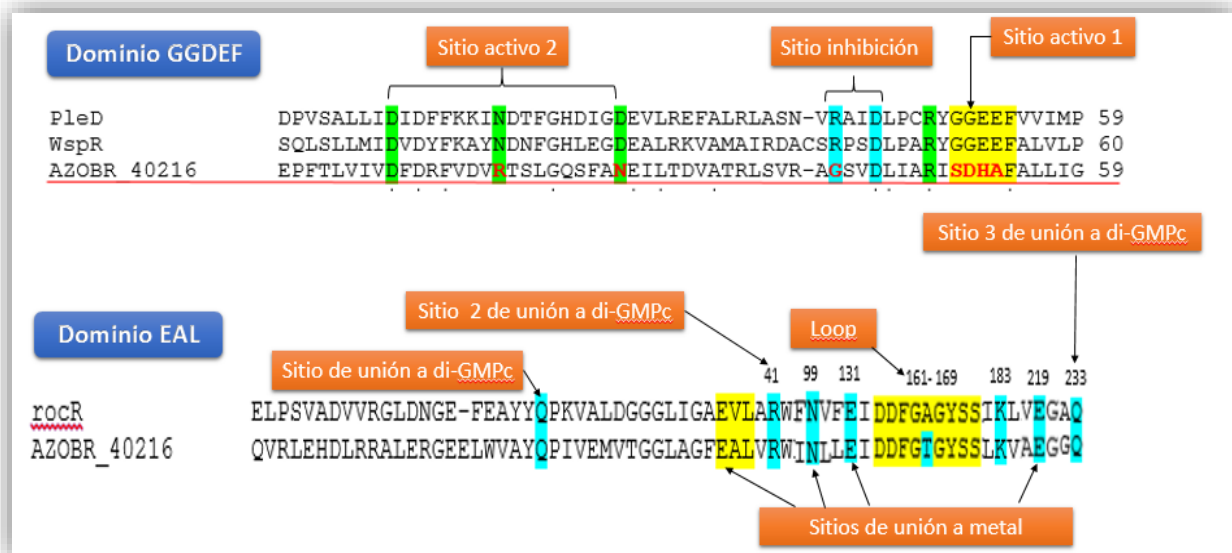


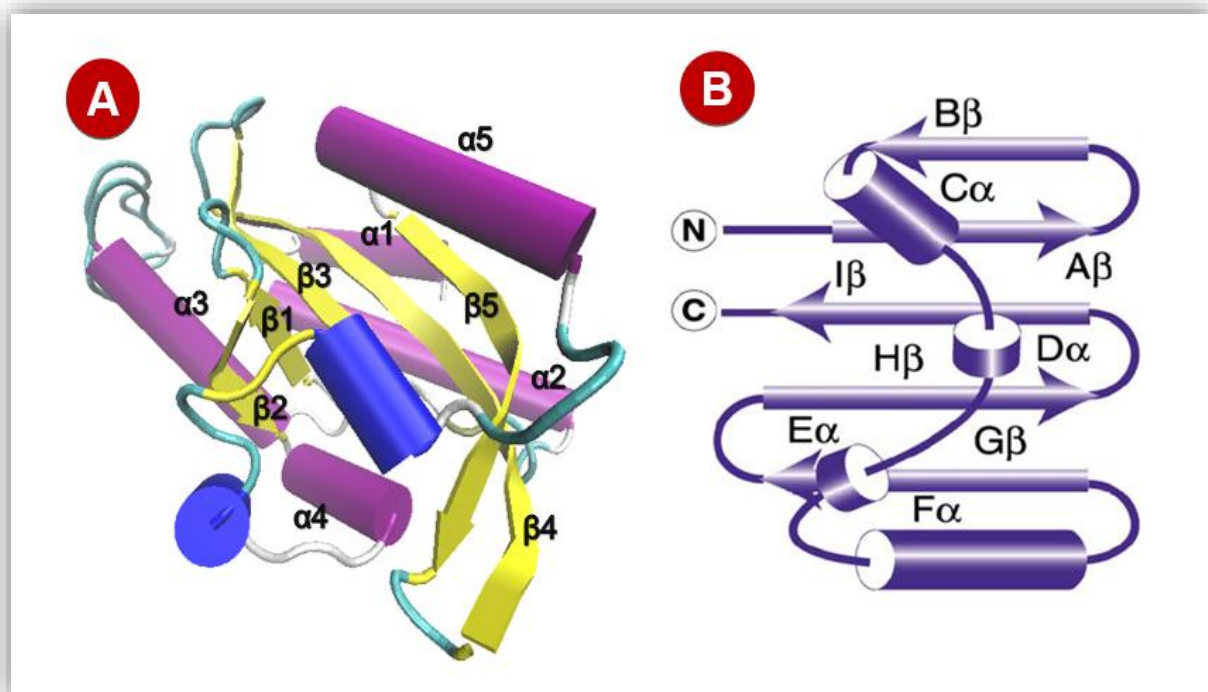
Figura 6.- Alineamientos múltiples de dominio GGDEF y EAL (Elaborado en Clustal omega)

- I-Tasser generó modelos estructurales 3D de cada dominio de la proteína recombinante, prediciendo sus conformaciones, sitios de unión a ligando y su función biológica, además dichos modelos fueron evaluados y comparados con otros servidores, como Swiss-model que nos permitió comparar con 50 templados homólogos a la proteína en estudio, coincidiendo con I-Tasser, al obtener las mismas plantillas y con los puntajes más altos de similitud (C-score), mientras que Phyre2 elaboró modelos semejantes al ordenador I-Tasser, permitiendo profundizar en el análisis de cada dominio:

Domínio PAS/PAC:

Como se muestra en la figura 7 (A), el modelo de la estructura terciaria de la secuencia polipeptídica del dominio PAS/PAC, que es un conjunto de conformaciones que fue elegido el programa I-Tasser de cinco estructuras y que genero los mejores parámetros, de acuerdo al algoritmo del programa, es decir un C-score: -1.01 (que va de un rango de -5 a 2). También se tomó en cuenta el TM-score (0.59 ± 0.14) y RMSD ($7.2 \pm 4.2 \text{ \AA}$) que se estiman con respecto al C-score y que son necesarios, para que el servidor haga alineamientos del modelo, que coinciden con las plantillas de las bases de datos. En la figura 7 (B) se observa la típica estructura secundaria de un dominio PAS (Amezcuca *et al.*, 2002), que permitió analizar y comparar el modelo propuesto por la base de datos.

Observando una similitud conformacional, por lo tanto, coinciden con un número de cinco betas plegadas y cinco alfa hélices, como lo sugiere Amezcua *et al.*, 2002.



Para analizar la estructura e inferir su función biológica del dominio PAS-PAC, se ejecutó una superposición del modelo 3D en estudio y una plantilla que tiene el mayor porcentaje de identidad 17%, un TM-score: 0.591 y una resolución: 1.04 Å de la estructura cristalográfica, como se observa en la figura 8, donde el modelo de color azul es el de la proteína en estudio y el de color rojo es el dominio 2GJ3 (PAS) de la proteína NifL de *Azotobacter vinelandii* (Key *et al.*, 2007). Evidenciando que adquiere una semejante conformación estructural a la plantilla propuesta por la herramienta bioinformática empleada.

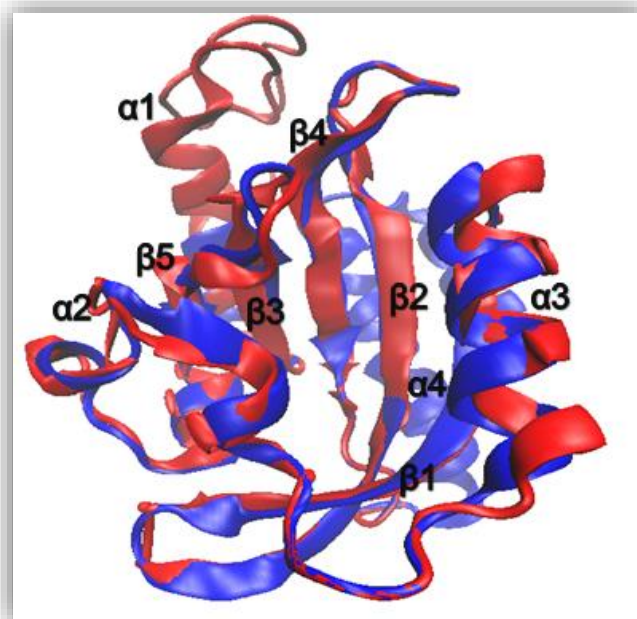
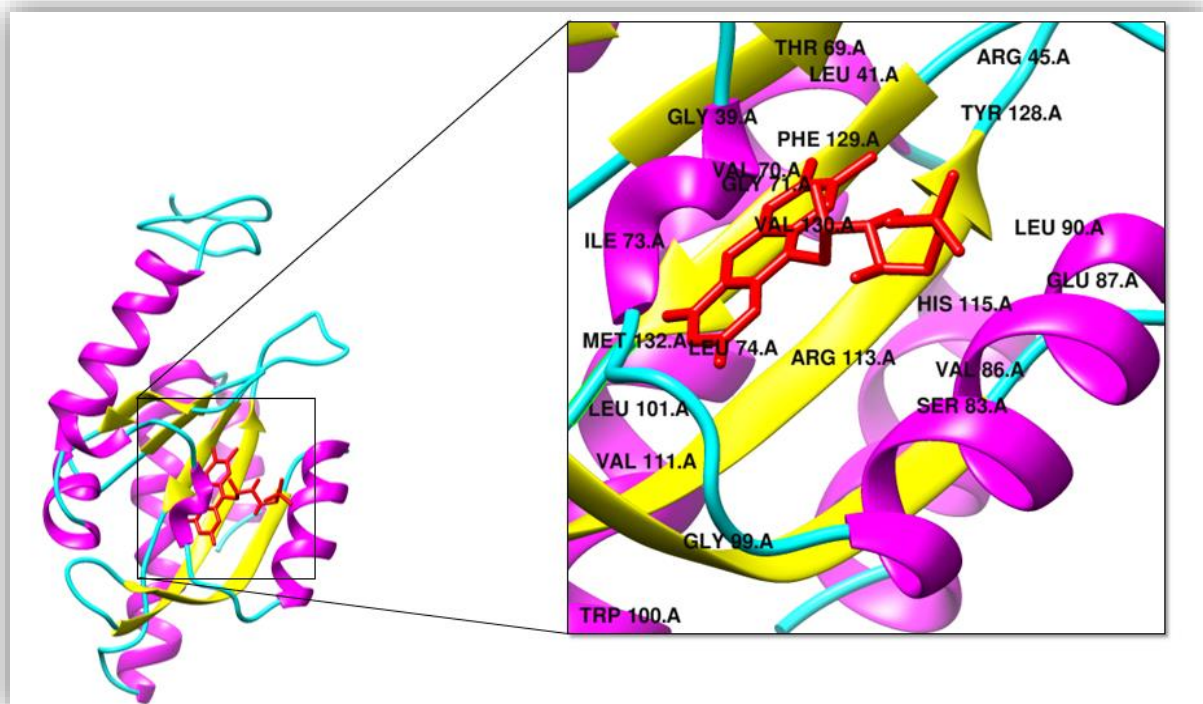


Figura 8.- Superposición de dominios PAS-PAC, la proteína en estudio (azul) y 2GJ3 de *A. vinelandii* (rojo). Representación elaborada en Chimera.

En la figura 9, se señala la predicción del sitio de unión a ligando, donde interacciona el FMN (flavin mononucleótido) con 21 aminoácidos (Gly, Leu, Arg, Thr, Val, Gly, Ile, Leu, Ser, Val, Glu, Leu, Gly, Leu, Val, Arg, His, Tyr, Phe, Val,



Met).

Figura 9.- Interacción de FMN en el sitio de unión a ligando en el dominio PAS-PAC, representación elaborada en Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).

Dominio GGDEF-EAL:

Al analizar el dominio GGDEF, el programa modeló una estructura 3D (figura 10.A) que obtuvo un C-score: 1.06, el TM-score (0.86 ± 0.07) y RMSD ($3.3 \pm 2.3 \text{ \AA}$). En la figura 10 (B) se observa la representación topográfica estructura secundaria de un dominio GGDEF (Deepthi *et al.*, 2014). Al comparar ambas imágenes se puede visualizar que contiene el mismo número de betas plegadas, como de alfas hélices.

