



Benemérita Universidad Autónoma de Puebla

Facultad de Medicina

Licenciatura en biomedicina

Título:

“Análisis de la funcionalidad de diguanilato ciclasa de la proteína CdgE de *Azospirillum baldaniorum* Sp245”

Tesis presentada para obtener el grado de:
Licenciado en Biomedicina

Presenta:

Alejandro Isaac Caballero Delgado

Director de tesis:

D.C Alberto Ramírez Mata

17 de junio del 2025
Puebla, Pue

Agradecimientos

Quiero dedicar esta tesis a mis padres, María del Carmen y Alejandro Isaac, que me apoyaron en este camino de adversidades para que pudiera llegar hasta aquí, y que siempre que lo necesite estuvieron siempre, y que fue un duro camino para ambos por el sacrificio que tuvieron que hacer los quiero mucho y agradezco de corazón.

Agradecer a todos mis familiares que me apoyaron tanto a mí como a mi madre para lograr que llegue hasta aquí. Así como a mi abuelita Domitila que estuvo siempre para mí.

Quiero agradecer a todos mis amigos que hice en este camino a Gama, Angel, Derek y Diego que siempre me dieron mucho de que reír en las noches y me apoyaron en toda la carrera, a mi novia Diana que me apoyo con amor y comprensión para que pudiera terminar este proyecto de vida, agradecer a mi compañero y amigo Oscar que siempre me ayudo en todo lo que necesite y me ayudo en fomentar mis conocimientos, a mis amigos de la facultad Dafne, Erika, Aline, Clara, Emma que hicieron que este camino no se sintiera tan áspero, a mis amigos externos Poncho, Jesús, Axel, Bayo, Sebas, Astrid, Alonso que siempre me dieron muchos momentos de risa y apoyo.

Agradecer al laboratorio de interacción bacteria planta, especialmente a los doctores, Alberto, Baca, Sandra, que me abrieron las puertas del laboratorio y ayudaron al progreso de mi conocimiento y siempre estuvieron abiertos a ayudarme, agradecer a la maestra Xiqui que siempre me apoyo en lo que necesitaba y me brindo de nuevos conocimientos. De igual manera agradecer a todos los compañeros del laboratorio que me apoyaron en responder todas mis preguntas y ayudarme en lo que necesitaba.

Y por último a mi gato que me acompañó en los días y noches escribiendo la tesis.

A todas estas personas, gracias de corazón.

Indice

Indice de figuras	6
Resumen	8
Introducción.....	9
Antecedentes generales.....	11
Antecedentes específicos.....	15
Justificación.....	19
Planteamiento del problema	19
Hipótesis.....	20
Objetivos.....	20
General.....	20
Específicos.....	20
Materiales y métodos.....	21
Cepas y vectores empleados en el estudio.....	21
Diseño oligonucleótidos	23
Análisis bioinformático	25
Clonación del fragmento HPT del gen <i>CdgE</i>	25
Transformación cepa <i>E. coli</i> AR3110 $\Delta cdgE$ y <i>E. coli</i> s17.1 pDZ1-1	26
Clonación del ORF del gen <i>cdgE</i>	27
Subclonación en el vector pGEX4T1	27
Determinación de la función de diguanilato ciclasa de la proteína CdgE a través de un biosensor de di-GMPc	27
Resultados.....	29
Evaluación de la secuencia del gen <i>cdgE</i>	29

Alineamientos de la proteína CdgE	30
Modelaje comparativo de la proteína	33
Obtención del amplificado de PCR del fragmento HPT del gen <i>cdgE</i>	34
Clonación del fragmento HPT del gen <i>cdgE</i> al vector pGEM-T-EASY	35
Secuenciación del fragmento HPT del gen <i>cdgE</i>	37
Clonación del ORF del gen <i>cdgE</i> en pGEM-T-EASY	38
Subclonación del ORF del gen <i>cdgE</i> al vector pGEX4T1	40
Transformación en células <i>E. coli</i> S17.1 con el biosensor <i>PDZI</i>	41
Transformación en células <i>E. coli</i> AR3110 $\Delta cdgE$ con el biosensor <i>pDZI</i>	41
Determinación de los niveles celulares de di-GMPc	43
Discusión	46
Conclusión	50
Perspectivas	51
Referencias:	52
Anexos	57

Indice de figuras

1.- Figura 1. Organización y patrones de fosforilación de los distintos tipos de TCS	12
2.- Figura 2. Estructura de dominios efectores en los RR	13
3.- Figura 3. Regulación de di-GMPc.....	14
4.- Tabla 1. Organización genética de los TCS de distintos géneros de <i>Azospirillum</i>	15
5.- Tabla 2. Clasificación de los TCS.....	15
6.- Figura 6. Contexto genético de la péntada de genes	16
7.- Figura. 4. Halo de crecimiento de las distintas cepas de <i>Azospirillum</i>	16
8.- Figura 5. Contexto genético de la péntada de genes	17
9.- Figura 7. Representación esquemática de las vías de señalización de dos componentes frente a las de múltiples componentes y del sistema de fosforilación CckA-ChpT-CtrA/CpdR	18
10.- Figura 8. Predicción de dominios.....	29
11.- Figura 9. Resultados BLAST	30
12.- Figura 10. Alineamiento dominio HPT	31
13.- Figura 11. Alineamiento de secuencias nucleotídicas remarcando los sitios activos de los dominios (REC-REC-GGDEF).	32
14.- Figura.12. Estructuras terciarias de la proteína CdgE	34
15.- Figura 13. Amplificación del fragmento HPT (951 pb) del gen <i>dgcE</i> de <i>A. baldaniorum</i> Sp245 por PCR	35
16.- Figura 14. Mapa del plásmido pGEM-T-EASY-Sec1cdgE.	36
17.- Figura 15. Análisis del amplificado del fragmento HPT del gen <i>cdgE</i> de <i>A. baldaniorum</i> Sp245 de la clonación obtenida.....	36
18.- Figura 16. Resultados de la secuenciación del fragmento HPT del gen <i>cdgE</i>	37
19.- Figura 17. Producto de PCR del ORF del gen <i>cdgE</i> de <i>A. baldaniorum</i> Sp245	38

20.- Figura 18. Mapa del plásmido pGEM-T-EASY-cdgE.....	39
21.- Figura 19. Análisis de los plásmidos de las 5 clonas obtenidas de la clonación en pGEM-T-EASY.	39
22.- Figura 20. Mapa del plásmido pGEX4T1-cdgE realizo.....	40
23.- Figura 21. Análisis de los plásmidos de las 3 clonas obtenidas de la subclonación en pGEX4T1.....	40
24.- Figura 22. Análisis de los plásmidos de las 3 clonas obtenidas de la transformación en E. coli S17.1.....	41
25.- Figura 23. Análisis de los plásmidos de las diversas clonas rescatadas.....	42
26.- Figura 24.1 Determinación de los niveles intracelulares de di-GMPc en E.coli S17.1/pDZ1.....	44
27.- Figura 24.2 Determinación de los niveles intracelulares de di-GMPc en E. coli AR3110 Δ cdgE/pDZ1.....	45
28.- Figura 25. Comparación de la arquitectura proteica de diguanilato ciclasa (DGC) en Azospirillum.....	46

Resumen

El ácido di-(3'-5') guanosin monofosfato (di-GMPc) es un segundo mensajero clave para las bacterias, está involucrado en diversos procesos celulares como lo es la formación de biopelículas, movilidad, virulencia, entre otros. La síntesis del di-GMPc es realizada por proteínas diguanilato ciclasas (DGC) las cuales contienen el dominio GGDEF el cual será el encargado de la formación del di-GMPc a partir de dos moléculas de GTP.

Para que la bacteria produzca este segundo mensajero es necesario un sistema de traducción de señales. Uno de los principales en *A. baldaniorum* Sp245, es el sistema de doble componente (TCS, por sus siglas en ingles two component system). Este sistema se basa en una histidine kinase (HK) o cinasa histidinica la cual tendrá un dominio sensor el cual recibirá la señal y se encargará de transmitir esta señal a partir de una fosfotransferencia al response regulator (RR) o regulador de respuesta que será el encargado de interpretar la señal.

Este trabajo tuvo como objetivo determinar experimentalmente la función del gen *cdgE* de *A. baldaniorum* Sp245, el cual contiene los dominios HPT-REC-REC-GGDEF y codifica para una proteína con función DGC, siendo éste un regulador de respuesta.

Debido a que los dominios HPT no suelen encontrarse comúnmente en los reguladores de respuesta se realizó la secuenciación de la región que corresponde al dominio HPT y la región intergénica. Para determinar la función de la proteína se analizó la fluorescencia emitida en dos fondos genéticos diferentes utilizando un riboswitch, produciendo la proteína fluorescente Amcyan y TurboRFP. Los resultados mostraron que, la proteína CdgE de *A. baldaniorum* Sp245 sintetiza di-GMPc, teniendo diferencias significativas con los controles positivos y negativos.

Introducción

Rizosfera

La rizosfera es la zona del suelo en la cual interactúan las raíces de las plantas con bacterias, las cuales serán atraídas por los exudados radiculares que emiten las plantas. En este microambiente ocurren distintos procesos entre los cuales destacan: la retención de agua, la adquisición de nutrientes, intercambio de cationes y producción de exudados radiculares (Reyes, *et al.* 2011).

Las bacterias aisladas de esta zona son llamadas rizobacterias y pueden ser de dos tipos; fitopatógenas, las cuales van a generar un daño a la planta y el segundo grupo favorecen el crecimiento de ésta misma, así como la capacidad de controlar ciertos patógenos, a este último grupo de bacterias se les conoce como PGPR (Por su acrónimo del inglés, Plant Growth Promoting Rhizobacteria), (Siddiqui, 2010).

Estas PGPR están involucradas en las actividades bióticas del ecosistema del suelo lo que ayuda a que sea sostenible para la producción de cultivos (Gupta *et al.*, 2015). Por lo cual su valor a nivel industrial ha aumentado, ya que cuenta con el potencial para desarrollar tecnologías ecológicas y con ello se genera un aumento de la producción agrícola. Dentro de los microorganismos PGPR más estudiados se encuentran a los géneros *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Klebsiella*, *Beijerinckia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Azoarcus*, *Arthrobacter*, *Enterobacter*, *Burkholderia*, *Serratia*, y *Azospirillum* (Bojórquez *et al.*, 2010; Loredó *et al.*, 2004).

Genero *Azospirillum*

Entre todos los géneros que existen dentro del grupo de las PGPRs, *Azospirillum* es uno de los más estudiados. El género *Azospirillum* pertenece al filo de proteobacterias, miembro de la subclase α e incluye una especie previamente nombrada *Spirillum lipoferum* (Beijerinck 1925). Las cuales fueron observadas por primera vez por Beijerinck en 1922 al generar un aumento en el contenido de nitrógeno en el medio (Beijerinck 1925). Posteriormente se aislaron varias cepas de diversos países como se describe en la publicación de Tarrand *et*

al., (1978). A la fecha se han descrito 24 especies del género *Azospirillum*: *Azospirillum agricola* (Lin *et al.*, 2016), *Azospirillum argentinense* (Dos Santos Ferreira *et al.*, 2022), *Azospirillum baldaniorum* (Dos Santos Ferreira *et al.*, 2020), *Azospirillum brasilense* (Tarrand *et al.*, 1978), *Azospirillum canadense* (Mehnaz *et al.*, 2007), *Azospirillum cavernae* (Zhu *et al.*, 2022), *Azospirillum doebereineriae* (Eckert *et al.* 2001), *Azospirillum fermentarium* (Lin *et al.* 2013), *Azospirillum formosense* (Lin *et al.*, 2012), *Azospirillum griseum* (Yang *et al.*, 2019), *Azospirillum halopraeferens* (Reinhold *et al.*, 1987), *Azospirillum humicireducens* (Zhou *et al.*, 2013), *Azospirillum largimobile* (Skerman *et al.*, 1983 & Ben Dekhil *et al.*, 1997), *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck 1925 & Tarrand *et al.*, 1979), *Azospirillum melinis* (Peng *et al.*, 2006), *Azospirillum oleiclasticum* (Wu *et al.*, 2020), *Azospirillum oryzae* (Xie and Yokota 2005), *Azospirillum palustre* (Tikhonova *et al.*, 2019), *Azospirillum picis* (Lin *et al.*, 2009), *Azospirillum ramasamyi* (Anandham *et al.*, 2019), *Azospirillum rugosum* (Young *et al.*, 2008), siendo *Azospirillum brasilense* Sp245 conocida actualmente como *Azospirillum baldaniorum* Sp245 debido que en el año 2020 recibió una reclasificación fundada en la constitución de su genoma, y nombrada en honor a los doctores José Ivo Baldani y Vera Divan Baldani por sus contribuciones pioneras a la investigación del género *Azospirillum* (Dos Santos Ferreira *et al.* 2020)

Las bacterias del género *Azospirillum* son gram negativas, con forma vibroide, pleomórfica, la mayor parte del género presenta la característica que puede fijar el N₂, con una motilidad evidente ya que presenta un flagelo polar y flagelos laterales que le van a permitir su desplazamiento por el medio, y así trasladarse a zonas donde las condiciones sean las indicadas para su desarrollo (Amaresan, *et al.*, 2020).

Estas características le han permitido colonizar distintos tipos de plantas que son de interés agrícola como el maíz, el arroz, la caña, etc. Generando un interés en la investigación de múltiples especies de este género (Amaresan, *et al.*, 2020).

Quimiotaxis

Para que *Azospirillum* pueda encontrar condiciones adecuadas para su crecimiento, así como para la colonización a la planta hace uso de distintas estrategias. Una de estas estrategias es la quimiotaxis, la cual permite a la bacteria desplazarse de manera dirigida tanto a favor de un gradiente químico (quimioatracción) como en contra (quimiorepelencia) (Bi *et al.* 2018; Colin *et al.* 2021), algunos gradientes químicos que la bacteria puede detectar son los distintos exudados radiculares de la planta, los que contienen: azúcares, aminoácidos, hormonas, ácidos orgánicos etc. Cuando la bacteria reconoce alguna de estas señales va a generar una cascada de transducción de señales que controlan la quimiotaxis, propiciando un movimiento hacia un ambiente óptimo, y una vez establecida esto le permitirá su crecimiento, supervivencia, formación de biopelícula y la interacción con hospedadores (Corral *et al.*, 2016). Para que pueda ocurrir este suceso necesita de una maquinaria de transducción de señales, la cual transmite información del ambiente al aparato motriz, donde los sistemas de doble componente se encuentran ampliamente involucrados (Phillips *et al.*, 2004).

Antecedentes generales

Sistema de doble componente (TCS)

Para que la bacteria pueda reaccionar a estas señales necesita un sistema complejo de señalización. Uno de los usados por *Azospirillum* son los sistemas de dos componentes (TCS por sus siglas en inglés Two Component System) estos sistemas le ayudaran a ajustar su comportamiento en consecuencia (Borland *et al.*, 2015).

