



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

**“EL GEN GDI_1248 COMO REGULADOR
TRANSCRIPCIONAL DE ZINC EN
GLUCONACETOBACTER DIAZOTROPHICUS
PAL5”**

TESIS

Para Obtener el Grado de:

LICENCIADA EN BIOMEDICINA

Presenta:

LUZ ANDREA MARTÍNEZ CISNEROS

Asesores experto y metodológico:

**D.C. LUCÍA SOTO URZÚA
D.C. LUIS JAVIER MARTÍNEZ MORALES**

**PUEBLA
JUNIO 2023**

Agradecimientos

A mis tutores, Lucía Soto Urzúa y Luis Javier Martínez Morales, por su apoyo, dedicación y tiempo invertidos en la elaboración de este proyecto.

Al comité tutorial, por el tiempo dedicado a la revisión de este documento y por las valiosas contribuciones que me hicieron.

A mis docentes, a quienes les debo mis conocimientos y agradezco el empeño que tienen por impartirlos.

A mi madre, por apoyarme y respaldarme siempre. Sin ella no hubiera sido posible llegar hasta aquí.

A mis compañeros de laboratorio, quienes me brindaron su apoyo.

A las amistades que hice en el trayecto de la licenciatura, con quienes viví momentos llenos de felicidad y que me han brindado un lugar en sus vidas.

Muchas gracias.

내 피 땀 눈물

-방탄소년단

Índice

Tabla de abreviaturas	iii
Tabla de figuras	v
Tabla de anexos	vii
I. Resumen	1
II. Introducción	2
III. Antecedentes	4
a. Generales	4
i. Microorganismos endófitos	4
ii. <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>	5
iii. Importancia del hierro y el zinc para los microorganismos	7
iv. Reguladores transcripcionales y su función	9
v. La oligomerización	10
vi. Súper familia FUR	11
1. Fur	12
2. Zur	14
b. Específicos	18
IV. Planteamiento del problema	20
V. Objetivos	21
a. General	21
b. Específicos	21
VI. Material y métodos	22
a. Material biológico	22
b. Análisis experimentales	22
i. Extracción de ADN plasmídico	22
ii. Inducción con IPTG y la expresión de la proteína reguladora GDI_1248	23
iii. Western blot de las fracciones proteicas de la proteína reguladora GDI_1248 obtenidas de la inducción con IPTG	23
c. Análisis bioinformáticos	24
i. Análisis de la proteína reguladora GDI_1248	24
ii. Predicción de la estructura 3D proteica	24
iii. Docking de la proteína reguladora GDI_1248	25
VII. Resultados	25

a.	Resultados experimentales	25
i.	Extracción de ADN plasmídico de la cepa <i>E. coli</i> BL21 pLys pEXP5-CT1248 y análisis por electroforesis.	25
ii.	Digestión enzimática con <i>Ava</i> I y <i>Eco</i> RI	26
iii.	Inducción de la proteína reguladora GDI_1248 en la cepa <i>E. coli</i> BL21 pLys pEXP5-CT1248 con IPTG	27
iv.	Western blot de las fracciones proteicas de la proteína reguladora GDI_1248 con diferentes tiempos de inducción	28
b.	Resultados de bioinformática	29
i.	Búsqueda de secuencias similares a la proteína reguladora GDI_1248 29	
ii.	Modelado de la proteína reguladora GDI_1248	33
iii.	Sitios de unión y oligomerización de la proteína reguladora GDI_1248	37
iv.	Docking	40
VIII.	Discusión	45
IX.	Conclusiones	52
X.	Perspectivas	53
XI.	Bibliografía	53
XII.	Anexos	61
	Anexo I: Medio LB	61
	Anexo II: Medio LGIE (para modificaciones de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>)	61
	Anexo III: Método de extracción de ADN genómico (Método de Tiocianato de Guanidina)	62
	Anexo IV: Método de extracción de ADN plasmídico [Modificado]	63
	Anexo V: Método de digestión enzimática	64
	Anexo VI: Inducción de la proteína reguladora GDI_1248 recombinante por IPTG.	64
	Anexo VII: Soluciones para SDS PAGE	65
	Anexo VIII: Buffer de lisis	66
	Anexo IX: Protocolo de lisis celular	66
	Anexo X: PAGE SDS 12%	67
	Anexo XI: Transferencia de proteínas a membrana y Western blot con anticuerpos anti-polihistidina (Sigma-Aldrich)	67

Tabla de abreviaturas

°C	Grados centígrados
<i>A.baumannii</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Ap	Ampicilina
<i>A.tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BPCV	Bacterias promotoras de crecimiento
Cm	Cloranfenicol
CTAB	Bromuro de cetiltrimetilamonio
DO ₆₀₀	Densidad óptica 600
DTT	Ditiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
Fe ²⁺	Ion ferroso
Fe ³⁺	Ion férrico
Fur	Regulador de la captura del hierro
FUR	Ferric Uptake Regulator (Family)
GDI	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>
<i>G. diazotrophicus</i>	<i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i>
gr	Gramos
IPTG	Isopropil-β-D-1-tiogalactopiranósido
L	Litros
LB	Medio Luria-Bertani
LGIE	Medio Lipman-Glucosa-Ivo-Extracto de levadura
M	Molar
mg	Miligramos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
<i>M. tuberculosis</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NCBI	Centro Nacional de Información sobre Biotecnología
pb	Pares de bases

PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
<i>R. leguminosarium</i>	<i>Rhizobium leguminosarium</i>
<i>R. palustris</i>	<i>Rhodopseudomonas palustris</i>
ROS	Especies reactivas de oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
<i>S. coelicolor</i>	<i>Streptomyces coelicolor</i>
<i>S. marenigrum</i>	<i>Synechococcus marenigrum</i>
<i>S. meliloti</i>	<i>Sinorhizobium meliloti</i>
<i>X. campestris</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>
<i>Z. mobilis</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>
Zn²⁺	Ion zinc
Zur	Regulador de la captura del zinc
mg	Microgramos
μl	Microlitros
μM	Micromolar

Tabla de figuras

Figura 1. Fotomicrografía de contraste de fases de células de <i>G. diazotrophicus</i> cultivadas con altos niveles de fuentes de nitrógeno (25 mM de nitrato de amonio) en medio semisólido LGI P tras 15 días de crecimiento. Barra = 10 μ M. Tomado de Muthukumarasamy (1).....	6
Figura 2. Procesos celulares modulados por el regulador de captura del hierro, Fur. Adaptado de Fillat (6).	12
Figura 3. Mecanismo de acción de Zur.....	15
Figura 4. Análisis del ADN plasmídico obtenido de la cepa <i>E. coli</i> BL21 pLys pEXP5-CT1248 en gel de agarosa 1%.....	26
Figura 5. Digestión enzimática con Aval en electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%	27
Figura 6. Análisis por electroforesis desnaturalizante en gel de poliacrilamida al 12% de la inducción de la proteína reguladora GDI_1248 recombinante... ..	28
Figura 7. Gel de poliacrilamida 12% teñido después de la transferencia a la membrana de nylon Hybond N+.....	29
Figura 8. Análisis por Western blot de las fracciones proteicas.	29
Figura 9. Resultado del análisis en HHpred.....	30
Figura 10. Alineamiento realizado con la herramienta Clustal Omega.....	32
Figura 11. Árbol filogenético de la proteína reguladora GDI_1248 de <i>G. diazotrophicus</i> Pal5 con las secuencias de aminoácidos de las proteínas Zur de <i>S.marenigrum</i> , <i>S.coelicolor</i> , <i>Z.mobilis</i> , <i>X.campestris</i> , <i>E.coli</i> , <i>A.baumannii</i> , <i>S.meliloti</i> , <i>R.leguminosarum</i> , <i>A.tumefaciens</i> y <i>R.palustris</i>	33
Figura 12. Estructura secundaria de la proteína reguladora GDI_1248 predicha por ITASSER.....	34
Figura 13. Top 10 de plantillas usadas para predecir la estructura 3D.	35
Figura 14. Modelo 3D de la proteína reguladora GDI_1248 de <i>Gluconacetobacter diazotrophicus</i> Pal5.	36
Figura 15. Modelo de la proteína 4MTD de <i>E. coli</i> K-12.....	37
Figura 16. Superposición de la proteína reguladora GDI_1248 (naranja) de <i>G. diazotrophicus</i> Pal5 con 4MTD (azul) de <i>E. coli</i> K-12.....	38
Figura 17. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína reguladora GDI_1248 de <i>G. diazotrophicus</i> Pal5 y 4MTD de <i>E. coli</i> K-12.....	38
Figura 18. Resultado del BlastP.....	39
Figura 19. Dominios conservados de la proteína reguladora GDI_1248 de <i>G. diazotrophicus</i> Pal5.	40
Figura 20. A. Docking de la proteína reguladora GDI_1248 con Zn ²⁺ . B. Tipo de enlace que se forma entre el Zinc y los residuos de cisteína de la proteína reguladora GDI_1248.	41
Figura 21. Coordinación del ligando para el sitio de zinc rico en azufre (ion metálico Zn ²⁺ mostrado en rojo) de <i>E. coli</i>	41
Figura 22. A. Docking de la proteína reguladora GDI_1248 con Fe ²⁺ . B. Tipo de enlace que se forma entre el Hierro y los residuos de cisteína e isoleucina (114C, 117C, 154C, 157C) de la proteína reguladora GDI_1248.....	42

Figura 23. A. Docking de 4MTD con Fe²⁺. B. Tipo de enlace que se forma entre el Hierro y los residuos de cisteína (103C, 106C, 143C, 146C) de 4MTD..... 42

Figura 24. Docking de la proteína reguladora GDI_1248 con Co²⁺. 43

Figura 25. A. Docking de 4MTD con Co²⁺. B. Tipo de enlace que se forma entre el Cobalto y los residuos de cisteína e histidina (88C, 96H) de 4MTD. 43

Figura 26. A. Docking de la proteína reguladora GDI_1248 con Mn²⁺. B. Tipo de enlace que se forma entre el manganeso y los residuos de arginina y aspartato (53D, 57T) de la proteína reguladora GDI_1248. S..... 44

Figura 27. A. Docking de 4MTD con Mn²⁺. B. Tipo de enlace que se forma entre el manganeso y las cisteínas (103C, 106C, 143C, 146C) de 4MTD..... 44

Figura 28. A. Docking de la proteína reguladora GDI_1248 con Ca²⁺. B. Tipo de enlace que se forma entre el Calcio y los residuos de ácido glutámico y glutamina (76E, 77Q) de la proteína reguladora GDI_1248..... 45

Figura 29. A. Docking de 4MTD con Ca²⁺. B. Tipo de enlace que se forma entre el Calcio y los residuos de leucina y aspartato (45R, 46D) de 4MTD..... 45

Tabla 1. Características principales de las proteínas Zur relevantes para este trabajo. 18

Tabla 2. Características fenotípicas de la cepa y plásmido que se utilizaron en este trabajo. 22

Tabla de anexos

Anexo I: Medio LB

Anexo II: Medio LGIE

Anexo III: Método de extracción de ADN genómico (Método de Tiocianato de Guanidina)

Anexo IV: Método de extracción de ADN plasmídico [Modificado]

Anexo V: Método de digestión enzimática

Anexo VI: Inducción de la proteína reguladora GDI_1248 recombinante por IPTG

Anexo VII: Soluciones para SDS PAGE

Anexo VIII: Buffer de lisis

Anexo IX: Protocolo de lisis celular

Anexo X: PAGE SDS 12%

Anexo XI: Transferencia de proteínas a membrana y Western blot con anticuerpos anti-polihistidina (Sigma-Aldrich)

I. Resumen

Gluconacetobacter diazotrophicus Pal5, es una bacteria endófito. En su genoma se encuentran los genes GDI_1398 y GDI_1248 que codifican para dos proteínas de la superfamilia FUR de las cuales, se ha estudiado e intentado determinar la función de la proteína reguladora GDI_1248 haciendo análisis fenotípicos en la cepa *E. coli* H1780 *pEXP5-CT1248*, *E. coli* H1780 *pEXP5CT* y *E. coli* H1780 probando su respuesta ante el estrés oxidativo.

Este trabajo tiene la finalidad de analizar y comparar mediante programas bioinformáticos la secuencia aminoacídica del gen GDI_1248 de la cepa *G. diazotrophicus* Pal5 con las secuencias de reguladores transcripcionales Zur de procariotas de diferentes grupos filogenéticos, y encontrar diferencias en la homología o similitud entre las secuencias analizadas. Para el estudio del gen GDI_1248 de manera experimental se utilizó la cepa *E. coli* BL21 *pLys pEXP5-CT1248*, que contenía la construcción GDI_1248 clonada en el vector de expresión *pEXP5CT*. Se estandarizaron las condiciones óptimas de la expresión de la proteína reguladora GDI_1248 recombinante, la cual fue confirmada mediante inmunodetección con anticuerpos monoclonales anti-polihistidina fosfatasa alcalina. Finalmente, se utilizó la herramienta bioinformática “docking”, con la cual se observaron las diferencias que existen entre los sitios de unión al ligando respectivo con la proteína reguladora GDI_1248 recombinante, así como los diferentes tipos de enlaces que éstos forman.

II. Introducción

Gluconacetobacter diazotrophicus es un microorganismo endófito, clasificado como alfa-proteobacteria. Es un bacilo largo, aerobio obligado, Gram negativo y ácido resistente (1). *G. diazotrophicus* es capaz de producir diferentes fitohormonas como el ácido indol acético, solubilizar minerales esenciales para la planta como el hierro, zinc, manganeso y fósforo, prevenir la infección por fitopatógenos y otorgar protección ante las especies reactivas de oxígeno (ROS) (2). Este microorganismo posee un efecto estimulador del crecimiento vegetal que ha sido asociado a su potencial de fijación de nitrógeno entre otros (3); por todos los mecanismos mencionados anteriormente, se le ha denominado como Bacteria Promotora de Crecimiento Vegetal (BPCV).

Tanto el hierro como el zinc poseen características duales, puesto que son benéficos para las bacterias en concentración intracelular óptima y tóxicos cuando se encuentran en exceso (4,5). Debido a esto, se requiere de una fina regulación del ambiente intracelular y, quienes llevan a cabo este proceso son los miembros de la súper familia de reguladores FUR, Ferric Uptake Regulator por sus siglas en inglés, que está integrada por una serie de reguladores sensibles a las concentraciones de diferentes iones metálicos (6).

Bertalan y cols. (7) secuenciaron el genoma de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5, revelando la presencia de dos proteínas FUR, denominadas WP_012224654.1 y WP_012554056.1, codificadas por los genes GDI_1398 y GDI_1248 respectivamente; sin embargo, poco se sabe del papel que juega el producto del gen GDI_1248.

La presente investigación se enfoca al análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica de la proteína reguladora GDI_1248, así como predecir el posible comportamiento ésta en presencia de iones metálicos divalentes, observando las

diferencias que existen entre los sitios activos de la proteína y los enlaces proteína-ligando que se forman.

III. Antecedentes

a. Generales

i. Microorganismos endófitos

Los microorganismos endófitos forman parte del microbioma vegetal que residen dentro de los tejidos de las plantas y que forman una asociación benéfica para ambos. Las bacterias endófitas pueden habitar en cualquier tejido de la planta, tales como las raíces, tallos, hojas, polen, frutos y semillas (8). Estos microorganismos juegan un papel clave en el sano desarrollo de los ecosistemas, a través de mecanismos directos e indirectos como la síntesis de sustancias promotoras del crecimiento vegetal, control biológico sobre infecciones por fitopatógenos y mejora de procesos de fitorremediación en la rizosfera (9). Se ha demostrado su capacidad de inducir vías de resistencia en plantas, aumentando su capacidad de supervivencia a diferentes tipos de estrés ambiental, además de su capacidad para producir sideróforos y fitohormonas (8). A su vez, se ha demostrado que los microorganismos endófitos son productores de metabolitos secundarios que incluyen compuestos antitumorales y agentes antiinflamatorios (9).

Una parte de la actividad metabólica de estos microorganismos resulta en la solubilización de PO_4^{3-} insolubles y captura de Fe^{3+} , mediante la síntesis de sideróforos, que de otra manera no estarían disponibles para las plantas (10). Especialmente, los microorganismos endófitos diazótrofos son capaces de realizar la fijación biológica de nitrógeno mediante el complejo nitrogenasa (requiere 38 átomos de hierro para funcionar), el cual cataliza la reducción de nitrógeno atmosférico a amoníaco; dicha actividad resulta de gran interés en la industria agroecológica (11).

Según Pinski et al. (11), el proceso de colonización de la planta por microorganismos endófitos se lleva a cabo por medio de 5 fases: a) reconocimiento de exudado de raíces y movilidad hacia la planta, b) adherencia a la superficie de las raíces, c) formación de biopelícula, d) penetración de la superficie de la raíz y e)

la colonización de las partes internas de la planta. En cada fase, diferentes factores genéticos y bioquímicos se ven involucrados para lograr una colonización exitosa.

En la actualidad, los genomas que se encuentran disponibles de estos microorganismos en las bases de datos, sirven como sistemas modelo para el estudio de las interacciones bacteria-planta y bacteria-bacteria. Además, las secuencias individuales del genoma mejoran el análisis de datos en estudios de metagenómica, proteómica y transcriptómica de microorganismos asociados a plantas. Por lo tanto, la identificación y caracterización de los genes implicados en las interacciones benéficas son altamente importantes para la manipulación efectiva de la asociación mutualista entre ambos (12).

El análisis de los genomas de los microorganismos endófitos ha proporcionado una herramienta para tener más información sobre su interacción con las plantas, ha esclarecido el tipo de procesos cooperativos entre ambas para obtener un beneficio común, como la producción de fitohormonas, la captura de minerales (hierro, zinc, etc.), la fijación de nitrógeno y la respuesta ante distintos tipos de estrés (13).

ii. Gluconacetobacter diazotrophicus

G. diazotrophicus Pal5 fue aislada por primera vez por Cavalcante y Döbereiner en 1988 a partir de raíces y tallos de caña de azúcar, nombrándola *Saccharobacter nitrocaptans* por su capacidad de fijar el nitrógeno. Posteriormente, luego de realizar experimentos de hibridación de ácidos nucleicos, se le denominó *Acetobacter diazotrophicus* por Gills, M. (14), pues pertenece a la familia *Acetobacteraceae*, a la cual pertenecen los géneros *Acetobacter*, *Gluconacetobacter*, *Gluconobacter* y *Acidomonas*. Finalmente, en el año de 1998 se le otorgó su nombre actual, pues una de sus características destacables es que genóticamente se distingue por la presencia de dos sitios de restricción internos en la secuencia del gen 16S ADN-ribosomal (7, 15).

Además de pertenecer a la familia de las *Acetobacteraceae*, se encuentra clasificada como una alfa-proteobacteria. Es un bacilo largo con extremos redondeados que posee dimensiones de 0.7-0.9 μm por 1-2 μm . Se puede observar solo, en parejas o en pequeñas cadenas (**Figura 1**). Es un microorganismo aerobio obligado, Gram negativo y ácido resistente (11). Dadas las necesidades fisiológicas de esta bacteria, se cultiva en medios que contengan 10% de sacarosa, con un pH de 5.5 y a una temperatura de 30°C. Puede utilizar glucosa, fructuosa y sacarosa como fuentes de carbono y produce ácido glucónico a partir de dichos sustratos. También puede realizar la fijación biológica de nitrógeno en ambientes ácidos de hasta pH 3 y en condiciones microaerófilas (3).