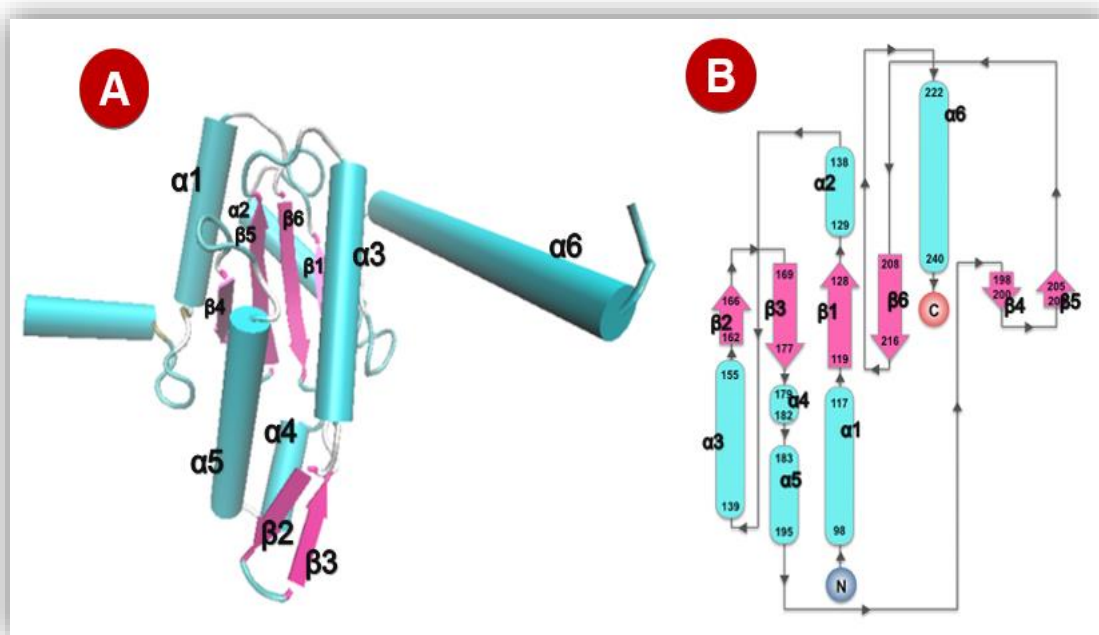


Figura 10.- Modelo de estructuras secundarias (A) Modelo de la estructura 3D del dominio GGDEF, representación elaborada en Visual Molecular Dynamics (Humphrey *et al.*, 1996). (B) Representación topográfica de la estructura secundaria de un dominio GGDEF (Deepthi *et al.*, 2014).

El modelo del dominio EAL que fue propuesto por los servidores, como el de mayor puntuación, es el que se observa en la figura 11 (A), ya que tiene un c-score: 1.54, un TM-score = 0.93 ± 0.06 y RMSD = $3.2 \pm 2.2 \text{ \AA}$. Al relacionarlo con la figura 11(B) de una topografía del dominio DosP de *E. coli* (Tarnawski *et al.*, 2013) logra percibir que tiene la misma estructura secundaria.

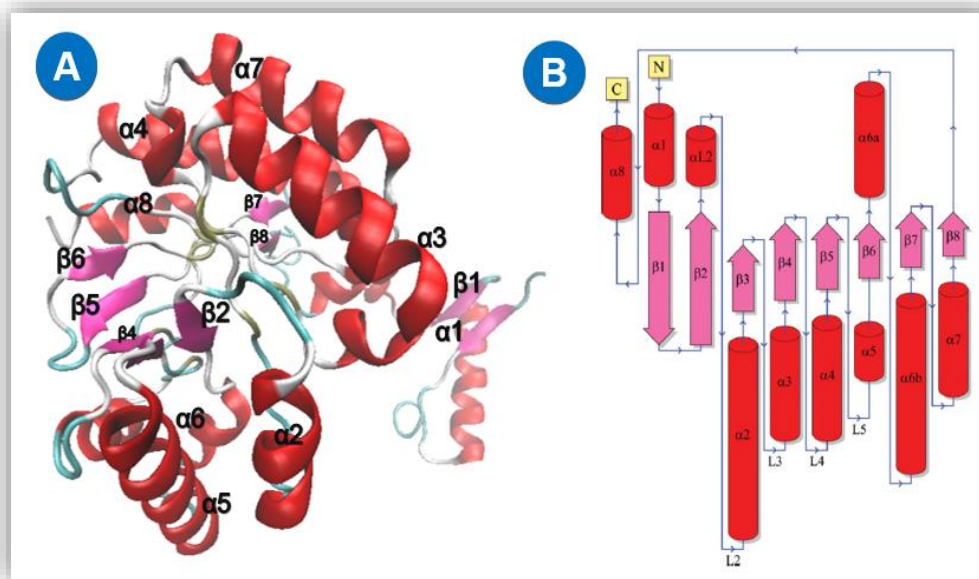


Figura 11.- Modelo de estructuras secundarias (A) Modelo de la estructura 3D del dominio EAL, representación elaborada en Visual Molecular Dynamics (Humphrey *et al.*, 1996). (B) Representación topográfica de la estructura secundaria de un dominio EAL (Tarnawski *et al.*, 2013).

Una vez analizadas las estructuras conformacionales de los dominios GGDEF-EAL de manera individual, se consideró examinar ambos dominios (Figura 12A) de color rosa se anotó el dominio EAL y de color amarillo el dominio GGDEF, que permitiera definir mejor su estructura y comprobar los estudios *in silico* precedentes, y así predecir si la proteína híbrida según el modelaje sería funcional.

Por consiguiente, la base de datos reconoció la plantilla de la proteína híbrida MorA de *P. aeruginosa* (Phippen *et al.*, 2014), con un porcentaje de 38.7% de identidad, TM-score: 0.930, RMSD: 1.57 similar al modelo propuesto, con la resolución de 2.85 Å de la estructura cristalográfica (figura 12B), en la cual se muestra un monómero con dominios GGDEF-EAL, de color azul el dominio EAL y de color rojo el dominio GGDEF, al visualizar en Chimera la superposición de ambas proteínas, muestra que el dominio PDE adquiere la misma conformación estructural con respecto al dominio EAL de MorA, mientras que el dominio DGC en estudio no adquirió la conformación del dominio GGDEF conservado de la plantilla.

Este análisis confirma el dato observado en los alineamientos obtenidos en el análisis Clustal omega (Ver Fig. 6); predice que el motivo GGDEF está degenerado, correspondiente al sitio activo A1, así como al de inhibición, por lo tanto, estos motivos generan un modelo estructural diferente (figura 12 C).

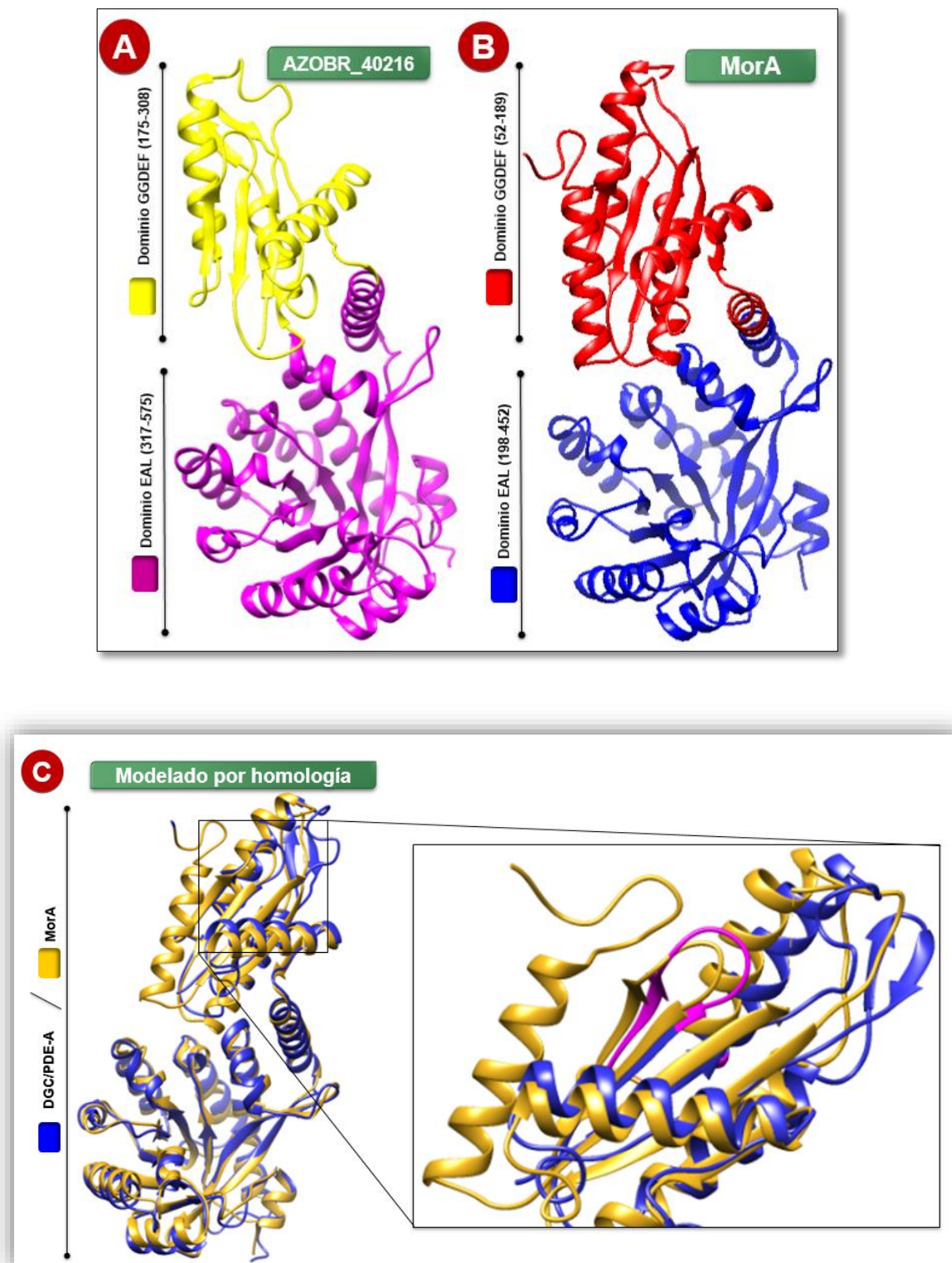
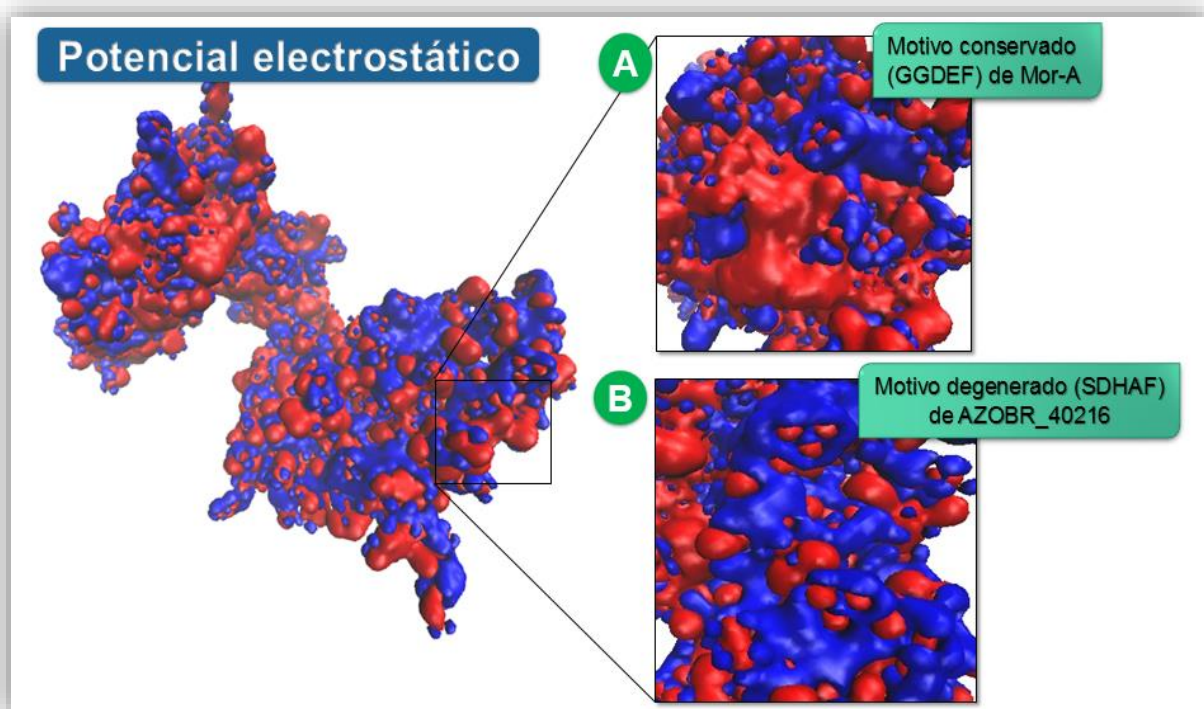


Figura 12.- Modelos de estructuras 3D de dominios en tándem (A) Modelos 3D de dominios GGDEF-EAL de la proteína en estudio, (B) Modelo 3D de proteína MorA, (C) Superposición de dominios GGDEF-EAL en tándem (color azul: AZOBR_40216 y dorado: MorA). Representaciones elaboradas en Visual Molecular Dynamics y Chimera (Humphrey *et al.*, 1996; Pettersen *et al.*, 2004)

Al advertir la diferencia en la conformación del dominio GGDEF degenerado con respecto a un dominio conservado, proseguimos a visualizar *in silico* en el programa VMD (Humphrey *et al.*, 1996), un análisis que estima las cargas de la estructura de la proteína, es decir determinar el “potencial electrostático”, en la Figura 13 se indica el monómero de los dominios GGDEF–EAL con dos colores diferentes, el rojo representa las cargas negativas y el azul representa cargas positivas.