Estos sistemas de señalización se basan en una reacción de fosfotransferencia, la fosfotransferencia canónica se basa en la transferencia del fosfato de histidina a aspartato (H→D), mientras que la fosfotransferencia no canónica se basara en la transferencia del fosfato en múltiples pasos (H→D→H→D) hasta que se realice la respuesta a la señal percibida. Ambas fosfotransferencias se realizan entre dos proteínas. La primera es una proteína receptora la cual se denomina cinasa histidinica sensora, (o HK por sus siglas en inglés histidine kinase). Las cuales pueden operar como dímeros y se activaran por el proceso de autofosforilación, éstas se pueden hallar ancladas a la membrana o en el citoplasma

bacteriano. Las cinasas histidínicas tendrán un dominio sensor que se encargará de recibir la señal del ambiente y un dominio catalítico que funcionará a expensas de ATP que al desprotonarse liberará un fosfato del dominio catalítico y lo transferirá al regulador de respuesta (Chang & Stewart 1998). Existen distintos tipos de cinasas histidínicas, las cuales se denominan cinasas histidínicas ortodoxas, no ortodoxas e híbridas. Las cinasas histidínicas ortodoxas, conforman el modelo clásico del sistema de dos componentes, estas contendrán el dominio sensor, el dominio catalítico, y por último el dominio de transferencia como lo puede ser un DHp (Figura 1 a). Las cinasas no ortodoxas, se van a diferenciar por su estructura o mecanismo de acción, estos cambios afectaran la forma que se transfiere el grupo fosfato, en lugar de transferir el fosfato directo al regulador de respuesta transferirán el fosfato a otro intermediario como podría ser a un dominio REC que contendrá un aspartato conservado o dominios HPT que tendrán una histidina conservada. Estos dominios se encuentran dentro de la misma cinasa histidínica, para que posteriormente transfiriera el grupo fosfato al regulador de respuesta (Figura 1 b). Por último, existen las cinasas histidínicas híbridas, las cuales se caracterizan por contener múltiples dominios de transferencia de fosfato en una sola proteína. Esta arquitectura les permite realizar la transferencia secuencial del fosfato entre distintos dominios que se encuentran dentro de la proteína, como los dominios HPT solubles. Estos dominios HPT, a pesar de que pueden estar contenidos en la misma proteína, actúan funcionalmente como proteínas intermediarias, facilitando la propagación de la señal hasta alcanzar al regulador de respuesta (Figura 1 c) (Liu C *et al.*, 2019).

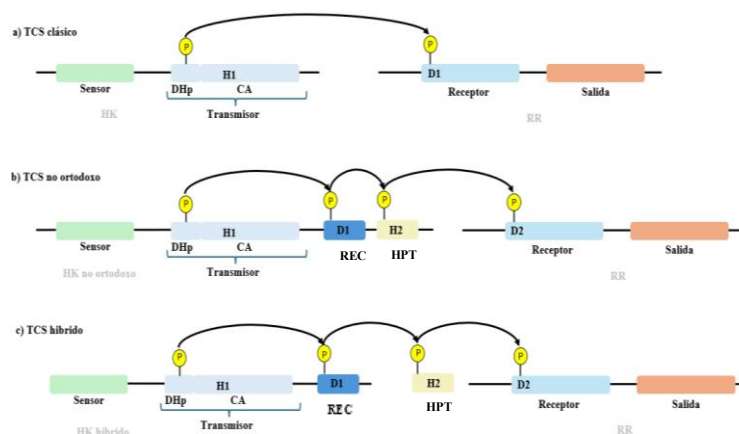


Figura 1. **Organización y patrones de fosforilación de los distintos tipos de TCS.**

a) La versión clásica comprende un dominio de entrada, (verde) un dominio transmisor (H1) (gris), el cual transfiere el grupo fosforilo (p) al dominio receptor (azul) en el regulador de respuesta (RR), la versión clásica es un mecanismo de fosforilación de dos pasos. **b)** La versión no ortodoxa, la cinasa histidínica (HK) contará con un dominio con un residuo de aspartato conservado (REC; D1) (azul rey) y un dominio con histidina conservada (HPT; H2) (amarillo) adicionales en el extremo C-terminal y será transferido al dominio con aspartato conservado (REC; D2) (azul) del regulador de respuesta (RR), esta versión es un mecanismo de cuatro pasos. **c)** La versión híbrida funciona de manera similar al no ortodoxo, agregando dominios de transferencia, (REC; D1) (azul rey) así como proteínas solubles (HPT; H2) que actúan como proteínas individuales (amarillo) que ayudan a la transferencia de la señal.

La segunda proteína involucrada es un regulador de respuesta (RR), la cual contiene un dominio receptor denominado dominio REC con un aspartato conservado, el cual recibe el fosfato proveniente de la HK y un dominio efector el cual se encargará de llevar a cabo la respuesta a la señal que se percibe del medio ambiente (Capra & Laub, 2012) (Jung *et al.*, 2012) (Figura 2). La arquitectura común de los RR se basa en dominios REC simples que tienen el aspartato conservado, sin embargo, se ha visto que suelen ser proteínas más complejas que albergan dominios adicionales como son los dominios PAS, GAF, HisKa, HATPasa, de esta manera se visualiza la versatilidad de los RR por la variedad de dominios que contengan (Jenal *et al.*, 2017).

Los RR tienen múltiples funciones y han sido clasificadas en base a ello: 1) A nivel transcripcional, por lo que codifican proteínas que contengan dominios de unión a DNA y RNA, el porcentaje de éstas será de un 64% del total de los RR, teniendo el mayor porcentaje. 2) Con función enzimática que tendrán un 13% del total de los RR, como las de diguanilato ciclasa, fosfodiesterasa, o metilesterasas. Estas proteínas de tipo GGDEF/EAL tendrán un 5% en la categoría de función enzimática. Por último, 3) con función en la interacción proteína-proteína. Las cuales que tienen un 3% del total de RR (Figura 2) (Djordjevic S *et al.*, 1998; Gao R *et al.*, 2009).

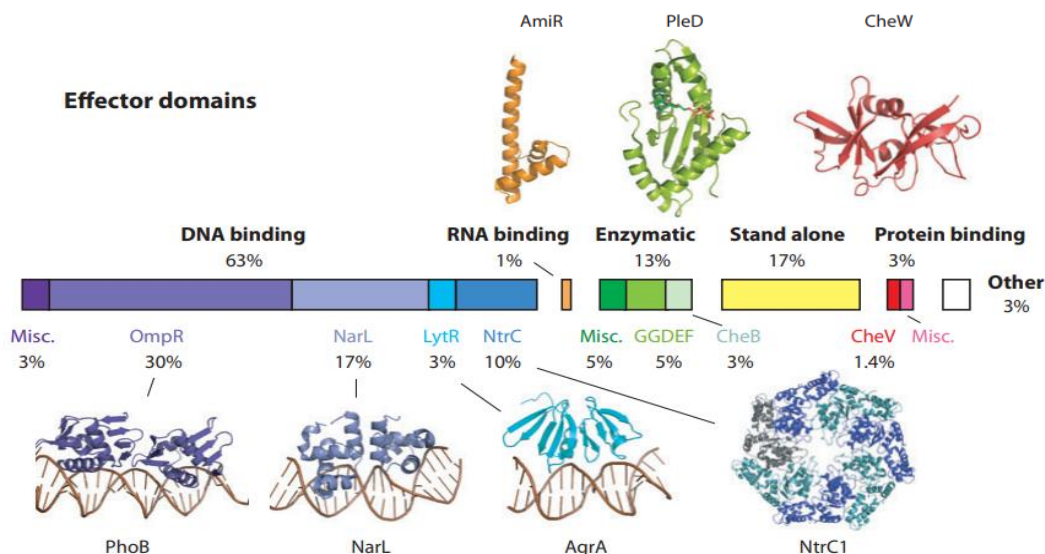


Figura 2. **Estructura de dominios efectores en los RR.** a) Distribución de los diversos dominios efectores de los RR representados en la barra horizontal según sus funciones. Los porcentajes encima de la barra representan las clases funcionales y los porcentajes debajo de la barra representan la distribución de las subfamilias de los RR. Extraído y modificado de Gao R. (2009).

Reguladores de Respuesta con Actividad de Diguanilato ciclasa

Una vez que la bacteria realiza la cascada de señalización producirá la respuesta necesaria como por ejemplo la movilidad y formación de biopelícula. Para el cambio de vida sésil-planctónico de la bacteria se ha descrito que está involucrado un segundo mensajero, el ácido di-(3'-5') guanosin monofosfato (di-GMPc), éste estimula la biosíntesis de adhesinas y exopolisacáridos, lo que inhibe la motilidad de la bacteria y promoverá la formación de biopelículas y por el contrario cuando disminuyan los niveles de este segundo mensajero se favorecerá la movilidad y la virulencia bacteriana (Xiqui *et al.*, 2003).

El di-GMPc es sintetizado por proteínas diguanilato ciclasa (DGC), estas proteínas tendrán un dominio conservado GG(D/E)EF, que serán los encargados de sintetizar el di-GMPc, a partir de dos moléculas de GTP y será degradado por fosfodiesterasas específicas (PDE) que contendrán el dominio EAL o en menor cantidad el dominio HD-GYP (Figura 3) (Newell *et al.*, 2011) .

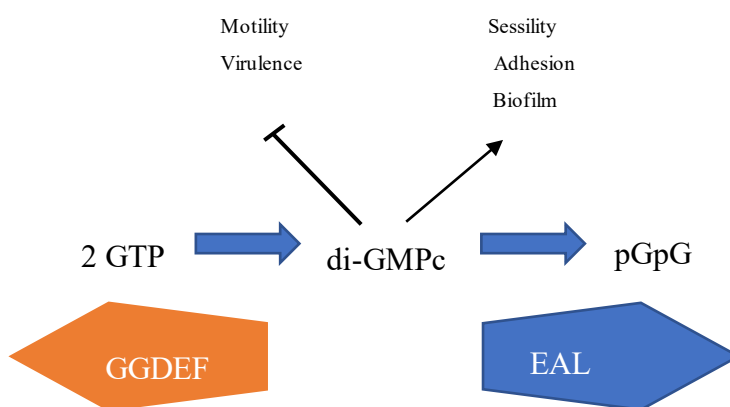


Figura 3. **Regulación de di-GMPc.** Representación de la síntesis por el dominio GGDEF (naranja) e hidrólisis por el dominio EAL (azul) de di-GMPc y sus funciones celulares. Adaptado de Jenal *et al.*, (2006).

Este segundo mensajero participa en distintas funciones en la bacteria, intervendrá en la regulación de la formación de biopelícula al regular la expresión de distintos genes que codifican para proteínas que forman la matriz extracelular de la biopelícula (Ramírez Mata *et al.*, 2014).

Antecedentes específicos

En 2015 Borland y colaboradores realizaron un análisis bioinformático de todos los TCS que se encuentran codificados en los genomas de 4 especies del género *Azospirillum* las cuales fueron, *Azospirillum lipoferum* 4B, *Azospirillum* Sp B510, *Azospirillum brasilense* Sp245, *Azospirillum brasilense* CBG497, encontrando que el género de *Azospirillum* tiene una gran cantidad de TCS a comparación de otras bacterias asociadas con plantas.

En los TCS la organización genética es importante por lo cual Borland clasifico los genes de *Azospirillum* según su contexto genético como: huérfanos cuando no se encontraba ningún gen codificante de RR o HK adyacente, por pares (RR o/y HK adyacentes), triadas (tres genes de RR o/y HK adyacentes), tétradas (cuatro genes de RR o/y HK contiguos), péntadas (cinco genes de RR o/y HK contiguos) o hexas (seis genes de RR o/y HK contiguos) (Tabla 1).

Tabla 1.

Strain	Orphan	Pair	Triad	Tetrad	Pentad	Hexad	TOTAL
<i>A. lipoferum</i> 4B	106	48	5	4	1	1	244
<i>Azospirillum</i> sp. B510	100	56	12	3	0	0	260
<i>A. brasilense</i> Sp245	128	46	10	1	1	0	259
<i>A. brasilense</i> CBG497	101	42	10	3	0	0	227

Tabla 1. Organización genética de los TCS de distintos géneros de *Azospirillum*

En este mismo estudio se encuentra que en *Azospirillum baldaniorum* Sp245 era el segundo microorganismo con más TCS de los géneros analizados, contando 259 genes, entre los cuales 124 genes codificantes de RR (Tabla 2).

Tabla 2.

Strains and feature	TCS type	Chromosome	p1	p2	p3	p4	p5 ^a	p6	Total ^b
<i>A. brasilense</i> Sp245									
Sensing HK	Classic HK	31	22	8	5	7	1	-	74
	HyHK	19	13	6	9	7	1	-	55
	CheA	1	2	1	-	-	-	-	4
Output response	RR	47	37	19	9	11	1	-	124
Phosphotransfer	HikA	-	-	-	-	-	-	-	0
	Hpt	1	1	-	-	-	-	-	2
Total		99	75	34	23	25	3	-	259

Tabla 2. Clasificación de los TCS. Realizada por Borland y colaboradores de los 259 genes de TCS encontrados en *Azospirillum baldaniorum* Sp245

Así mismo se identificó la presencia de una péntada única en el genoma de *Azospirillum baldaniorum* Sp245, la cual se decidió estudiar en el laboratorio de interacción bacteria planta del Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.



Figura 6. Contexto genético de la péntada de genes

En 2014 Gamboa con el fin de analizar la participación de las proteínas con dominios GGDEF de *A. baldaniorum* Sp245 en crecimiento y estrés, realizó una mutación en el gen *cdgE* (diguamilato ciclasa E) mediante la inserción de un casete de resistencia a kanamicina-beta-glucuronidasa (*gusA-Km^R*) y comparó el crecimiento con la cepa silvestre, visualizó que la mutante estaba afectada en la movilidad en comparación de la cepa silvestre, probablemente la mutación ocasionó un desplazamiento de los genes río abajo afectando con ello su transcripción.



Figura. 4. Halo de crecimiento de las distintas cepas de *Azospirillum*, *A. baldaniorum* Sp245(Wildtype), 7U-3 (Mutación por delección del gen *cdgE*), 5-A (Mutación por inserción de un casete de resistencia a kanamicina-beta-glucuronidasa en el gen *cdgE*).

Posteriormente, Avalos Rangel obtuvo una mutante de *A. baldaniorum* $\Delta cdgE$ sin un marcador de selección que evitara la afectación de los genes río abajo, posteriormente, con esta nueva mutante realizó las mismas pruebas que llevó a cabo Gamboa. Como se puede ver en la figura 4 se encuentra la cepa wild type (WT 245) la cual es la movilidad normal que tiene la bacteria, en la cepa 7U-3 ($\Delta cdgE$) la cual corresponde a la mutante que realizó Avalos Rangel, la cual mostró una afectación significativa en su movilidad y por último la cepa 5-A (*gusA-KmR*) la cual es la mutante que realizó Gamboa se ve una movilidad nula por parte de la bacteria. Lo que llevó a analizar a los demás genes que se encuentran en el contexto genético (Figura 4).

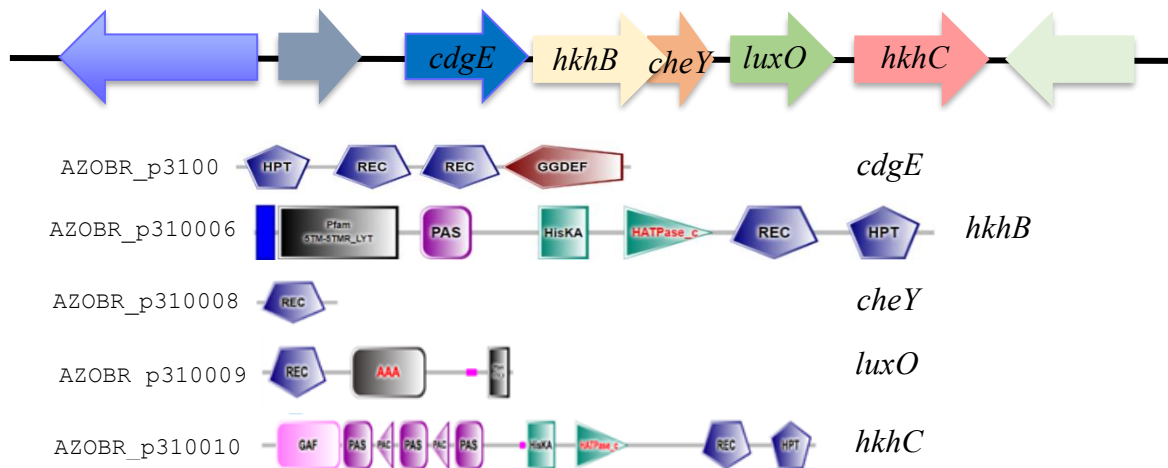


Figura 5. **Contexto genético de la péntada de genes y su arquitectura.** Ubicado en el plásmido 3 de *Azospirillum baldaniorum* Sp245. Está compuesta por *cdgE*, una posible diguanilato ciclasa con dominio GGDEF; *hkhB* y *hkhC*, quinasas histidínicas híbridas; *cheY*-like, un posible regulador de motilidad; y *luxO*-like, un posible regulador transcripcional.