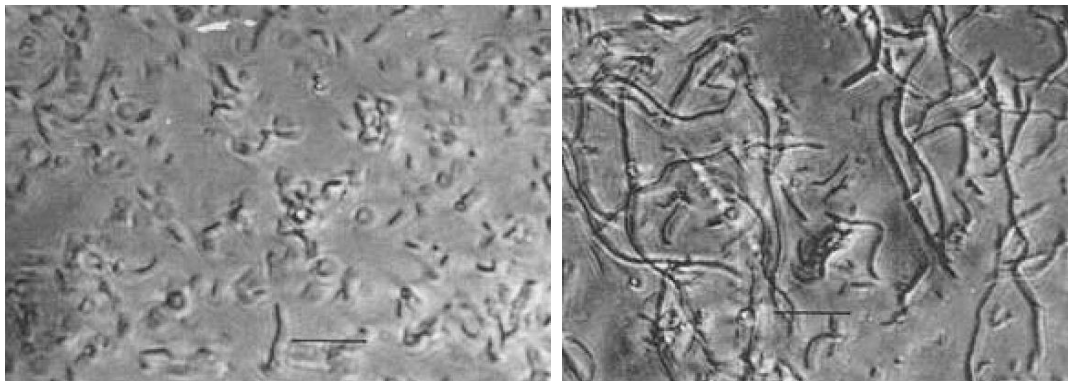


Figura 1. Fotomicrografía de contraste de fases de células de *G. diazotrophicus* cultivadas con altos niveles de fuentes de nitrógeno (25 mM de nitrato de amonio) en medio semisólido LGI P tras 15 días de crecimiento. Barra = 10 μm . Tomado de Muthukumarasamy (1).

G. diazotrophicus se ha aislado en plantas con alto contenido en azúcares. Se le ha encontrado al interior de los tallos de la caña de azúcar cultivada en Brasil, Australia, México, Canadá, India y Cuba (15).

Como se mencionó anteriormente, en las fases de colonización de la planta, durante la etapa de formación de biopelículas, el exopolisacárido de *G. diazotrophicus* Pal5 juega un papel muy importante pues mejora la capacidad de unión y la colonización, ya que la inactivación del gen *gumD*, que codifica la enzima responsable de la biosíntesis de este EPS, resulta en la disminución de la colonización de la rizósfera de las raíces de arroz (11).

G. diazotrophicus Pal5 posee un efecto estimulador del crecimiento que ha sido asociado a su potencial fijador de nitrógeno, excretando el 50% del nitrógeno fijado al interior de la planta (3), además de su capacidad para producir ácido indol acético, la prevención de una infección por fitopatógenos, la capacidad de solubilizar minerales esenciales para la planta como el hierro, zinc, manganeso y fósforo, así como de otorgar protección ante las especies reactivas de oxígeno (ROS) (2).

Cuando las enzimas superóxido dismutasa y glutatión reductasa son mutadas, *G. diazotrophicus* Pal5 no es capaz de colonizar las raíces de la planta de manera eficiente, lo cual confirma la importancia de la desintoxicación de especies reactivas de oxígeno en la etapa de colonización de las raíces (11).

Estudios realizados por Bertalan y cols. (7), mostraron que el genoma completo de *G. diazotrophicus* es de aproximadamente 3.9 Mpb. Posee dos plásmidos con longitudes de 20 a 170 Kb, los cuales pudieran conferirle ventajas competitivas contra otros microorganismos y desempeñar funciones relevantes respecto a su interacción con las plantas.

iii. Importancia del hierro y el zinc para los microorganismos

El hierro es el cuarto metal más abundante en el suelo, siendo uno de los micronutrientes esenciales para casi todos los seres vivos, menos las bacterias ácido-lácticas, las cuales usan el cobalto y el manganeso en lugar de dicho metal. En las bacterias es esencial para el crecimiento y la colonización del huésped (5).

El hierro es un metal altamente reactivo y puede existir en varios estados de oxidación: forma ferrosa (Fe^{2+}), forma férrica (Fe^{3+}) y forma hierro cero valente $\text{Fe}(0)$. Los estados de oxidación del hierro lo hacen versátil para unirse o coordinarse con otras moléculas, formando complejos estables (por ejemplo, el complejo hierro-sideróforo) en la naturaleza. El potencial de óxido-reducción de su

forma ferrosa a férrica hace al hierro un elemento muy versátil cuando se le incorpora como centro catalítico o como acarreador de electrones (16).

Aunque este elemento es abundante en la corteza terrestre, su biodisponibilidad es baja debido a la alta reactividad que tiene en una atmósfera oxidante como la nuestra, lo cual le lleva a su rápida oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} y la consecuente formación de hidróxidos insolubles (17).

La mayor parte del hierro que se encuentra en el suelo está formando silicatos de ferromagnesio e hidróxidos u óxidos de hierro, tal que no son fácilmente disponibles para las plantas. Sin embargo, diferentes poblaciones microbianas pueden liberar el hierro de los compuestos orgánicos que lo posean y transformarlo en formas disponibles y asimilables para las plantas (16).

Se han descrito cinco estrategias esenciales para la movilización del hierro que son llevadas a cabo por las bacterias: a) un sistema de transporte de alta afinidad que permite capturar el hierro del entorno, b) la reserva del mineral en depósitos intracelulares para que pueda ser utilizada en caso de escasez en el medio extracelular, c) uso en los sistemas que proporcionan resistencia al estrés oxidativo, d) control de la captura del hierro por subregulación de la expresión de proteínas de almacén cuando se presentan condiciones de escasez; y e) el sistema de regulación del hierro que coordina la expresión de la respuesta ante las fluctuaciones en la disponibilidad de éste (12).

Coleman en 1992, propone que el zinc es el segundo metal traza más abundante que se encuentra en los organismos eucariotas, rebasado por el hierro. El zinc está presente en seis clases de enzimas donde juega un papel estructural y catalítico en las proteínas (4). Aproximadamente el 5% - 6% de las proteínas bacterianas son dependientes del zinc. Actúa como un ácido de Lewis en la mayoría de las reacciones hidrolíticas, pues es un catalizador de ellas. Se encuentra incorporado a

una gran variedad de metaloenzimas, proteínas de almacén y factores de transcripción (18).

Este ion metálico estabiliza las proteínas y los dominios proteicos, lo cual previene el desplegamiento de éstos, pues actúa como un antioxidante, protegiendo los grupos sulfhidrilo de las proteínas ante un ataque de radicales libres, así como evitando su formación, logrando mantener la estabilidad y función de estas moléculas. También es componente estructural de la RNA polimerasa y la maquinaria ribosómica, participa en el metabolismo del carbón y contribuye a regular el estado redox del entorno, lo cual previene que las células sean dañadas como consecuencia del estrés oxidativo (6, 18).

Como se menciona anteriormente, el zinc no sólo es necesario para las funciones catalíticas de las enzimas, sino que también estabiliza e induce el plegamiento de proteínas. Esta función se ha deducido mediante el descubrimiento de su papel esencial en el plegamiento de los dominios de unión al ADN de los factores de transcripción eucariotas, incluidos los factores de transcripción de dedos de zinc, la familia de proteínas receptoras de hormonas y en los factores de transcripción de levaduras (4).

Sin embargo, éste puede llegar a ser tóxico para la célula en concentraciones elevadas o superiores a las normales, pues bloquea los grupos tiol de las proteínas o actúa como competidor de otros iones metálicos, dando como resultado una metalación defectuosa, lo cual podría afectar o impedir que se lleven a cabo diferentes procesos fisiológicos (18).

iv. Reguladores transcripcionales y su función

La regulación transcripcional es un proceso vital, pues permite la respuesta celular ante diferentes señales intra y extracelulares, manteniendo y coordinando la actividad celular adecuadamente (19). Este proceso involucra una serie de

moléculas que establecen redes globales, las cuales tienen diferentes eventos sucediendo simultáneamente, asociando a las proteínas con el material genético. Dichas asociaciones tienen lugar debido a la alta especificidad de los promotores y los factores de transcripción (20). Los pasos más importantes en la transcripción son: 1) el reclutamiento y ensamblaje de la maquinaria de transcripción, 2) la iniciación, la liberación y elongación y 3) el término de la transcripción (19).

Un regulón es aquel que puede controlar a uno o más operones por sí mismo participando en diferentes procesos individualmente, mientras que un regulador global tiene la capacidad de controlar operones que pertenecen a diferentes vías metabólicas (21).

Según Gottesman (21), los componentes de una red de reguladores globales son: a) el estímulo y la señal; b) las proteínas reguladoras; c) los operones regulados y d) la homeóstasis.

v. La oligomerización

Los metales de transición son esenciales para el desarrollo de la mayoría de los organismos, pero una vez que se encuentran en exceso pueden ser tóxicos para ellos. Por esto, deben de estar finamente regulados mediante una gran red metabólica encargada del mantenimiento de la homeóstasis de estos componentes. Para lograr mantener el equilibrio correcto entre escasez y abundancia de metales, los microorganismos poseen factores de transcripción reactivos a metales, denominados metalorreguladores; de manera que, al unirse el metal a su regulador, este último modifica su estructura, mediante la oligomerización, para adquirir afinidad o perderla respecto a los sitios de unión al ADN (22).

“En este contexto, la regulación alostérica es el proceso mediante el cual la unión de metales a sitios específicos del metalorregulador influye en la unión del ADN por una región distante. El zinc inhibe o activa la unión a secuencias específicas en la

cadena de ADN diana ubicadas en la región promotora, para que, según sea el caso, se active o reprima la transcripción” (22).

El entrecruzamiento de las proteínas es un suceso que, aunque no pasa con mucha frecuencia, ocurre naturalmente formando especies cuaternarias o complejos activos unidos covalentemente, a partir de monómeros inactivos. Este fenómeno suele ocurrir entre las cisteínas libres de dos subunidades diferentes que se acoplan para formar puentes disulfuros intermoleculares dependiendo del estado redox del ambiente (23). Un ejemplo de esto es la capacidad de la superfamilia FUR para formar oligómeros. Las interacciones proteína-ADN le permiten lograr una ocupación secuencial de las cajas Fur, lo cual resulta en una regulación muy específica de la expresión de los genes encargados de regular la captura del hierro. Asimismo, la formación de oligómeros también depende de la concentración de la misma proteína y de la fuerza iónica, sugiriendo la presencia de interacciones hidrofóbicas entre los monómeros de la proteína (24). El metalorregulador de la familia FUR, Zur, bajo condiciones repletas de zinc se une al ADN estrechamente en su forma de represor a los sitios del operador de la caja Zur, reprimiendo la transcripción de los transportadores de la captura de zinc. En algunos microorganismos, Zur está muy bien estudiada, pero en otros poco o nada se conoce. En estudios *in vivo* con *E. coli*, Jung *et al.* (2020), encontraron que la tasa de desunión de Zur del ADN es sensible a la concentración de la proteína Zur, por otro lado, encuentran que la desunión probablemente resulta de la oligomerización de Zur en el cromosoma involucrando puentes salinos entre proteínas (25).

vi. Súper familia FUR

La súper familia de reguladores FUR, consta de un conjunto de reguladores transcripcionales encargados de controlar la homeóstasis de diferentes metales esenciales para el metabolismo de los microorganismos (26). Esta familia está conformada por reguladores sensibles a la concentración de metales como el hierro (Fur), zinc (Zur), manganeso (Mur), níquel (Nur); aunque también pueden regular la

respuesta ante el estrés oxidativo (PerR) y la respuesta hemo-dependiente de hierro (Irr) (6).

En la **Figura 2** se muestran los procesos celulares en los que está involucrada la familia FUR.



Figura 2. Procesos celulares modulados por el regulador de captura del hierro, Fur. Adaptado de Fillat (6).

1. Fur

Aunque el hierro es esencial para el desarrollo de los microorganismos y el correcto funcionamiento de su metabolismo, éste debe ser estrictamente regulado debido a su propensión a formar radicales hidroxilo cuando se encuentra en altas concentraciones (5).

Escolar y *et al* (27), fueron los primeros en describir Fur en *E. coli*, que se encarga de regular la expresión de más de 90 genes relacionados a la regulación de la captura de hierro de manera directa e indirecta. Sus propiedades fisicoquímicas y su rol funcional se han extrapolado e investigado en diversos modelos biológicos.

Los miembros de la familia Fur son pequeños, pues su rango de tamaño molecular ronda entre los 14 y 20 kDa y poseen regiones altamente conservadas ricas en histidina (28).

En las bacterias, la proteína Fur es un factor transcripcional, que utiliza Fe^{2+} como co-represor, capaz de unirse al ADN. Participa en el mantenimiento de la homeóstasis del hierro. Es la encargada de la regulación de la expresión de los genes implicados en la captura del hierro (5). Ésta actúa como un represor que reconoce una secuencia de 19 pb del ADN, denominada caja Fur, ubicada en la región operadora de los genes que pertenecen al regulón Fur y se une a ella bloqueando la transcripción de ellos. Esto sucede cuando la proteína Fur se une con el Fe (II), formando el complejo Fur-Fe (II). Por lo tanto, la transcripción de dichos genes sólo es interrumpida cuando existe una concentración intracelular del hierro que excede los niveles necesarios para la bacteria (26,29).

El mecanismo de regulación de esta proteína se enciende cuando el nivel de hierro intracelular es más alto de lo normal, entre 10^{-6} y 10^{-8} M (29). Así, Fur en su conformación dimérica, forma un complejo con el co-represor Fe^{2+} y se une a las cajas Fur, evitando la transcripción de los genes involucrados en la captura del hierro. Por el contrario, cuando el hierro es escaso, los complejos Fur- Fe^{2+} se despegan de la región promotora (caja Fur) de la secuencia de los genes diana, permitiendo que la ARN polimerasa inicie la transcripción de los genes que participan en la biosíntesis de sideróforos (captura del metal) y biosíntesis de proteínas receptoras de membrana externa (5, 26, 27).

Las proteínas Fur de *E. coli* tienen una secuencia aproximada de 120 aminoácidos. En su extremo N-terminal poseen un sitio de unión al ADN, mientras que en su extremo C-terminal poseen un sitio de unión a metales, el cual participa en la dimerización. Ambos extremos están unidos por una unión tipo bisagra, que está conformada por un clúster de histidinas. Existe otro sitio de unión a metal, que generalmente se encuentra ocupado por un Zn^{2+} sin embargo, éste cumple sólo una función estructural. Su conformación principal es en forma de un dímero que se une a un sitio del ADN palindrómico con secuencias ricas en A/T, usando al metal como co-represor (6, 28, 30).

El sitio de unión ADN-Fur, conocido como caja Fur, es un motivo altamente conservado constituido por 19 pares de bases palíndromos (5'-GATAATGATAATCATTATC-3'), ubicado entre los sitios -35 y -10 en la región promotora de los genes regulados por Fur (31).

2. Zur

El mantenimiento de la homeostasis del zinc en las bacterias está regulado por al menos tres procesos que abarcan: la importación y exportación, la unión intracelular y el censo de su concentración. Para realizar estas actividades se han descrito a los factores de transcripción dependientes de zinc (Zn^{2+}); éstos incluyen a la familia FUR (Zur) y a la familia MarR/SlyA (AdcR), encargados de controlar el importe; y a la familia MerR (ZntR) y las familias ArsR/SmtB, encargados de incrementar la exportación y/o el secuestro intracelular (20). Zur actúa como un represor de los genes que codifican para el importador de alta afinidad del Zn^{2+} , transportador tipo ABC denominado *znuABC*, y las proteínas ribosomales que movilizan este ion (32).

Comúnmente, el regulón Zur comprende un conjunto de genes que codifican para transportadores de zinc de alta y baja afinidad, chaperonas y parálogos no dependientes de zinc de proteínas ribosomales (6).

De la misma forma que los demás reguladores de la familia Fur, las proteínas Zur actúan primordialmente como represores transcripcionales. Cuando el zinc se encuentra unido al Zur (condiciones de abundancia), éste bloquea el sitio de reconocimiento del complejo de iniciación, el sitio -35 en la región promotora de la transcripción de la ARN polimerasa. Esta represión mediada por el complejo Zur-Zn²⁺ se libera cuando existe una depleción del Zn²⁺ (18). Esto puede verse representado en la **Figura 3**.

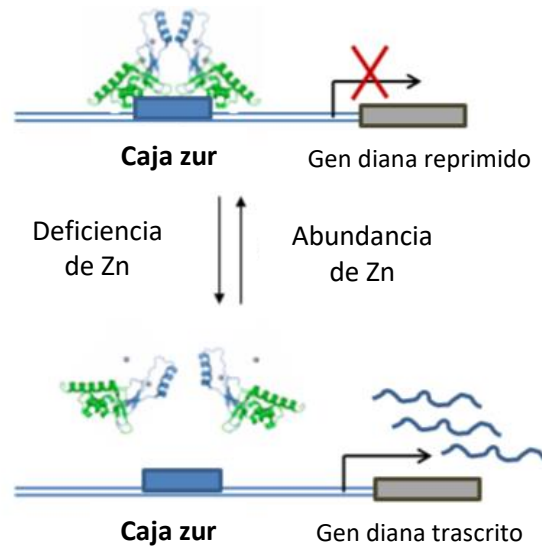


Figura 3. Mecanismo de acción de Zur. Se muestra el funcionamiento del represor bajo la suficiencia de zinc. La holoproteína se une a las cajas Zur presentes en sus dianas, bloqueando el acceso a la ARN polimerasa. Cuando hay escasez de zinc, el co-represor se disocia y provoca un cambio conformacional en la proteína que reduce su afinidad por el ADN. Tomado de Sevilla, Bes, Peleato y Fillat (30).

Las proteínas Zur se encuentran muy extendidas en las bacterias y han sido estudiadas en diversas especies bacterianas. Por ejemplo, en *Mycobacterium smegmatis*, Zur y SmtB son importantes reguladores del metabolismo del zinc (33). En *Acinetobacter baumannii*, Zur es crítico para la respuesta ante la limitación de zinc mediada por el hospedador, que es necesaria para el crecimiento de patógenos dentro del hospedador (34). En *Vibrio cholerae*, dos grupos de genes, *znuABC* y *zrg*, codifican sistemas de transporte de zinc regulados por Zur (35).

En el caso de *Streptomyces coelicolor*, en la proteína Zur cristalizada se encontraron dos sitios que censan el zinc por cada monómero, lo que permite la modulación sutil de la unión de Zur al ADN como respuesta a la concentración de zinc. En *Bacillus subtilis* se encontró que el par de dímeros 2Zn-2Zur, se activa secuencialmente de un estado parcialmente activo, luego asimétrico con 3Zn-2Zur, a totalmente activo con una conformación 4Zn-2Zur. En la proteína Zur de esta bacteria, iones Zn^{2+} adicionales ocupan dos sitios “regulatorios” que tienen sensibilidad a este ión en cantidades sub-fentomolares (6).

Las proteínas Zur también desempeñan un importante papel en la patogenicidad bacteriana. En *E. coli* uropatógena, Zur regula el sistema de captura de zinc de alta afinidad TroCBA y la chaperona metálica putativa YciC, junto con ZinT y ZnuABC para la supervivencia en condiciones de zinc limitado (36). En *Enterococcus faecalis*, la interacción entre la homeóstasis del cobre y del zinc se controla mediante el regulador transcripcional Zur (37).

La proteína Zur se encuentra como un dímero que posee dos dominios: el N-terminal, con una estructura alfa-hélice que se une al ADN y el C-terminal con estructura triple de hojas beta plegadas, donde se lleva a cabo la dimerización. De la misma manera que otros miembros de la familia FUR, los dímeros de Zur presentan dos conformaciones: abierta, con una baja afinidad al ADN; y cerrada, con alta afinidad por el ADN (38). Como la mayoría de los parálogos de Fur, Zur posee al menos dos sitios de unión de metales por monómero. El sitio 1, con función estructural, conformados por cuatro cisteínas correspondientes al motivo altamente conformado CXXC. El sitio 2, con función reguladora, conformado comúnmente por dos histidinas junto con una cisteína y un aminoácido ácido. Otro sitio adicional se ha encontrado en otras proteínas Zur, cuya función podría ser estabilizar la estructura del dímero, censar el equilibrio en la concentración del Zn^{2+} y el estado redox (30).