Con estos datos se decidió, investigar y se comparó la carga los sitios activos de los dominios DGC, localizando que en el sitio activo de un dominio conservado de la proteína MorA está cargado negativamente (Figura 12A), contrario al dominio degenerado en estudio que se encuentra cargado positivamente (Figura



12B), lo cual nos permite inferir que el dominio podría ser inactivo.

Figura 13.- Representación de potencial electrostático en el sitio activo (GGDEF), color rojo (carga negativa) y color azul (carga positiva) (A) Potencial electrostático del motivo conservado de la proteína MorA, (B) Potencial electrostático del motivo degenerado de la proteína en estudio, representación elaborada en Visual Molecular Dynamics (Humphrey *et al.*, 1996).

Los análisis realizados tanto bioinformáticos como de estructura; así como los datos aportado en la literatura (Phippen *et al.*, 2014), nos permite inferir que los dominios no actúan como monómeros.

Por lo que, continuamos con la investigación estructural de la probable formación del dímero de los dominios, en el programa Chimera (Pettersen *et al.*, 2004), observando que los monómeros del dominio DGC en la proteína en estudio no se enlazan.

Mientras que en el dominio PDE, el estudio es sugerente de la formación de un dímero (Figura 14A), debido a el motivo conservado denominado lazo 6 (“loop 6”), indicado en color azul, mismo que permite que se lleve a cabo esta conformación de la proteína (Phippen *et al.*, 2014), en la figura 14 B se aprecia el sitio activo en color verde y el lazo 6 en color azul, en los cuales se logra observar el di-GMPc que interactúa con 21 aminoácidos aproximadamente, del dominio EAL.

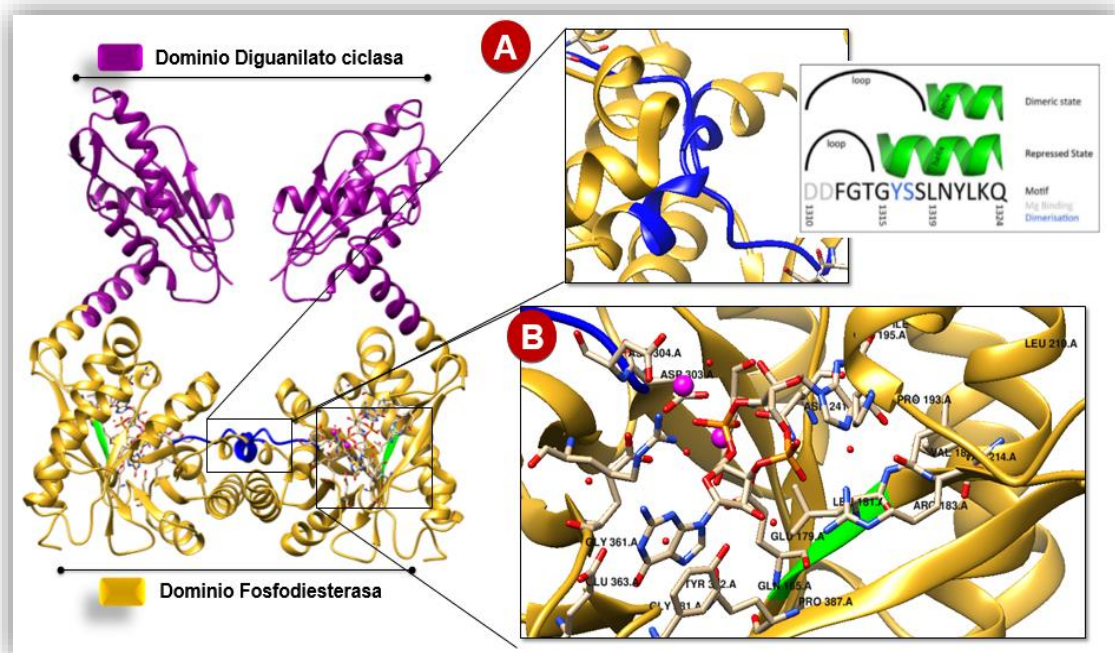


Figura 14-. Dímero de dominios GGDEF-EAL de la proteína en estudio, (A) Representación e interpretación del lazo 6 en color azul. (B) Interacción de molécula de di-GMPc en el sitio activo en color verde y el lazo en 6 color azul, representación elaborada en Chimera (Pettersen *et al.*, 2004).

Datos experimentales

Amplificación de gen de interés

Por PCR se amplificó el gen de interés en las condiciones ya mencionadas anteriormente, de un tamaño de ≈ 1.7 kb como se muestra en la figura 15.

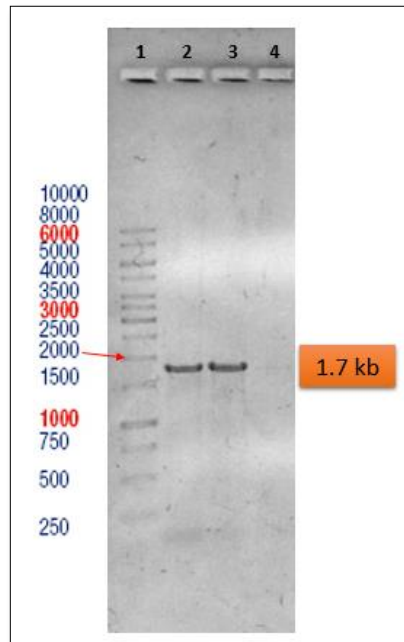


Figura 15.- Producto de PCR del gen AZOBR_40216. Carril 1: marcador, carril 2 y 3: Productos de PCR del gen de interés y carril 4: control negativo (sin DNA).

Verificación de construcción de clonas

Se procedió a clonar el producto de PCR en el vector pGEM T-easy, posteriormente se subclonó en el vector de expresión pGEX 4T1, obteniendo los siguientes resultados comprobatorios como se muestra en la Figura 16. Se observa en el carril 2 y 3 el amplificado de las clonas 1 y 4, que corresponden a un tamaño de 6.7 kb. Mientras que, en los siguientes carriles se usaron las enzimas de restricción *EcoRI* y *XhoI*, que nos permitieron comprobar la construcción adecuada del gen y el plásmido para la obtención de clonas, así proseguir en la transformación en células de *E. coli* BL21, para posteriormente, realizar la expresión de la proteína recombinante.

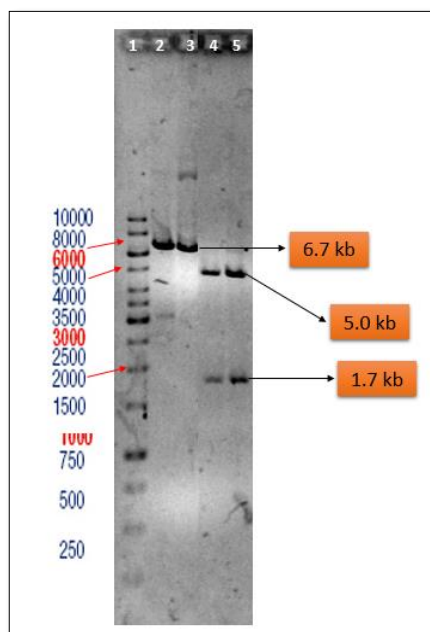


Figura 16.- Perfil de restricción de clonas de interés.
Carril 1: marcador, carril 2 y 3: Productos de PCR de construcciones de clonas 1 y 4, carril 4 y 5: cortes de restricción por *EcoRI* y *XhoI*.

Inducción de la proteína en estudio

Al obtener los resultados anteriores, se prosiguió a evaluar las clonas 1 y 4, demostrando inducción en ambas construcciones, como se observa en la Figura 17, en el carril 1 (marcador para proteínas), carril 2 un control negativo de una clona sin inductor. Mientras que, en los carriles 3 y 4 la expresión de las clonas que presentan un tamaño ≈ 83 KDa, muestran una inducción de 4 h, incubadas a 37°C , a una concentración de 0.1 mM de IPTG.

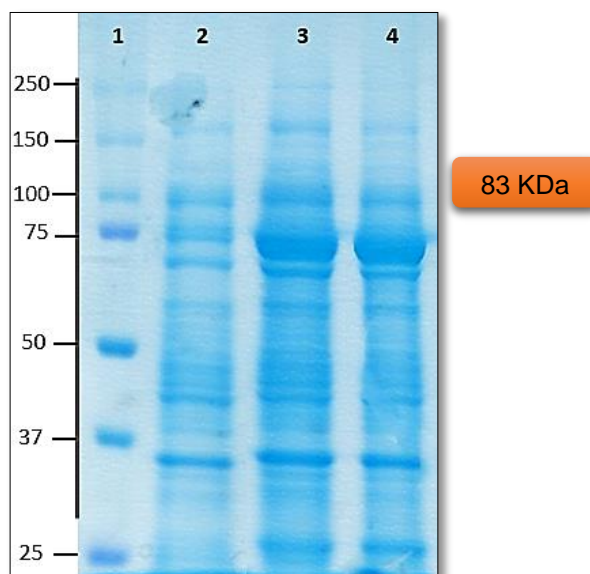


Figura 17.- Expresión la proteína híbrida (AZOBR_40216).
Carril 1: marcador, carril 2: control negativo (sin IPTG), carril 3 y 4: Expresión de la proteína de las clonas 1 y 4.

Purificación de la proteína

- **Cromatografía de afinidad-Glutation S transferasa**

Para la obtención de proteína soluble se realizaron ensayos variando diferentes parámetros como: temperatura, concentración de IPTG, tiempo de inducción, alcanzando las condiciones óptimas.

Proseguir con la purificación de la proteína por el método de cromatografía de afinidad a Glutation, como se constata en la Figura 18, se presenta la inducción de la proteína, la muestra no absorbida (la que no tiene afinidad al glutation) y el ultimo lavado (carril 1, 2, 3), y a partir del carril 5 al 19 se presenta las eluciones de la proteína purificada y en el carril 20 se muestra la resina final (después eluir las muestras).

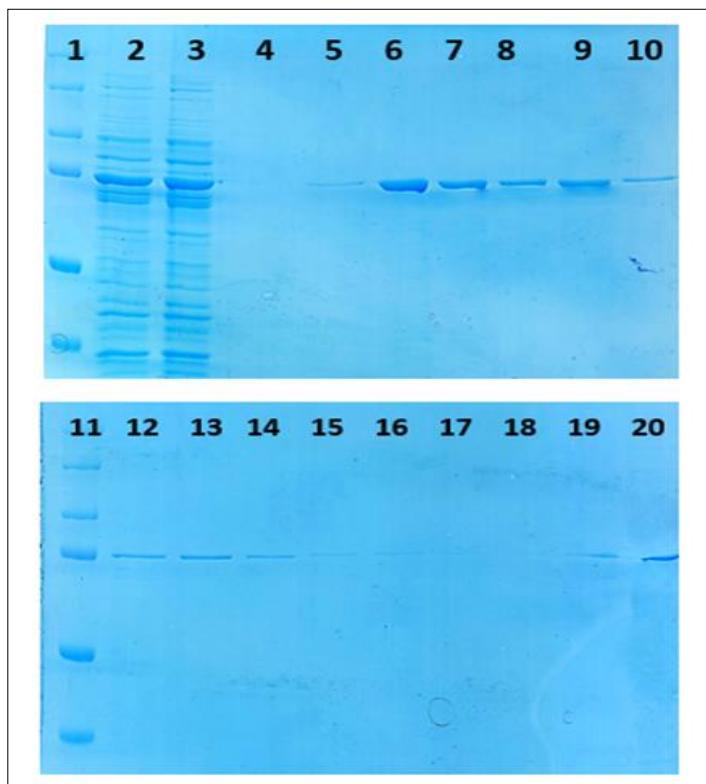


Figura 18.- Purificación de la proteína recombinante de interés.