Por lo cual, en el laboratorio los trabajos de Yessica Ibelith Cosme, Uriel Cardona Baltazar y Christopher Navarro, han contribuido a analizar el mapa físico de la región péntada de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 la cual contiene dos genes que codifican para los RR (*cdgE* y *luxO*-like), dos genes para HK (*hkhB* y *hkhC*) y un dominio REC libre (*cheY*-like) teniendo algunos avances en la definición de los dominios como se muestra en la figura 5.

A partir de esto se realiza una búsqueda para analizar la estructura de la proteína CdgE encontrando que tiene una estructura similar a la proteína PleD de *Caulobacter crescentus*, esta proteína contiene dos dominios REC y un dominio GGDEF (PDB: 2V0N), la cual ya ha sido reportada y que se ha cristalizado su estructura, esta proteína funciona esencialmente en el control del ciclo celular de la bacteria (Aldridge *et al.*, 2003), y con base a la información de Ramírez Mata (2018) que observó las estructuras comunes de los diversos RR se visualizó que la proteína CdgE de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 tenía una estructura no canónica con respecto a diversos RR, debido a que el dominio HPT es comúnmente encontrado en las HK y HPT solubles, originando curiosidad por el gen *cdgE* y su arquitectura poco común.

Estas estructuras de proteínas de la familia PleD las cuales contiene los dominios REC, REC y GGDEF como lo menciona Ralf Paul y colaboradores en 2007 funciona en dímeros, y para que ocurra esta dimerización es necesario que se fosforile alguno de los dominios REC de la proteína, teniendo una mayor eficacia en la producción de di-GMPc.

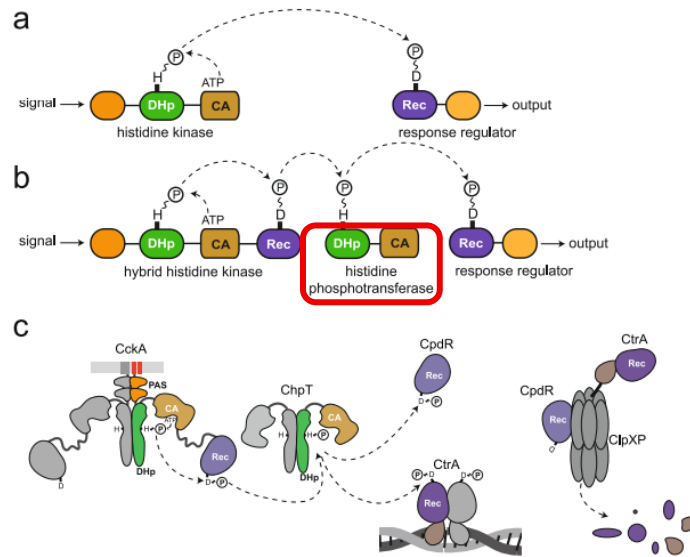


Figura 7. Representación esquemática de las vías de señalización de dos componentes frente a las de múltiples componentes y del sistema de fosforilación CckA-ChpT-CtrA/CpdR a) Esquema de función de un TCS clásico conteniendo un HK y un RR. b) Un esquema de función de un TCS múltiple un DHp soluble encerrado en rojo con un sitio catalítico (CA). c) Esquema de las distintas funciones que puede realizar este dominio DHp con sitio catalítico, extraído de Brüderlin *et al.*, (2023).

Recientemente en 2023 Brüderlin y colaboradores buscaron las diferencias de los dominios REC que se encuentran en los RR y en las HK, en estos resultados encontraron un homólogo a un dominio HPT soluble, el cual es una proteína con dominio DHp el cual servirá para la transferencia de la señal en el sistema de doble componente, sin embargo, esta proteína contiene un dominio catalítico (CA) en la región C-terminal el cual funciona con el ATP para desprotonarlo, esto nos podría indicar que existen proteínas HPT con dominios adicionales mencionando la versatilidad de estas proteínas como lo puede ser CdgE de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 (Figura. 7).

En 2019 Pfiffer y colaboradores con el fin de estudiar DGC y EAL maestras las cuales se encargarán de la mayor parte de producción o degradación del di-GMPc en la bacteria encontraron que si se eliminaban la DGC maestra la producción de éste bajaba sus niveles de manera muy significativa creando así la cepa *E. coli* AR3110 $\Delta cdgE$, lo que nos llamó la atención para poderla utilizar en los experimentos donde sea más tangible la producción más tangible de di-GMPc que en este caso sería el gen *cdgE* de *A. baldaniorum* Sp245 (Pfiffer *et al.*, 2019).

Justificación

Aún falta conocer demasiado acerca de los mecanismos que utiliza las bacterias para dar respuesta a distintos estímulos los cuales han llevado décadas de evolución que ahora le permiten sobrevivir a distintos ambientes, el dar respuesta a distintas señales a través de los TCS y en particular de los RR que tienen una estructura no documentada. Tratar de entender estos mecanismos refuerzan las bases del conocimiento científico necesario para crecer y dar respuesta a como ha sido la evolución en la bacteria que origino la asociación de esta bacteria con la planta.

Planteamiento del problema

Azospirillum baldaniorum Sp245 es una bacteria significativa del grupo de las PGPR y de cual su estudio es de gran interés debido a la gran cantidad de beneficios que otorga a la planta con las que interactúa. Para lograr llevar a cabo esta asociación se requieren sistemas de detección versátil como los sistemas de dos componentes, que resulta vitales para esta función y de los cuales aún se desconoce bastante tanto de las cinasas histidínicas, como de los reguladores de respuesta, originando curiosidad en la proteína CdgE de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 que es un RR y el cual contiene un dominio HPT que no es canónico en los RR lo que podría explicar su versatilidad en la detección de señales de los RR y proteínas que contienen una arquitectura similar.

Dado esto nos surgieron las siguientes preguntas: ¿La proteína CdgE contendrá algún codón de paro entre el dominio HPT y el primer dominio REC ?, ¿La proteína CdgE tendrá función de diguanilato ciclasa?

Hipótesis

“La proteína CdgE de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 participa en la síntesis de di-GMPc”

Objetivos

General

- Determinar la función de diguanilato ciclasa de la proteína CdgE de *A. baldaniorum* Sp245

Específicos

- Resequenciar la región que codifica el dominio HPT del gen *cdgE* de *A. baldaniorum* Sp245
- Clonar el ORF del gen *cdgE* de *A. baldaniorum* Sp245 en vectores de expresión para proteínas recombinantes
- Determinar la función de diguanilato ciclasa de la proteína CdgE de *A. baldaniorum* Sp245 utilizando un biosensor de di-GMPc.

Materiales y métodos

Cepas y vectores empleados en el estudio

Cepas utilizadas	Característica	Referencia
<i>Azospirillum baldaniorum</i> Sp245	Cepa silvestre	Baldani <i>et al.</i> , 1983
<i>E. coli</i> DH5 α	F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF) U169, hsdR17(rK-mK+), λ -	Hanahan, 1983
<i>E. coli</i> DH5 α Sec-1/cdgE (secuenciación)	Cepa derivada de <i>E. coli</i> DH5 α contiene el vector pGEM-T-EASY-Sec1cdgE	En este estudio
<i>E. coli</i> S17.1	recA thi pro hdsR4 (rK- mK+) (RP4-2T::MKm::Tn7) Tpr SmR λ pir	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>E. coli</i> S17.1 pDZ1 -1	Cepa derivada de <i>E. coli</i> S17.1, contiene el biosensor de di-GMPc, pDZ1.	En este estudio
<i>E. coli</i> S17.1 pDZ1 - 2	Cepa derivada de <i>E. coli</i> S17.1, contiene el vector pGEX4T1-cdgE y el biosensor de di-GMPc, pDZ1.	En este estudio
<i>E. coli</i> S17.1 pDZ1 - 3	Cepa derivada de <i>E. coli</i> S17.1, contiene el vector pQE-31 <i>cdgA</i> y el biosensor de di-GMPc, pDZ1.	López Lara <i>et al.</i> , 2014
<i>E. coli</i> AR3110 Δ cdgE	Cepa derivada de <i>E. coli</i> AR3110 el cual contiene la mutación por eliminación de una diguanilato ciclasa maestra.	Pfiffer <i>et al.</i> , 2019

<i>E. coli</i> AR3110 - 1	Cepa derivada de <i>E. coli</i> AR3110 $\Delta cdgE$, contiene el biosensor de di-GMPc, pDZ1.	En este estudio
<i>E. coli</i> AR3110 - 2	Cepa derivada de <i>E. coli</i> AR3110 $\Delta cdgE$, contiene el vector pGEX4T1- <i>cdgE</i> y el biosensor de di-GMPc, pDZ1.	En este estudio
<i>E. coli</i> AR3110 - 3	Cepa derivada de <i>E. coli</i> AR3110 $\Delta cdgE$, contiene el vector pQE-31 <i>cdgA</i> y el biosensor de di-GMPc, pDZ1.	En este estudio
Vectores utilizados	Característica	
pGEM-T-EASY	Vector de mantenimiento	Promega
pGEM-T-EASY-Sec1 <i>cdgE</i> (secuenciación)	Vector de mantenimiento con el fragmento de HPT de <i>cdgE</i> de <i>A. baldanorium</i> Sp245	En este estudio
pGEM-T-EASY- <i>cdgE</i>	Vector de mantenimiento con el ORF de <i>cdgE</i> de <i>A. baldanorium</i> Sp245	En este estudio
pGEX4T1	Vector de expresión	Promega
pGEX4T1- <i>cdgE</i>	Vector de expresión con el ORF del gen <i>cdgE</i> de <i>A. baldanorium</i> Sp245	En este estudio
pQE-31 <i>cdgA</i>	Vector de expresión que contiene el gen <i>cdgA</i> de <i>A. brasilense</i> Sp7	López Lara <i>et al.</i> , 2014
pDZ1	Riboswitch que contiene los genes que codifican a las proteínas fluorescentes (TurboRFP y Amcyan)	Zamorano Sánchez, 2019.

Diseño oligonucleótidos

Oligonucleotidos	Sequencia	Tm	Referencia
F-cdgE-sec1 (Forward)	5' TGCCATTGATCTTCGGCG 3'	Tm: 57.8°C	En este estudio
R-cdgE-sec1 (Reverse)	5' CAAGAGAGCCTCCTCGACG 3'	Tm: 57.9°C	En este estudio
F-cdgE-pGEX4T1 (Forward)	5' CGATCC ATGAATTCGACGATGATCAGCG 3' Enzima de restricción: BamHI	Tm: 55.3°C	En este estudio
R-cdgE-pGEX4T1 (Reverse)	5' CTCGAG GAAGGCGGACTCGTC GAG3' Enzima de restricción: XhoI	Tm: 57.9°C	En este estudio
LQ1F (Forward)	CGTCCGTCGACATGCTGGATTGGTTGGTTC Enzima de restricción: SalI	Tm: 53.8°C	López Lara <i>et al.</i> , 2014
LQ1R (Reverse)	CGTCCAAGCTTTCACATGCCTGGTTCGTAAAC CC Enzima de restricción: HindIII	Tm: 56.3°C	López Lara <i>et al.</i> , 2014

Los oligonucleótidos se realizaron con la ayuda de los programas bioinformáticos: IDT Technologies (oligo analyzer), SNAPGENE, SMART PROTEIN el uso de esta última fue con el fin de amplificar únicamente la región HPT para su secuenciación. Se realizaron dos pares de primers, para los oligonucleotidos utilizados en la secuenciación se decidió amplificar menos de 1000 pares de bases teniendo en cuenta una secuenciación eficaz y sin posibles errores, secuenciando la región intergénica del gen rio arriba hasta el primer REC del gen *cdgE* de *A. baldaniorum* Sp245 dando un amplificado de 951 pares de bases, y se nombraron los oligonucleótidos F-cdgE-sec1 y R-cdgE-sec1. Para los otros oligonucleotidos se insertaron los sitios de restricción BamHI y XhoI para los oligonucleótidos forward y reverse respectivamente con el fin de amplificar 1677 pares de bases correspondientes al ORF del gen *cdgE* de *A. baldaniorum* Sp245 y se nombraron F-cdgE-pGEX4T1 y R-cdgE-pGEX4T1. Se establecieron las siguientes características para su uso en PCR:

Condiciones de PCR para los primers F-cdgE-sec1 y R-cdgE-sec1

Componentes PCR secuenciación	Volumen (μL)
Agua	3
DreamTaq2x ThermoFisher	5
DNA	1
Oligo F	.5
Oligo R	.5

Primer ciclo	95°C	5min	1 ciclo
Segundo ciclo	95°C	30seg	30 ciclos
	53°C	30seg	
	72°C	1 min	
Tercer ciclo	72°C	7:00 min	1 ciclo
Ciclo final	4°C		∞

Condiciones de PCR para los primers F-cdgE-pGEX4T1 y R-cdgE-pGEX4T1

Primer ciclo	95°C	5min	1 ciclo
Segundo ciclo	95°C	30seg	30 ciclos
	54°C	30seg	
	72°C	1:40 min	
Tercer ciclo	72°C	5:00 min	1 ciclo
Ciclo final	4°C		∞

Análisis bioinformático

Para el análisis bioinformático se realizó la búsqueda y recuperación de la secuencia del gen *cdgE* de *A. baldaniorum* Sp245, la cual efectuó en la base de datos del NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_014198789.1). Para predecir los dominios que contenía el gen, se utilizó la plataforma de CONSERVED DOMAINS DATABASE (Lu *et al.*, 2020., <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) y SMART PROTEIN (Letunic *et al.*, 2015; <http://smart.embl-heidelberg.de/>). Se utilizó la plataforma de NCBI BLAST ([BLAST: Basic Local Alignment Search Tool](#)) para la búsqueda de secuencias similares al gen *cdgE* de *A. baldaniorum* Sp245. Para la predicción del modelo proteico de CdgE de *A. baldaniorum* Sp245 se empleó el programa de SWISS-MODEL y se utilizó la plataforma de RCSB PROTEIN DATA BANK (<https://www.rcsb.org>) para la obtención del dominio HPT (ShpA) de *Caulobacter vibrioides* CB15 (Código PDB: 2OOC) (Xu Q *et al.*, 2009) y de los dominios REC-REC-GGDEF de la proteína PleD de *Caulobacter vibrioides* CB15 (Código PDB: 2V0N) (Chan C *et al.*, 2004) ambas secuencias se utilizaron como plantillas estructurales. Para los alineamientos comparativos de las secuencias obtenidas se utilizó la plataforma de CLUSTAL W (<https://www.ebi.ac.uk/jdispatcher/msa/clustalo>). El análisis de la estructura obtenida por SWISS-MODEL de CdgE de *A. baldaniorum* Sp245 se realizó con el software CHIMERAX (Pettersen *et al.*, 2004).

Clonación del fragmento HPT del gen *CdgE*

Si creció la cepa *A. baldaniorum* Sp245 en medio K-lactato durante 18 horas en agitación a 150rpm a 30°C. Se extrajo DNA genómico mediante el método de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) (Murra, *et al.* 1980) (anexo 4) y se comprobó por medio de gel agarosa al 1% y con electroforesis. La amplificación del fragmento se realizó con las condiciones mencionadas anteriormente con el uso de los primers F-cdgE-sec1 y R-cdgE-sec1.

Se clonó en el vector pGEM-T-EASY como el proveedor lo indica (Promega), y se transformó en células quimiocompetentes de *E. coli* DH5 α , las cuales crecieron en placas de LB a 37°C durante 12h y se seleccionaron las clonas por X-GAL 40 μ g/mL y por resistencia a ampicilina 100 μ g/mL.