Kandari, *et al* (39), estudiaron en *E. coli* los promotores de los genes diana, que codifican proteínas reguladoras de Zn²⁺, tienen una secuencia rica en AT de 30 pb llamada caja Zur, que se superpone con su región promotora. Sin embargo, Sevilla, *et al* (30), mencionan que las cajas Zur consisten en una secuencia rica en AT, casi palíndrome de 21 a 23 pares de bases de longitud.

Se muestra en la **Tabla 1** las características principales de las proteínas Zur cristalizadas relevantes para este trabajo, entre ellas se remarcán las similitudes típicas que existen entre este tipo de reguladores transcripcionales, como los sitios N-terminal y C-terminal con sus motivos característicos, como las hélices aladas y la región tipo bisagra. Posteriormente, se mencionarán las proteínas de las alfa-proteobacterias utilizadas en el alineamiento de secuencias múltiples.

Modelo	M.O.	Dominio de unión a DNA	Dominio de dimerización	Conformación oligomérica
4MTD (40)	<i>Escherichia coli</i>	Motivo HTH. Interactúa con los surcos mayor y menor del ADN.	Unido al N-terminal por una hélice alada.	Dímero de dímeros.
2O03 (41)	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	Tres α -hélices seguidas de una lámina β bicatenaria antiparalela. Motivo de hélice alada con un haz de tres hélices (H1, H2 y H3).	Tres hebras β antiparalelas (S3, S4 y S5) y una hélice α larga (H4) estabilizada por uno de los sitios de unión a metales.	3 iones metálicos 1 en la bisagra 2 dominio de dimerización.

7NE9 (42)	<i>Synechococcus marenigrum</i>	Hélice alada que media la interacción con el ADN.	Unido al N-terminal por una bisagra. Posee 2 sitios de unión a metales.	Dímero.
3MWM (43)	<i>Streptomyces coelicolor</i>	Motivo de hélice alada consiste en un has trilobulado y una hoja bicatenaria.	2 dos dominios forman el núcleo dimérico.	Hay tres sitios de unión de zinc en cada monómero de ScZur: sitio 1 (M), sitio 2 (C) con 4 cisteínas y sitio 3 (D).
7DH8 (44)	<i>Xanthomonas campestris</i>	Cuatro hélices α y una horquilla β .	Comprende una hoja β de tres hebras y una larga hélice α .	Dos dominios conectados por una bisagra parcialmente flexible.

Tabla 1. Características principales de las proteínas Zur cristalizadas relevantes para este trabajo.

b. Específicos

G. diazotrophicus Pal5 es una alfa-proteobacteria, cuyo genoma fue totalmente secuenciado, revelando dos proteínas FUR, denominadas WP_012224654.1 y WP_012554056.1, codificadas por los genes GDI_1398 y GDI_1248 respectivamente (7).

En el laboratorio de Fisiología Microbiana de la Interacción Microorganismo – Hospedero del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas (ICUAP) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla (BUAP), se ha iniciado el estudio de los dos reguladores transcripcionales Fur, mencionados anteriormente,

presentes en *G. diazotrophicus* Pal5, para conocer el papel que éstos tienen en el estilo de vida de este organismo.

García (45), analizó el operón *feuABC* de *G. diazotrophicus* Pal5, el cual está relacionado con un sistema de transporte de hierro tipo ABC, constituido por una proteína de unión a periplasma (PBP), una permeasa y una ATPasa codificada por los genes *feuA*, *feuB* y *feuC* respectivamente. Realizó un análisis con la herramienta Clustal Omega donde evidenció una caja Fur putativa con una identidad del 57% con la caja Fur de *E. coli*.

Pérez (46), utilizando la herramienta bioinformática de NCBI, *Conserved Domain Database*, sugirió que la proteína Fur1398 de *G. diazotrophicus* Pal5 tiene dos sitios de unión a metal y un sitio estructural afín al zinc. Así mismo, mostró que esta proteína interactúa con el Co^{2+} y Mn^{2+} promoviendo la formación de dímeros; sin embargo, también se observa una conformación dimérica y trimérica cuando interactúa con Fe^{2+} y Zn^{2+} , demostrando que la presencia del hierro es indispensable para la conformación del estado oligomérico y que el Zn^{2+} es necesario para la estabilización de la conformación.

Roldán (47), clonó en el vector de expresión *pEXP5CT* el gen GDI_1248 de la cepa *G. diazotrophicus* Pal5 y lo transformó en *E. coli* BL21 *pLys*. Realizó la purificación de la proteína reguladora GDI_1248 recombinante para analizar el efecto del estado oligomérico de la proteína bajo diferentes condiciones como fuerza iónica, iones metálicos divalentes y agentes oxidantes y reductores.

Onofre (12), realizó análisis *in silico* y comparó los motivos de unión al hierro la proteína reguladora GDI_1248 con otras proteínas Fur de diferentes proteobacterias, hizo una complementación del gen GDI_1248 en la cepa de *E. coli* H1780 *fur* y determinó la funcionalidad de la cepa complementada haciendo análisis fenotípicos en la cepa de *E. coli* H1780 con el vector de expresión *pEXP5CT*:GDI_1248.

Después de realizar el modelaje de la proteína utilizando el programa ITASSER, sugiere que la proteína codificada por el gen GDI_1248 de *G. diazotrophicus* es muy similar a la proteína Zur de *E. coli* y diferente a la proteína Fur del mismo microorganismo. A su vez, propone que la cepa complementada HF1248 presenta mayor protección contra el estrés oxidativo cuando es expuesta a una concentración de 55 μM de ZnSO_4 , que a la misma concentración de FeSO_4 , lo cual indicó la posibilidad de que la proteína sea un regulador del zinc en lugar de hierro (12).

IV. Planteamiento del problema

El zinc y el hierro son elementos esenciales necesarios para la supervivencia de todos los microorganismos, pero su exceso es letal, por lo que es necesario regular su concentración intracelular. Para llevar a cabo esta tarea, los microorganismos expresan genes que sintetizan reguladores transcripcionales de la familia FUR, como Fur y Zur, los cuales funcionan como sensores del exceso o la escasez de los iones metálicos Fe^{2+} y Zn^{2+} respectivamente.

G. diazotrophicus es una bacteria endófito que se encuentra en una amplia gama taxonómica de plantas hospederas ricas en azúcar y posee mecanismos importantes como la fijación de nitrógeno (10), estimulación el crecimiento de plantas mediante la producción de fitohormonas como el ácido indol acético, producción de metabolitos antimicrobianos que afectan el crecimiento de hongos fitopatógenos (48), entre otros más. Por todas estas cualidades, *G. diazotrophicus* Pal5 se ha considerado como potencial biofertilizante que ayuda en la promoción del crecimiento vegetal y como método de biocontrol efectivo, evitando el uso de pesticidas químicos.

El propósito de esta tesis de investigación es analizar diversas secuencias de proteínas Zur presentes en diferentes bacterias utilizando herramientas bioinformáticas. Se busca identificar el grado de homología y los motivos

conservados con respecto al producto de expresión del gen GDI_1248, la proteína reguladora GDI_1248 en *G. diazotrophicus* Pal5. Además, se pretende observar las diferencias entre los sitios de unión del ligando respectivo a la proteína recombinante y los diferentes tipos de enlaces que forman. Todo esto permitirá sugerir el papel que estos sitios tienen en la modificación de la conformación de la proteína reguladora GDI_1248 y su interacción con el ADN de los genes diana.

Para los estudios experimentales que se realizaron en el laboratorio de fisiología microbiana, se reactivó la cepa *E. coli* BL21 *pLys pEXP5-CT1248*, se analizó la presencia del gen GDI_1248 en el vector de expresión *pEXP5CT* mediante la enzima de restricción *AvaI*, se indujo la expresión de la proteína reguladora GDI_1248 con IPTG 0.1 mM y se detectó mediante Western Blot; técnicas que permitieron el adiestramiento en el laboratorio.

V. Objetivos

a. General

Analizar por herramientas bioinformáticas la proteína reguladora GDI_1248 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 y su reactivación en la cepa *E. coli pEXP5CT:GDI_1248*.

b. Específicos

- Determinar la presencia y viabilidad del plásmido *pEXP5-CT* que contiene el gen GDI_1248 en la cepa *E. coli* BL21 *pLys*.
- Inducir y detectar la proteína reguladora GDI_1248 recombinante en la cepa *E. coli* BL21 *pLys pEXP5-CT1248* utilizando IPTG 0.1mM y analizar por Western Blot.
- Analizar bioinformáticamente la secuencia aminoacídica de la proteína reguladora GDI_1248 y compararla con las secuencias de proteínas Zur de otros grupos bacterianos.

- Realizar un docking con la proteína reguladora GDI_1248 con los respectivos iones metálicos divalentes Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} y Ca^{2+} .
- Realizar un docking con la proteína 4MTD de *E. coli* con los respectivos iones metálicos divalentes Fe^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} y Ca^{2+} .

VI. Material y métodos

a. Material biológico

En la **Tabla 2** se enlista las características fenotípicas de la cepa y del plásmido que se utilizaron durante la realización de este trabajo.

Cepa / Plásmido	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i> BL21 pLys pEXP5-CT1248	<i>E. coli</i> BL21 pLys con el plásmido pEXP5-CT:GDI_1248	(12)
pEXP5-CT / TOPO	Vector de expresión. Posee un tag de 6xHis, la cual permite la detección y purificación.	INVITROGEN

Tabla 2. Características fenotípicas de la cepa y plásmido que se utilizaron en este trabajo.

Para la reactivación de la cepa *E. coli* BL21 pLys pEXP5-CT1248 se preparó medio LB, en placa y en caldo, adicionado con los antibióticos Cloranfenicol (10 μ g/ml) y Ampicilina (100 μ g/ml), y se incubó a 37°C durante toda la noche.

b. Análisis experimentales

i. Extracción de ADN plasmídico

La extracción del plásmido se realizó a partir de las cepas que se encuentran almacenadas a -70°C en tubos con glicerol en el cepario del laboratorio de Fisiología Microbiana de la Interacción Microorganismo – Hospedero del Centro de

Investigación en Ciencias Microbiológicas de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Se tomaron 150 µL que fueron inoculados en tubos de ensayo con 5 mL de caldo LB adicionado con Ampicilina (Ap) y Cloranfenicol (Cm), incubándolos a 37°C durante toda la noche.

El ADN plasmídico de *E. coli BL21 pLys pEXP5-CT1248* se obtuvo a partir de un cultivo en caldo LB, adicionado con los antibióticos Ampicilina (Ap) y Cloranfenicol (Cm), de 12 horas a 37°C utilizando la técnica MiniPrep (Sambrook y cols., 2004) descrita en el **Anexo IV**. Posteriormente, se realizó una digestión enzimática según se describe en el **Anexo V**.

El ADN plasmídico y la digestión enzimática fueron analizadas mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% en buffer TAE 1X y ~80 V.

ii. Inducción con IPTG y la expresión de la proteína reguladora GDI_1248

Se realizaron ensayos con IPTG 0.1 mM a diferentes tiempos de incubación para determinar las condiciones óptimas para la mayor expresión de la proteína, **Anexo VI**.

iii. Western blot de las fracciones proteicas de la proteína reguladora GDI_1248 obtenidas de la inducción con IPTG

De los paquetes celulares que se obtuvieron de la inducción con IPTG 0.1mM a diferentes tiempos de incubación, se realizó una lisis celular (**Anexo VIII** y **Anexo IX**) y, posteriormente un gel de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) según se describe en el **Anexo X**, para separar las proteínas del sobrenadante.

Se hicieron dos geles idénticos. Uno se tiñó con azul de Coomassie y el otro se sumergió en solución de transferencia y se trató conforme indica el **Anexo XI**. Se utilizaron anticuerpos monoclonales anti-polihistidina fosfatasa alcalina. Para el revelado se utilizó el reactivo BCIP/NBT.

c. Análisis bioinformáticos

i. Análisis de la proteína reguladora GDI_1248

En la base de datos de NCBI, GeneBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), está disponible la secuencia completa del genoma de *G. diazotrophicus* Pal5; con el número de acceso NC_010125.1. El gen GDI_1248 codifica una proteína reguladora de 161 aminoácidos, tipo represor transcripcional con número de acceso WP_012554056.1.

Utilizando la herramienta HHpred, disponible en <https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred>, se realizó un análisis bioinformático para identificar las proteínas que tuvieran similitud con la proteína reguladora GDI_1248, realizar los alineamientos e identificar los sitios de unión a ADN, sitios de unión a metal y el sitio estructural con Zinc y, posteriormente, dar seguimiento a los resultados que se obtuvieron del docking.

ii. Predicción de la estructura 3D proteica

Mediante el uso del servidor ITASSER (Iterative Threading ASSEmbly Refinement), disponible en <https://zhanggroup.org/I-TASSER/>, se predijo la estructura 3D de la proteína reguladora GDI_1248.

ITASSER (62) predice la estructura 3D de un *query* a partir de su secuencia de aminoácidos basado en la alineación de estructuras secundarias, conocida como la técnica de plegamiento, buscando sus *templates* en la biblioteca de PDB.

iii. Docking de la proteína reguladora GDI_1248

Con el servidor MIB2: Metal Ion-Binding Site Prediction and Modelling (combio.life.nctu.edu.tw/MIB2/) se realizó el docking de la proteína reguladora GDI_1248 y la proteína 4MTD de *E. coli* con los iones metálicos Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} y Ca^{2+} .

MIB2 (49) proporciona un método preciso para buscar los residuos en los sitios de unión de iones metálicos mediante el método de transformación de fragmentos, utilizando la base de datos de estructuras proteicas AlphaFold para tomar información y realizar el acoplamiento de iones metálicos y predecir los residuos de unión.

VII. Resultados

a. Resultados experimentales

i. Extracción de ADN plasmídico de la cepa *E. coli* BL21 *pLys pEXP5-CT1248* y análisis por electroforesis.

Se utilizó la cepa *E. coli* BL21 *pLys pEXP5-CT1248*, generada en el laboratorio de Fisiología Microbiana de la Interacción Microorganismo – Hospedero del Centro de Investigación en Ciencias Microbiológicas del ICUAP, de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, mencionada en la **Tabla 2**.

Se reactivó la cepa *E. coli* BL21 *pLys pEXP5-CT1248* y se realizó la extracción del ADN plasmídico de según se indica en el **Anexo IV**. Posteriormente, se realizó una electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% para corroborar la presencia del plásmido que tenía insertado.

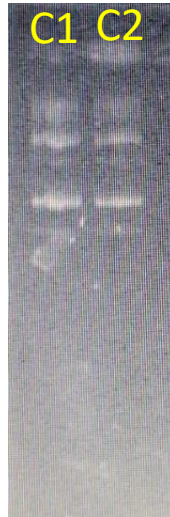


Figura 4. Análisis del ADN plasmídico obtenido de la cepa *E. coli* BL21 *pLys pEXP5-CT1248* en gel de agarosa 1%. C1: extracción de ADN plasmídico muestra 1. C2: extracción de ADN plasmídico muestra 2.

ii. Digestión enzimática con *Ava*I y *Eco*RI

Posterior a la extracción de ADN plasmídico, se realizó la digestión enzimática como se indica en el **Anexo V**. Se utilizaron las enzimas *Ava*I y *Eco*RI para confirmar la presencia del plásmido *pEXP5-CT1248*, así como su correcta orientación.

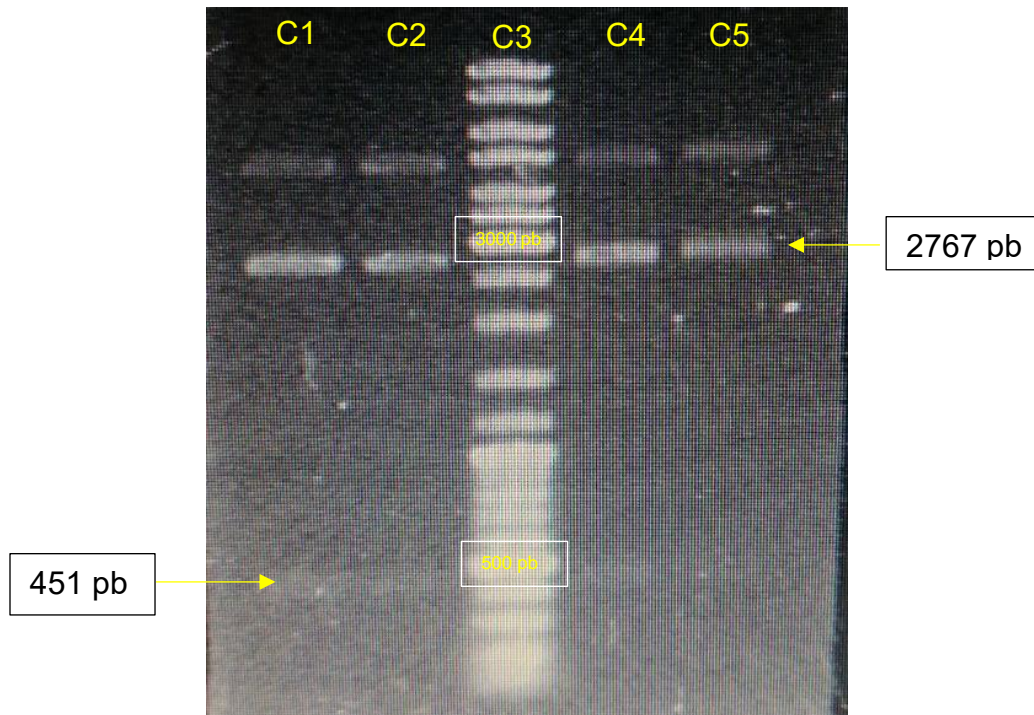


Figura 5. Digestión enzimática con *Ava*I en electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1%. La figura muestra los fragmentos de 2767 y 451 pb generados por la enzima de restricción *Ava*I. C1: *E. coli* BL21 *pLys pEXP5-CT1248* muestra 1 incubada por 90 minutos, C2: *E. coli* BL21 *pLys pEXP5-CT1248* muestra 2 incubada por 90 minutos, C3: Marcador de peso molecular 1kb-250pb, C4: *E. coli* BL21 *pLys pEXP5-CT1248* muestra 1 incubada por 120 minutos, C5: *E. coli* BL21 *pLys pEXP5-CT1248* muestra 2 incubada por 120 minutos. Resultados de digestión enzimática con *Eco*RI no se muestran.

iii. Inducción de la proteína reguladora GDI_1248 en la cepa *E. coli* BL21 *pLys pEXP5-CT1248* con IPTG

Para determinar las condiciones óptimas de la inducción de la proteína reguladora GDI_1248 recombinante se utilizó la concentración de 0.1 mM de IPTG, ya que estudios realizados anteriormente mostraron que con esta concentración se observó mayor expresión proteica (50), sin embargo, se probó el tiempo de incubación con el IPTG, tomando muestras cada hora hasta llegar a un tiempo final de 4 horas, obteniendo una máxima expresión a las 2 horas de haberse incubado como se aprecia en la **Figura 6**.