Carril 1: marcador, carril 2: inducción de la proteína, carril 3: no absorbido (proteína que no se une a la resina), carril 4: ultimo lavado, carril 5: elución 1, carril 6: elución 3, carril 7: elución 6, carril 8: elución 9, carril 9: elución 11, carril 10: elución 12, carril 11: marcador, carril 12: elución 13, carril 13: elución 14, carril 14: elución 15, carril 15: elución 16, carril 16: elución 17, carril 17: elución 18, carril 18: elución 19, carril 19: elución 20, carril 20: resina final.

- **Concentración de la proteína purificada**

Para retirar el glutatión reducido que se utilizó para eluir la proteína, se dializó, y posteriormente se concentró la proteína y finalmente realizar los ensayos enzimáticos Figura 19.

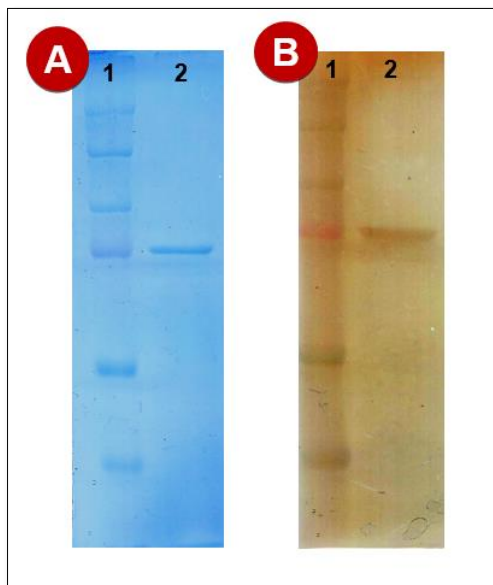


Figura 19.- Proteína purificada concentrada. (A) Gel de SDS-PAGE (1.5 μ g), (B) Gel con tinción de plata (1.5 μ g).

Para identificar y comprobar de manera específica, que es la proteína de interés que está unida a una etiqueta de GST se procedió a realizar western blot con anticuerpos específicos (Anticuerpo primario 1:5000 anti-GST y un anticuerpo secundario 1:3000 Anti-IgG (H+L), conjugado HRP).

La figura 20, nos permitió observar que se tenía la proteína de interés, debido al revelado de la banda, en el tamaño esperado de la proteína de interés.

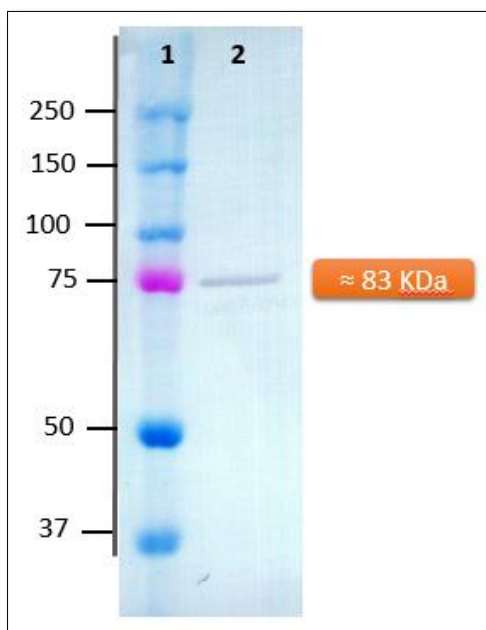


Figura 20.- Western blot de proteína recombinante.
Carril 1: marcador, carril 2: western blot de la proteína

Actividad de Fosfodiesterasa

Con el reactivo bis-p-NPP se evaluó la actividad de PDE de acuerdo a Phippen *et al.* (2014), modificando la concentración de proteína y se aprecia que la proteína tiene actividad de PDE.

Ya que, al obtenerse el producto de la reacción, se genera la coloración que corresponde al producto generado en la reacción, el orto nitro fenol (tubo 2); como se muestra en la Figura 21, tomando en cuenta los controles (tubo 1 y 3).

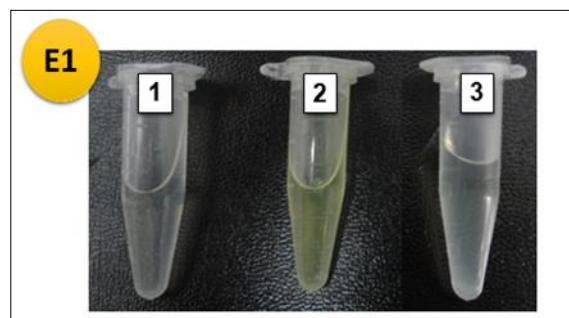
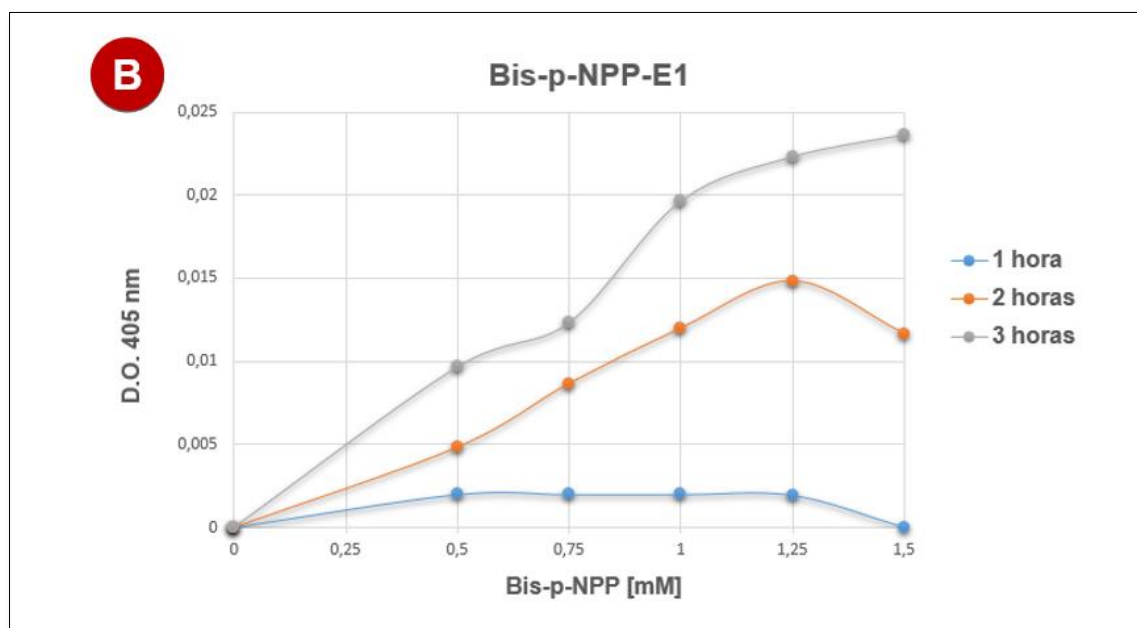
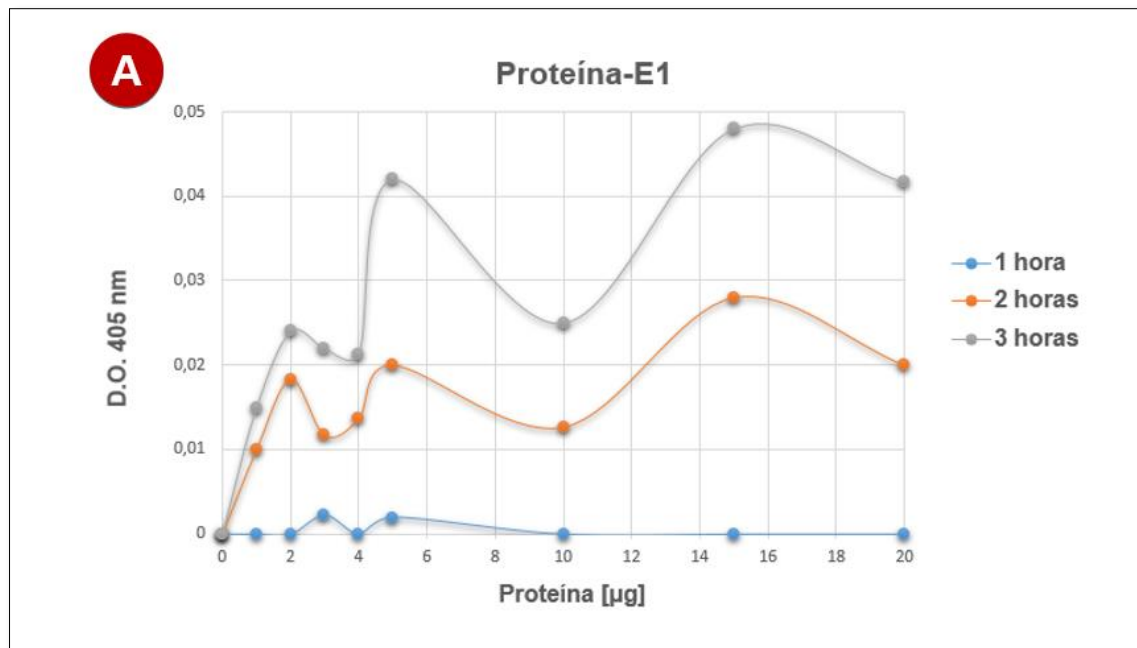


Figura 21.- Reacción de Bis-p-NPP.

Tubo 1: Control negativo (proteína hervida), tubo 2: reacción con proteína purificada, tubo 3: reacción con GST.

En vista de que la proteína recombinante obtenida mostró actividad fue pertinente buscar los parámetros de la reacción, que permitieran obtener las condiciones óptimas de actividad considerando: concentración de proteína, sustrato (Bis-p-NPP), cofactor ($MgCl_2$), pH y tiempo, Figura 22. Por lo tanto, se demostró que la cantidad de proteína para la actividad es a partir $5 \mu g$ después de 2 y 3 horas (Figura 22-A). Mientras que, la cantidad óptima de sustrato es de 1.5 mM (Figura 22-B).

En la Figura 22C, se expone que 1 mM es la cantidad óptima de cofactor para la reacción, ya que a diferentes tiempos, es el punto de mayor reacción y en la Figura 22D se observa la evaluación del parámetro pH, demostrando que en los tres diferentes tiempos la reacción se mantiene adecuadamente en un pH 8.



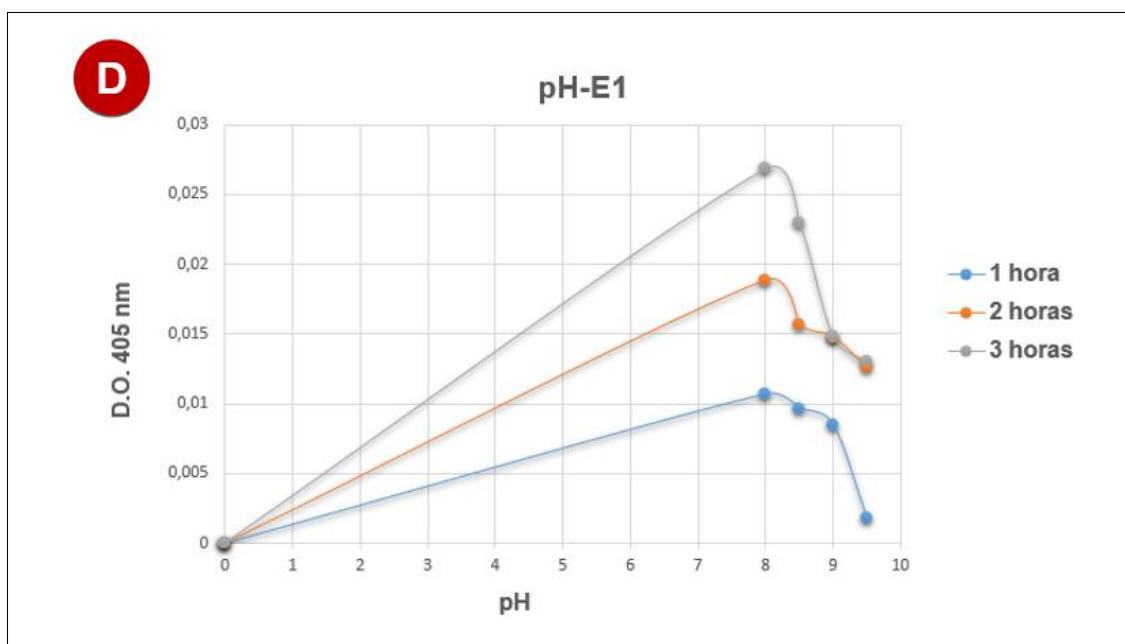
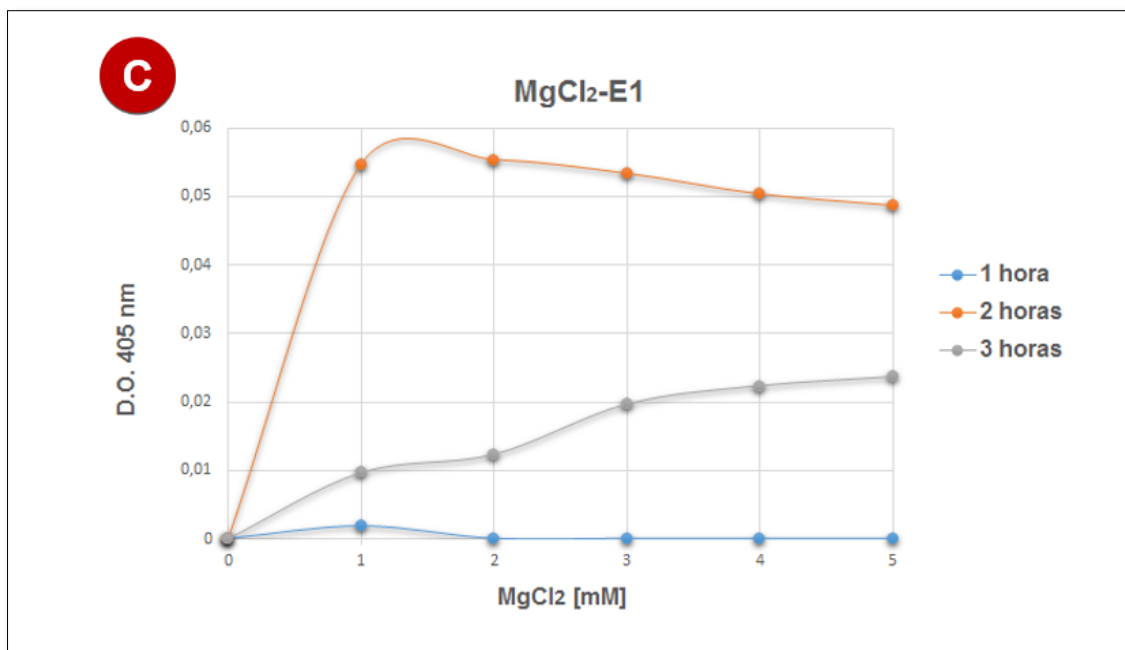