A la clona seleccionada la cual contenía el plásmido, se creció en LB líquido suplementado con ampicilina 100 µg/mL durante 12 horas a 31°C, se realizó la extracción plasmídica (Sambrook, *et al.*, 1989) (Anexo 1). Se comprobó por análisis de restricción y PCR. Confirmado el fragmento, ésta se envió a secuenciar por el método de Sanger y posteriormente se analizó la secuencia obtenida a partir de un BLASTN y BLASTX ([BLAST: Basic Local Alignment Search Tool](#)) así como un alineamiento comparativo de la secuencia de la base de datos y la secuencia obtenida (Anexo 5).

Transformación cepa *E. coli* AR3110 Δ cdgE y *E. coli* s17.1 pDZ1-1

En virtud de los recientes resultados de Pfiffer y colaboradores en 2019 se decidió utilizar la cepa *E. coli* AR3110 Δ cdgE para los experimentos de estimación de los niveles de di-GMPc. De igual manera debido a que la cepa *E. coli* s17.1/pDZ1-pQE-31 *cdgA* había perdido la fluorescencia se decidió realizar de nuevo la transformación.

Las células de *E. coli* s17.1 y en *E. coli* AR3110 Δ cdgE se hicieron quimiocompetentes por el método de Mendel e Higa (1970)(Anexo 3), y se transformaron con el plásmido *pDZ1* (Zamorano Sánchez, 2019.) en LB suplementado con gentamicina 5 µg/mL a 37° C durante 12 horas, estas se confirmaron por microscopia de fluorescencia con los el fluoróforo Amcyan que se excita de 457nm a 520nms y del fluoróforo reportero TurboRFP que se excita de 553nm a 574nm.

Para la cepa de *E. coli* s17.1 pDZ1-2 se tomó la cepa pLIL2-*cdgA* esta se creció en medio LB amplificado con ampicilina 100 µg/mL y cloranfenicol 3.7 µg/mL durante 12 horas a 31°C, y se extrajo el plásmido pQE-31 (Sambrook, *et al.*, 1989) (Anexo 1).

El plásmido pQE-31 se transformó en células quimiocompetentes *E. coli* s17.1 *pDZ1*-1 y en *E. coli* AR3110-1, estas se crecieron las placas de LB a 37°C durante 12h y se seleccionaron las clonas por resistencia a gentamicina 5 µg/mL y ampicilina 100 µg/mL. Se hizo la comprobación por restricción y PCR.

Clonación del ORF del gen *cdgE*

Utilizando el DNA extraído de *A. baldaniorum* Sp245 se amplificó el ORF del gen *cdgE* de *A. baldaniorum* Sp245, la amplificación del fragmento se realizó con las condiciones vistas anteriormente

La clonación se realizó en el vector pGEM-T-EASY como lo indica el proveedor (Promega) y se realizó la transformación en las células quimiocompetentes *E. coli* DH5 α , estas se crecieron las placas de LB a 37°C durante 12h y se seleccionaron las clonas por X-GAL 40 μ g/mL y por resistencia a ampicilina 100 μ g/mL.

Subclonación en el vector pGEX4T1

A la clona que contenía el amplificado se creció en LB líquido suplementado con ampicilina 100 μ g/mL a 37°C durante 12 horas y se llevó a cabo la extracción de DNA plasmídico (Sambrook, *et al.*, 1989) (Anexo 1). Se comprobó por restricción y PCR.

Se realizó la extracción del fragmento del plásmido el cual corresponde al gen *cdgE* de *A. baldaniorum* Sp245 por medio de sitios de restricción que rodean el gen y se hizo la subclonación en el vector de expresión pGEX4T1, realizada la ligación del fragmento al plásmido este se transformó en células quimiocompetentes *E. coli* s17.1 *pDZ1-1* y en *E. coli* AR3110-1 anteriormente hechas. Estas se crecieron las placas de LB a 37°C durante 12h y se seleccionaron las clonas por resistencia a gentamicina 5 μ g/mL y ampicilina 100 μ g/mL. Se hizo la comprobación por restricción y PCR.

Determinación de la función de diguanilato ciclasa de la proteína CdgE a través de un biosensor de di-GMPc

La determinación de di-GMPc se realizó en el sistema heterólogo mediante un biosensor específico para el di-GMPc y se efectuó la evaluación de la producción de di-GMPc de manera macroscópica visualizando la intensidad que contenían los medios y de manera microscópica utilizando un microscopio Nikon TE2000U equipado con un objetivo 100X (objetivo de inmersión en aceite). Las cepas *E. coli* S17.1-2, *E. coli* S17.1 *pDZ1-3*, *E. coli* S17.1 *pDZ1-1*, y *E. coli* AR3110-2, *E. coli* AR3110-3, *E. coli* AR3110-1, fueron crecidas en

LB suplementado con gentamicina 5 $\mu\text{g/mL}$ y ampicilina 100 $\mu\text{g/mL}$ hasta que presentaran una DO de 600nms entre 0.4 - 0.6 y se añadió el inductor IPTG en una concentración final de 0.5mM y se dejó creciendo a 30°C en agitación de 150rpm. Cada 24 se tomaron las muestras, una vez acabado estos tiempos se tomó 1mL de medio de cada cultivo y se concentró 10 veces, se resuspendió el paquete celular en agua destilada para su visualización macroscópica. Para la visualización microscópica se depositó una gota de cada uno de los cultivos en un cubreobjetos cubriendo el cultivo con agarosa [1 % p/v]. Se utilizó el microscopio de fluorescencia en el cual se ocupará el fluoróforo Amcyan que se excita de 457nm a 520nms y del fluoróforo reportero TurboRFP que se excita de 553nm a 574nm. Las imágenes obtenidas fueron editadas empleando el software NIS Elements Advanced Research (Nikon Instruments Inc). Obteniendo el RFI (Relative Fluorescent Intensity) que representa la relación entre las intensidades de fluorescencia de TurboRFP y AmCyan y es directamente proporcional a los niveles de di-GMPc.

Resultados

Evaluación de la secuencia del gen *cdgE*

Para iniciar el análisis del gen *cdgE* de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 se rescató su secuencia (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/WP_014198789.1). El gen *cdgE* de *A. baldaniorum* Sp245 de acuerdo con el análisis en la plataforma CONSERVED DOMAINS de NCBI, presenta dominios conservados que sugieren una posible actividad de diguanilato ciclasa. Los resultados indicaron que pertenece a la familia PleD y que además posee un dominio adicional del tipo HPT. Para verificar estos resultados se utilizó la plataforma SMART PROTEIN en donde se pudieron identificar los dominios HPT, REC, REC y GGDEF los cuales forman parte de la proteína CdgE de *A. baldaniorum* Sp245 (Figura 8).

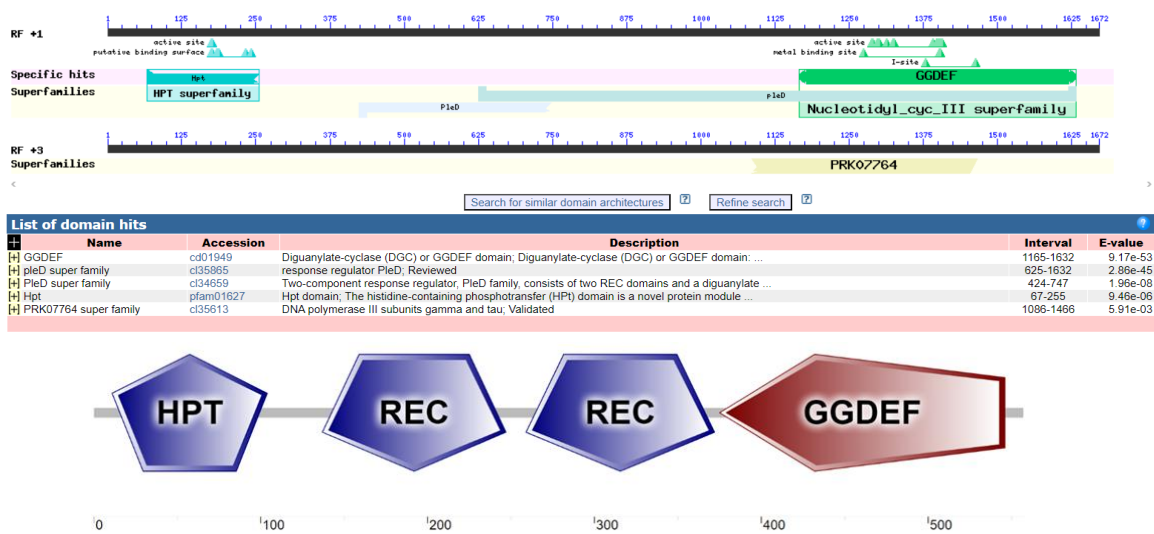


Figura 8. Predicción de dominios. Resultados otorgados por las plataformas CONSERVED DOMAINS (arriba) obteniendo los dominios de HPT y los dominios de una proteína tipo PleD (REC-REC-GGDEF) y SMART PROTEIN (abajo) obteniendo

Se realizó la búsqueda de secuencias similares en BLASTN y BLASTP, teniendo como resultados que no se encontraron secuencias de alto porcentaje de identidad (Figura. 9).

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

Sequences producing significant alignments

DownloadSelect columnsShow100?

select all

3 sequences selected

GenBankGraphicsDistance tree of resultsMSA Viewer

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	Azospirillum brasilense Sp245 plasmid AZOBR_p3 complete genome	Azospirillum baldaniorum	3092	3092	100%	0.0	100.00%	778798	HE577330.1
☒	Azospirillum baldaniorum strain Sp245 plasmid Sp245_p03	Azospirillum baldaniorum	3092	3092	100%	0.0	100.00%	810374	CP022255.1
☒	Azospirillum argentinense strain MTCC4035 plasmid p1 complete sequence	Azospirillum argentinense	1033	1033	96%	0.0	78.52%	1930550	CP032322.1

Descriptions

Graphic Summary

Alignments

Taxonomy

Sequences producing significant alignments

DownloadSelect columnsShow100?

select all

100 sequences selected

GenPeptGraphicsDistance tree of resultsMultiple alignmentMSA Viewer

	Description	Scientific Name	Max Score	Total Score	Query Cover	E value	Per. Ident	Acc. Len	Accession
☒	diguanylate cyclase [Azospirillum baldaniorum]	Azospirillum baldaniorum	1127	1127	100%	0.0	100.00%	557	WP_014198789.1
☒	diguanylate cyclase [Azospirillum baldaniorum]	Azospirillum baldaniorum	1117	1117	100%	0.0	99.10%	557	WP_145708272.1
☒	diguanylate cyclase [Azospirillum argentinense]	Azospirillum argentinense	867	867	98%	0.0	78.98%	556	WP_137116694.1
☒	TPA diguanylate cyclase [Azospirillaceae bacterium]	Azospirillaceae bacterium	452	452	96%	1e-149	48.17%	560	HYD30959.1
☒	diguanylate cyclase [Oscillatoria sp. PMC 1076.18]	Oscillatoria sp. PMC 1076.18	422	422	97%	1e-137	40.88%	565	MEC4982938.1
☒	diguanylate cyclase [Oscillatoria sp. PMC 1050.18]	Oscillatoria sp. PMC 1050.18	418	418	97%	4e-136	40.67%	567	MEC4895182.1
☒	diguanylate cyclase [Oscillatoria salina]	Oscillatoria salina	417	417	97%	6e-136	40.91%	567	WP_224408963.1
☒	diguanylate cyclase [Kastovskya adunca ATA6-11-RM4]	Kastovskya adunca ATA6-11-...	405	405	97%	4e-131	40.78%	565	MBW4649107.1
☒	diguanylate cyclase [Sulfuriferula thiophila]	Sulfuriferula thiophila	396	396	94%	7e-128	40.71%	558	WP_124949366.1
☒	diguanylate cyclase [Synechococcus sp. Nb3U1]	Synechococcus sp. Nb3U1	396	396	95%	1e-127	42.51%	556	WP_235277387.1

Figura 9. **Resultados BLAST.** Resultados otorgados por BLASTN (arriba) y BLASTP (abajo), rodeando los resultados de importancia que significa que tan similar es a la secuencia del gen o proteína de CdgE de *Azospirillum baldaniorum* Sp245

Alineamientos de la proteína CdgE

Se decidió realizar un alineamiento de las secuencias aminoacídicas de los dominios HPT, REC, REC y GGDEF de la proteína CdgE, con proteínas que ya han sido cristalizadas y comprobadas experimentalmente. Debido a que no existe ninguna proteína con esta arquitectura se decidió realizar el alineamiento del dominio HPT aparte; para lo cual se comparó con proteínas HPT solubles de las proteínas ShpA de *Caulobacter vibroides* CB15 (PDB:200C), HptB de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (PDB: 7C1I), ArcB de *Escherichia coli* (PDB:2A0B) y por último ZmHP2 de *Zea mays* (PDB:1WN0), se decidió utilizar la secuencia de un organismo eucariota para comprar la similitud de estos resultados mostrados en la figura 10.



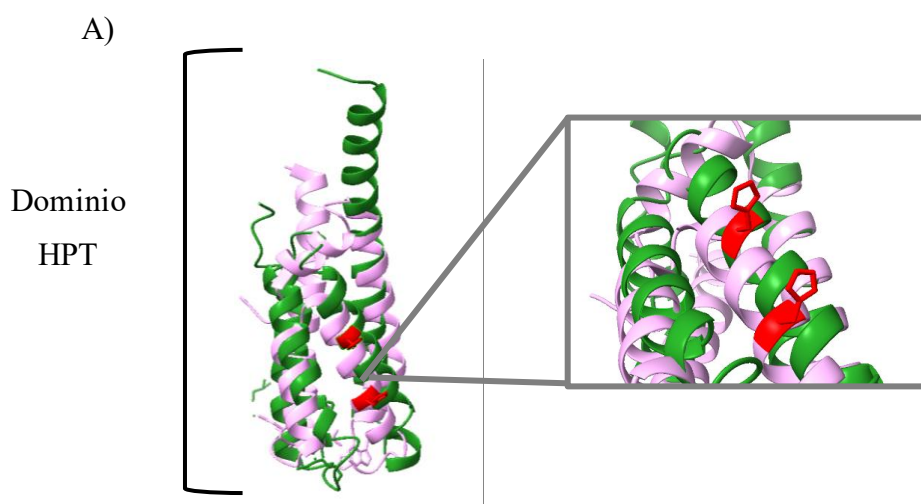
Figura 10. **Alineamiento dominio HPT.** Alineamiento de secuencias nucleotídicas del dominio HPT de diversas proteínas cada título pertenece a ShpA de *C. vibroides* CB15 (PDB:2V0N), ArcB de *Escherichia coli* (PDB:2A0B), ZmHP2 de *Zea Mays* (PDB:1WN0), CdgE *A. baldaniorum* Sp245 y HptB de *P. aeruginosa* PAO1 (PDB: 3I5B), en el recuadro rojo se muestra el residuo de H el cual podría participar en la fosforilación. En medio de los alineamientos un WEBLOGO de los aminoácidos mayormente conservadas.

Se tuvo en cuenta las mismas características para la comparación de los demás dominios de la proteína CdgE (REC-REC-HPT), esta se comparó con las proteínas PleD de *Caulobacter Vibroides* CB15 (PDB: 2V0N), WspR de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (PDB: 3I5B) y DgcR de *Leptospira biflexa* (PDB:6ZXB). Debido a que DgcR y WspR solo tenían un dominio REC, éste se utilizó para comparar ambos REC de la proteína CdgE de *A. baldaniorum* Sp245 como se visualiza en los resultados de la figura 11.

Como se observa en ambas figuras (10 y 11), los motivos importantes para llevar a cabo su actividad como la histidina (H) conservada en el HTP, el aspartato (D) y los aminoácidos serina (S) o treonina (T) en ambos REC y el motivo GGDEF se encuentra conservados por lo que sugiere que la proteína en general puede presentar función de DGC en la bacteria.