Los paquetes fueron lisados utilizando 50 μ L de SDS 0.1% y sonicándolas según las especificaciones dadas en el **Anexo IX**. Posteriormente, se tomaron muestras

de 15 μ L para analizar por SDS-PAGE, lo que permitió determinar las condiciones de sobreexpresión proteica, que son 0.1 mM de IPTG incubado a 37°C, 175 rpm por 180 minutos.

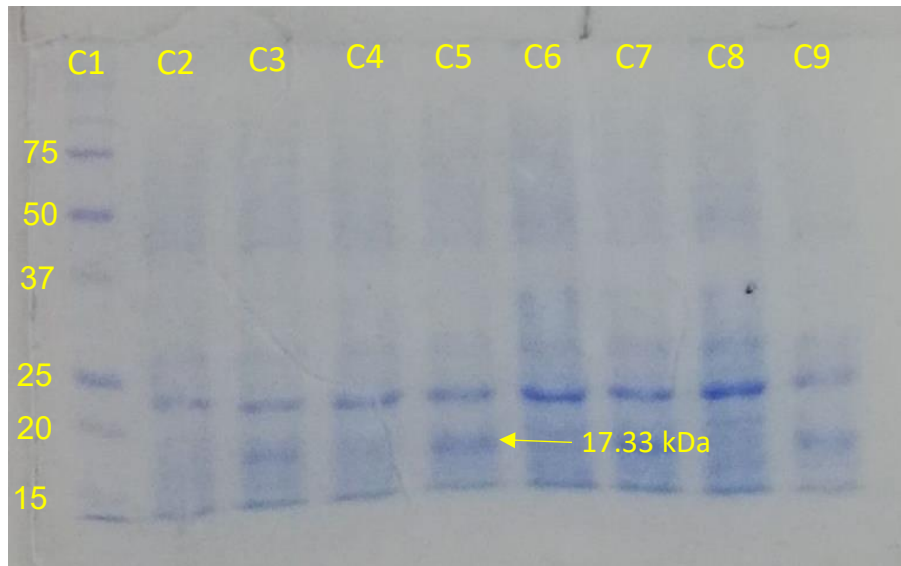


Figura 6. Análisis por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida al 12% de la inducción de la proteína reguladora GDI_1248 recombinante. En esta figura se observan los perfiles proteicos obtenidos de los diferentes tiempos de inducción con 0.1 mM de IPTG analizados en una SDS-PAGE 12%. C1: Marcador de peso molecular Precision Plus Protein BIORAD, C2: Sin inducir 1 hora, C3: Inducción con IPTG 0.1 mM a 1 hora, C4: Sin inducir 2 horas, C5: Inducción con IPTG 0.1 mM a 2 horas, C6: Sin inducir 3 horas, C7: Inducción con IPTG 0.1 mM a 3 horas, C8: Sin inducir 4 horas, C9: Inducción con IPTG 0.1 mM a 4 horas.

iv. Western blot de las fracciones proteicas de la proteína reguladora GDI_1248 con diferentes tiempos de inducción

Se identificó la proteína reguladora GDI_1248 mediante inmunodetección con anticuerpos anti-polihistidina conjugados a fosfatasa alcalina. Se corrieron dos electroforesis desnaturizantes al 12% de concentración de poliacrilamida bajo las mismas condiciones. Uno se tiñó con Azul de Coomassie, mientras que otro se reservó para realizar la transferencia a la membrana de nylon Hybond N+ y se dejó reaccionar al anticuerpo antipolihistidina acoplado a fosfatasa alcalina para finalmente, hacer el revelado con el reactivo NBT/BCIP (consultar **Anexo XI**). La reacción se observa como una serie de bandas color púrpura como se muestra en

la **Figura 8**. Se le realizó tinción con Azul de Coomassie al gel transferido como se observa en la **Figura 7**, indicando que se había realizado una exitosa transferencia a la membrana de Hybond N+.



Figura 7. Gel de poliacrilamida 12% teñido después de la transferencia a la membrana de nylon Hybond N+.

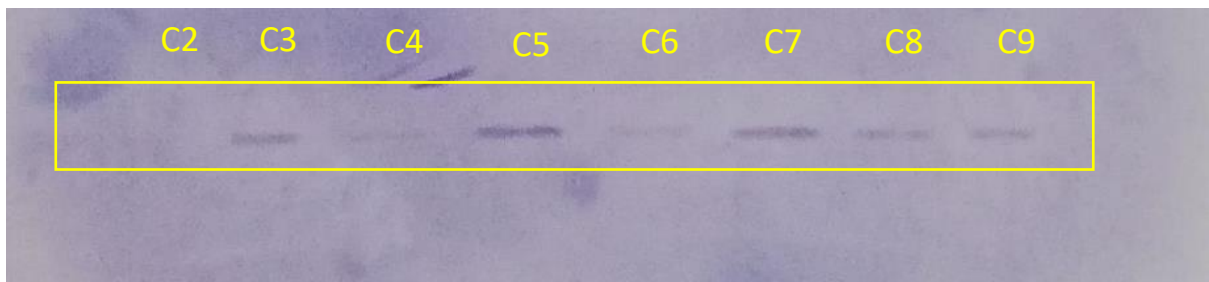


Figura 8. Análisis por Western blot de las fracciones proteicas. C2: Sin inducir 1 hora, C3: Inducción con IPTG 0.1 mM a 1 hora, C4: Sin inducir 2 horas, C5: Inducción con IPTG 0.1 mM a 2 horas, C6: Sin inducir 3 horas, C7: Inducción con IPTG 0.1 mM a 3 horas, C8: Sin inducir 4 horas, C9: Inducción con IPTG 0.1 mM a 4 horas. Bajo las condiciones experimentales llevadas a cabo, se observa que el tiempo óptimo de inducción es de 2 horas como se observa en el carril 5.

b. Resultados de bioinformática

i. Búsqueda de secuencias similares a la proteína reguladora GDI_1248

Para realizar la búsqueda de secuencias similares a la proteína reguladora GDI_1248 se utilizó la herramienta HHpred (<https://toolkit.tuebingen.mpg.de/tools/hhpred>) y se ingresó la secuencia de la proteína WP_012554056.1 (proteína reguladora GDI_1248). El alineamiento arrojó

varias proteínas con secuencias similares, sin embargo, se seleccionaron aquellas que específicamente eran clasificadas como proteínas Zur, las cuales se enlistarán a continuación con su número de acceso en PDB entre paréntesis:

- Regulador de la captura del Zinc en *E. coli* K-12 (4MTD)
- Regulador de la captura del Zinc en la cianobacteria marina *Parasynechococcus marenigrum* WH 8102 (7NE9)
- Regulador de la captura del Zinc en *S. coelicolor* (3MWM)
- Regulador de la captura del Zinc en *X. campestris* (7DH8)

Posteriormente, se procedió a realizar un alineamiento en Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) con las secuencias mencionadas previamente, así como con otras secuencias Zur de alfa-proteobacterias que se recuperaron de la base de datos de NCBI. El objetivo de este alineamiento fue analizar los sitios conservados que existen entre las secuencias de proteínas Zur.

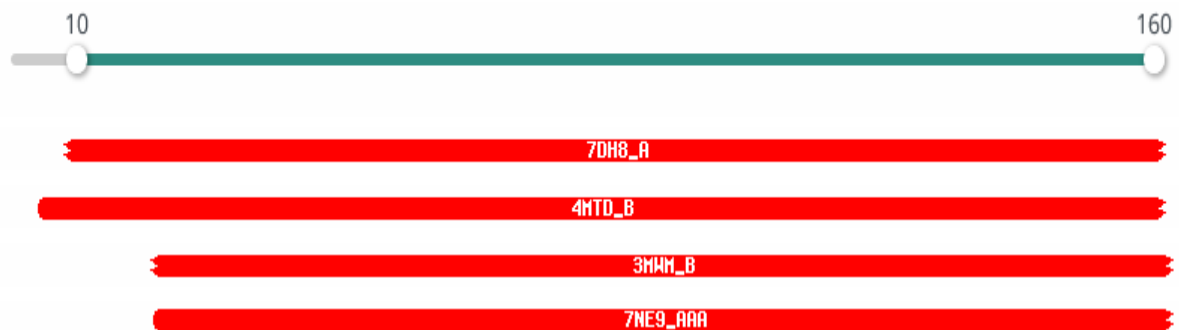


Figura 9. Resultado del análisis en HHpred. Se observan las secuencias proteicas mencionadas anteriormente con total del query que abarcan representado de manera gráfica, así como su número de acceso en PDB para próximas consultas.

Alineamiento y árbol filogenético

El alineamiento se realizó con la finalidad de determinar la homología entre los productos génicos involucrados en la regulación de la captura del zinc. Se utilizó la herramienta Clustal Omega, disponible en

<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>, y se obtuvo el resultado que se muestra en la **Figura 10**.

En el alineamiento se incluyeron las proteínas Zur de diferentes géneros bacterianos, algunos mencionados anteriormente *Escherichia coli* (4MTD), *Synechococcus marenigrum* (7NE9), *Streptomyces coelicolor* (3MWM) y *Xanthomonas campestris* (7DH8) junto con las proteínas Zur de las alfa-proteobacterias Gram negativas *Rhizobium leguminosarum* (KED73667.1), *Sinorhizobium meliloti* (CCM67686.1), *Agrobacterium tumefaciens* (WP_113157779.1), *Acinetobacter baumannii* (ADX01812.1), *Zimomonas mobilis* (AHJ71595.1) y *Rhodopseudomonas palustris* (QQM02016.1).

El resultado demuestra que, pese a que hay poca homología entre las secuencias, existen regiones altamente conservadas de aminoácidos que conforman el sitio de unión a ADN en el extremo N-terminal y el sitio de dimerización en el extremo C-terminal.

En la **Figura 10** se muestra en el recuadro azul los aminoácidos involucrados en el sitio de unión a ADN y, en el recuadro rojo, los aminoácidos relacionados en el sitio de dimerización.

CLUSTAL O(1.2.4) multiple sequence alignment



Figura 10. Alineamiento realizado con la herramienta Clustal Omega. En la figura se presentan los alineamientos de secuencias de aminoácidos de diversos grupos bacterianos utilizados para este estudio, donde se puede observar los aminoácidos que se encuentran conservados en mayor o menor grado presentes en el sitio de interacción con el ADN y en el sitio de oligomerización. En el recuadro azul se indican las secuencias conservadas relacionadas al sitio de unión al ADN. En el recuadro rojo se indican las secuencias conservadas involucradas en el sitio de unión a metales.

El árbol filogenético se construyó basándose en el alineamiento realizado en Clustal Omega. El análisis de la filogenia nos indica que la proteína reguladora GDI_1248

posee mayor cercanía evolutiva con la proteína Zur de la alfa-proteobacteria *A. baumannii*. A su vez, ambas proteínas poseen alta cercanía evolutiva con Zur de *E. coli*.

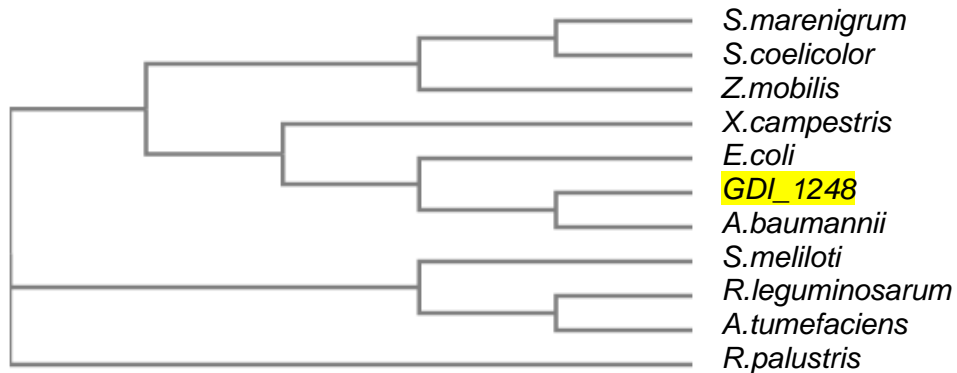


Figura 11. Árbol filogenético de la proteína reguladora GDI_1248 de *G. diazotrophicus* Pa15 con las secuencias de aminoácidos de las proteínas Zur de *S. marenigrum*, *S. coelicolor*, *Z. mobilis*, *X. campestris*, *E. coli*, *A. baumannii*, *S. meliloti*, *R. leguminosarum*, *A. tumefaciens* y *R. palustris*.

ii. Modelado de la proteína reguladora GDI_1248

El modelado de la proteína se llevó a cabo con la herramienta bioinformática ITASSER debido a su precisión al predecir estructuras 3D (calificada como número 1 según CASP15), accesibilidad y facilidad de uso.

Se ingresó la secuencia de la proteína reguladora GDI_1248 mencionada a continuación y se obtuvo tanto la estructura secundaria y terciaria, entre otros resultados relevantes que se mencionarán.

Query de la proteína reguladora GDI_1248

```
>WP_012554056.1 (proteína reguladora GDI_1248) transcriptional repressor
[Gluconacetobacter diazotrophicus]
MTGLSFADRTETWLADNERLCAARGSRITDLRRQVLGLVLDAGRPGVAYDLLDG
LRTDKKSAAPPTVYRALDFLLEQGLIHKIERLSAFVGCTHALDGTACGDHPHAQ
FLICTGCGQVTELDHGHILHALVDATRTIGFTVRHSTVEAEGLCACRDAA
```

Estructura secundaria de la proteína reguladora GDI_1248

En esta predicción hecha por ITASSER se clasifican a los aminoácidos dependiendo si formarán parte de las alfa-hélices, las hojas beta-plegadas o las colas. Este servidor indica que mientras más cercano a 10 sea el score, la predicción será más precisa. En el *query* que fue ingresado, la mayoría de los aminoácidos tienen una calificación cercana a 10, por lo que podríamos asumir que es confiable.

	20	40	60		
Sequence	MTGLSFADRTETWLDNAERLCAARG SRLTDLRRQVLGLVLDAGRPVGAYDLLDGLRDTKKS AAPPTVYRALDFLLEQ				
Prediction	CCCCC HHHHHHHHHHHHHHHHHHH CCCCC HHHHHHHHHHH CCCCC CCCCC HHHHHHHHH C				
Conf. Score	99987216699999999999999869997999999999998279899999999999868998824598999999988				
	H:Helix; S:Strand; C:Coil				
	80	100	120	140	160
	GLIHKIERLSAFV GCTHALDGTRACGDHPHAAQFLICTGCGQVTELD DHGILHALVDATRTIGFTVRHSTVEA EGLCAACRDAA				
	CCSSSS CCCCCCCCC C H H C C C C C C C C C C C S S S C C C C C S S S C C C C H H H H H H H H H H C C C S S S C C S S S S S C H H H H C C				
	99899821687421111122025677888778746989999988855746999999999759989231899999997763447				

Figura 12. Estructura secundaria de la proteína reguladora GDI_1248 predicha por ITASSER. Se observan las colas, representadas por la letra C; las alfa-hélices con una H y las hojas beta-plegadas con una S.

Plantillas usadas para predecir la estructura 3D

ITASSER determinó una serie de 10 plantillas que fueron identificadas por LOMETS en la biblioteca de PDB, produciendo miles de alineamientos de plantillas; sin embargo, ITASSER sólo usa las de mayor importancia según el Z-score que obtengan.

El Z-score debe calificarse mayor a 1 para demostrar que hay un buen alineamiento entre el query y el template; si éste es menor nos indica que el alineamiento es deficiente. En nuestras secuencias alineadas sólo hay dos que se encuentran por debajo de 1: 7KFOA y 7ML0W.

Rank	PDB Hit	Iden1	Iden2	Cov	Norm. Z-score	Download Align.
1	4mtdA	0.43	0.41	0.91	2.85	Download
2	7kfoA	0.11	0.18	0.75	0.84	Download
3	7dh7	0.44	0.42	0.91	1.94	Download
4	2fe3	0.23	0.22	0.88	1.75	Download
5	4mtdA	0.43	0.41	0.91	3.48	Download
6	2fe3	0.23	0.22	0.86	2.49	Download
7	4mteA	0.43	0.41	0.91	3.18	Download
8	4mtdA	0.43	0.41	0.91	4.35	Download
9	7ml0W	0.15	0.26	0.81	0.76	Download
10	4mtdA	0.43	0.41	0.91	4.79	Download

Figura 13. Top 10 de plantillas usadas para predecir la estructura 3D. Se observa que 8 de 10 obtuvieron una calificación mayor a 1 en el Z-score (las únicas excepciones son las cepas 2 y 9), lo cual nos indica un buen alineamiento entre las secuencias.

Modelo final predicho por ITASSER de la proteína reguladora GDI_1248 de *G. diazotrophicus* Pal5

ITASSER realiza 5 modelos finales de los cuales, en la **Figura 14**, se muestra el modelo de la estructura 3D predicho con el mejor C-score (0.18) cuyo rango es -5 a 2 y, mientras mayor sea el puntaje obtenido, la figura predicha es más confiable. Así mismo, se consideró la puntuación del TM-score (0.74±0.11) utilizada por el servidor para ofrecer mayor confiabilidad en el modelo. En la **Figura 15**, se muestra la plantilla (proteína 4MTD) utilizada para la elaboración del modelo 3D de la proteína reguladora GDI_1248.

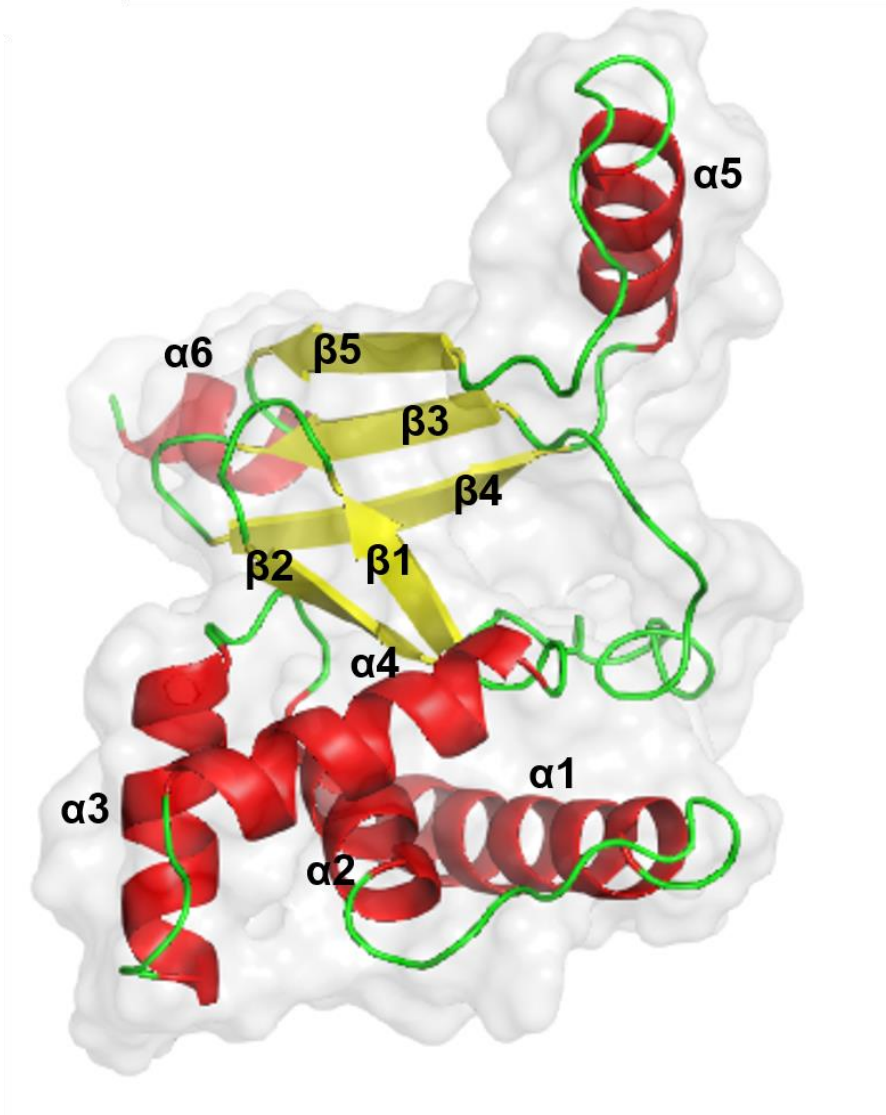


Figura 14. Modelo 3D de la proteína reguladora GDI_1248 de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. La hélice $\alpha 4$ es una hélice putativa, la zona $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 3$, $\beta 4$ y $\beta 5$ pertenece al sitio de unión al metal (zinc), la zona $\alpha 2$ y $\alpha 3$ corresponde al sitio de unión a DNA y la zona $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\beta 1$ y $\beta 2$ corresponde a un sitio de unión a metal. Información obtenida de la base de datos Conserved Domain Database. Color rojo representa alfa hélices, amarillo representa hojas beta plegadas y verde representa colas y giros.