Figura 22.- Gráficas de evaluación de parámetros de reacción. (A) Gráfica de estandarización de concentración de proteína, (B) Gráfica de estandarización de sustrato, (C) Gráfica de estandarización de cofactor, (D) Gráfica de estandarización de pH.

Las condiciones de buffer de reacción fueron las siguientes: 1.5 mM Bis-p-NPP y 1 mM MgCl₂ en Tris-HCl, pH: 8; con 5 µg de proteína, durante 3 h.

Ya que la proteína presenta un dominio PAS/PAC se decidió evaluar a dos moléculas (FAD y GTP), que eventualmente modularan la actividad de la PDE, (Figura 23).

La concentración de 3 μM de FAD en la reacción después de 3 h, se observa un aumento (0,0775) como se observa en la figura 23-A, tres veces más con respecto a la reacción óptima y sin FAD, como se muestra Figura 22D, durante tres hrs con un pH: 8 (0,026), y cuando se agregó GTP 50 μM a la reacción, aumentó aproximadamente el doble (0,0415).

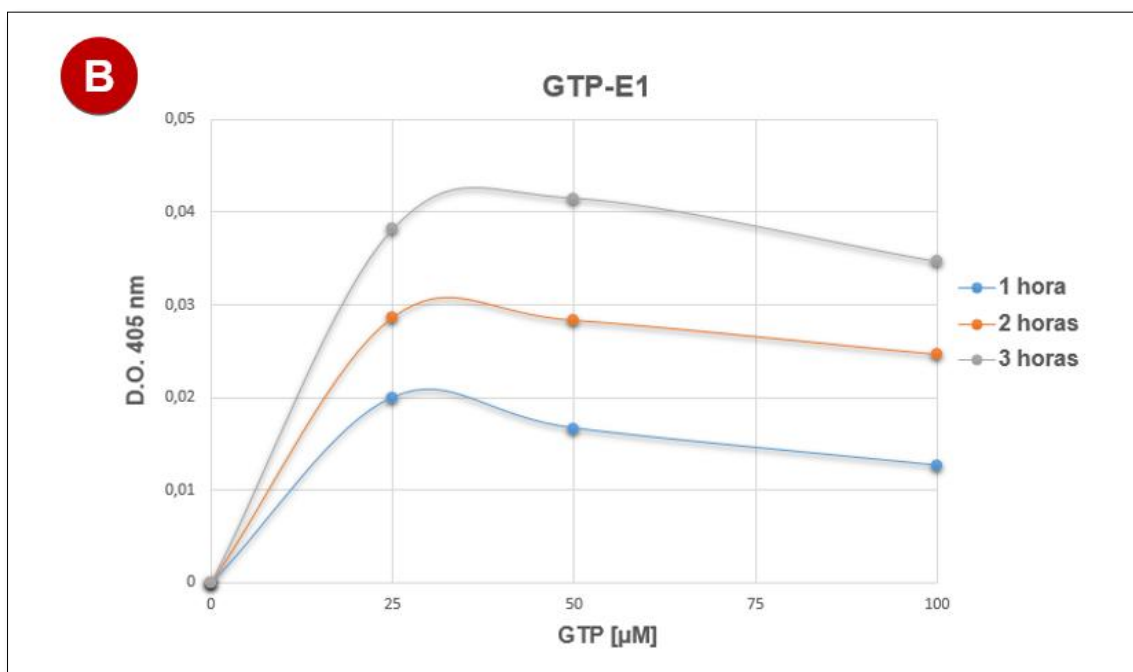
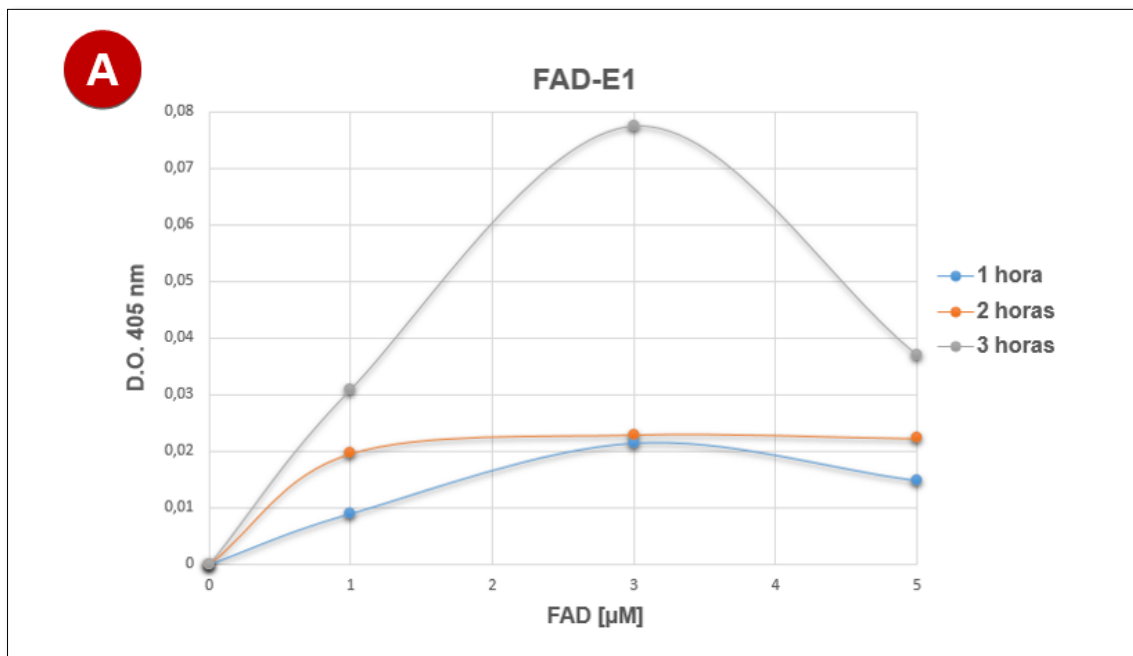


Figura 23.- Gráficas de ensayos de reacción de PDE con FAD y GTP. (A) Evaluación con FAD, (B) Evaluación con GTP.

Ya que se presentan en la proteína dos dominios PAS/PAC se consideró incluir en la mezcla de reacción ambos cofactores bajo las condiciones previamente estandarizadas. Revelando que no hay algún aumento significativo al agregar ambas moléculas, ya que en la concentración 5 μg de proteína se obtiene 0.0716 después de 3 horas, siendo una cantidad similar al agregar FAD, mientras tanto al aumentar la cantidad de proteína, simplemente es proporcional a la cantidad de proteína (Figura 24).

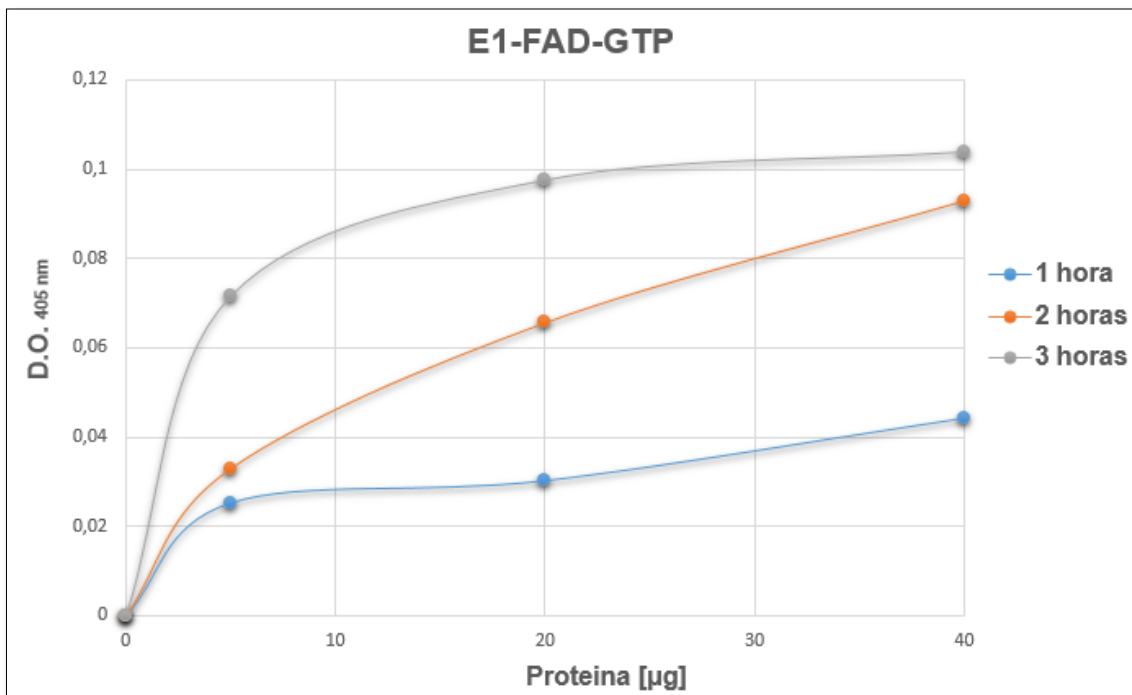


Figura 24.- Gráficas de evaluación de FAD y GTP en la misma reacción de PDE.

Por lo tanto, estos datos mencionados anteriormente, se resumieron en una gráfica, que permitieron determinar la actividad de fosfodiesterasa, como se muestra en la figura 25, y posteriormente estos valores (absorbancia) se interpolaron en una curva de p-nitrofenol con diferentes concentraciones (figura 26-A), debido a que el producto de la reacción enzimática es de p-nitrofenol y con ello se obtuvo la unidad de Actividad enzimática de cada reacción (figura 26-C), demostrando que el cofactor FAD aumenta la actividad de la proteína, al comparar una reacción sin dicho cofactor.