Modelaje comparativo de la proteína

El modelado estructural de la proteína CdgE se realizó a partir de la predicción obtenida de la página SWISS MODEL que nos otorgó un GMQE de 0.81, el dominio HPT fue comparado con la proteína ShpA de *Caulobacter vibroides* CB15 (PDB:200C) cuyo HPT es de dominio libre. Mientras que el resto de la proteína de CdgE se comparó con la proteína PleD de *Caulobacter vibroides* CB15 (PDB:2V0N) ya que este contiene los mismos dominios. El dominio HPT presentó una estructura de 4 α hélices, mientras que la proteína ShpA (PDB:200C) presentaba 5 α hélices. Por otro lado, en el resto de la proteína CdgE (REC-REC-GGDEF), en los dominios de REC diferían conforme a los dominios REC de la proteína PleD, sin embargo, el dominio GGDEF de CdgE era similar al dominio GGDEF de la proteína PleD. Teniendo en cuenta estos resultados y los alineamientos anteriormente realizados sugiere que la proteína CdgE pudiese llevar a cabo la actividad catalítica.



B)

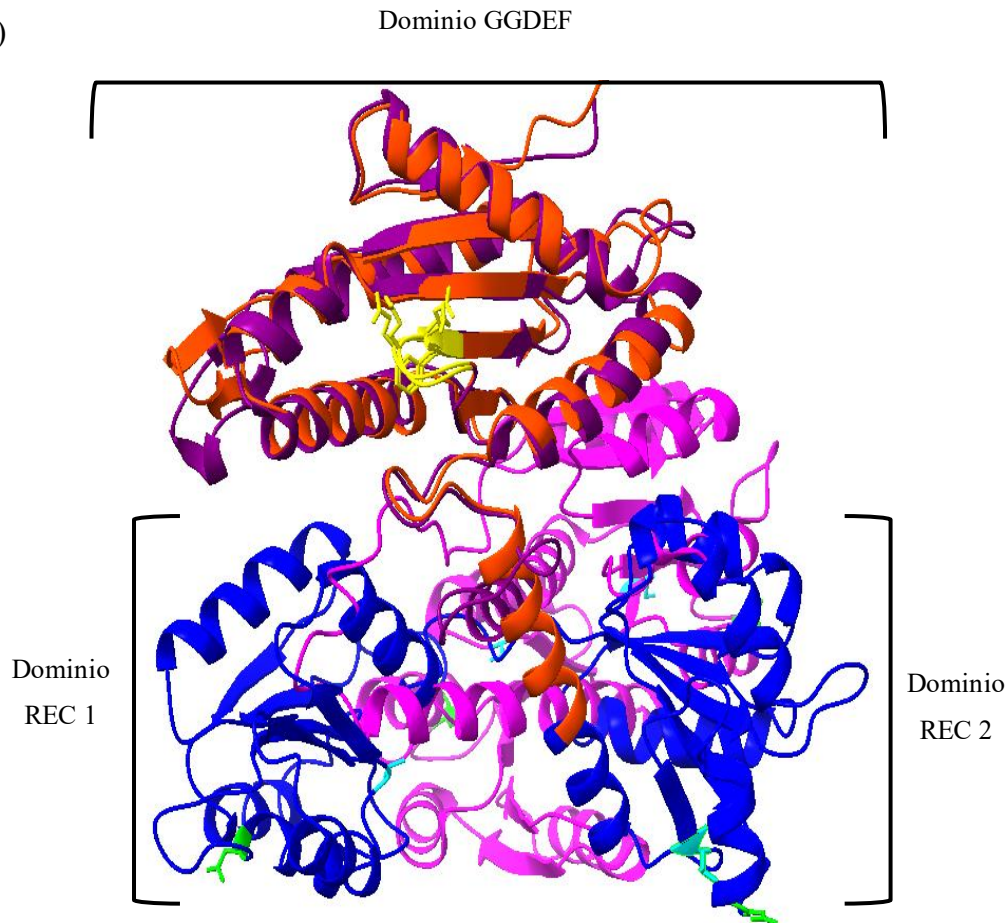


Figura.12. **Estructuras terciarias de la proteína CdgE.** A) superposición del dominio HPT de CdgE (verde) contra la proteína ShpA de *Caulobacter vibroides* CB15 (PDB:200C) (rosa). La histidina conservada involucrada en la fosforilación esta remarcada en rojo los valores del modelo proporcionados por ChimeraX tuvo un RMSD de: 1.447 Å. B) Superposición del resto de la proteína de CdgE. En rojo el dominio GGDEF y en azul los dominios REC, contra la proteína PleD de *Caulobacter vibroides* CB15 (PDB: 2V0N) en morado el dominio GGDEF y en rosa los dominios REC, en amarillo se marca el sitio GGDEF, marcando en cyan la tirosina o serina encargados de la dimerización y en verde el ácido aspártico involucrado en la fosforilación el valor del modelo proporcionado por ChimeraX es de un RMSD de: 0.883 Å.

Obtención del amplificado de PCR del fragmento HPT del gen *cdgE*

Debido a que la estructura del gen *cdgE* de *A. baldaniorum* Sp245 es no canónica para un regulador de respuesta se decidió resecuenciar desde la región intergénica hasta el dominio HPT y verificar que no hubiera un error en la secuencia, así como un codón de paro que sugiriera la presencia de un dominio HPT soluble.

Con las condiciones descritas previamente en la sección de métodos, se realizó una primera PCR utilizando una temperatura de alineamiento (T_m) de 54 °C. El objetivo fue obtener el fragmento esperado de 951 pb para su posterior clonación en un vector de mantenimiento. En la figura 13 se muestra el producto amplificado correspondiente al tamaño esperado.

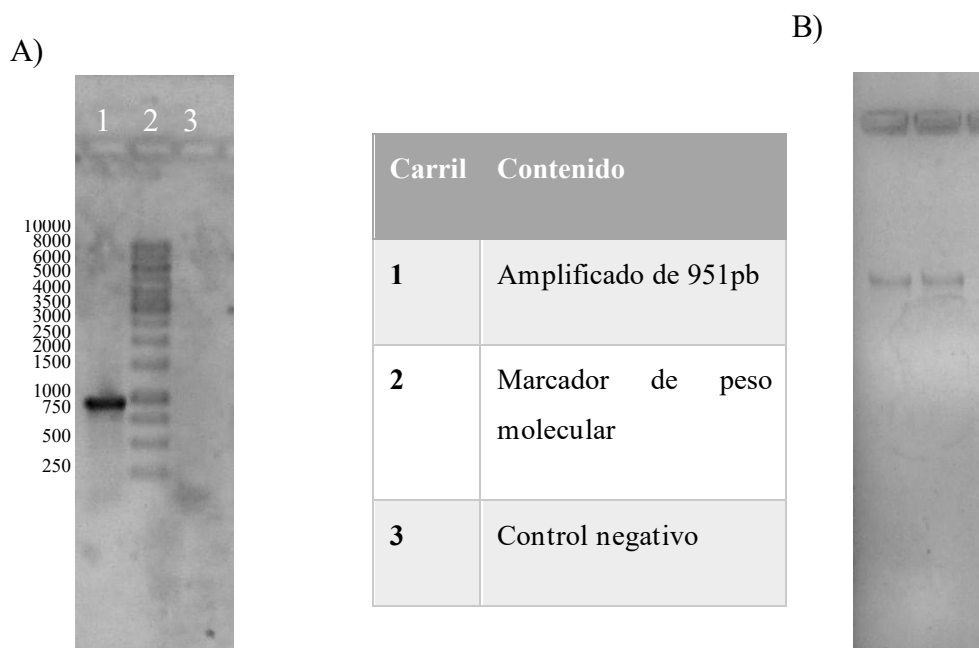


Figura 13. Amplificación del fragmento HPT (951 pb) del gen *dgcE* de *A. baldaniorum* Sp245 por PCR. A) Producto de PCR del fragmento HPT del gen *dgcE* de *A. baldaniorum* Sp245, a su costado se encuentra la tabla del contenido de cada carril. B) ADN genómico usado como molde.

Clonación del fragmento HPT del gen *cdgE* al vector pGEM-T-EASY

Establecida la temperatura y confirmado el amplificado deseado se procedió a realizar la inserción del fragmento en el plásmido de pGEM-T-EASY con el propósito de mantener el fragmento para su posterior secuenciación, de esta manera se obtuvo la construcción llamada pGEM-T-EASY-Sec1*cdgE* (Figura 14).

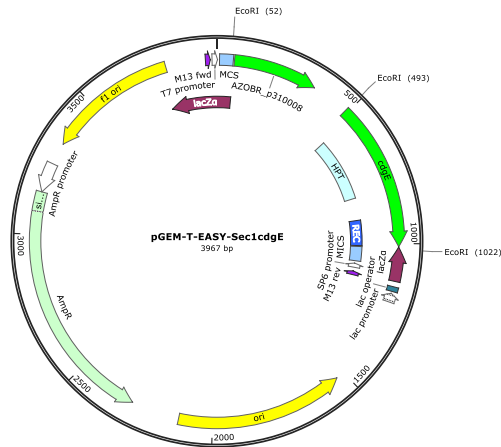


Figura 14. Mapa del plásmido pGEM-T-EASY-Sec1cdgE.

Realizada la transformación obtuvimos dos clonas (#37 y 38). Para confirmar que las clonas poseyeran el fragmento, se les realizó PCR con los oligonucleótidos anteriormente hechos (F-cdgE-sec1 y R-cdgE-sec1) y la enzima de restricción EcoRI el cual sus sitios de restricción se ubicaban en el plásmido pGEM-T-EASY y cuya restricción genera tres fragmentos: el primer fragmento de 2997pb, el segundo de 529pb y el ultimo de 441pb. La clona 37 fue la única que contaba con el fragmento esperado como se visualiza en la figura 15.

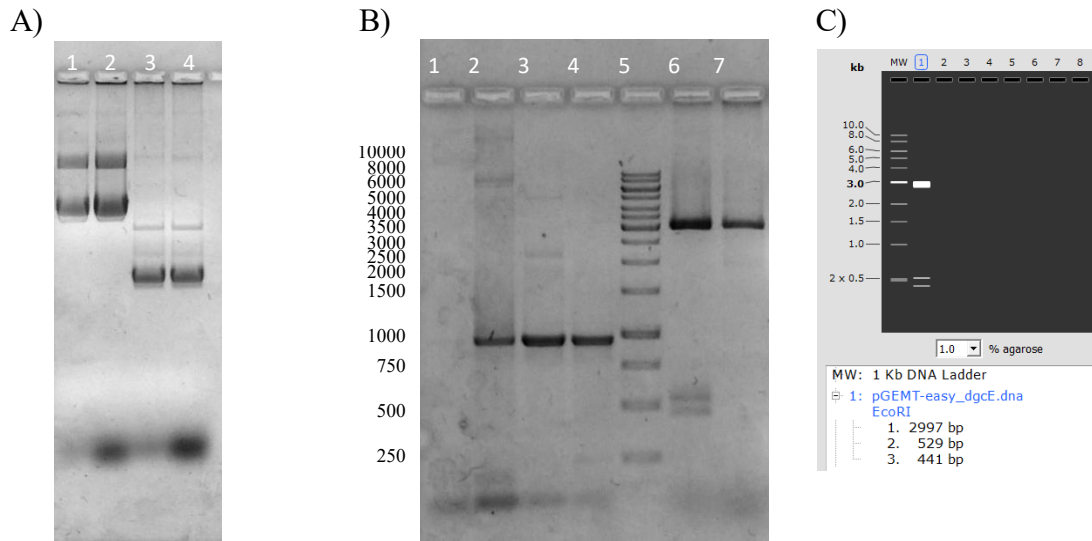


Figura 15. Análisis del amplificado del fragmento HPT del gen *cdgE* de *A. baldaniorum* Sp245 de la clonación obtenida. A) Extracción plasmídica de las clonas rescatadas, en el carril 1 y 2 se encuentra el DNA de la clona 37, en el carril 3 y 4 el DNA de la clona 38, se utilizaron el DNA de los carriles 1 y 3 para su templado en el PCR y restricción. B) Carril 1: Control negativo, carril 2 y 3: producto PCR clona 37 y 38 respectivamente, Carril 4: control positivo del DNA de *A. baldaniorum* Sp245, carril 5: Marcador de peso, carril 6 y 7: restricción con la enzima EcoRI de la clona 37 y 38 respectivamente. C) Análisis del patrón de restricción *in silico* realizado en SNAPGENE

Secuenciación del fragmento HPT del gen *cdgE*.

Una vez confirmado el fragmento, se procedió a su secuenciación. Con los resultados obtenidos, se realizaron análisis BLASTN y BLASTX con el objetivo de comparar la secuencia obtenida con la reportada en la base de datos. Ambos análisis mostraron un 100 % de identidad.

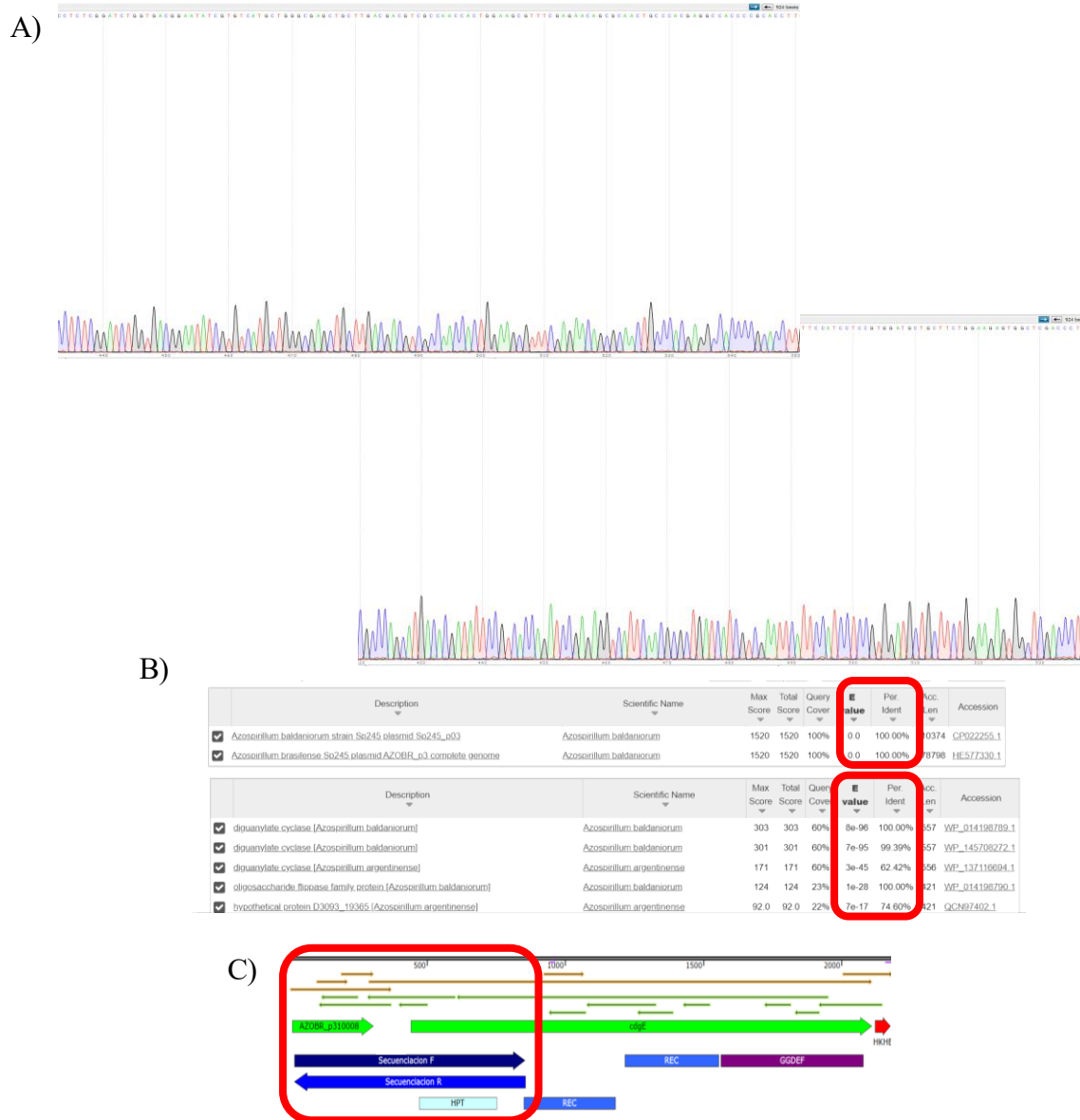
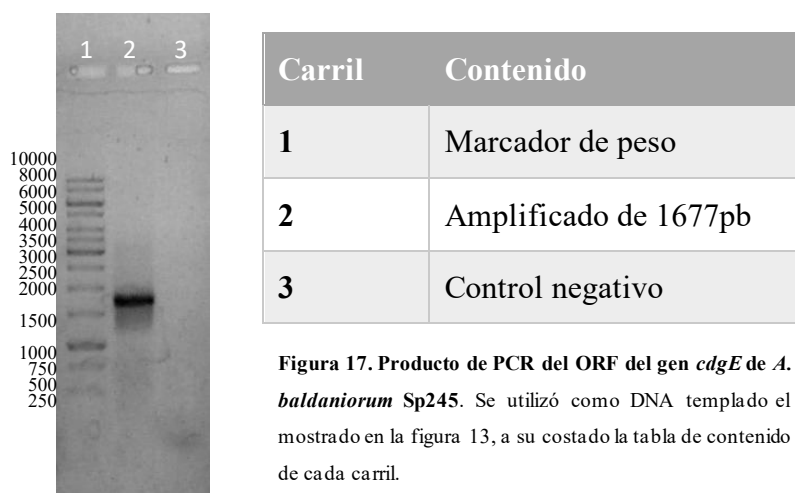


Figura 16. Resultados de la secuenciación del fragmento HPT del gen *cdgE*. A) Trazado de secuenciación, en la parte izquierda la región amplificada por el primer forward al costado la región amplificada por el primer reverse, realizado en SNAPGENE. B) En la parte superior se muestran los resultados otorgados por BLASTN rodeando en rojo el porcentaje de identidad, en la parte inferior resultados otorgados por BLASTX rodeando en rojo el porcentaje de identidad. C) Región que se secuenció, realizado en SNAPGENE.