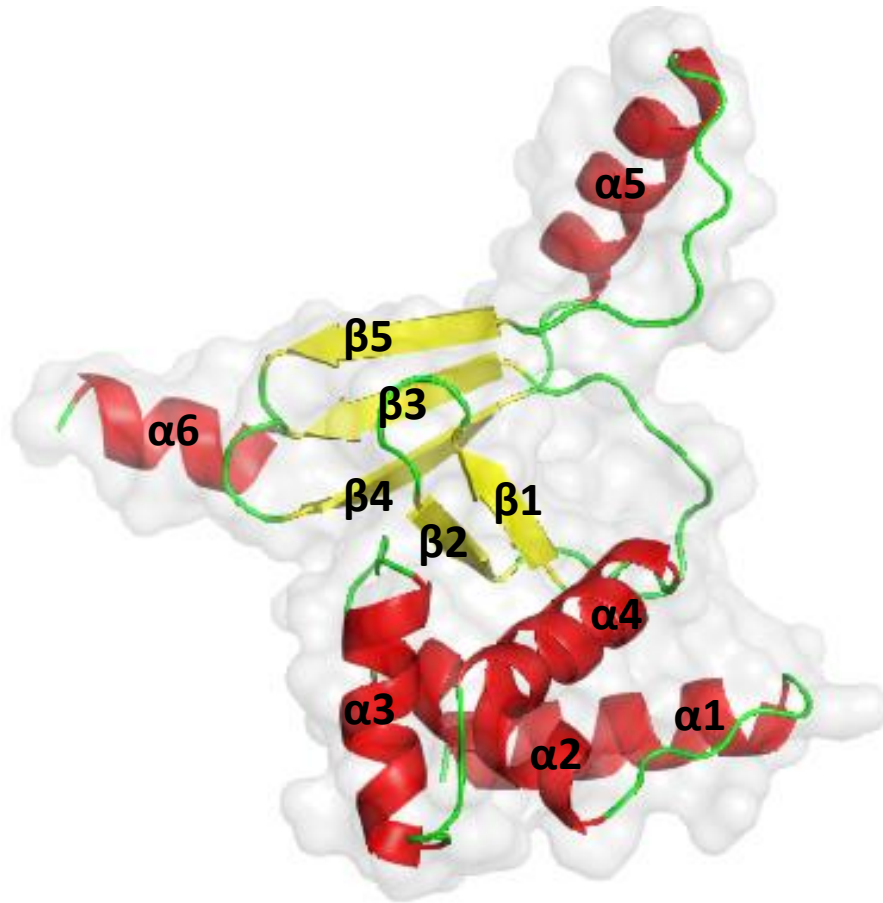


Figura 15. Modelo de la proteína 4MTD de *E. coli* K-12. Adaptada de Gilston (40). Color rojo representa alfa hélices, amarillo representa hojas beta plegadas y verde representa colas y giros.

iii. Sitios de unión y oligomerización de la proteína reguladora GDI_1248

La **Figura 16** representa la superposición de la proteína 4MTD de *E. coli* con la proteína reguladora GDI_1248 de *G. diazotrophicus* Pal5, lo que nos permite observar la similitud cercana que hay entre ambas, así como inferir los aminoácidos que están involucrados en la interacción con un ion metálico divalente. Dicha semejanza conformacional fue predicha por ITASSER; sin embargo, en un alineamiento realizado con la plataforma BlastP (**Figura 18**) se sugiere como la secuencia proteica con mayor porcentaje de identidad (43.92%). Más adelante se adjunta un alineamiento de secuencias realizado con la herramienta Clustal Omega

entre 4MTD y la proteína reguladora GDI_1248 (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) (Figura 17).

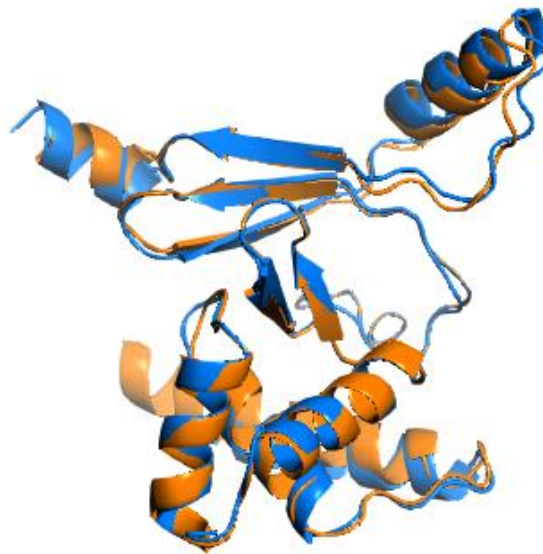


Figura 16. Superposición de la proteína reguladora GDI_1248 (naranja) de *G. diazotrophicus* Pal5 con 4MTD (azul) de *E. coli* K-12.

```

pdb|4MTD|A      ---MEKTTTQELLAQAEKICAQRNVRLTPORLEVLRLMSLQDGAISAYDLLDLLREAE 56
WP_012554056.1 MTGLSFADRTEWLDNAERLCAARGSLTDLRRQVLGLVLDAGRVPVGAYDLLDGLRTDKK 60
                *: * :*:*:** * ** * :* * : . :.***** * * ;

pdb|4MTD|A      QAKPPTVYRALDFLLEQGFVHKVESTNSYVLCHLF-----DQPTHTSAMFICDRCGAV 109
WP_012554056.1 SAAPPTVYRALDFLLEQGLIHKIERLSAFVGCTHALDGTACGDHPHAAQFLICTGCGQV 120
                .* *****:***: * :*: * .: * : * : * : * : * : *

pdb|4MTD|A      KEECAEGVEDIMHTLAAKMGFALRHNVIEAHGLCAACVEVEACRHPQCQHDHSVQVKKK 169
WP_012554056.1 TELDDHGILHALVDATRTIGFTVRHSTVEAEGLCACRDAA----- 161
                .* *: . : : :*:*:*:*:*:***** :.

pdb|4MTD|A      PR 171
WP_012554056.1 -- 161

```

Figura 17. Alineamiento de las secuencias de aminoácidos de la proteína reguladora GDI_1248 de *G. diazotrophicus* Pal5 y 4MTD de *E. coli* K-12. Asteriscos: aminoácidos altamente conservados/idénticos, dos puntos/un punto: aminoácidos similares/sustituciones.

Description							
<input checked="" type="checkbox"/>	Chain A, Transcriptional regulator fur family [Xanthomonas campestris pv. campestris str. 8004]						
<input checked="" type="checkbox"/>	Zinc Uptake Regulator Complexed With Zinc AND DNA [Escherichia coli K-12]						
<input checked="" type="checkbox"/>	The crystal structure of bacillus subtilis PerR-Zn reveals a novel Zn(Cys)₄ Structural redox switch [Bacillus subtilis]						
<input checked="" type="checkbox"/>	Structural basis for peroxide sensing and gene regulation by PerR from Streptococcus pyogenes. [Streptococcus pyoge...						
<input checked="" type="checkbox"/>	The crystal structure of PerR-Ox highlights 2-oxo-Histidine formation [Bacillus subtilis]						

Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
Xanthomonas ca...	125	125	93%	1e-36	42.76%	170	7DH7_A
Escherichia coli K...	118	118	91%	8e-34	43.92%	171	4MTD_A
Bacillus subtilis	44.7	44.7	82%	8e-06	25.56%	145	2FE3_A
Streptococcus py...	41.2	41.2	81%	2e-04	20.45%	163	4I7H_A
Bacillus subtilis	38.5	38.5	82%	0.001	22.86%	145	2RGV_A

Figura 18. Resultado del BlastP. Se observan las secuencias de aminoácidos de proteínas cristalizadas con el porcentaje de similitud que tienen con la proteína reguladora GDI_1248. 4MTD es la que tiene un mayor porcentaje de identidad con la proteína reguladora GDI_1248, confirmando el resultado obtenido con ITASSER, en donde esta obtuvo el mayor z-score, razón por la que fue utilizada para modelar la proteína reguladora GDI_1248.

En la base de datos *Conserved Domain Database* se muestran los dominios conservados de la proteína reguladora GDI_1248 de *G. diazotrophicus* Pal5. En la **Figura 19**, se puede apreciar una hélice putativa de unión al ADN entre los aminoácidos 63 a 77, la interfase del dímero entre el 113 al 153; así como dos sitios de unión a metal, el primero del 106 al 146, el segundo del 45 al 122, y el sitio de unión a metal correspondiente Zn^{2+} con función estructural corresponde al rango 114 a 154.

Gilston (40) menciona que el sitio en el cual el Zn^{2+} se une a la proteína Zur es en 4 cisteínas: 103, 106, 143 y 146; mientras que en el docking realizado se indican los sitios cisteína 114,117, 154 y 157.

La **Figura 19**, muestra que la proteína pertenece a la super familia HTH (tiene dominios hélice-giro-hélice), es decir, funciona con dominios de unión al ADN.

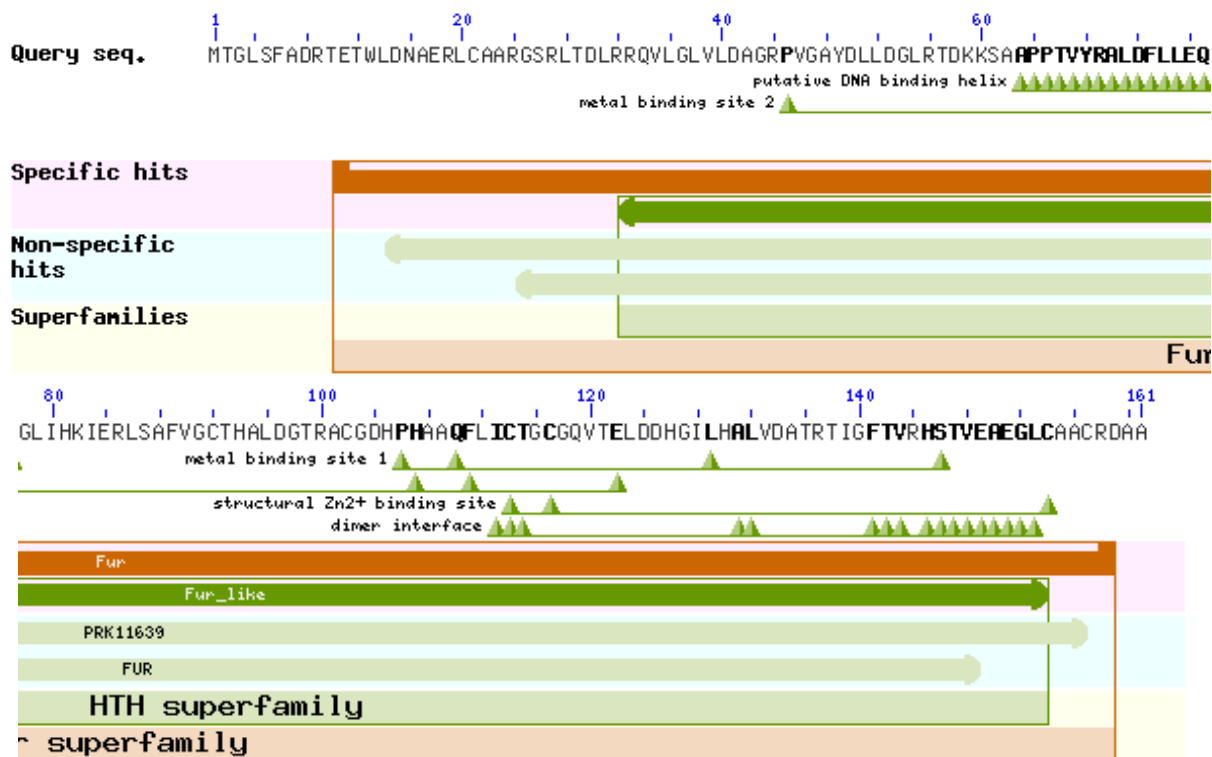


Figura 19. Dominios conservados de la proteína reguladora GDI_1248 de *G. diazotrophicus* Pa15.

iv. Docking

Se utilizó el servidor MIB2 para realizar el docking de la proteína reguladora GDI_1248 y la proteína 4MTD frente a los iones metálicos divalentes Zn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} y Ca^{2+} , de tal manera que fuese posible comparar los sitios de unión y el tipo de enlace que se desarrolla en cada complejo proteína-ligando.

Este servidor aprovecha el método de transformación de fragmentos para llevar a cabo una comparación local entre las plantillas de residuos de unión entre residuos metálicos y la proteína para posteriormente, asignar una puntuación al alineamiento, estableciendo un umbral que deberá ser superado por los residuos de unión a metales.

En la **Figura 20**, se ve representada la interacción entre el ligando Zn^{2+} y la proteína reguladora GDI_1248, el cual tuvo un score de 4.075, siendo el mayor. Los residuos de unión son 4 cisteínas en las posiciones 114, 117, 154 y 157, el tipo de unión es similar a lo que menciona Gilston (40) en la **Figura 21**.

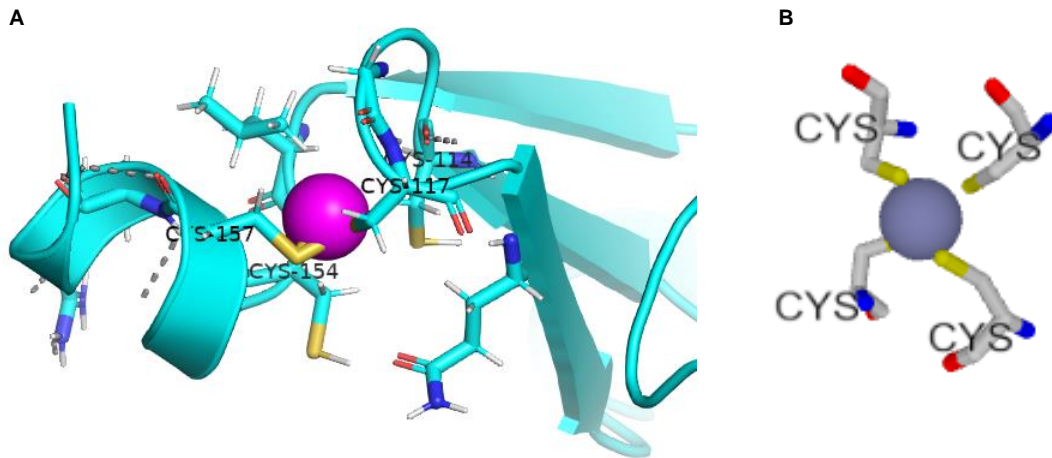


Figura 20. A. Docking de la proteína reguladora GDI_1248 con Zn^{2+} . B. Tipo de enlace que se forma entre el Zinc y los residuos de cisteína de la proteína reguladora GDI_1248. Se pueden apreciar los sitios de unión de la proteína con el Zn^{2+} en los residuos de cisteína 114, 117, 154 y 157 ("sticks"). El ion metálico Zn^{2+} se encuentra representado en color lila.

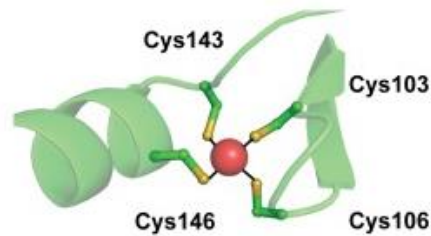


Figura 21. Coordinación del ligando para el sitio de zinc rico en azufre (ion metálico Zn^{2+} mostrado en rojo) de *E. coli*. Tomado de Gilston (40).

En la **Figura 22**, se representa la interacción entre el ligando Fe^{2+} y la proteína reguladora GDI_1248; mientras que la **Figura 23** sirve como un comparativo de como la proteína Zur de *E. coli* (4MTD) interactúa con el mismo ión metálico, dejando ver que éste no se une al "sitio catalítico" de la proteína y, por lo tanto, esto podría afectar su función. El mismo comportamiento se observó cuando se realizó

el análisis en los resultados obtenidos con las siguientes parejas de figuras: **Figura 24** y **Figura 25** representando el docking con Co^{2+} , **Figura 26** y **Figura 27** representando el docking con Mn^{2+} y **Figura 28** y **Figura 29** representando el docking con Ca^{2+} .

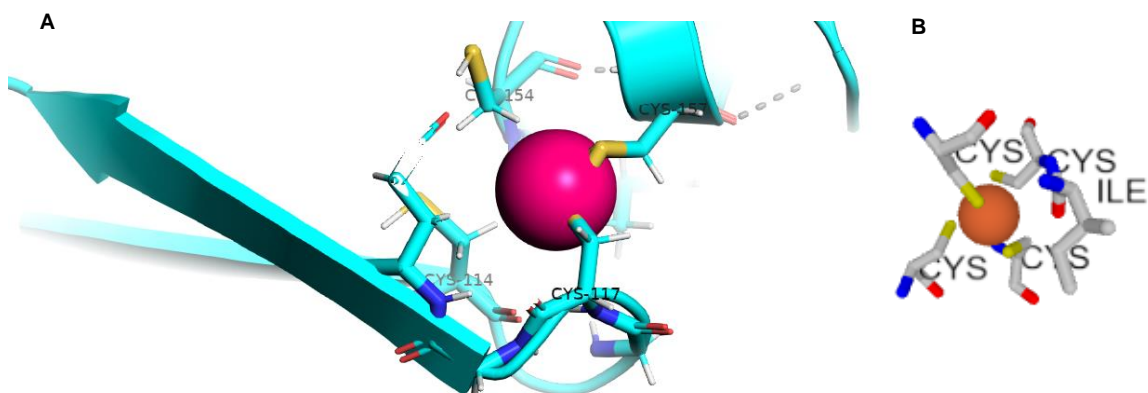


Figura 22. A. Docking de la proteína reguladora GDI_1248 con Fe^{2+} . B. Tipo de enlace que se forma entre el Hierro y los residuos de cisteína e isoleucina (114C, 117C, 154C, 157C) de la proteína reguladora GDI_1248. Se pueden apreciar los sitios de unión de la proteína con el Fe^{2+} en los residuos de cisteína 114, 117, 154 y 157. El Fe^{2+} se encuentra representado en color magenta.