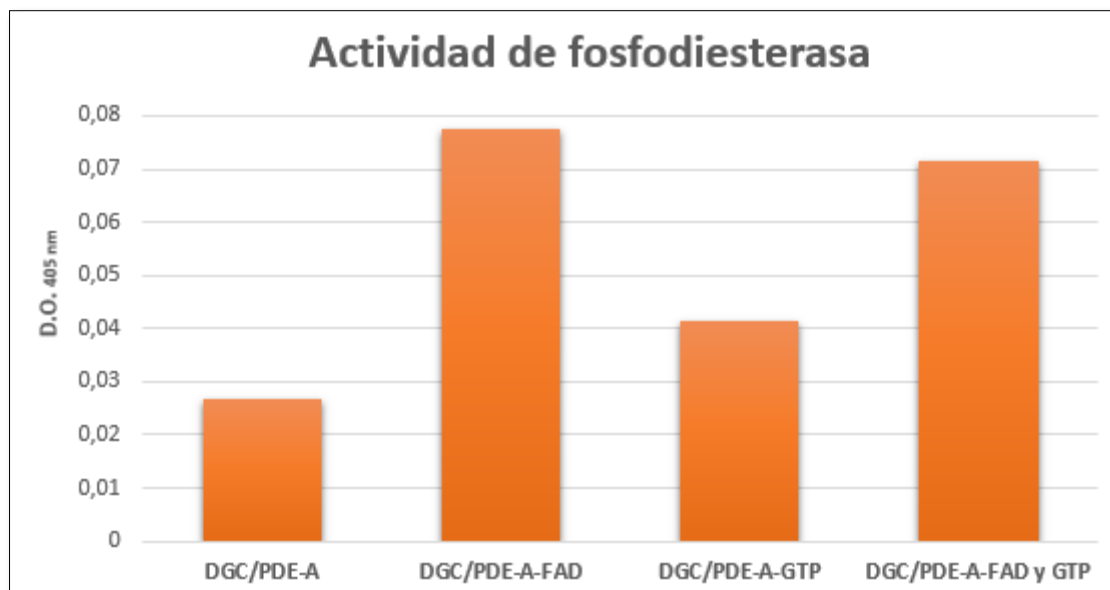
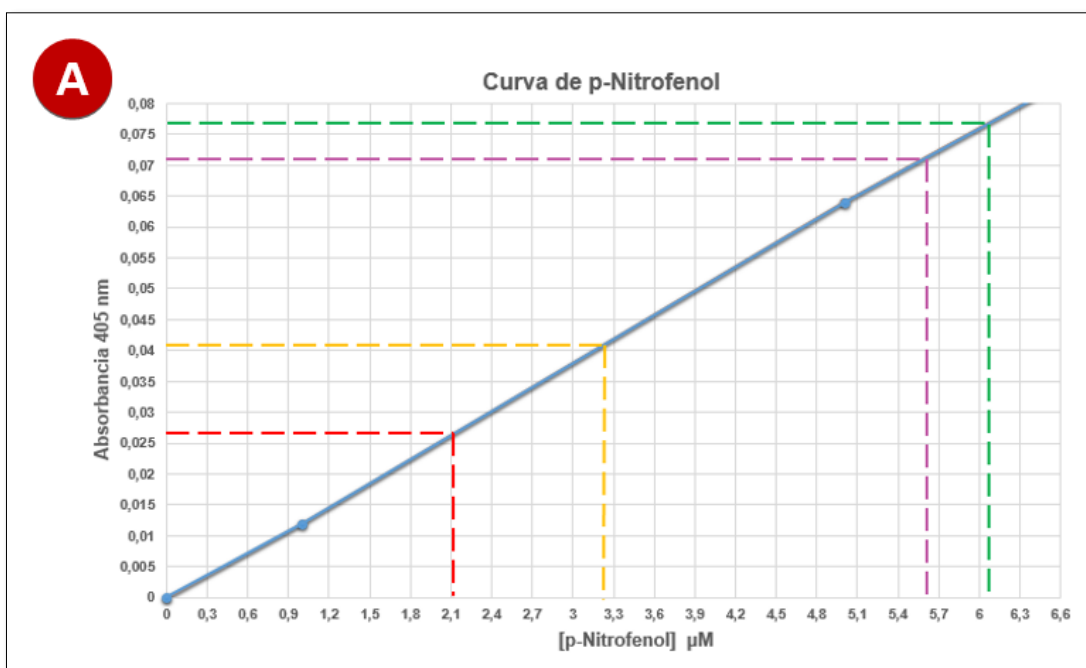


Figura 25.- Gráfica de actividad de fosfodiesterasa



B

$$[AE] = \frac{\Delta Abs}{\Delta t \cdot \epsilon \cdot l}$$

[AE]: Unidad de actividad enzimática (mol/min/L)= (U/L)
 ΔAbs : Variación de absorbancia
 Δt : Variación de tiempo (min)
 ϵ : Coeficiente de extinción molar (1/ M *cm) del producto
 l: 1 cm de sección de la cubeta

$$\epsilon = \frac{\Delta abs}{c \cdot l}$$

ϵ : Coeficiente de extinción molar (1/ M *cm) del producto
 ΔAbs : Variación de absorbancia
 c: Concentración (mol/L)
 l: 1 cm de sección de la cubeta

C

Reacción	Abs (405 nm)	μM	M (mol)	C-conc. (mol/L)	E-Coef. Ext. Molar (1/M*cm)	[AE] (nmoles)
Proteína	0,02683333	2,11	0,00000211	8,44E-08	317930,45	0.468
Proteína-FAD	0,0775	6,05	0,00000605	0,000000242	320247,934	1.344
Proteína-GTP	0,0415	3,23	0,00000323	1,292E-07	321207,43	0.717
Proteína-FAD y GTP	0,07166667	5,61	0,00000561	2,244E-07	319370,187	1.246

Figura 26.- Resultados de unidades de actividad enzimática de cada reacción. (A) Gráfica de interpolación de valores en curva de p-nitrofenol, (B) Ecuaciones para la unidad de actividad enzimática y para coeficiente de extinción molar, (C) Tabla de resultados de actividad enzimática.

Actividad de Diguanilato ciclasa

Se realizaron los ensayos enzimáticos incubando durante 3 h a 30°C con el sustrato GTP marcado radiactivamente, usando 5 μg de la proteína purificada. También se realizaron otras reacciones que nos sirvieron de control, como se demuestra en la figura 27, se usó como control negativo a la proteína desnaturalizada y como control positivo, la Diguanilato ciclasa activa-DgcA (Ramírez *et al.*, 2016).

Por lo tanto, se logró observar la síntesis de di-GMPc en la reacción de la proteína DgcA, mientras que en la proteína de estudio no se percibe ninguna marca correspondiente al di-GMPc.

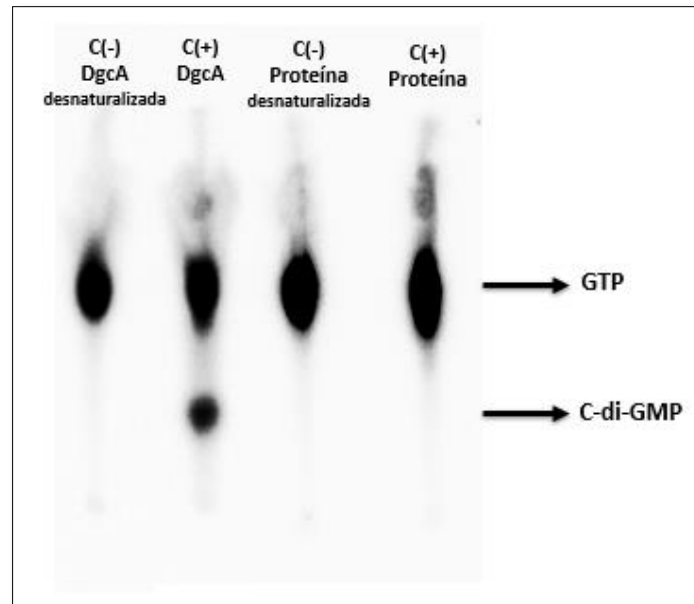


Figura 27.- Actividad de diguanilato ciclasa en TLC

DISCUSIÓN

En este proyecto se caracterizó un gen (AZOBR_40216) de *A. brasilense* Sp 245, el cual codifica a una proteína híbrida, contiene una estructura con tres dominios: un dominio sensor PAS-PAC, un dominio DGC (diguanylato ciclasa) y un dominio PDE (fosfodiesterasa), Gomelsky y Hoff en el 2011 mencionan que este tipo de proteínas se han localizado en otras comunidades bacterianas, y que están implicadas en la síntesis e hidrólisis del di-GMPc. Mientras que, el dominio de señalización, tiene la función de producir una variedad de respuestas, incluyendo cambios en la expresión de los genes o niveles de segundos mensajeros y modificación de proteínas.

El análisis bioinformático con varios algoritmos permitió contar con información útil relevante, que nos proporcionó datos para predecir la función de la proteína, a partir de la secuencia de aminoácidos por medio alineamientos hasta el desarrollo de modelos de estructuras 3D de cada dominio proteico.

La estructura secundaria del dominio PAS se comparó con una representación topográfica de Amezcua *et al.* (2002) que hace referencia de rasgos importantes estructuralmente, como un asa compuesta por cuatro alfa hélices ($C\alpha$, $D\alpha$, $E\alpha$ y $F\alpha$), secuencia proteica (de cuatro alfa hélices) que se encuentra conservada en los microorganismos como *Bradyrhizobium japonicum* y *Sinorhizobium meliloti*, que toman un importante papel en la estabilidad del dominio, adjudicándole flexibilidad y estabilidad.

Al analizar la estructura 3D de dominio PAS, se infiere que adopta una conformación semejante a la proteína NifL de *Azotobacter vinelandii* (Key *et al.* 2007), además que en el sitio de unión a ligando se logró observar una interacción con una molécula de FMN, que corresponde al grupo 4 y 5, según la clasificación de Henry y Crosson (2011); que agrupa 8 tipos de dominios PAS, de los cuales, el 3 percibe luz visible que enlaza flavina, el 4 está implicado en la regulación energética celular detección de iones redox y unión a FAD.

Por lo que, propondríamos que el dominio PAS-PAC presente en la proteína híbrida estudiada pertenecería al tipo 4.

Se examinó la estructura secundaria del dominio GGDEF comparando a la del modelo TdgC de *Thermotoga maritima* (Deepthi *et al.*, 2014), DGC con una estructura general del monómero: una β -plegada central ($\beta 2$ - $\beta 3$ - $\beta 1$ - $\beta 6$), rodeado por cinco alfa-hélices.

El análisis de la Fig. 10 sugería que se tenía un dominio DGC, se procedió a evaluar su conformación, para inferir su probable actividad enzimática, por lo tanto se analizó la semejanza con el dominio DGC conservado y activo de MorA de *P. aeruginosa* (Phippen *et al.*, 2014), evidenciando diferencias conformacionales en el sitio activo de la proteína, por lo tanto se procedió a examinar las cargas del conjunto del dominio GGDEF, con respecto a MorA se

observó mayor cantidad de cargas negativas, a diferencia del dominio GGDEF degenerado en estudio que tenía mayor cantidad de cargas positivas.

Es posible que este cambio de carga confiera una diferencia de afinidad por el sustrato GTP, lo cual propiciaría que el dominio careciera de actividad enzimática.

Por último, el análisis bioinformático de la estructura del dominio EAL, se comparó con la proteína Dos de *E. coli* (Tarnawski *et al.*, 2013) y con MorA de *P. aeruginosa* (Phippen *et al.*, 2014) indicando una similitud en su estructura y conformación de barril (β/α)₈ de la TIM (Triosafosfato isomerasa), donde α -hélices están unidas a β 1 y β 2 plegadas y éstas se conectan a una horquilla (β -central).

También se analizó el sitio de unión a ligando, la interacción fue con la molécula del di-GMPc, además el modelo sugiere que la proteína es capaz de formar el dímero por medio del sitio denominado lazo 6, como mostraron Rao *et al.* (2008).

Además se confirmó que el motivo conservado en el dominio EAL se ubicó entre las β 5 y α 6, está constituido por los aminoácidos DDFGTGYSSL. Se ha establecido que los residuos DD tienen la función de estabilizar la interacción con el metal usado como cofactor mostrado por Rao *et al.* (2009).

En efecto, el estudios recientes realizados por Phippen *et al.* (2014) demostraron que al realizar una mutación de este motivo en la proteína MorA de *P. aeruginosa* cambiando los dos ácidos aspártico por asparaginas, se afecta la actividad de fosfodiesterasa, aunque esté conservado el motivo EAL.

Las predicciones aportadas del análisis bioinformático sugieren que la proteína híbrida de *A. brasilense* Sp245 codificada por el gen AZOBR_40216), apuntan a que funcionaría como PDE, careciendo de actividad de DGC, y para confirmar dichos datos, se realizó ensayos experimentales para sustentar dicha información.

Con este fin el gen se clono en un vector de expresión pGEX 4T1, generando una fusión traduccional con la proteína Glutation S Transferasa (GST), obteniendo clonas que sobreexpresan la proteína en la cepa de *E. coli* BL21.

Este vector fue empleado ya que con el vector de expresión pET6XHN, no fue exitosa la expresión de la proteína, concluyendo como en el caso de Ryjenkov *et al.* (2005), dichos autores clonaron el gen de una proteína con dominio DGC, en el vector pET23a y no lograron obtener expresión y concluyeron que la proteína resulta tóxica para *E. coli*.

Por lo tanto, se decidió utilizar un vector que incluyera una etiqueta que actuara como chaperona, para proteger a la proteína de la degradación, para alcanzar mayor solubilidad y para propiciar el plegamiento de la proteína.