Los resultados mostraron que el amplificado coincidía con lo que se reportaba en la base de datos (Figura 16), de tal manera que se confirmó que este dominio forma parte de la proteína CdgE de *A. baldanorium* Sp245.

Clonación del ORF del gen *cdgE* en pGEM-T-EASY

Una vez verificada la secuencia se procedió a verificar su función como diguanilato ciclasa. A partir de las condiciones anteriormente descritas se estableció una T_m de 54°C para la amplificación del ORF el cual nos debería dar un amplificado de 1677pb tal y como se muestra en la figura 17.



Ya establecida la temperatura de la PCR y obtenido el fragmento, se procedió a realizar la clonación en el vector pGEM-T-EASY, el cual se nombró pGEM-T-EASY-*cdgE* (Figura 18).

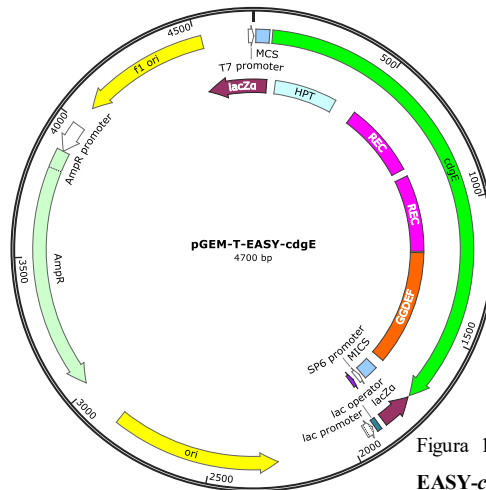


Figura 18. Mapa del plásmido pGEM-T-EASY-*cdgE*

Para confirmar la inserción del ORF en el vector pGEM-T-EASY, se seleccionaron cinco clonas a las que se les realizó una PCR para verificación del fragmento. De estas, se seleccionaron dos clonas (#13 y 14), ya que mostraron la presencia del fragmento esperado. A la clona 13 se le realizó restricción, y posteriormente fue seleccionada para extraer su ADN y utilizarlo en la subclonación final.

a)

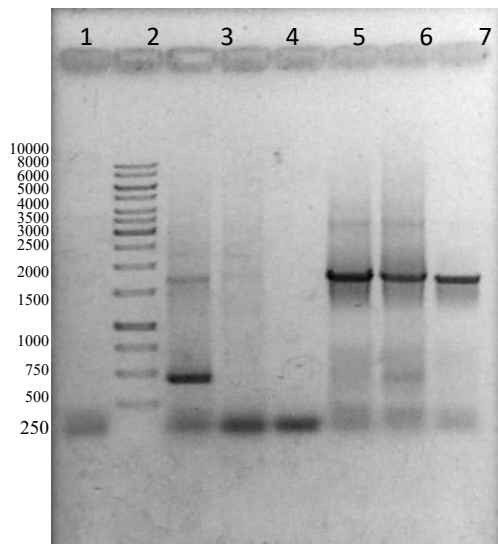
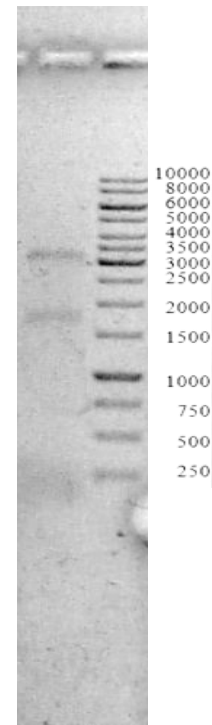


Figura 19. Análisis de los plásmidos de las 5 clonas obtenidas de la clonación en pGEM-T-EASY. a) Amplificado realizado a 5 clonas que fueron seleccionadas de la transformación con el vector pGEM-T-EASY-*cdgE*, a su costado la tabla de contenido de cada carril. b) Restricción de la clona 13 con las enzimas BamHI y XhoI.

b)

Carril	Contenido
1	Control negativo
2	Marcador de peso
3	Clona 10
4	Clona 11
5	Clona 12
6	Clona 13
7	Clona 14
8	Control positivo



Subclonación del ORF del gen *cdgE* al vector pGEX4T1

Se realizó la subclonación en el vector pGEX4T1 utilizando el producto de la digestión con las enzimas BamHI y XhoI del plásmido pGEM-T-EASY-*cdgE* y del vector pGEX4T1, la clonación se llevó a cabo de manera dirigida, garantizando que las clonas obtenidas contengan el fragmento correspondiente a *cdgE* en la orientación 5'-3' de esta manera creando el vector pGEX4T1-*cdgE* (Figura. 20).

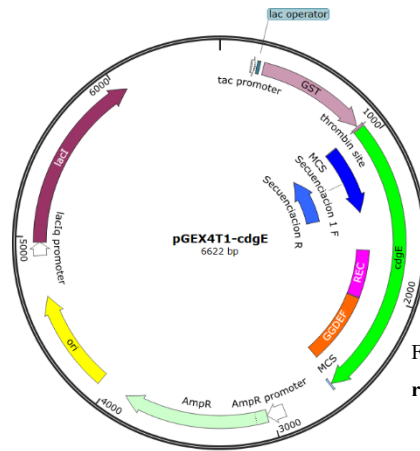
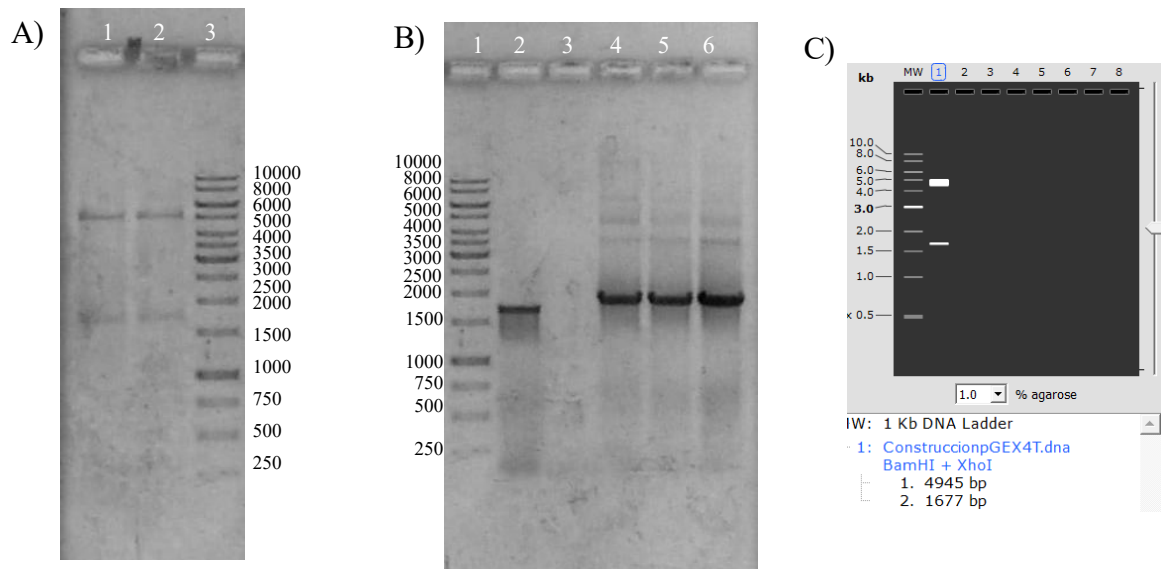


Figura 20. Mapa del plásmido pGEX4T1-*cdgE* realizado

Se seleccionaron 3 clonas a las cuales se les realizó PCR y restricción con las enzimas BamHI y XhoI para verificar que conservaran el fragmento insertado en el vector pGEX4T1.



Estas fueron las clonas 6 y 9, ambas clonas presentaban el patrón del perfil de restricción que se esperaba, así mismo tenían el amplificado de 1677pb esperado, por lo cual se escogió una de ellas para su transformación en las células *E. coli* S17.1 *pDZ1-1* y *E. coli* AR3110-1.

Transformación en células *E. coli* S17.1 con el biosensor *PDZ1*

Se utilizó el plásmido pGEX4T1-*cdgE* para transformar células de *E. coli* S17.1 que contenían el biosensor. De esta transformación se obtuvieron cinco clonas, a las cuales se les realizó PCR para confirmar la presencia del inserto. Posteriormente, las clonas 3 y 4 fueron seleccionadas de forma aleatoria para realizar una digestión por restricción, lo que permitió confirmar que ambas contenían correctamente el ORF del gen *cdgE* (Figura 22).

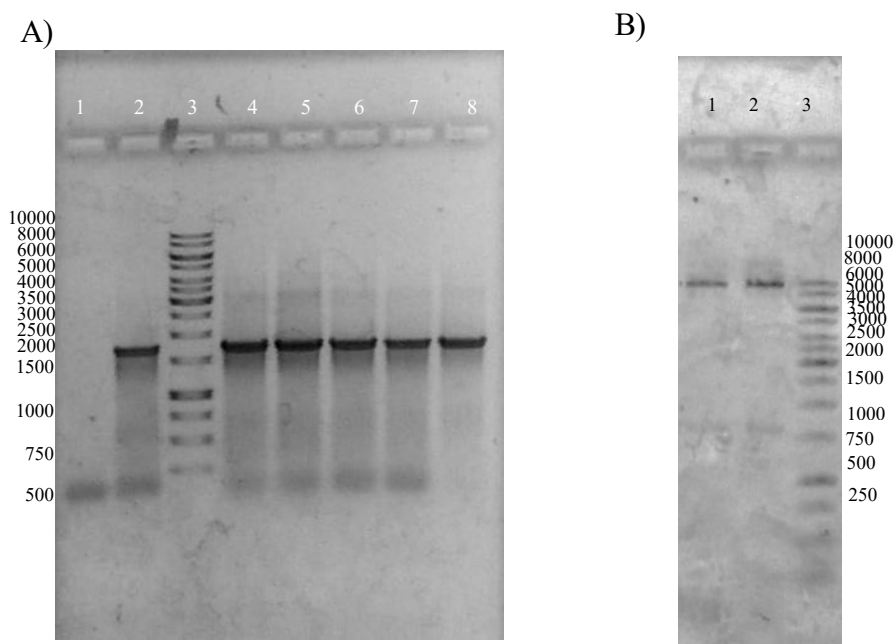


Figura 22. Análisis de los plásmidos de las 3 clonas obtenidas de la transformación en *E. coli* S17.1. A) Amplificado de las clonas rescatadas 1, 2, 3, 4 y 5, carril 1: control negativo, carril 2: control positivo, carril 3: marcador de peso, carril 4: clona 1, carril 5: clona 2, carril 6: clona 3, carril 7: clona 4, carril 8: clona 5. B) Restricción de las clonas 4 y 5, carril 1: restricción clona 3, carril 2: restricción clona 4 y carril 3: marcador de peso

Transformación en células *E. coli* AR3110 Δ *cdgE* con el biosensor *pDZ1*

Se empleó nuevamente el plásmido pGEX4T1-*cdgE* para transformar células de *E. coli* AR3110 portadoras del biosensor (*E. coli* AR3110-1). Ante la ausencia de cepas control, se procedió a realizar la transformación con el vector pQE31-*cdgA*, previamente descrito por López-Lara *et al.*, (2014), conforme a lo descrito en el apartado de Métodos. De estas

transformaciones se rescataron cuatro clonas, realizándose posteriormente la comprobación por restricción a la primera clona de cada cepa de *E. coli* AR3110-3 y de *E. coli* AR3110-2. Los resultados confirmaron la presencia del fragmento esperado correspondiente a cada vector (pGEX4T1 y pQE31, respectivamente) (Figura 23).

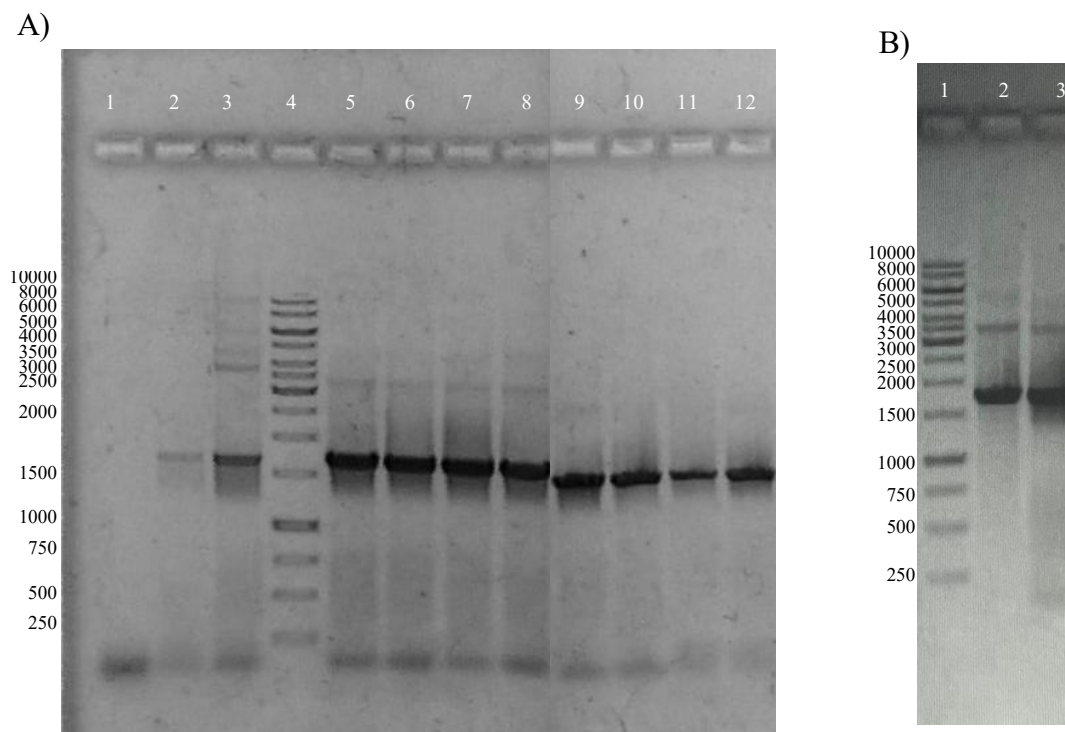


Figura 23. **Análisis de los plásmidos de las diversas clonas rescatadas** A) Amplificado de las diversas clonas. Carril 1: Control negativo, carril 2: control positivo 1 (*A. baldaniorum* Sp245), carril 3: control positivo 2 (*A. brasiliense* Sp7), carril 4: marcador de peso, carril 5: clona 1 *E. coli* AR3110-3, carril 6: clona 2 *E. coli* AR3110-3, carril 7: clona 3 *E. coli* AR3110-3 carril 8: clona 4 *E. coli* AR3110-3, carril 9: clona 1 *E. coli* AR3110-2, carril 10: clona 2 *E. coli*-2, carril 11: clona 3 *E. coli* AR3110-2, carril 12: clona 4 *E. coli* AR3110-2. B) Restricciones de las clonas 1 de los genes *cdgA* y *cdgE*. Carril 1: marcador de peso, carril 2: Restricción con las enzimas BamHI y XhoI al ORF del gen *cdgE*. Carril 3: Restricción con las enzimas HindIII y SalI al gen *cdgA*.