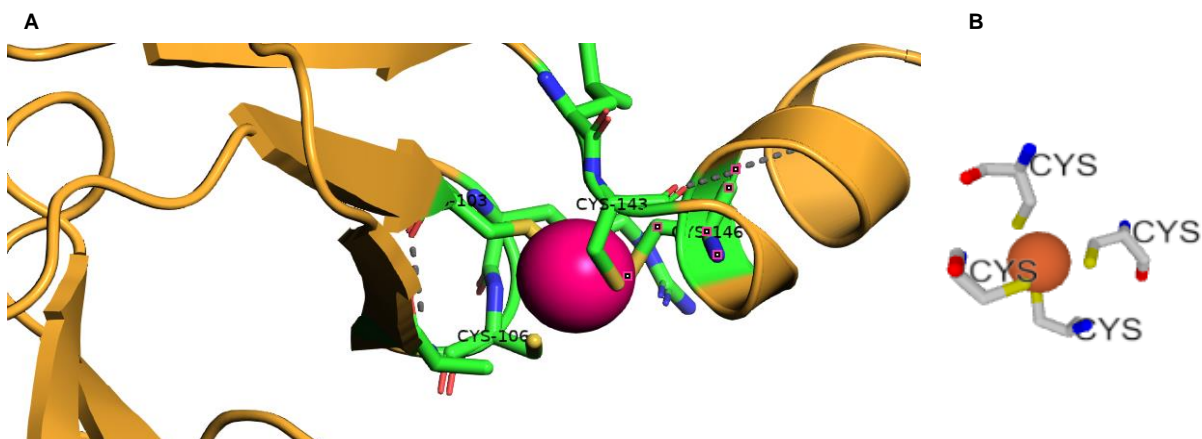


Figura 23. A. Docking de 4MTD con Fe^{2+} . B. Tipo de enlace que se forma entre el Hierro y los residuos de cisteína (103C, 106C, 143C, 146C) de 4MTD. Se pueden apreciar los sitios de unión de la proteína con el Fe^{2+} en los residuos de cisteína 103, 106, 143 y 146. El ion metálico Fe^{2+} se encuentra representado en color magenta.

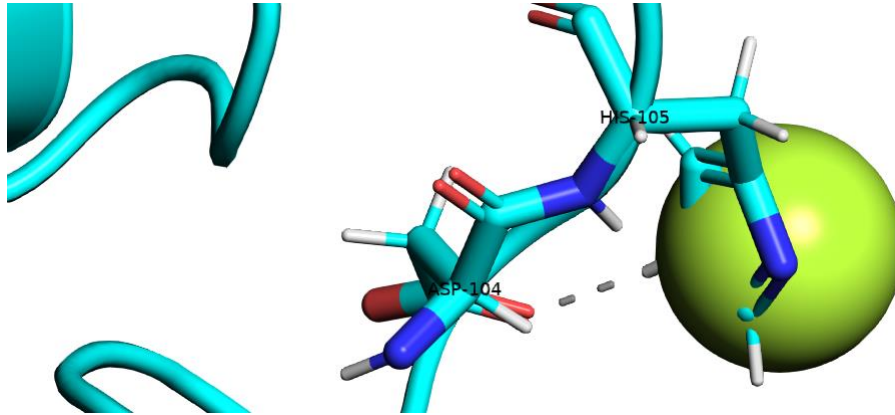


Figura 24. Docking de la proteína reguladora GDI_1248 con Co^{2+} . Se pueden apreciar los sitios de unión de la proteína con el Co^{2+} en los residuos de residuos de aspartato e histidina (104D, 105H). El ion metálico Co^{2+} se encuentra representado en color verde.

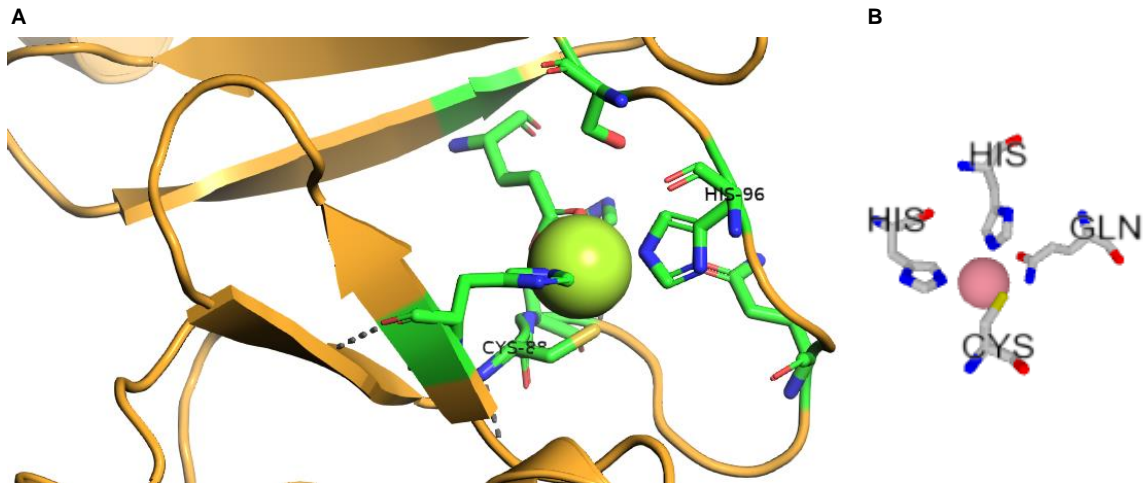


Figura 25. A. Docking de 4MTD con Co^{2+} . B. Tipo de enlace que se forma entre el Cobalto y los residuos de cisteína e histidina (88C, 96H) de 4MTD. Se pueden apreciar los sitios de unión de la proteína con el Co^{2+} en los residuos de residuos de cisteína e histidina (88C y 96H). El ion metálico Co^{2+} se encuentra representado en color verde.

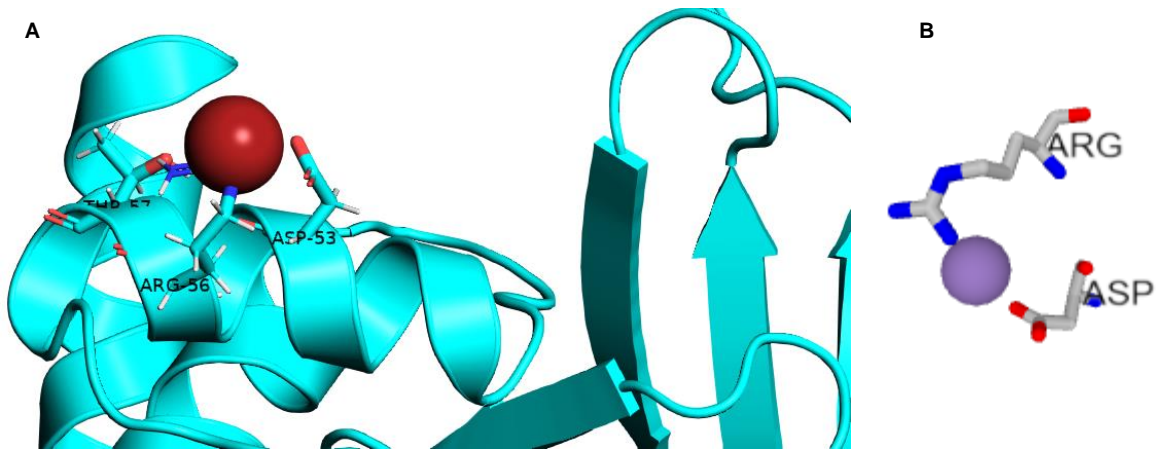


Figura 26. A. Docking de la proteína reguladora GDI_1248 con Mn^{2+} . B. Tipo de enlace que se forma entre el manganeso y los residuos de arginina y aspartato (53D, 57T) de la proteína reguladora GDI_1248. Se pueden apreciar los sitios de unión de la proteína con el Mn^{2+} en los residuos de residuos de arginina y aspartato (53D y 57T). El ion metálico Mn^{2+} se encuentra representado en color rojo.

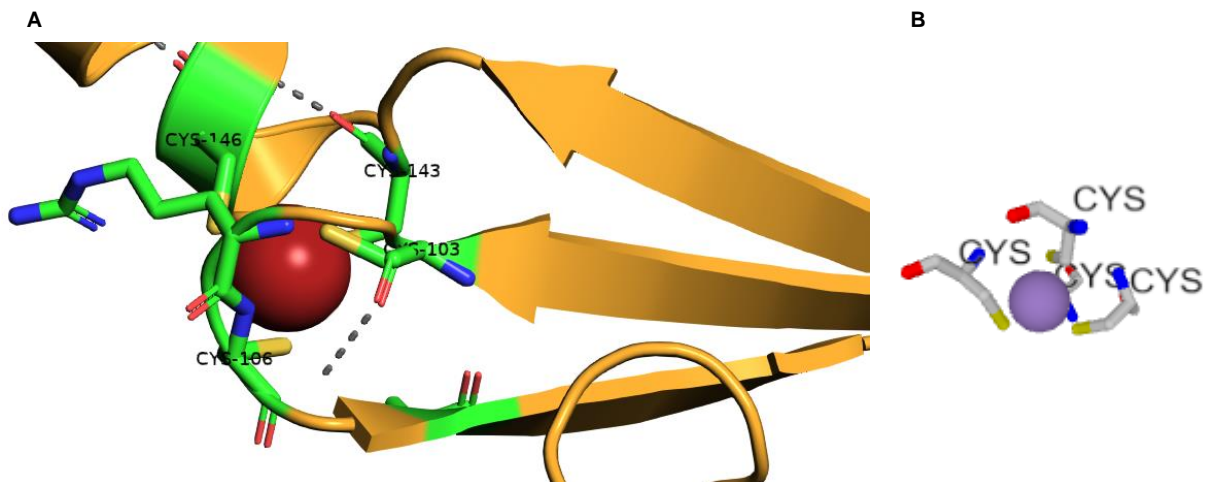


Figura 27. A. Docking de 4MTD con Mn^{2+} . B. Tipo de enlace que se forma entre el manganeso y las cisteínas (103C, 106C, 143C, 146C) de 4MTD. Se pueden apreciar los sitios de unión de la proteína con el Mn^{2+} en los residuos de residuos de cisteína (103C, 106C, 143C y 146C). El ion metálico Mn^{2+} se encuentra representado en color rojo.

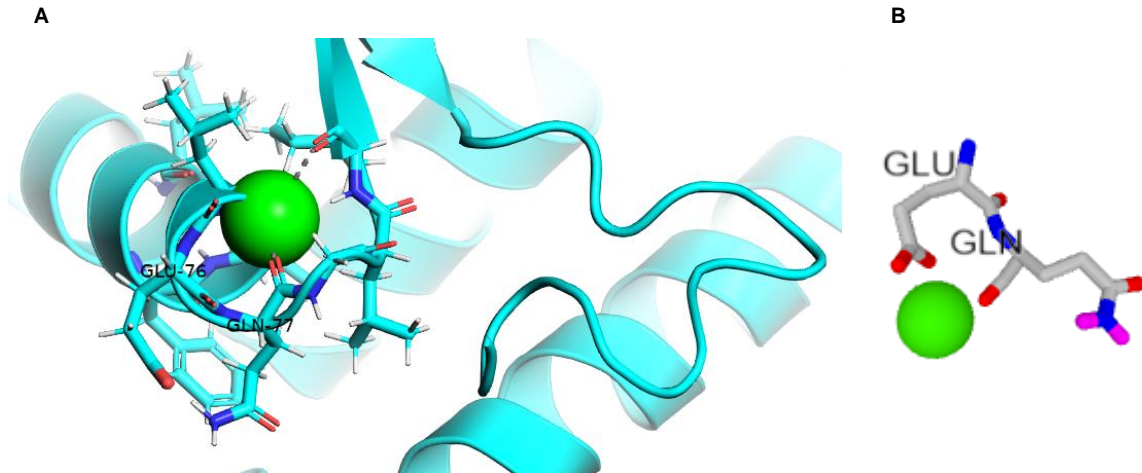


Figura 28. A. Docking de la proteína reguladora GDI_1248 con Ca^{2+} . B. Tipo de enlace que se forma entre el Calcio y los residuos de ácido glutámico y glutamina (76E, 77Q) de la proteína reguladora GDI_1248. Se pueden apreciar los sitios de unión de la proteína con el Ca^{2+} en los residuos de residuos de ácido glutámico y glutamina (76E y 77Q). El ion metálico Mn^{2+} se encuentra representado en color verde.

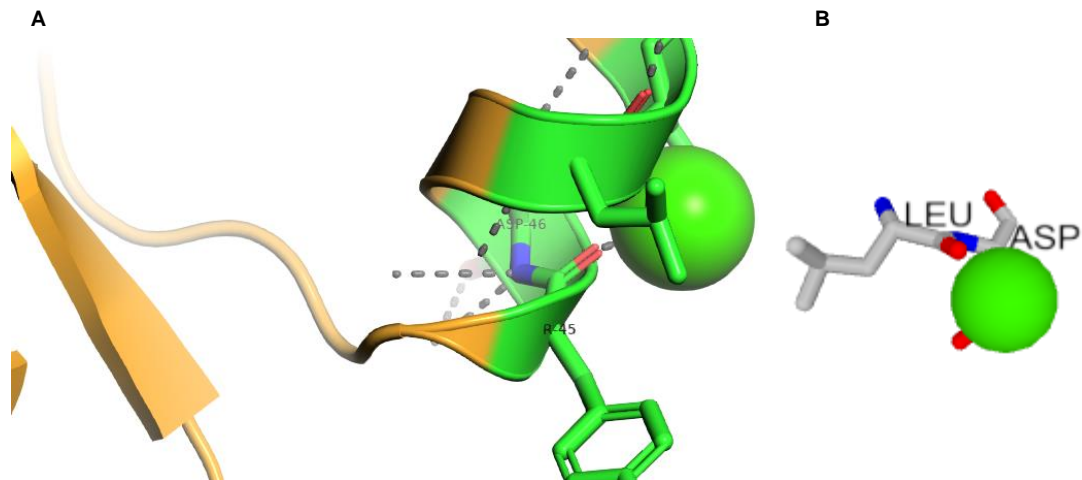


Figura 29. A. Docking de 4MTD con Ca^{2+} . B. Tipo de enlace que se forma entre el Calcio y los residuos de leucina y aspartato (45R, 46D) de 4MTD. Se pueden apreciar los sitios de unión de la proteína con el Ca^{2+} en los residuos de residuos de leucina y aspartato (45R y 46D). El ion metálico Mn^{2+} se encuentra representado en color verde.

VIII. Discusión

El hierro es el cuarto metal más abundante en el suelo, es altamente reactivo y versátil para unirse con otras moléculas como centro catalítico o acarreador de electrones. (5, 6). El zinc se encuentra presente como catalizador en la mayoría de

las reacciones hidrolíticas, estabiliza proteínas y dominios proteicos, pues evita el desplegamiento de éstos; contribuye a regular el estado redox del entorno y es un componente estructural de la RNAPolimerasa (6, 18). Juega un papel muy importante para la actividad de varias enzimas y es incorporado en proteínas involucradas en el mantenimiento celular y supervivencia (51, 52), incluido como componente estructural de los factores transcripcionales (53, 54). Ambos metales son micronutrientes esenciales para los microorganismos, sin embargo, cuando se encuentran en exceso pueden ser dañinos para las células, como en el caso del zinc, el cual utiliza el sitio activo de las proteínas que no lo contienen y conduce a la generación de especies reactivas de oxígeno (51, 52), por lo que debe ser regulado finamente.

De manera experimental se realizó la reactivación del plásmido *pEXP5-CT1248* transformado en la cepa de *E. coli BL21 pLys* por Roldán (47). Como se ilustra en la **Figura 4**, se aprecia que en el gel de agarosa al 1% se encuentran 3 bandas prominentes, las cuales representan tres conformaciones, súper enrollada, relajada y lineal, las cuales tienen el mismo número de pares de bases; sin embargo, al estar en diferentes conformaciones, ocupan un volumen efectivo diferente, lo que las hace migrar de manera distinta a lo largo del gel. Este hecho es causado por el súper enrollamiento natural que existe en el ADN causando por la enzima girasa (topoisomerasa tipo II). Al ser las moléculas súper enrolladas más compactas, se les facilitará más migrar por el gel, de modo que serán las que se aprecian más abajo en el corrimiento, seguidas por relajadas y finalmente, las lineales (55).

Posteriormente, se hizo una digestión enzimática con *AvaI* y *EcoRI* (resultados de *EcoRI* no mostrados), para corroborar que el ADN plasmídico *pEXP5-CT1248* no se hubiese perdido en el periodo de almacenamiento de la cepa y estuviera insertado en la orientación correcta. El objetivo de realizar digestiones enzimáticas con el ADN plasmídico utilizando enzimas de restricción como lo son *AvaI* y *EcoRI*, es generar fragmentos de restricción específicos que puedan utilizarse para la clonación u otras aplicaciones futuras.

En la **Figura 5**, se observan los fragmentos de 2767 y 451 pb generados por la enzima *Ava*I, cuyos tamaños fueron sugeridos de manera bioinformática por Roldán (47). La enzima *Ava*I genera dos cortes y permite comprobar la orientación correcta de la construcción del plásmido; mientras que la enzima *Eco*RI linealiza el plásmido (resultados no mostrados).

Una vez que se había corroborado que la construcción de la proteína reguladora GDI_1248 contenida en el plásmido se encontraba sin alteración, se procedió a realizar los ensayos para determinar la cinética de la inducción utilizando IPTG al 0.1mM. Los resultados se muestran en la **Figura 6**, en la cual se puede apreciar que la condición en la que la proteína se encuentra a mayor concentración es a las 2 horas. Esto únicamente basándonos en el grosor de la banda que presentaba el peso molecular predicho por Roldán (47) que era de 17.33 kDa al momento de hacer la tinción del gel con Azul de Coomassie; además, el análisis realizado por Roldán (47) demostró que el tiempo de incubación con el inductor en el que la proteína se expresó en mayor cantidad fue a las 2 horas.

Para finalizar con los ensayos experimentales y, con el objetivo de comprobar que la proteína reguladora GDI_1248 recombinante era aquella que se sobrepresó con el inductor, se realizó un Western blot o inmunodetección con anticuerpos anti-poli-histidina acoplados a fosfatasa alcalina. En la **Figura 8**, se ven representadas únicamente las bandas moradas equivalentes a la proteína de interés. Éstas se logran apreciar en todos los carriles donde se corrieron los lisados de las cepas inducidas con el IPTG 0.1 mM en diferentes tiempos de incubación (C3, C5, C7 y C9) y que se encuentran expresadas en cantidades superiores a diferencia de las cepas no inducidas, ya que en la bacteria se encuentra el vector con la construcción que expresa la proteína reguladora GDI_1248 recombinante a niveles endógenos (56). Esto se ve reflejado en el grosor de las bandas (C3, C5, C7 y C9), ya que las bandas que representan las muestras que fueron inducidas se observan más gruesas o marcadas. Es importante mencionar que la intensidad de la banda en un

Western blot podría utilizarse para estimar la cantidad relativa de la proteína de interés en cualquier muestra; sin embargo, es importante aclarar que la intensidad de la banda puede no ser siempre proporcional a la cantidad de proteína presente en la muestra. Factores como la eficiencia de la transferencia de proteínas, la sensibilidad de los reactivos de detección y la saturación del sistema de detección pueden influir en la intensidad de la banda. Por lo tanto, es recomendable utilizar una curva de calibración estándar para cuantificar con precisión la cantidad de proteína presente por muestra (57, 58).

De manera bioinformática se llevaron a cabo, principalmente, 3 técnicas bioinformáticas, el modelado 3D de la proteína reguladora GDI_1248, el alineamiento múltiple de secuencias y el docking de la proteína reguladora GDI_1248 y 4MTD contra diferentes los iones metálicos divalentes Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} y Ca^{2+} .