Una vez obtenida la expresión como se muestra en la figura 17 y la purificación (figura 19), se procedió a establecer los parámetros de condiciones óptimas de actividad que fueron 5 µg de proteína, 1.5 mM de sustrato, 2 mM de MgCl₂, 3 µM de FAD, 50 µM de GTP en un pH: 8.0, durante 3 h de reacción, figuras 22 y 23, con las cuales se continuo ensayando cada una de las actividades.

En el ensayo de la actividad de la PDE empleando como sustrato el bis-*p*-nitrofenil fosfato (bis-*p*NPP), no fisiológico, se detectó actividad.

Por lo tanto, se efectuaron cuatro diferentes reacciones: una reacción sin cofactor, con los ligados FAD, GTP y una última con ambos cofactores, observando una diferencia, al agregar FAD hay un aumento en las unidades de enzima con respecto a la reacción sin cofactor, esto podría ser similar al caso de Tarnawski *et al.* (2013) con la proteína DosP de *E.coli*, que tiene un dominio PAS y un dominio fosfodiesterasa, donde el dominio PAS monitorea el estado redox de la célula a través de la unión a algún cofactor como es el FAD y esto modula la actividad de la PDE.

Mientras que, al agregar GTP no se logró observar un aumento.

En el ensayo de diguanilato ciclasa se utilizó GTP marcado radiactivamente y fue revelado por cromatografía de capa fina, y no se logró observó actividad enzimática, incorporando como control positivo de actividad de DGC a CdgA (Ramírez *et al.*, 2016).

Es posible que la etiqueta de GST afecte la actividad al impedir que la proteína forme el dímero. Por lo que será necesario repetir este ensayo para definir inequívocamente, que está desprovista de actividad de DGC.

CONCLUSIONES

- La proteína híbrida mostró actividad de PDE únicamente.
- El cofactor FAD está participando en la actividad PDE de la proteína y se infiere que está modulando la actividad enzimática a través del dominio PAS de la proteína.

PERSPECTIVAS

- Realizar el ensayo con trombina para eliminar la etiqueta de GST de la proteína híbrida.
- Realizar en ensayos de actividad con los dominios por separados.
- Realizar ensayos enzimáticos con el sustrato bis-pNpp y el cofactor FAD para obtener parámetros cinéticos, y evaluar la afinidad de la proteína por el sustrato.
- Caracterizar en que función está involucrada esta proteína.

REFERENCIAS

1. Alexandre G., Greer S., Zhulin I. 2000. Energy Taxis Is the Dominant Behavior in *Azospirillum brasilense*. J. bacteriol. p. 6042–6048.
2. Amezcua C. A., Harper S. M., Rutter J., and Gardner K. H. 2002. Structure and interactions of PAS kinase N-terminal PAS domain: model for intramolecular kinase regulation. Cell press .p.1349–1361.
3. Baca B., Xiqui M. 2010. Nuevo sistema de señalización en bacterias mediado por el (3'5') guanosín-monofosfato-cíclico (di-gmpc). Redalyc, p.21-29.
4. Baldani V. L. D., Alvarez U. A. B., Baldani J. I., and Döbereiner, J. 1986. Establishment of inoculated *Azospirillum* spp. in the rhizosphere and in roots of field grown wheat and sorghum. Plant Soil 90:35-46.
5. Ben D. S., Cahill M., Stackebrandt E., Sly L. 1997. Transfer of *Conglomeromonas largomobilis* sub sp. *largomobilis* to the genus *Azospirillum* as *Azospirillum largimobile* comb. nov., and elevation of *Conglomeromonas largomobilis* sub sp. *parooensis* to the new type species of *Conglomeromonas*, *Conglomeromonas parooensis* sp. nov. Syst. Appl. Microbiol.p. 20: 72-77.
6. Bethesda Research Laboratories. 1986. BRL pUC host: *E. coli* DH5 α competent cells. Focus 8(2):9.
7. Cardon Z.G., Whitbeck J.L. 2007. The Rhizosphere - An Ecological Perspective. Academic Press, San Diego, CA. p. 31-56.
8. Chen M. W., Kotaka M., Vornrhein C., Bricogne G., Rao F., Chuah M. L., Svergun D., Schneider G., Liang Z. X., and Lescar J. 2012. Structural insights into the regulatory mechanism of the response regulator RocR from *Pseudomonas aeruginosa* in cyclic Di-GMP signaling. J. Bacteriol. p.194:4837–4846.
9. Christen M, Christen B, Folcher M, Schauerte A, Jenal U. 2005. Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. J. Biol. Chem. p.280: 30829–30837.
10. De Zelicourt A., Al-Yousif M., Hirt H. 2013. Rhizosphere Microbes as Essential Partners for Plant Stress Tolerance. Mol. Plant. P. 6:242-45.
11. Deepthi A., Liew C. W., Liang Z. X., Swaminathan K. & Lescar J. 2014. Structure of a Diguanylate Cyclase from *Thermotoga maritima*: Insights into Activation, Feedback Inhibition and Thermostability. PloS one 9, e110912.
12. Eckert B., Weber O.B., Kirchhof G., Halbritter A., Stoffels M., Hartmann A. 2001. *Azospirillum doebereineriae* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium associated with the C4-grass Miscanthus. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. p. 51: 17-26.
13. Galperin, M., N. Nikolskaya, and E. Koonin. 2001(A). Novel domains of the prokaryotic twocomponent signal transduction systems. FEMS Microbiol.p.203:11-21.

14. Galperin, M., T. Gaidenko, A. Mulkidjanian, M. Nakano, and C. Price. 2001(B). MHYT, a new integral membrane sensor domain. *FEMS Microbiol Lett.* p. 205:17-23.
15. Gilles-Gonzalez, MA. 2001. Oxygen signal transduction. *IUBMB Life* .p.51:165-173.
16. Gomelsky M, Hoff WD. 2011. Light helps bacteria make important lifestyle decisions. *Trends Microbiol.* p.19:441– 448.
17. Gunarto I., Adachi K., Senboku T. 1999. Isolation and selection of indigenous *Azospirillum* spp. from a subtropical island and effect of inoculation on growth of lowland rice under several levels of N application. *Biol. Fertil. Soils.* p. 28: 129-135.
18. Hadas R., Okon Y. 1987. Effect of *Azospirillum brasilense* inoculation on root morphology and respiration in tomato seedlings. *Biol. Fertil. Soils.* p.5: 241-247.
19. Hecht GB, Newton A. 1995. Identification of a novel response regulator required for the swarmer-to-stalked-cell transition in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* p. 177:6223– 6229.
20. Henry J.T. and Crosson S. 2011. Ligand binding PAS domains in a genomic, cellular, and structural context. *Annu. Rev. Microbiol.* 65: 261-286.
21. Humphrey W. F., Dalke A., and Schulten K. 1996. VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Mol. Graphics*, 14, 33-38.
22. Iyer L.M., Anantharaman V., Aravind L. 2003. Ancient conserved domains shared by animal soluble guanylyl cyclases and bacterial signaling proteins. *BMC Genomics* 4:5.
23. Kaelin W.G., Jr. Krek W., Sellers W.R., DeCaprio J.A., Ajchenbaum F., Fuchs C.S., Chittenden T., Li Y., Farnham P.J., Blunar M.A., Livingston D.M., and Flemington E.K. 1992. Expression cloning of a cDNA encoding a retinoblastoma-binding protein with E2F-like properties. *Cell* 70, 351-364.
24. Key J., Hefti M., Purcell E.B., Moffat K. 2007. Structure of the Redox Sensor Domain of *Azotobacter vinelandii* NifL at Atomic Resolution: Signaling, Dimerization, and Mechanism. *Biochemistry.* p.46:3614–3623.
25. Khammas K. M., Ageron E., Grimont P., Kaiser P. 1989. *Azospirillum irakense* sp. nov., a nitrogen fixing bacterium associated with rice roots and rhizosphere soil. *Res. Microbiol.* p.140: 679–693.
26. Loh W.T, C. I. 1984. Intermediary Carbon Metabolism of *Azospirillum brasilense*. *J. bacteriol.* p. 264-268.
27. Magalhães F.M., Baldani J.I., Souto M., Kuykendall J.R., Dobereiner J. 1983. A new acid tolerant *Azospirillum* species. *Ann. Acad. Bras. Cienc.* p. 55: 417–430.
28. Malone J.G., Williams R., Christen M., Jenal U., Spiers A.J., Rainey P.B. 2007. The structure-function relationship of WspR, a *Pseudomonas fluorescens* response regulator with a GGDEF output domain. *Microbiology.* p. 153:980 –994.

29. McDougald D., Scott A. R., Nicolas B., Peter D. S., and Staffan K. 2012. Should We Stay or Should We Go: Mechanisms and Ecological Consequences for Biofilm Dispersal. *Nature R Microbiol.* p.10, 39-50.
30. Mehnaz S., Weselowski B., Lazarovits G. 2007. *Azospirillum zeae* sp. nov., a diazotrophic bacterium isolated from rhizosphere soil of *Zea mays*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* p.57:2805-2809.
31. Minjarez Saenz M. I. 2015. *Papel de la fosfodiesterasa putativa B de Azospirillum brasilense en la quimiotaxis.* (Tesis Maestría). Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas.
32. Peng G., Wang H., Zhang G., Hou W., Liu Y., Wang E.T., Tan Z. 2006. *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses grass. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* p.56: 1263-1271.
33. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. 2004. UCSF Chimera - A visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 25(13):1605–1612.
34. Phippen C.W., Mikolajek H., Schlaefli H.G., Keevil C.W., Webb J.S., Tews I. 2014. Formation and dimerization of the phosphodiesterase active site of the *Pseudomonas aeruginosa* MorA, a bi-functional c-di-GMP regulator. *FEBS.*p.588:4631-463.
35. Prigent C. Claire y Moëne L. Y. 2016. *Ecologie Micobiene, Lyon.*<http://www.ecologiemiobiennelyon.fr/spip.php?rubrique29&lang=fr>.
36. Ramírez M. A., López L. L. I., Xiqui V. Ma. L., Jijón M. S., Romero O. A., Baca B. E. 2016. The cyclic-di-GMP diguanylate cyclase CdgA has a role in biofilm formation and exopolysaccharide production in *Azospirillum brasilense*. *Research in Microbiology* 167:3, 190-201.
37. Rao F., Qi Y., Chong H.S., Kotaka M., Li B., Li J., Lescar J., Tang K., Liang Z.X. 2009. The functional role of a conserved loop in EAL domain-based cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase. *J Bacteriol.*191:4722–4731.
38. Rao F., Yang Y., Qi Y., Liang Z.X. 2008. Catalytic mechanism of cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase: a study of the EAL domain-containing RocR from *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 190:3622–3631.
39. Reinhold B., Hurek T., Fendrik I., Pot B., Gillis M., Kersters K., Thielemans S., De Ley J. 1987. *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). *Int. J. Syst. Bacteriol.*p. 37:43-51.
40. Römling U. 2009. Rationalizing the Evolution of EAL Domain-Based Cyclic di-GMP-Specific Phosphodiesterases. *J. Bacteriol.* 191:15 4697-4700.
41. Römling U. 2013. Cyclic di-GMP: the First 25 Years of a Universal Bacterial. *Microbiol. and Mol. Biology Reviews.* p.1-52.
42. Ryjenkov D.A., Tarutina M., Moskvina O.V., Gomelsky M. 2005. Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. *J Bacteriol.* 187:1792–1798.

43. Ryan Robert. 2013. Cyclic di-GMP signalling and the regulation of bacterial virulence. *Microbiology*.p.159: 1286–1297.
44. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. 1989. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. p. 1.74-1.84.
45. Shu, C., L. Ulrich, and I. Zhulin. 2003. The NIT domain: a predicted nitrate-responsive module in bacterial sensory receptors. *Trends Biochem Sci*.p. 28:121-124.
46. Spaepen S., Van Derleyden J., Okon Y. 2009. Plant growth-promoting actions of rhizobacteria. *Adv. Bot. Res*.p. 51:283–320.
47. Tarnawski M., Barends T. R., Hartmann E., Schlichting I. 2013. Structures of the catalytic EAL domain of the *Escherichia coli* direct oxygen sensor. *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr*. p.69, 1045–1053.
48. Tarrand J.J., Krieg N.R., Döbereiner J. 1978. A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group with descriptions of a new genus *Azospirillum* gen. nov. and two species *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Can. J. Microbiol*. p.24: 967-80.
49. Vacheron J., Desbrosses G., Bouffaud M., Bruno Touraine B., Yvan Moëgne Y., Muller D., Legendre I., Wisniewski-Dyé F. and Claire Prigent-Combaret C. 2013. *Plant growth-promoting rhizobacteria and root system functioning*. *Front Plant Sci*.p.4: 356.
50. Valentini M. y Filloux A. 2016. Biofilms and Cyclic di-GMP (c-di-GMP) Signaling: Lessons from *Pseudomonas aeruginosa* and Other Bacteria. *J. biol. Chemistry*. p.24:12547–12555.
51. Wood W.B. 1966. Host specificity of DNA produced by *Escherichia coli*: bacterial mutations affecting the restriction and modification of DNA. *J.Mol.Biol*. 16:118-133
52. Xie C.H., Yokota A. 2005. *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the roots of the rice plant *Oryza sativa*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. p.55: 1435-1438.
53. Young C.C., Hupfer H., Siering C., Ho M.J., Arun A.B., Lai W.A., Rekha P.D., Shen F.T., Hung M.H., Chen W.M., Yassin A.F. 2008. *Azospirillum rugosum* sp. nov., isolated from oil-contaminated soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*. p. 58: 959-963.
54. Zhulin I., A. Nikolskaya and M. Galperin. 2003. Common extracellular sensory domains in transmembrane receptors for diverse signal transduction pathways in bacteria and archaea. *J Bacteriol*. p.185:285-294.