Confirmandonos que las cepas eran exitosas y que podrian ser usadas para la determinación de la función de diguanilato ciclase de la proteína CdgE a través de un biosensor de di-GMPc.

Determinacion de los niveles celulares de di-GMPc

Con el fin de visualizar la función de la proteína CdgE de *A. baldaniorum* Sp245 esta se comparó con la actividad de la proteína CdgA una diguanilato ciclasa caracterizada de *A. brasiliense* Sp7 (López Lara *et al.*, 2014). Para estimar los niveles intracelulares de di-GMPc, se expresó a la proteína CdgA en los modelos bacterianos heterólogos (Zhou *et al.*, 2016), los cuales son las cepas *E. coli* S17.1 *pDZ*-1 y *E. coli* AR3110-1, estos modelos cuentan con los mecanismos necesarios para la activación de la proteína.

Para determinar los niveles intracelulares de di-GMPc se utilizó un riboswitch contenido en el plásmido *pDZ*1. Este sistema expresa de manera constitutiva la proteína fluorescente AmCyan (fluorescencia verde), lo que permite normalizar la señal, mientras que la expresión de la proteína fluorescente TurboRFP (fluorescencia roja) se activa únicamente cuando el riboswitch detecta la presencia de di-GMPc, lo que se traduce en un aumento en la intensidad de fluorescencia. El análisis se realizó cuantificando la intensidad de fluorescencia del riboswitch, este cociente de intensidad de TurboRFP y AmCyan es directamente proporcional a los niveles de di-GMPc.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la proteína CdgE presentó actividad catalítica. Además, se descartó que el incremento en fluorescencia fuera consecuencia del vector o del modelo biológico, gracias al uso de los controles negativos correspondientes de *E. coli* S17.1 *pDZ*1 y de *E. coli* AR3110 (Figura 24.1 y Figura 24.2).

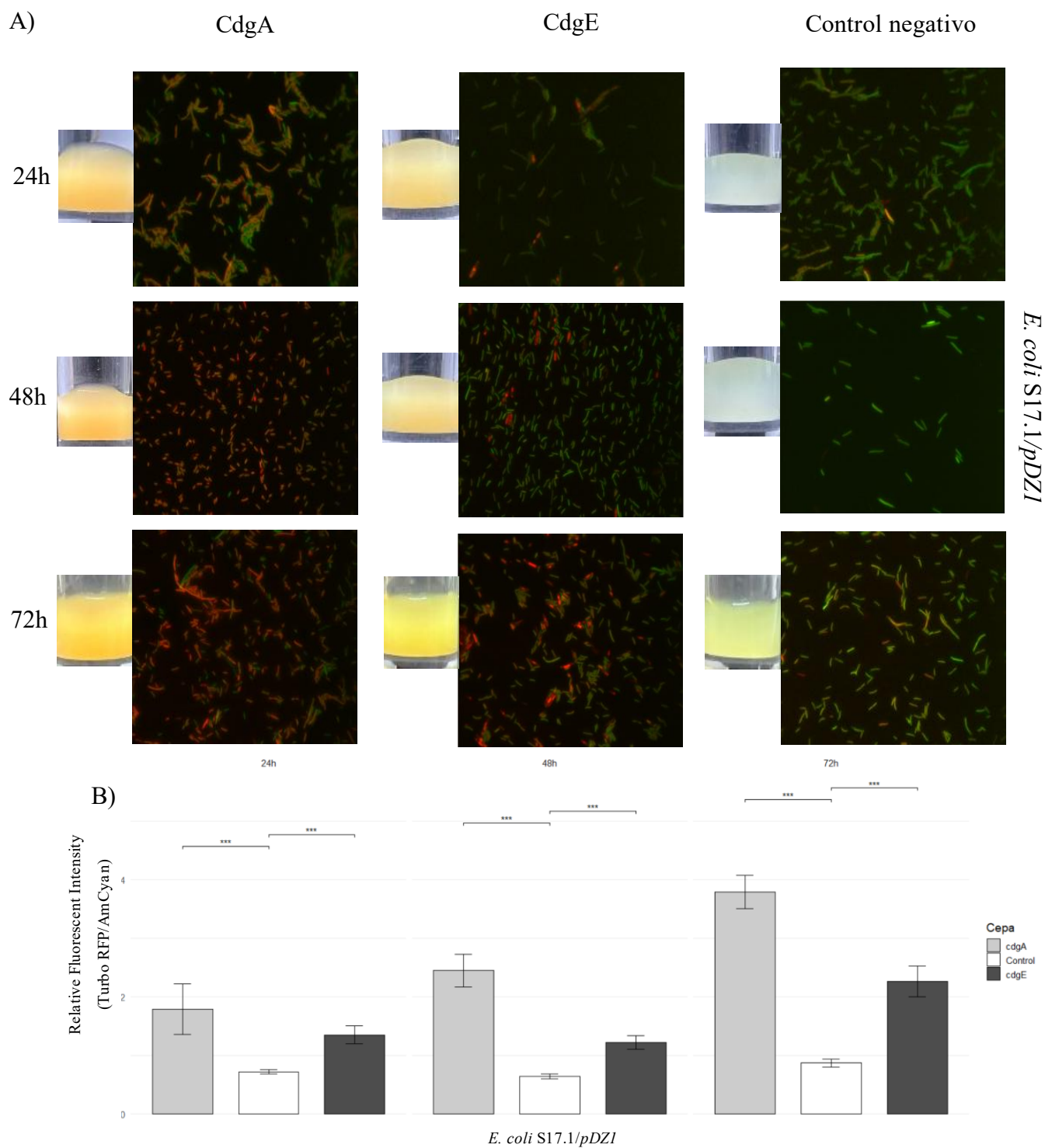


Figura 24.1 **Determinación de los niveles intracelulares de di-GMPc en *E. coli S17.1/pDZ1*.** A) Micrografías de las cepas *E. coli S17.1 pDZ1-1* (control negativo), *E. coli S17.1 pDZ1-3* (control positivo) y *E. coli S17.1 pDZ1-2*, se creció en medio LB suplementado con gentamicina 5 µg/mL, ampicilina 100 µg/mL e IPTG en una concentración final de 0.5mM e incubadas durante 24h, 48h y 72h a 30°C en agitación. Para la micrografía fueron fijadas en la superficie de un cubreobjetos y se selló con agaral 1% para reducir el movimiento. Las imágenes se tomaron a las 24h, 48h y 72h después de la inoculación. B) Gráfica del RFI (Relative Fluorescent Intensity) de las cepas de *E. coli S17.1*, representa las intensidades de fluorescencia de la proteína TurboRFP y AmCyan y es directamente proporcional a los niveles de di-GMPc. Los valores de RFI representan las desviaciones estándar de tres réplicas biológicas y son diferencias significativas indicadas en * P < 0.05 usando la prueba de t-student.

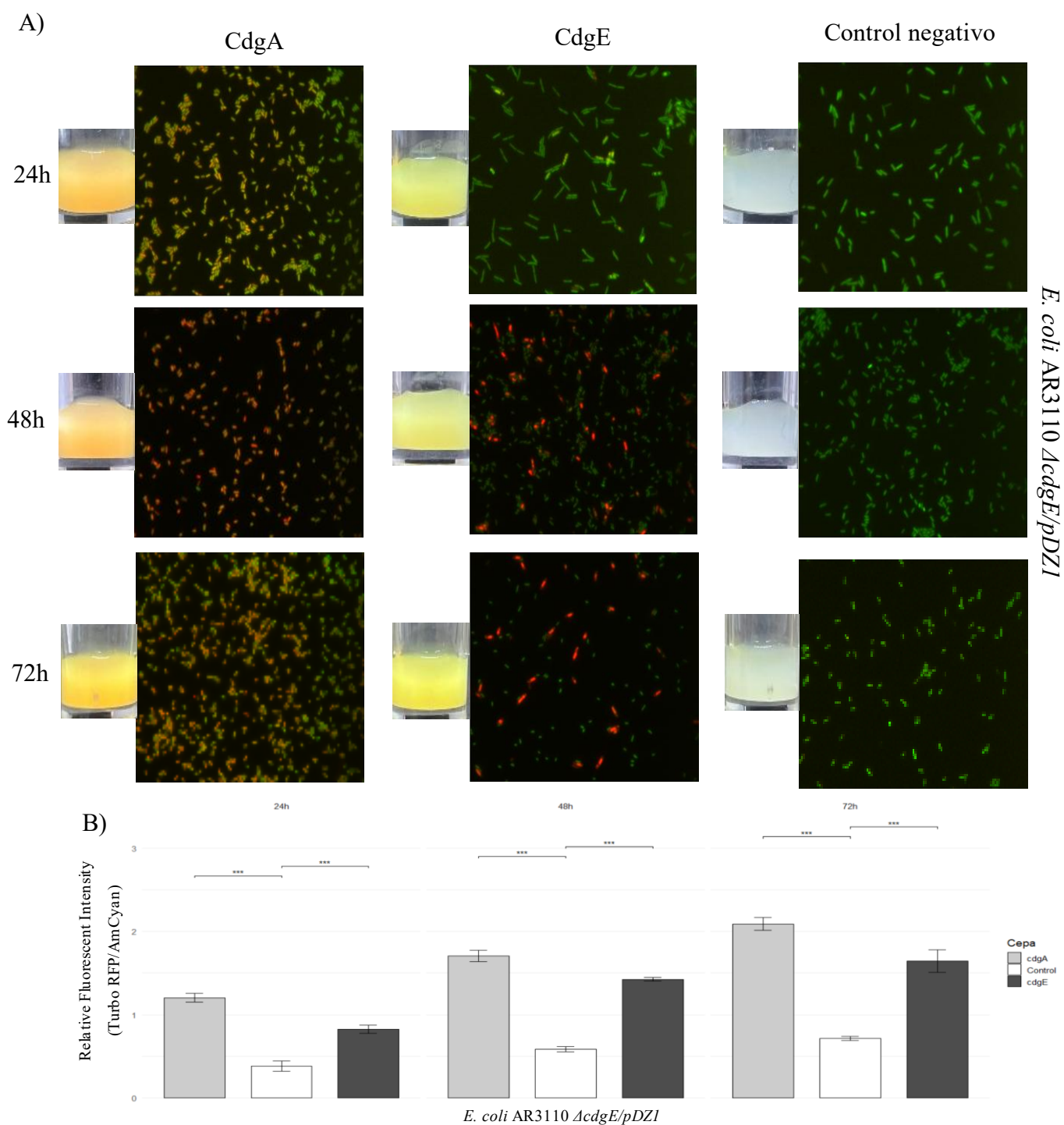


Figura 24.2 **Determinación de los niveles intracelulares de di-GMPc en *E. coli* AR3110 Δ cde/pDZ1.** A) Micrografías de las cepas *E. coli* AR3110-1 (control negativo), *E. coli* AR3110-3 (control positivo) y *E. coli* AR3110-2; ambos grupos se crecieron en medio LB suplementado con gentamicina 5 μ g/mL, ampicilina 100 μ g/mL e IPTG en una concentración final de 0.5mM e incubadas durante 24h, 48h y 72h a 30°C en agitación. Para la micrografía fueron fijadas en la superficie de un cubreobjetos y se selló con agar al 1% para reducir el movimiento. Las imágenes se tomaron a las 24h, 48h y 72h después de la inoculación. B) Gráfica del RFI (Relative Fluorescent Intensity) de las cepas de *E. coli* Ar3110, representa las intensidades de fluorescencia de la proteína TurboRFP y AmCyan y es directamente proporcional a los niveles de di-GMPc. Los valores de RFI representan las desviaciones estándar de tres réplicas biológicas y son diferencias significativas indicadas en * $P < 0.05$ usando la prueba de t-student.

Discusión

Como lo demuestra Borland y colaboradores (2015) *Azospirillum baldaniorum* Sp245 contiene una gran cantidad de TCS los cuales le ha dado una gran versatilidad a la bacteria para responder a múltiples estímulos a los que se enfrenta gracias a este sistema de comunicación que existe, sin embargo, a pesar de esto aún no se ha descrito en su totalidad los RR, surgiendo varias preguntas aún acerca de estos y originando curiosidad acerca del gen *cdgE* de *A. baldaniorum* Sp245 debido a que es un RR con una estructura no reportada hasta la fecha ya que como se mencionó los dominios HPT se encuentran comúnmente en las HK o como proteínas solubles, como lo demuestra Ramírez Mata y colaboradores (2018) donde estudiaron las arquitecturas comunes de las proteínas DGC que únicamente contienen GGDEF de diversas cepas del género de *Azospirillum* (Figura. 25).

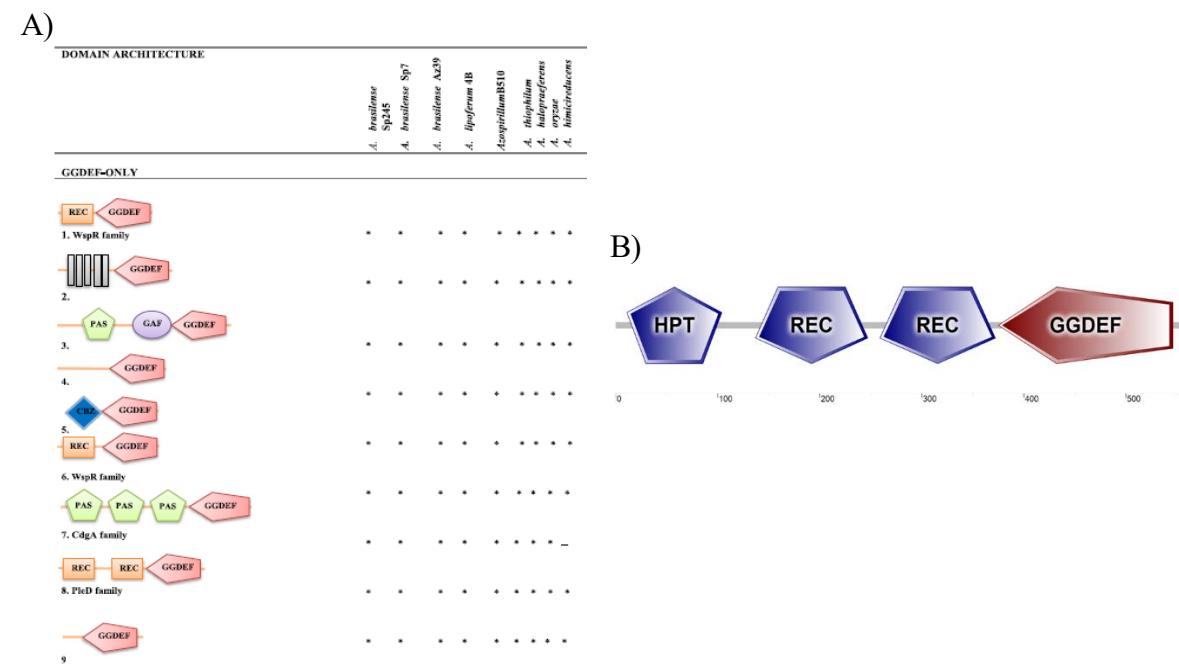


Figura 25. Comparación de la arquitectura proteica de diguanilato ciclasa (DGC) en *Azospirillum*. A) Arquitectura común de DGC que solo contienen GGDEF. En la parte superior se encuentran en distintas cepas del género *Azospirillum* indicando cuales contienen la familia de proteínas de tipo DGC B) Estructura del gen *cdgE* de *A. baldaniorum* Sp245 otorgada por SMART PROTEIN

A partir de esto se pudo visualizar que la arquitectura que tiene *cdgE* de *A. baldaniorum* Sp245 era poco común, sugiriendo que esta podría activar distintas proteínas como las que

se encuentran en la péntada, destacando a la proteína CheY-*Like* la cual es un dominio REC soluble o la proteína LuxO-*Like* la cual es una proteína de unión a DNA teniendo con ello, un sistema complejo de regulación y pudiendo explicar la función del dominio HPT.