La proteína reguladora GDI_1248 posee un porcentaje de identidad del 43.92% por la proteína Zur de *E. coli* K-12 (4MTD), **Figura 18**, lo cual podría parecer poco, sin embargo; este dato es de utilidad puesto que, extrapoliándolo al modelado de la proteína, sabiendo que 4MTD es una proteína que ha sido cristalizada por Gilston (40) es la fuente más confiable para hacer la comparación. En la **Figura 10**, se resaltan en los recuadros azul y rojo los sitios de unión a ADN y dimerización, respectivamente, pues se puede apreciar que estas secuencias están altamente conservadas en las diferentes proteínas. Es importante resaltar que pueden haber 2 sitios de unión a metal, el primero posee un motivo rico en histidinas (HHXHXXCXXC) que se encuentra altamente conservado y se ve involucrado en la oligomerización de las proteínas; el segundo, es un motivo tipo CXXC que se encuentra menos conservado (algunos microorganismos no lo poseen), sin embargo, poseen otros aminoácidos como ácido glutámico, ácido aspártico e histidinas que sustituyen la función de la cisteína, realizando así la unión a los iones metálicos (71).

El árbol filogenético hecho a partir de un alineamiento realizado en la herramienta Clustal Omega, proporciona diferentes tipos de información sobre las relaciones evolutivas entre las secuencias analizadas, por ejemplo: identificación de relaciones evolutivas, estimación de distancias evolutivas, identificación de regiones conservadas, identificación de dominios funcionales e identificación de eventos de duplicación génica (60). En la **Figura 11** podemos observar las secuencias que se encuentran con mayor cercanía evolutiva entre ellas y las que se han visto mayormente distanciadas.

El alineamiento que se muestra en la **Figura 17** donde se observa que ambas proteínas poseen varios aminoácidos conservados y altamente conservados, además de bastantes deleciones y sustituciones.

El análisis de los dominios conservados de la proteína, que se muestra en la **Figura 19**, definió el contexto genético que sugiere que la proteína reguladora GDI_1248 pertenece a la superfamilia HTH, es decir que cuenta con dominios hélice-giro-hélice (dominios de unión específica al ADN orientado hacia el extremo N-terminal y, hacia el C-terminal poseen sitios de unión a metales).

Posteriormente, en la **Figura 14**, se muestra el modelo 3D de la proteína reguladora GDI_1248 predicho por ITASSER, mientras que en la **Figura 15** se muestra la estructura de 4MTD. Si se analizan detenidamente, es posible observar la gran similitud que hay entre ambos modelos, lo cual es correspondiente al parecido que hay entre ambas proteínas.

A su vez, en la **Figura 16** se muestra la sobreposición de ambas proteínas dejando ver que tienen sitios de unión en común entre ellas, además de ser casi idénticas estructuralmente hablando. Dichos sitios de unión al zinc son observables en el docking que se muestra en la **Figura 20**. Según Gilston (40) existen dos sitios de unión de Zn^{2+} en cada monómero de Zur, en el sitio A (**Figura 21**) se encuentra unido a 4 átomos de azufre de Cys103, Cys106, Cys143 y Cys146, mientras que en

el sitio B está unido a los residuos His77, Cys88, His96 y Glu111. Esto se puede observar en la realización del docking, pues obtuvimos similares a lo mencionado anteriormente puesto que el sitio de unión coincide de manera muy parecida entre ambas proteínas. También podemos observar que el zinc se unió al sitio de unión a metal Zn^{2+} que se ve representado en la **Figura 20**.

En las **Figuras 22, 24, 26 y 28**, se pueden observar los demás docking que se realizaron entre la proteína reguladora GDI_1248 y Zn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} y Ca^{2+} , respectivamente.

En la **Figura 24A**, donde se aprecia el docking con Co^{2+} , los residuos de unión predichos (con mayor score=2.888) son 104D (ácido aspártico) y 105H (histidina) y en la **Figura 24B** el tipo de enlace que existe en el complejo. Luego en la **Figura 26A** se muestra el docking con Mn^{2+} , donde los residuos de unión con mayor score (2.965) son 53D (ácido aspártico) y 57T (treonina); en la **Figura 26B** se observa el tipo de enlace entre la proteína y su ligando. Para finalizar, en la **Figura 28A**, se observa el docking realizado contra Ca^{2+} , donde se obtuvo el score 2.376, con residuos de unión 76E (ácido glutámico) y 77Q (glutamina); mientras que en la **Figura 28B** se muestra el enlace formado para dicha conformación. Todos los docking realizados se pueden consultar en el siguiente link: <http://combio.life.nctu.edu.tw/MIB2/structure/c28984df608156a9e6ffc4b2f7a1a578>

—

En las **Figuras 23, 25, 27 y 29** se observan los demás docking realizados entre 4MTD Zn^{2+} , Fe^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} y Ca^{2+} , respectivamente, los cuales sirven como punto de comparación para analizar las interacciones que existen entre las dos proteínas con los iones metálicos diferentes al Zinc.

En dichas figuras se puede observar que el tipo de enlaces es diferente al que se forma cuando el ligando es zinc, además de que se presenta en diferentes residuos que no son los establecidos ya como sitios de unión o sitio activo en la proteína.

Como se menciona anteriormente, debido a que la proteína cristalizada con mayor similitud a la proteína reguladora GDI_1248 fue 4MTD y que se utilizó como plantilla para realizar el modelo 3D de Fur, sabemos que el sitio de unión A al Zinc consta de los residuos de azufre de Cys103, Cys106, Cys143 y Cys146 y el sitio de unión B está unido a los residuos His77, Cys88, His96 y Glu111 en 4MTD (40); y que en la proteína reguladora GDI_1248 el zinc se une a los residuos de cisteína 114, 117, 154 y 157, cuya posición es muy similar a la de los aminoácidos de la proteína 4MTD de *E. coli*. Por lo tanto, en el caso del docking con Fe²⁺, tiene como residuos de unión a metales cisteína 114, 117, 154 y 157 con un score de 4.372, por lo que cabría la posibilidad de que también pudiera unirse a este metal con una alta probabilidad; sin embargo el tipo de enlace entre el ligando y la proteína (**Figura 23**) es bastante diferente al que se formaría con zinc y que, es idéntico al formado entre 4MTD y la proteína reguladora GDI_1248, dando las evidencias para decir que la proteína reguladora GDI_1248 es una proteína Zur expresada por el gen GDI_1248 en *G. diazotrophicus* Pal5. Todos los docking realizados se pueden consultar en el siguiente link: <http://combio.life.nctu.edu.tw/MIB2/structure/c2e0b3c20dce73e3d06537b20bb99a13>.

Como se mencionó anteriormente, las proteínas Zur son factores de transcripción que regulan la expresión de los genes implicados en la homeostasis del zinc en las bacterias. La unión del zinc a estos factores de transcripción es esencial para su funcionamiento y la oligomerización de la proteína con el ion zinc es importante en la regulación de la expresión génica en respuesta a cambios en la disponibilidad de zinc. El docking es una herramienta bioinformática utilizada para predecir la unión de dos moléculas, como una proteína con un ligando, pero también se puede utilizar para la predicción de sitios activos. Lin *et al* (49), desarrollaron un servidor de predicción de sitios de unión a iones metálicos llamado MIB, el cual proporciona un enfoque preciso e integrado para buscar los residuos en los sitios de unión a iones metálicos utilizando el método de transformación de fragmentos. MIB puede predecir residuos que se unen a 12 tipos de iones metálicos, incluido el zinc, que es

relevante para la oligomerización de la proteína Zur con el ion zinc. La precisión de MIB se evaluó utilizando un conjunto de datos de 100 proteínas de unión a iones metálicos, y los resultados mostraron que MIB alcanzó una precisión del 85,5% en la predicción de sitios de unión a iones metálicos (49). Sin embargo, Cole *et al.* (61) destacaron los principales problemas en la comparación de programas de acoplamiento proteína-ligando, que incluyen la precisión de la estructura de la proteína y la conformación del ligando, la dinámica de la proteína y el ligando, y la calidad de las estructuras de entrada. Por lo tanto, la precisión de los resultados de docking depende de la calidad de las estructuras de entrada, y la validación experimental es necesaria para confirmar los resultados de docking. Además, esta técnica no puede utilizarse por sí sola para determinar si una proteína es reguladora de la captación de zinc. Aunque los iones de zinc son importantes para la función de muchos factores de transcripción sensibles al zinc, como la proteína Zur, la presencia de un ion de zinc por sí sola no indica necesariamente que una proteína sea reguladora de la captura de zinc. Otros factores, como la estructura, la secuencia y los sitios de interacción de la proteína, también deben tenerse en cuenta para determinar su función (25, 61). Por lo tanto, es importante utilizar una combinación de enfoques experimentales y bioinformáticos para identificar y caracterizar los factores de transcripción sensibles al zinc y sus regulones (61).

IX. Conclusiones

- Se reactivó la cepa *E. coli* Bl21 pLys que contiene el plásmido *pEXP5-CT1248*.
- Se expresó la proteína reguladora GDI_1248 recombinante con el inductor IPTG (0.1 mM).
- Se confirmó la presencia de la proteína posterior a su inducción mediante inmunodetección.
- El modelo 3D de la proteína realizado con la herramienta bioinformática ITASSER, así como los alineamientos realizados sugirieron que ésta posee una alta similitud con la proteína Zur de *E. coli*.

- Los resultados de los análisis bioinformáticos realizados con la proteína reguladora GDI_1248 de *G. diazotrophicus* Pal5 y la proteína 4MTD de *E. coli* mostraron sitios comunes conservados en ambas proteínas prediciendo que la proteína reguladora GDI_1248 es una proteína Zur de la superfamilia FUR.

X. Perspectivas

- Analizar el comportamiento de la proteína reguladora GDI_1248 recombinante en presencia de los iones Zinc, Cobalto, Manganeso y Calcio en condiciones oxidantes y reductoras de manera experimental.

XI. Bibliografía

1. Muthukumarasamy R, Revathi G, Seshadri S, Lakshminarasimhan C. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. *Current Science*. 2002; 83(2): 137-145.
2. Ríos Y, Dibut B, Rojas M, Ortega M, Arozarena N, Rodríguez J. Interacción de la bacteria *Gluconacetobacter diazotrophicus* y hortalizas de raíz. *Cultivos tropicales*. 2016; 37(supl.1):28-32. doi: [10.13140/RG.2.1.2799.0640](https://doi.org/10.13140/RG.2.1.2799.0640)
3. Muñoz J, Caballero J. *Gluconacetobacter dizotrophicus*, modelo de bacteria endófito. En: Martínez E, Martínez JC, editores. *Microbios*. Universidad Autónoma de México. (2001) 157-176.
4. Coleman JE. Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annu Rev Biochem*. 1992; 61(1):897-946. doi: [10.1146/annurev.bi.61.070192.004341](https://doi.org/10.1146/annurev.bi.61.070192.004341)
5. Berg K, Pedersen HL, Leiros I. Biochemical characterization of ferric uptake regulator (Fur) from *Aliivibrio salmonicida*. Mapping the ADN sequence specificity through binding studies and structural modelling. *BioMetals*. 2020; 33(1): 169-185. doi: [10.1007/s10534-020-00240-6](https://doi.org/10.1007/s10534-020-00240-6)

6. Fillat MF. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: diversity and versatility of key transcriptional regulators. Arch Biochem Biophys. 2014; 15(546): 41-52. doi: [10.1016/j.abb.2014.01.029](https://doi.org/10.1016/j.abb.2014.01.029)
7. Bertalan M, Albano R, Pádua V, Rouws L, Rojas C, Hemerly A, et al. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. BMC Genomics. 2009; 10(1):450. doi: [10.1186/1471-2164-10-450](https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-450)
8. Ortíz MA, Hernández JE, Valenzuela B, De los Santos S, Rocha MC, Santoyo G. Diversidad de las bacterias endófitas cultivables asociadas a plantas de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) cv. Biloxi xon actividades promotoras del crecimiento vegetal. SciELO. 2018; 34(2). doi: [10.4067/S0719-38902018005000403](https://doi.org/10.4067/S0719-38902018005000403)
9. Pérez A, Chamorro L. Bacterias endófitas: Un nuevo campo de investigación para el desarrollo del sector agropecuario. Rev. Colombiana cienc. Anim. 2013; 5(2): 439-462. doi: [10.24188/recia.v5.n2.2013.457](https://doi.org/10.24188/recia.v5.n2.2013.457)
10. Hardoim PR, van Overbeek LS, Berg G, Pirttilä AM, Compant S, Campisano A, Döring M, Sessitsch A. The Hidden World within Plants: Ecological and Evolutionary Considerations for Defining Functioning of Microbial Endophytes. Microbiol Mol Biol Rev. 2015; 79(3):293-320. doi: [10.1128/MMBR.00050-14](https://doi.org/10.1128/MMBR.00050-14).
11. Pinsky A, Betekhtin A, Hupert K, Mur LAJ, Hasterok R. Defining the genetic basis of plant-endophytic bacteria interactions. Int J Mol Sci. 2019; 20(8). doi: [10.3390/ijms20081947](https://doi.org/10.3390/ijms20081947)
12. Onofre BL. Análisis funcional de la proteína Fur (GDI_1248) de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 [Tesis de maestría]. Puebla: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2019.
13. Kaul S, Sharma T, Dhar M. “Omics” tools for better understanding the plant-endophyte interactions. Front. Plant Sci. 2016; 7(955). doi: [10.3389/fpls.2016.00955](https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00955)
14. Gills M, Kersters K, Hoste B, Janssens D, Kroppenstedt RM, Stephan MP, et al. *Acetobacter diazotrophicus* sp. nov., a nitrogen-fixing acetic acid

- bacterium associated with sugarcane. Int. J. Syst. Bacteriol. 1989; 39(1): 361-364. doi: [10.1099/00207713-39-3-361](https://doi.org/10.1099/00207713-39-3-361)
15. Ríos Y, Dibut B. *Gluconacetobacter diazotrophicus*: un microorganismo promisorio en la elaboración de biopreparados. Cultivos tropicales. 2007; 28(4). Disponible en: <https://www.redalyc.org/comocitar.oa?id=193217894003>
 16. Aguado GA, Moreno B, Jiménez B, García E, Preciado RE. Impacto de los sideróforos microbianos y fitosideróforos en la asimilación de hierro por las plantas: una síntesis. Revista fitotecnia mexicana. 2012; 35(1). ISSN 0187-7380
 17. Harrington JM, Crumbliss. The redox hypothesis in siderophore-mediated iron uptake. Biometals. 2009; 22(4): 679-689. doi: [10.1007/s10534-009-9233-4](https://doi.org/10.1007/s10534-009-9233-4)
 18. Kandari D, Gopalani M, Gupta M, Joshi H, Bhatnagar S, Bhatnagar R. Identification, Functional Characterization, and Regulon Prediction of the Zinc Uptake Regulator (zur) of *Bacillus anthracis* – An Insight Into the Zinc Homeostasis of the Pathogen. Front. Microbiol. 2019; 9(3314). doi: [10.3389/fmicb.2018.03314](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03314)
 19. Cassamassimi A, Ciccodicola A. Transcriptional regulation: molecules, involved mechanisms and misregulation. Int J Mol Sci. 2019; 20(6):1281. doi: [10.3390/ijms20061281](https://doi.org/10.3390/ijms20061281)
 20. Martínez A, Collado J. Identifying global regulators in transcriptional regulatory networks in bacteria. Current Opinion in Microbiology. 2003; 6(5), 482–489. doi: [10.1016/j.mib.2003.09.002](https://doi.org/10.1016/j.mib.2003.09.002)
 21. Gottesman, S. Bacterial Regulation: Global Regulatory Networks. Annual Review of Genetics. 1984; 18(1), 415–441. doi: [10.1146/annurev.ge.18.12018](https://doi.org/10.1146/annurev.ge.18.12018)
 22. Baksh KA, Zamble DB. Allosteric control of metal-responsive transcriptional regulators in bacteria. J. Biol. Chem. 2020, 295(6):1673-1684. doi: [10.1074/jbc.REV119.011444](https://doi.org/10.1074/jbc.REV119.011444)

23. Gotte G, Libonati M. Protein oligomerization. En: Lesieur C, editor. Oligomerization of chemical and biological compounds. Intech Open. 2014, p.239-278. doi: [10.5772/57489](https://doi.org/10.5772/57489)
24. Hernández JA, López S, Muro A, Valladares A, Bes MT, Peleato ML y Fillat MF. Interaction of FurA from *Anabaena sp.* PCC7120 with ADN. A reducing environment and the presence of Mn²⁺ are positive effectors in the binding to *isiB* and *furA* promoters. *Biometals*. 2006; 19:259-268. doi: [10.1007/s10534-005-7750-3](https://doi.org/10.1007/s10534-005-7750-3).
25. Jung W, Sengupta K, Wendel BM, Helmann JD, Chen P. Biphasic unbinding of a metalloregulator from DNA for transcription (de)repression in Live Bacteria. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(5):2199–208. doi: [10.1093/nar/gkaa056](https://doi.org/10.1093/nar/gkaa056)
26. Latorre M, Quenti D, Travisany D, Singh KV, Murray BE, Maass A, et al. The role of fur in the transcriptional and iron homeostatic response of *Enterococcus faecalis*. *Front Microbiol.* 2018; 9(1). doi: [10.3389/fmicb.2018.01580](https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01580)
27. Escolar L, Pérez J, Lorenzo V. Opening the Iron Box: Transcriptional Metalloregulation by the Fur Protein. *J Bacteriol.* 1999; 181(20):6223-6229. doi: [10.1128/JB.181.20.6223-6229.1999](https://doi.org/10.1128/JB.181.20.6223-6229.1999)
28. Hernández JA, BES MT, Fillat MF, Neira JL, Peleato ML. Biochemical analysis of the recombinant Fur (ferric uptake regulator) protein from *Anabaena* PCC 7119: factors affecting its oligomerization state. *Biochem J.* 2002; 366(part 1): 315-322. doi: [10.1042/BJ20020135](https://doi.org/10.1042/BJ20020135)
29. Bosch M. Caracterización de los mecanismos de captación de hierro de *Pasteurella multocida* [Tesis de doctorado]. Bellaterra: Universidad Autónoma de Barcelona; 2003.
30. Sevilla E, Bes MT, Peleato ML, Fillat MF. Fur-like proteins: Beyond the ferric uptake regulator (Fur) paralog. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2021; 701. doi: [10.1016/j.abb.2021.108770](https://doi.org/10.1016/j.abb.2021.108770)
31. Berg K, Pedersen HL, Leiros I. Biochemical characterization of ferric uptake regulator (Fur) from *Aliivibrio salmonicida*. Mapping the ADN sequence