ANEXOS

Preparación de medios de cultivo

- Medio Rojo congo

Reactivos	Cantidades para preparar 1 L
D.L. málico	5 g
Extracto de levadura	0.5 g
K ₂ HPO ₄	0.5 g
MgSO ₄ *7H ₂ O (10%)	2 mL
NaCl (10 %)	1mL
FeCl ₃	1.4 mL
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O (0.1%)	2 mL
Ajustar pH 6.8 con KOH	
Rojo congo	15 mL
Agar bacteriológico 1.5%	15 g

Esterilizar a 15 Lb durante 20 minutos.

- Medio Luria Bertani

Reactivos	Cantidades para preparar 1 L
Peptona de caseína	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Ajustar el pH a 7 con NaOH 10 N	
Agar bacteriológico 1.5 %	15 g

Esterilizar a 15 Lb durante 20 minutos.

- Medio K- malato

Reactivos	Cantidades para preparar 1 L
KH ₂ PO ₄	0.87 g
K ₂ H PO ₄	1.67 g
MgSO ₄	0.29 g
NaCl	0.48 g
Ácido Málico	4.5326 g
Ajustar pH 6.9 con KOH	
Agar bacteriológico 1.5 %	15 g

Esterilizar a 15 Lb durante 20 minutos.

Posteriormente, complementar el medio en condiciones de esterilidad, con las siguientes soluciones:

Soluciones	Cantidades para preparar 1 L
CaCl ₂ (0.7 %)	10 mL
FeCl ₃ (1.0 %)	1 mL
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O (0.5 %)	1 mL
NH ₄ Cl (20 %)	5 mL
Oligoelementos 10x	1 mL

Preparación de soluciones para ADN

- **TAE 50X (solución stock)**

Para 50 ml de solución:

Disolver poco a poco 12.1 g de Tris y 0.93 g de EDTA en 25 ml de agua bidestilada, colocar la solución en un medidor de pH y agregar ácido acético concentrado (aprox. 4 ml) hasta ajustar el pH a 8.0. Aforar a 50 ml con agua bidestilada.

Esterilizar a 15 lb por 20 minutos y almacenar a temperatura ambiente.

- **TAE 1X (solución de trabajo)**

PARA 100 ml de solución:

Agregar 2 ml de TAE 50X a 98 ml de agua bidestilada, mezclar y almacenar a temperatura ambiente.

La concentración final es de 40 mM de Tris y 1 mM de EDTA.

- **Agarosa al 0.8% en buffer TAE 1X**

Para 35 ml de solución:

Pesar 0.28 g de agarosa, colocarla en un matraz de 125 ml de capacidad, agregar 35 ml de TAE 1X, tapar el matraz con un tapón de algodón y calentar en el microondas por 30 segundos, homogeneizar moviendo lentamente el matraz, calentar nuevamente en el microondas por 15 segundos, volver a homogeneizar muy lentamente.

Enfriar la solución manteniendo el matraz a temperatura ambiente hasta que alcance una temperatura de aprox. 60°C. Vaciar en el molde para geles de agarosa. Dejar gelificar a temperatura ambiente (aprox. 25 minutos).

- **Buffer de carga 5X para DNA**

Para 15 ml de solución:

En 4 ml de agua bidestilada estéril, disolver 0.0182 g de Tris, 0.279 g de EDTA (poco a poco). Ajustar el pH a 7.6 con NaOH 10 N. Agregar 7.5 ml de glicerol puro, 0.0075 g de xileno cianol y 0.0075 g de azul de bromofenol, aforar a 15 ml con agua bidestilada estéril. Almacenar a -20°C.

Extracción de DNA de bacterias Gram positivas y Gram negativas con el método de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB)

Soluciones:

Buffer TE

SDS 20%

CTAB 10% en NaCl 0.7 M

Fenol en buffer de Tris-HCl pH 8

Cloroformo-alcohol isoamílico (24:1)

NaCl 3 M

Etanol absoluto

Etanol al 70%

Buffer TE con 100 µg/ml de RNasa

Método:

1. Inocular 5 ml de medio LB con una sola colonia bacteriana. Si se parte de un precultivo en medio líquido, inocular 50 µl del precultivo en 5 ml de LB. Incubar durante 16-18 h a 37 °C en agitación constante (150 rpm).
2. En un tubo Eppendorf estéril centrifugar 3-5 ml del cultivo a 10000 rpm durante 1 min a 4°C o temperatura ambiente. Remover el resto de medio de cultivo mediante aspiración con una micropipeta hasta que quede sólo el paquete celular.
3. Resuspender el paquete celular en 500 µl de buffer TE. Agregar 40 µl de SDS 20%.
4. Agregar 100 µl de NaCl 3 M y 80 µl de una solución alcalina de CTAB al 10 % (debido a que es una solución muy viscosa, cortar el extremo de la punta que se usará para pipetear). Mezclar por 2 minutos e incubar 10 minutos a 37 °C.
5. Agregar 150 µl de fenol y 400 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Mezclar por 2 minutos.
6. Centrifugar a 10000 rpm por 10 minutos.
7. Transferir la fase superior a otro tubo y lavar con 500 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1).
8. Centrifugar 5 minutos a 10000 rpm.
9. Transferir la fase superior a otro tubo. Si es necesario lavar una vez más con cloroformo-alcohol isoamílico hasta que la interfase esté libre de restos celulares los cuales se visualizan como un precipitado blanco entre la fase acuosa y la orgánica.
10. Agregar 1.5 volúmenes de etanol absoluto concentrado.
11. Incubar a -20°C o -80 °C durante 10 minutos. En esta etapa el DNA se puede dejar precipitando a -20°C toda la noche.

12. Centrifugar a 10000 rpm durante 15 minutos a 4°C.
13. Eliminar el sobrenadante por decantación cuidando de no perder el DNA que se visualiza como un precipitado blanco al fondo del tubo.
14. Lavar el DNA agregando 1 ml de etanol al 70%. Mezclar por inversión durante 1 minuto y centrifugar a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Repetir este proceso una vez más.
15. Eliminar por decantación la mayor cantidad posible de etanol. Después de decantar el tubo centrifugar a 10000 rpm durante 1 minuto a 4°C y eliminar el resto de etanol con ayuda de una micropipeta o con un palillo de madera.
16. Colocar el tubo con la tapa abierta en un termoblock a 37-50 °C durante 5-10 minutos hasta evaporar completamente el resto de etanol.
17. Resuspender el DNA en 50-60 µl de una solución de TE con 100 µg/ml de RNasa e incubar a 37 °C durante al menos 20 minutos.
17. Realizar una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% con 3-5 µl de muestra de DNA. El resto de la muestra almacenarla a 4°C o a -20°C si se desea preservar durante varios meses.

Preparación de soluciones:

- **Buffer TE con Tris-HCl 10 mM pH 8; EDTA 1 mM**

Para 50 ml: disolver 0.06057 g de Tris y 0.01861 g de EDTA en 45 ml de agua bidestilada, ajustar a pH 8.0 con HCl y aforar a 50 ml con agua. Esterilizar a 5 libras por 30 minutos. Almacenar a temperatura ambiente.

- **SDS 20%**

Para 20 ml: (NOTA: utilizar máscara o cubre boca para pesar). Disolver poco a poco 4 g de SDS en 15 ml de agua bidestilada, aforar a 20 ml y esterilizar a 15 lb por 20 minutos.

- **CTAB 10% en NaCl 0.7 M**

Para 50 ml: Disolver poco a poco 2.044 g de NaCl en 40 ml de agua bidestilada, colocar la solución en baño María a 65°C. Agitar con bala magnética y agregar poco a poco 5 g de CTAB hasta disolver completamente. Ajustar el volumen a 50 ml con agua. Esterilizar a 15 lb durante 20 min. Almacenar a temperatura ambiente.

- **Fenol saturado con Tris/HCl 0.1 M ajustado a un pH= 8**

Se hace en base al protocolo indicado por el proveedor (Invitrogen Ultra Pure Phenol)

- **Cloroformo /Alcohol Isoamílico (24:1, Se encuentran en el área de solventes)**

Para 50 mL: 48 mL de Cloroformo y 2 mL de Alcohol Isoamílico. Almacenar a 4°C en un frasco ámbar.

- **Etanol al 70 %**

Para 100 mL: 70 ml de alcohol etílico absoluto (Se encuentra en el área de solventes) 30 ml de H₂O inyectable. Almacenar a 4°C en un frasco ámbar.

- **NaCl 3 M**

Para 50 ml: disolver poco a poco 8.76 g de NaCl en 35 ml de agua bidestilada, aforar a 50 ml. Esterilizar a 5 libras por 30 minutos. Almacenar a temperatura ambiente.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés (*Polymerase Chain Reaction*), es una técnica de biología molecular desarrollada en 1986 por Kary Mullis, cuyo objetivo era y es obtener un gran número de copias de un fragmento de DNA determinado, partiendo de una cadena molde.

Las condiciones para la mezcla de PCR para amplificar el gen silvestre, son las siguientes:

Reactivo	Volumen (µL)
H ₂ O	10.2
DMSO	1
10x PCR Buffer(-Mg)	2
50mM MgCl ₂	0.6
10mMdNTP	4
Forward	0.5
Reverse	0.5
DNA	1
Taq DNA Polimerasa	0.2

Etapa	Ciclos	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización	1x	95°C	5 min
Alineamiento	30x	95°C	30 seg
		71.5°C	30 seg
		72°C	2 min
Extensión	1x	72°C	7 min
Extensión final		4°C	∞

	Notación del oligonucleótido	Secuencias	Sitios de restricción	Longitud del oligonucleótido	Contenido de GC %	Tm (°C)
Delantero con sitio de corte	pGEX40216F	AATTGAATTC AAGCCGG ACCCTCACCTCGCC	<i>EcoRI</i>	21	71.42	72
Reverse con sitio de corte	pGEX40216R	ATATCTCGAGGCGCGG CACCTGCCAGGGCAG	<i>XhoI</i>	21	80.95	76

Transformación de células de *E. coli* quimiocompetentes

(Modificado de Sambrook, *et al.*, 1989)

Método:

1. Colocar un baño María a 42 °C.
2. Se preparan las puntas de PCR para colocar la ligación, el hielo, el baño controlado a 42 °C y la ligación en hielo.
3. Una vez preparado todo en condiciones estériles se sacan las células competentes de -80 °C y dejar 5 min en hielo. Agregar 2-3 µl de la ligación y dejar en hielo aproximadamente 5 min y posteriormente se realiza en choque térmico a 42 °C por 2 min.
4. Incubar de 2-3 hrs a 37 °C en 2 ml de LB o medio SOC en un tubo de 16 x 150 mm.
5. Preparar placas de LB con el antibiótico indicado de preferencia el mismo día.
6. Plaquear de la siguiente manera: 50, 100, 150, 200 µl y concentrado (para el concentrado centrifugar los 1.5 ml de cultivo en un tubo eppendorf de 1.5 ml de capacidad y resuspender en 150 µl de caldo LB.
7. Incubar las placas durante toda la noche a 37 °C y al siguiente día seleccionar las colonias blancas y resembrarlas en una placa de LB con el antibiótico indicado.
8. Realizar el escrutinio por PCR y restricción.

Inducción de la proteína

1. Se realiza un precultivo de 16 horas de incubación en medio LB con Ampicilina (100µg/ml).
2. Se toman 1ml del precultivo para inocular un matraz con 20ml de medio LB y Ampicilina (100µg/ml), aunque el número de matraces dependerá de la cantidad de inducción deseada.
3. Se incuba con agitación a 37 °C, hasta obtener un D.O. 0.5 a 0.7.
4. Una vez alcanzada la D.O. se induce con una concentración 0.1 mM de IPTG durante 3 horas a 25 °C.
5. Centrifugar el cultivo a 3,000 RPM durante 20 minutos para separar el pellet del sobrenadante. (Almacenar pellet a -80°C).