- specificity through binding studies and structural modelling. *Biometals*. 2020; 33(4): 169-185. doi:[10.1007/s10534-020-00240-6](https://doi.org/10.1007/s10534-020-00240-6)
32. Seung-Hwan C, Kang-Lok L, Jung-Ho S, Yoo-Bok C, Sun-Shin C, Jung-Hye R. Zinc-dependent regulation of zinc import and export genes by Zur. *Nature Communications*. 2017; 8:15812. doi: [10.1038/ncomms15812](https://doi.org/10.1038/ncomms15812)
33. Goethe E, Laarmann K, Lühns J, Jarek M, Meens J, Lewin A, et al. Critical Role of Zur and SmtB in Zinc Homeostasis of *Mycobacterium smegmatis*. *mSystems*. 2020;5(2). doi: [10.1128/mSystems.00880-19](https://doi.org/10.1128/mSystems.00880-19)
34. Mortensen BL, Rathi S, Chazin WJ, Skaar EP. *Acinetobacter baumannii* response to host-mediated zinc limitation requires the transcriptional regulator Zur. *J Bacteriol*. 2014;196(14):2616–26. doi: [10.1128/JB.01650-14](https://doi.org/10.1128/JB.01650-14)
35. Sheng Y, Fan F, Jensen O, Zhong Z, Kan B, Wang H, et al. Dual zinc transporter systems in *Vibrio cholerae* promote competitive advantages over gut microbiome. *Infect Immun*. 2015;83(10):3902–8. doi: [10.1128/iai.00447-15](https://doi.org/10.1128/iai.00447-15)
36. Chaoprasid P, Dokpikul T, Johnrod J, Sirirakphaisarn S, Nookabkaew S, Sukchawalit R, et al. *Agrobacterium tumefaciens* Zur regulates the high-affinity zinc uptake system TroCBA and the putative metal chaperone YciC, along with ZinT and ZnuABC, for survival under zinc-limiting conditions. *Appl Environ Microbiol*. 2016;82(12):3503–14. doi: [10.1128/AEM.00299-16](https://doi.org/10.1128/AEM.00299-16)
37. Latorre M, Low M, Gárate E, Reyes-Jara A, Murray BE, Cambiazo V, et al. Interplay between copper and zinc homeostasis through the transcriptional regulator Zur in *Enterococcus faecalis*. *Metallomics*. 2015;7(7):1137–45. doi: [10.1039/c5mt00043b](https://doi.org/10.1039/c5mt00043b)
38. Mikhaylina A, Ksibe AZ, Blindauer CA. Bacterial zinc uptake regulator proteins and their regulons. *Biochemical society transactions*. 2018; 46(4):983-1001. doi:[10.1042/bst20170228](https://doi.org/10.1042/bst20170228)
39. Kandari D, Joshi H, Bhatnagar R. Zur: Zinc-sensing transcriptional regulator in a diverse set of bacterial species. *Pathogens*. 2021; 10(3):344. doi: [10.3390/pathogens10030344](https://doi.org/10.3390/pathogens10030344)

40. Gilston BA, Wang S, Marcus MD, Canalizo-Hernández MA, Swindell EP, Xue Y, Mondragón A, O'Halloran TV. Structural and mechanistic basis of zinc regulation across the E. coli Zur regulon. PLoS Biol. 2014;12(11):e1001987. doi: [10.1371/journal.pbio.1001987](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001987).
41. Lucarelli D, Russo S, Garman E, Milano A, Meyer-Klaucke W, Pohl E. Crystal structure and function of the zinc uptake regulator FurB from Mycobacterium tuberculosis. J Biol Chem. 2007;282(13):9914–22. doi: [10.1074/jbc.M609974200](https://doi.org/10.1074/jbc.M609974200)
42. Mikhaylina A, Ksibe AZ, Wilkinson RC, Smith D, Marks E, Coverdale JPC, et al. A single sensor controls large variations in zinc quotas in a marine cyanobacterium. Nat Chem Biol. 2022;18(8):869–77. doi: [10.1038/s41589-022-01051-1](https://doi.org/10.1038/s41589-022-01051-1)
43. Shin J-H, Jung HJ, An YJ, Cho Y-B, Cha S-S, Roe J-H. Graded expression of zinc-responsive genes through two regulatory zinc-binding sites in Zur. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011;108(12):5045–50. doi: [10.1073/pnas.1017744108](https://doi.org/10.1073/pnas.1017744108)
44. Liu F, Su Z, Chen P, Tian X, Wu L, Tang D-J, et al. Structural basis for zinc-induced activation of a zinc uptake transcriptional regulator. Nucleic Acids Res. 2021;49(11):6511–28. doi: [10.1093/nar/gkab432](https://doi.org/10.1093/nar/gkab432)
45. García LI. Purificación de la proteína de unión a sustrato (PBP) de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 [Tesis]. Puebla: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2011.
46. Pérez AR. Purificación y caracterización bioquímica parcial de la proteína Fur de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal 5. [Tesis]. Puebla: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2015.
47. Roldán BE. Purificación de la proteína La proteína reguladora GDI_1248 recombinante de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5: Factores que afectan su estado de oligomerización [Tesis]. Puebla: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2018.
48. Rivera-Urbalejo AP, Juárez-Hernández D, Hernández Tenorio AL, Morales-García YE. Aplicaciones potenciales de *Gluconacetobacter diazotrophicus*

- para incrementar los rendimientos agrícolas. AyT BUAP. 2019; 4(13):32-44. doi: [10.5281/zenodo.5090696](https://doi.org/10.5281/zenodo.5090696)
49. Chih-Hao Lu*, Yu-Feng Lin, Jau-Ji Lin, Chin-Sheng Yu, Prediction of Metal Ion-Binding Sites in Proteins Using the Fragment Transformation Method, PLOS ONE. 2012; 7(6), e39252 doi: [10.1371/journal.pone.0039252](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039252)
50. Pardo MS. Análisis fenotípico de la mutante del gen *fur* en *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5 [Tesis]. Puebla: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2018.
51. Sagardoy R, Morales F, López-Millán A-F, Abadía A, Abadía J. Effects of zinc toxicity on sugar beet (*Beta vulgaris* L.) plants grown in hydroponics. Plant Biol (Stuttg). 2009;11(3):339–50. doi: [10.1111/j.1438-8677.2008.00153.x](https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2008.00153.x)
52. Vallee BL, Falchuk KH. The biochemical basis of zinc physiology. Physiol Rev. 1993;73(1):79–118. doi: [10.1152/physrev.1993.73.1.79](https://doi.org/10.1152/physrev.1993.73.1.79)
53. Madigan, M. T., J. M. Martinko, J. Parker. 2000. Brock Biology of Microorganisms, Ninth ed. Prentice-Hall Inc., Upper Saddle River, New Jersey.
54. Parkin G. Synthetic analogues relevant to the structure and function of zinc enzymes. Chem Rev. 2004;104(2):699–767. doi: [10.1021/cr0206263](https://doi.org/10.1021/cr0206263)
55. Herráez A. Plásmidos en electroforesis. UAH. Disponible en: <https://biomodel.uah.es/an/plasmido/inicio.htm>
56. Dittmer A, Dittmer J. Beta-actin is not a reliable loading control in Western blot analysis. Electrophoresis. 2006;27(14):2844–5. doi: [10.1002/elps.200500785](https://doi.org/10.1002/elps.200500785)
57. Taylor SC, Posch A. The design of a quantitative western blot experiment. Biomed Res Int. 2014;2014:361590. doi: [10.1155/2014/361590](https://doi.org/10.1155/2014/361590)
58. Gilda JE, Ghosh R, Cheah JX, West TM, Bodine SC, Gomes AV. Western blotting inaccuracies with unverified antibodies: Need for a western blotting minimal reporting standard (WBMRS). PLoS One. 2015;10(8):e0135392. doi: [10.1371/journal.pone.0135392](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135392)

59. Pérard J, Covès J, Castellan M, Solard C, Savard M, Miras R, et al. Quaternary structure of Fur proteins, a new subfamily of tetrameric proteins. *Biochemistry*. 2016;55(10):1503–15. doi: [10.1021/acs.biochem.5b01061](https://doi.org/10.1021/acs.biochem.5b01061)
60. Edgar RC. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res*. 2004;32(5):1792–7. doi: [10.1093/nar/gkh340](https://doi.org/10.1093/nar/gkh340)
61. Mikhaylina A, Ksibe AZ, Scanlan DJ, Blindauer CA. Bacterial zinc uptake regulator proteins and their regulons. *Biochem Soc Trans*. 2018;46(4):983–1001. doi: [10.1042/bst20170228](https://doi.org/10.1042/bst20170228)

XII. Anexos

Anexo I: Medio LB

<i>Peptona de caseína</i>	10 gr
<i>Extracto de levadura</i>	5 gr
<i>NaCl</i>	10 gr
<i>H₂O cbp</i>	1000 mL
<i>Agar</i>	15 gr/L

*pH 7.0 ajustar con HCl o KOH según sea el caso

Anexo II: Medio LGIE (para modificaciones de *Gluconacetobacter diazotrophicus*)

K ₂ HPO ₄	0.2 gr
KH ₂ PO ₄	0.6 gr
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.2 gr
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.02 gr
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.002 gr
FeCl ₃ ·6H ₂ O	0.010 gr
Peptona de caseína	1 gr
Extracto de levadura	0.2 gr
Glucosa/Azúcar morena	5 gr
Glicerol	10 mL
H₂O cbp	1000 mL
Agar	15gr/L

*pH 5.5 ajustar con ácido acético

Anexo III: Método de extracción de ADN genómico (Método de Tiocianato de Guanidina)

1. Tomar una colonia de la cepa de interés y crecerla en medio LB para *E. coli* y LGIE para *G. diazotrophicus* Pal5 (5 ml para que sea a pequeña escala).
2. Centrifugar a 6000 rpm durante 10 min a 4°C a máxima velocidad durante 2 minutos.
3. Desechar el sobrenadante y lavar con 1 ml de TE 10.1.
4. Resuspender en 65 µL de TE.
5. Agregar 2 µL de RNAsa (10 mg/ml) mezclando suavemente.
6. Lisar las células con 315 µL de Tiocianato de Guanidina, incubar 15 minutos en hielo.
7. Agregar 160 µL de acetato de amonio 7.5 M frío e incubar en hielo por 10-15 minutos.
8. Agregar un volumen igual de la mezcla fenol-cloroformo-isoamílico.
9. Agitar durante 10 minutos y centrifugar a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
10. Separar la fase acuosa a otro tubo eppendorf y repetir 3 veces más la misma operación.
11. Pasar la fase acuosa a otro eppendorf estéril y agregar un volumen similar de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) y agitar durante 5 minutos.
12. Repetir la etapa anterior las veces necesaria hasta observar transparente la interfase.
13. Adicionar 0.54 volúmenes de etanol absoluto frío.
14. Mezclar suavemente y dejar 30 minutos a -20°C o toda la noche.
15. Centrifugar a 10000 rpm durante 20 minutos a 4°C o 15000 rpm/10 minutos a 4°C.

16. Desechar el sobrenadante y agregar 1 ml de etanol al 70% (eliminar sales) y centrifugar a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C.
17. Repetir el lavado de EtOH al 70% las veces necesarias.
18. Centrifugar y eliminar el EtOH residual decantando suavemente. Dejar secar de 20-30 minutos.
19. Resuspender en 100 µL de agua tridestilada estéril.
20. Correr en electroforesis de agarosa al 0.8%.

Anexo IV: Método de extracción de ADN plasmídico [Modificado]

1. A partir de un cultivo bacteriano de 12 horas de incubación, centrifugar a 12000 rpm durante 1 minuto.
2. Lavar la pastilla dos veces con 300 µL de buffer TE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8).
3. Colocar 300 µL de solución P1 (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 8) y resuspender, posteriormente agregar 15 µL de lisozima 4 mg/ml e incubar 5 minutos.
4. Agregar 400 µL de solución P2 (400 mM NaOH, 2% SDS) y mezclar por inversión. Dejar incubar 5 minutos.
5. Agregar 350 µL de solución P3 (3 M acetato de amonio pH 5.5 ajustar con ácido acético) y mezclar por inversión muy suavemente. Incubar 10 minutos a 4°C.
6. Centrifugar 15 minutos a 10000 rpm a 4°C.
7. Tomar el sobrenadante y pasarlo a un tubo eppendorf nuevo. Hacer un lavado de 400 µL de cloroformo-alcohol-isoamílico 24:1, mezclar durante 5 minutos y centrifugar 12 minutos a 10000 rpm.
8. Recuperar la fase acuosa y hacer dos lavados de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 y centrifugar 12 minutos a 10000 rpm.
9. Transferir la fase acuosa a un tubo de eppendorf nuevo y agregar 0.7 volúmenes de isopropanol, mezclar suavemente y dejar incubar a 4°C durante 30 minutos. Centrifugar a 4°C a 13000 rpm durante 20 minutos.

10. Eliminar el sobrenadante. Lavar con 1 mL de etanol al 70%. Centrifugar 10 minutos a temperatura ambiente. Repetir los lavados dos veces.
11. Eliminar cuidadosamente el etanol y dejar secar la pastilla.
12. Resuspender la pastilla en 50 μ L de agua con RNAsa e incubar durante 60 minutos a 37°C.

Anexo V: Método de digestión enzimática

7.5 μ L	Agua pisa o tridestilada
1 μ L	Buffer 10X
1 μ L	ADN
0.5 μ L	AVA/ EcoR

1. Agregar a un tubo de eppendorf estéril 7.5 μ L de agua pisa.
2. Agregar el buffer 10X correspondiente con la enzima que se utilizará.
3. Agregar el ADN.
4. Agregar la enzima correspondiente (sacada directamente del congelador al momento de usarla).
5. Darle un spin en la centrifuga.
6. Ponerla a incubar a 37°C. durante 90 minutos.
7. Inactivar a 65°C.
8. Correr la muestra en una electroforesis de agarosa 1%.

Anexo VI: Inducción de la proteína reguladora GDI_1248 recombinante por IPTG.

1. Realizar un precultivo de *E. coli* BL21 *pLys pEXP5-CT1248* en medio LB con antibióticos ampicilina [100 μ g/mL] y cloranfenicol [15 μ g/mL], de 12 horas de incubación a 37°C y 175 rpm, con una DO₆₀₀ de ~1.0.

2. Inocular en un matraz Erlenmeyer con 25 mL de caldo LB, con los antibióticos de selección, una relación 1:100 a partir del precultivo, e incubar a 37°C, 175 rpm hasta alcanzar una DO_{600} de 0.4-0.6
3. Agregar el inductor a la concentración 0.1mM al matraz Erlenmeyer e incubar a 37°C durante 4 horas a 175 rpm e ir tomando muestras a cada hora después de agregar el inductor.
4. Alicuotar el contenido de los matraces después de la inducción en tubos eppendorf de 1.5 mL conteniendo 500 μ L. Centrifugar a 8000 rpm durante 3 minutos.
5. Decantar el sobrenadante y lavar la pastilla celular con buffer PBS pH 7. Centrifugar y decantar el sobrenadante.
6. Almacenar la pastilla a -20°C.
7. Analizar las pastillas por PAGE SDS 12%.

Anexo VII: Soluciones para SDS PAGE

Solución 1: Bis-acrilamida

Acrilamida 29.2 g / Bis 0.8 g / cbp 100 mL.

*Agitar y filtrar. Guardar en frasco ámbar.

Solución 2: 1.5M Tris /HCl pH 8.8

Tris base 36.2 g / 200 mL.

*Almacenar a 4°C.

Solución 3: Stacking Buffer (1.0 M Tris/HCl pH 6.8)

Tris 6 g / 150 mL

Solución 4: SDS 10 %

SDS 2g / 20 mL

Solución 5: Iniciador APS 10 % persulfato de amonio

Solución 6: Buffer de tratamiento 2X (0.25 M Tris/HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glicerol, 10% β -mercaptoetanol)

Tris / 1.25 ml de solución 3

SDS / 2 ml de solución 4

Glicerol / 1ml

β -mercaptoetanol / 0.5 ml

H₂O cbp / 5 ml

Azul de bromofenol

*Dividir en alícuotas y congelar (250 μ L/ tubo)

Solución 7: Buffer de cámara 10X (0.025 M Tris/HCl pH 8.3, 0.1924 glicina)

Tris base 12.12 g / Glicina 57.6 g / H₂O cbp 400 ml.

Solución 8: Tinción (0.125% azul de Coomassie R250, 50% metanol, 10% ácido acético)

Solución 9: Destinción (30% ácido acético)

Anexo VIII: Buffer de lisis

Para preparar el buffer de lisis se deben utilizar las siguientes soluciones:

Buffer de lisis con glicerol: 20mM Tris/HCl, 300 mM NaCl, 0.5% glicerol. pH8

Sarcocyl 0.5%

PMSF 1 mM

Ditiotreitol 0.1mM

30 μ L lisozima

O en su defecto, se puede usar solamente SDS al 0.1%.

Anexo IX: Protocolo de lisis celular

1. Añadir a nuestras muestras con la proteína inducida el buffer de lisis y dejar incubar por media hora a 37°C; si sólo se ocupará el SDS 0.1%, se le añaden 50 µL de éste.
2. Sonicar y seguir las especificaciones dadas.
3. Almacenar a 4°C. (Si sólo se usó el SDS 0.1%, acá termina el proceso).
4. Centrifugarlas por 20 minutos a 4°C.
5. Decantar el sobrenadante en un tubo eppendorf nuevo y conservar.

*Especificaciones para utilizar el sonicador

Potencia: 20%

Tiempo: 2 minutos

Ciclos: 2

Pulsos: 20

Anexo X: PAGE SDS 12%

<i>Gel separador (10 mL)</i>		<i>Gel concentrador (3 mL)</i>	
<i>H₂O</i>	3.3 mL	<i>H₂O</i>	2.1 mL
<i>Acrilamida</i>	4.0 mL	<i>Acrilamida</i>	0.5 mL
<i>Tris (pH 8.8)</i>	2.5 mL	<i>Tris (pH 8.8)</i>	0.38 mL
<i>10% SDS</i>	0.1 mL	<i>10% SDS</i>	0.03 mL
<i>10% APS</i>	0.1 mL	<i>10% APS</i>	0.03 mL
<i>TEMED</i>	0.005 mL	<i>TEMED</i>	0.004 mL

*Usar SDS al 0.1% para limpiar el material de la cámara en la que se preparará el gel.

Anexo XI: Transferencia de proteínas a membrana y Western blot con anticuerpos anti-polihistidina (Sigma-Aldrich)

- Lisar una pastilla resultante de la inducción en condiciones desnaturalizantes y separar las proteínas de la muestra por PAGE-SDS 12%. Correr dos geles idénticos, uno será teñido con azul de Coomassie y el otro dejarlo en la Solución de transferencia por 10 – 15 minutos.
- Transferir a una membrana de nylon en semiseco (Trans-Blot® Semi-Dry Transfer Cell, BioRad®).
- Aplicar 15V durante 20 – 25 minutos.
- Posteriormente, sacar con cuidado la membrana y proceder a hacer el bloqueo.

Preparación de la membrana de nylon y montaje del trans-Blot®

1. Poner a remojar papel filtro y la membrana de nylon en el buffer de transferencia. Mantener así entre 10 - 15 minutos a temperatura ambiente.
2. Limpiar el trans-blot® con agua destilada y dejar secar bien.
3. Colocar un papel filtro en el trans-blot® (mojar bien con solución de transferencia).
4. Poner la membrana de nylon previamente remojada en metanol y solución de transferencia.
5. Colocar el gel encima de la membrana, evitando formar burbujas. Mojar bien con el buffer de transferencia.
6. Colocar la tapa y transferir a 15V durante 20 – 25 minutos.

Solución de Transferencia

Tris 1.51 gr, Glicina 7.2 gr, SDS 0.1% 1.6 ml, Metanol 160 ml para 200 ml finales.

Western Blot

1. Bloquear la membrana con Buffer TBST con 5% de leche en polvo descremada durante al menos 2 horas en agitación (55 rpm).

2. Incubar 2 horas con el anticuerpo anti-polihistidina conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich) en Buffer TBST con 2.5% de leche en polvo descremada.
3. Revelar con buffer alcalino BCIP/NBT, hasta que sean notables las bandas azul-purpura.
4. Detener la reacción con solución de paro o con agua destilada.

Solución de paro

100mM Tris

150mM NaCl

1mM MgCl₂

Ajustar pH 9 y esterilizar 15lb por 20 minutos.

Preparación de anticuerpos anti-polihistidina

- En buffer PBS con 1% de BSA, diluir el anticuerpo a una relación 1:2000.
- Agregar 0.01% de azida de sodio para evitar contaminantes.
- Almacenar a -20°C