En este sentido, se decidió ver si la proteína contenía los residuos conservados que funcionan como sitios catalíticos, esto usando como base múltiples dominios HPT que se han reportado, encontrando que en el dominio HPT de *A. baldaniorum* Sp245 se encontraba el residuo de histidina conservada, sugiriendo que este podría fosfotransferir la señal al dominio REC de *cdgE* de *A. baldaniorum* Sp245, sin embargo se ha visto que esta señal que reciben los dominios HPT puede ser nuevamente transferidas a una cinasa histidinica (HK) permitiendo una mayor complejidad en la vía de señalización o la posibilidad de integrar múltiples señales (Hoch, 2000) (Figura 10). De igual manera ambos dominios REC de *A. baldaniorum* Sp245 contienen el ácido aspártico característico que sugiere la percepción de la señal del HPT o fosforilándose y así promoviendo la actividad de diguanilato ciclasa (Paul *et al.*, 2004), aunado a esto, se encontraron en los dominios REC los aminoácidos S o T conservados los cuales se ha observado que están implicados en los cambios conformacionales pudiendo explicar el funcionamiento de la proteína CdgE de *A. baldaniorum* Sp245 (Figura 11) (Bourret, 2010; Brüderlin *et al.*, 2023).

El modelo de la proteína CdgE de *A. baldaniorum* Sp245 se realizó a través de un modelo predictivo en SWISS MODEL (GMQE=0.81), el cual se comparó con una proteína soluble HPT y PleD, ambas de *Caulobacter vibrioides* CB15 (PDB HPT:200C, PDB PleD: 2V0N), las cuales se priorizó que estuvieran comprobados experimentalmente y cristalizados (Xu *et al.*, 2009; Wassmann *et al.*, 2007). El modelaje comparativo de HPT mostró que contenía la histidina conservada en un sitio bastante similar al modelo base, aunque tenía faltante una de las α hélices (Figura 12-A), esto podía ser debido a que este un modelo predictivo y cabe la posibilidad de tener errores el modelo resultante.

En cuestión del resto de la proteína, tanto el REC1 y REC2 no lograron empalmar correctamente sin embargo contaba con los sitios catalíticos correctos, y el dominio GGDEF era el más conservado ya que el sitio GGDEF correspondía al sitio del modelo base (Figura

12-B), estos errores podían ser debido al modelo predictivo dado a pesar de que tenía un puntaje de GMQE confiable este puede contener errores en la estructura.

Sin embargo, aún quedaba verificar que este dominio fuera parte del gen, debido a que suelen suceder errores en las secuenciaciones masivas de genomas de bacterias, por lo cual decidimos realizar la secuenciación para verificar que este espacio intergénico que existe entre el dominio HPT y el primer dominio REC de la proteína no existiera un codón de paro, gracias a los resultados de la secuenciación que obtuvimos se verificó que no existía un codón de paro alguno (Figura 16).

La identificación de este dominio en la proteína nos brindó una nueva perspectiva sobre su posible funcionalidad. La presencia de dominios adicionales en ciertas proteínas sugiere que pueden desempeñar funciones más amplias que las previamente reportadas. Tal es el caso de la proteína CdGE de *Azospirillum baldaniorum* Sp245, que contiene un dominio HPT. De manera similar, en *Caulobacter crescentus* se ha descrito una proteína con un dominio tipo DHp, cuya función es comparable a la del dominio HPT, ya que ambos están involucrados en la recepción y transferencia de señales al regulador de respuesta (RR). Esta proteína (DHp) puede estar asociada a dominios adicionales, como el dominio CA, lo que sugiere que podrían interactuar con múltiples proteínas.

En conjunto, esto indica que las proteínas con dominios extras o adicionales podrían tener una mayor capacidad para responder a distintos estímulos, permitiéndoles adaptarse mejor a las necesidades fisiológicas de la célula (Brüderlin *et al.*, 2023).

Los análisis de producción de di-GMPc se realizaron en el sistema heterólogo a través del etiquetado con proteínas fluorescentes, los datos se obtuvieron a través de microscopia confocal, primeramente, se evaluó la intensidad y tonalidad presente en los medios de cultivo, en los resultados obtenidos, se observó que las cepas *E. coli* S17.1 pDZ1-3 y *E. coli* AR3110-3 (controles positivos) mostraron un color anaranjado más intenso en el medio, lo cual sugiere una mayor producción de di-GMPc. En contraste, las cepas *E. coli* S17.1 pDZ1-2 y AR3110-2, que contenían el gen de interés, presentaron una tonalidad menos intensa y con

predominancia de verde, indicando una menor activación del biosensor y, por lo tanto, una menor producción de di-GMPc (Figura 24-A-B).

Respecto a las imágenes de microscopia confocal se observaron diferencias claras entre las cepas, además de una característica muy interesante que producían las cepas *E. coli* S17.1 pDZ1-2 y *E. coli* - 2 (Figura 24-A-B), las cuales contaban con fluorescencia roja claramente visible en aglomeraciones solo en ciertas regiones de la bacteria. Este comportamiento se ha documentado previamente en *Caulobacter crescentus*, donde el nivel de di-GMPc aumenta de forma gradual durante la transición G1/S del ciclo celular, alcanzando niveles máximos justo antes del inicio de la replicación del DNA, este incremento localizado de di-GMPc en un polo celular, mostrándonos que CdgE de *A. baldaniorum* Sp245 localiza el di-GMPc según su necesidad, explicando porque solo algunas células presentan esta fluorescencia tal y como sucede en las cepas de *E. coli* S17.1 pDZ1-2 y *E. coli* AR3110-2 (Kaczmarczyk *et al.*, 2024) (Jenal *et al.*, 2020).

Por otro lado, se ha visto en *Rhizobium etli* que este segundo mensajero activa proteínas de la membrana denominadas moonlighting proteins las cuales son proteínas con funciones múltiples que se encargaran de la glucólisis, apoptosis, etc. (Lorite *et al.*, 2023). El comportamiento que realiza la proteína CdgE de *A. baldaniorum* Sp245 permite a la bacteria coordinar múltiples respuestas y señales que recibe esto puede tener efecto en los distintos procesos celulares como lo división celular o la organización del esqueleto bacteriano como se visualiza en otras bacterias, en donde los niveles de di-GPMC influyen en la adaptación de diferentes entornos (Valentini & Filloux, 2016), además de modular distintos comportamientos como la movilidad, adhesión, formación de biopelícula, etc. (Jenal *et al.*, 2017).

Los resultados del RFI mostraron que en las cepas de *E. coli* S17.1 pDZ1-2 y *E. coli* AR3110-2 (Figura 24-C) presentaron una mayor intensidad de fluorescencia en comparación con el control negativo, lo que indica producción de di-GMPc. Sin embargo, dicha fluorescencia fue menor que la observada en el control positivo (*cdgA* de *A. brasilense* Sp7), dándonos diferencias estadísticamente significativas con nuestros datos. Al comparar estos resultados con los reportados por Cacho *et al.*, (2021), quien observó que la proteína CdgC de

Azospirillum baldaniorum Sp245 inducía a una mayor producción de di-GMPc que la proteína CdgA de *A. brasilense* Sp7, sugiriendo que CdgE de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 tiene actividad como diguanilato ciclasa, pero posiblemente en menor medida que CdgC.

Finalmente, se puede concluir que, si bien CdgE posee actividad como diguanilato ciclasa, su capacidad de producción de di-GMPc es considerablemente menor en comparación con otras proteínas de la misma clase, esto podría deberse a la arquitectura antes mencionada, sugiriendo que la señal recibida por el dominio HPT pudiera ser transferida a otra proteína, reduciendo así la activación del GGDEF lo que justificaría esta menor producción de di-GMPc que se está observando (Hengge & Christen, 2009).

Conclusión

Se logró la resecuenciación de la región que codifica para el dominio HPT, lo cual confirmó que el dominio HPT forma parte de la proteína CdgE de *Azospirillum baldaniorum* Sp245. El análisis bioinformático permitió identificar que la proteína tiene conservados los sitios activos y evidenció una estructura distinta a las proteínas base.

Se pudieron realizar exitosamente las clonaciones y subclonación del ORF del gen *cdgE* de *Azospirillum baldaniorum* Sp245 en el vector de expresión. La correcta inserción fue verificada mediante digestión por restricción y análisis en gel, confirmando la presencia del fragmento esperado en los plásmidos utilizados.

Finalmente, se pudo demostrar que la proteína CdgE de *Azospirillum baldaniorum* Sp245, presentaba función de diguanilato ciclasa. A partir del uso del sistema heterólogo el cual contiene el biosensor, se logró medir de manera semicuantitativa los niveles de di-GMPc que producía CdgE en comparación a los controles.

Perspectivas

A partir de los resultados obtenidos, se abren diversas líneas de investigación. En particular, será necesario estudiar de manera detallada el papel del dominio HPT en la modulación de la actividad enzimática de la proteína CdgE, así como en regiones potenciales involucradas en la interacción entre dominios a partir de mutaciones del sitio activo de la proteína y visualizar su comportamiento. De igual manera debido a que esta comprobación se realizó en un sistema heterólogo es necesario comprobar la función de esta proteína en el sistema de *Azospirillum baldanorium* Sp245. Estos trabajos ayudarían a darle un mejor entendimiento a la proteína y así explicar a proteínas similares los cuales contienen dominios extras como lo es la proteína CdgE de *A. baldanorium* Sp245.

Referencias:

1. Aldridge P, Paul R, Goymer P, Rainey P, Jenal U. Role of the GGDEF regulator PleD in polar development of *Caulobacter crescentus*. *Molecular Microbiology*. 1 de marzo de 2003;47(6):1695-708. Disponible en: <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2003.03401.x>
2. Amaresan N, Kumar MS, Annapurna K, Kumar K, Sankaranarayanan A. *Beneficial Microbes in Agro-Ecology: Bacteria and Fungi*. Academic Press; 2020.
3. Beijerinck, M. W. (1925). Über ein Spirillum, welches freien Stickstoff binden kann. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene, Abteilung II*, 63, 353–359.
4. Tarrand, J.J., Krieg, N.R., & Döbereiner, J. (1978). A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*, 24(8), 967–980.
5. Bi S, Sourjik V. Detección de estímulos y procesamiento de señales en la quimiotaxis bacteriana. *Curr Opin Microbiol*. 2018; 45:22-9.
6. Biogenesis in *Caulobacter crescentus*. *Journal Of Molecular Biology*. 19 de mayo de 2009;390(4):686-98. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.05.023>
7. Borland, S., Oudart, A., Prigent-Combaret, C., Brochier-Armanet, C., & Wisniewski-Dyé, F. (2015). Genome-wide survey of two-component signal transduction systems in the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum*. *BMC Genomics*, 16, 833. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1962-x>
8. Bourret, R. B. (2010). Receiver domain structure and function in response regulator proteins. *Current Opinion In Microbiology*, 13(2), 142-149. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2010.01.015>
9. Brüderlin M, Böhm R, Fadel F, Hiller S, Schirmer T, Dubey BN. Características estructurales que discriminan los dominios Rec de las quinasas híbridas de histidina de los homólogos de los reguladores de respuesta. *Nat Commun*. 2023;14(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-023-36597-8>
10. Caballero-Mellado J. El género *Azospirillum*. México, D F: UNAM; 2002.
11. Cacho, D. S., Sánchez, D. S. Z., Xiqui-Vázquez, M. L., Góngora, V. I. V., Ramírez-Mata, A., & Baca, B. E. (2021). CdgC, a Cyclic-di-GMP Diguanilate Cyclase of *Azospirillum baldaniorum* Is Involved in Internalization to Wheat Roots. *Frontiers In Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.748393>
12. Chan C, Paul R, Samoray D, Amiot NC, Giese B, Jenal U. Structural basis of activity and allosteric control of diguanilate cyclase. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*. 29 de noviembre de 2004;101(49):17084-9. Disponible en: <https://doi.org/10.1073/pnas.0406134101>
13. Chang C, Stewart RC. La regulación del sistema de dos componentes de diversas vías de señalización en procariotas y eucariotas. *Plant Physiol*. 1998;117(3):723-31.
14. Colin R, Ni B, Laganenka L, Sourjik V. Múltiples funciones de la motilidad flagelar y la quimiotaxis en la fisiología bacteriana. *FEMS Microbiol Rev*. 2021;fuab038.
15. Corral-Lugo A, Torre JD la, Matilla MA, Fernández M, Morel B, Espinosa-Urgel M. Evaluación de la contribución de la señalización basada en quimiorreceptores a la formación de biopelículas. *Environ Microbiol*. 2016;18:3355-72.

16. Dos Santos Ferreira, N., Sant'Anna, F. H., Reis, V. M., Ambrosini, A., Volpiano, C. G., Rothballer, M., Schmid, M., Schwab, S., Passaglia, L. M. P., & Zilli, J. E. (2020). Genome-based reclassification of *Azospirillum brasilense* Sp245 as the type strain of *Azospirillum baldaniorum* sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 70(12), 6203–6212. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004517>
17. Djordjevic S, Goudreau PN, Xu Q, Stock AM, West AH. Structural basis for methylesterase CheB regulation by a phosphorylation-activated domain. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences* 17 de febrero de 1998;95(4):1381-6. Disponible en: <https://doi.org/10.1073/pnas.95.4.1381>
18. Eckert, B., Weber, O.B., Kirchhof, G., Halbritter, A., Stoffels, M., & Hartmann, A. (2001). *Azospirillum doebereineri* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium associated with the C4-grass *Miscanthus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51(1), 17–26.
19. Elder RT. Cloning Techniques Molecular Cloning: A Laboratory Manual T. Maniatis E. R. Pritsch J. Sambrook. BioScience. 1 de diciembre de 1989;33(11):721–2. Disponible en: <https://doi.org/10.2307/1309366>
20. Gamboa-Pérez, A. (2014). DOMINIOS GGDEF EN CRECIMIENTO DE *Azospirillum brasilense*
21. Gao R, Stock AM. Biological Insights from Structures of Two-Component Proteins. *Annual Review Of Microbiology*. 8 de septiembre de 2009;63(1):133-54. Disponible en: <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073214>
22. Gouda S, Kerry RG, Das G, Paramithiotis S, Shin HS, Patra JK. Revitalización de bacterias promotoras del crecimiento vegetal para un desarrollo sostenible en la agricultura. *Microbiol Res*. 2018b;206:131-40. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.08.016>
23. Hengge, R., & Christen, M. (2009). Principles of c-di-GMP signaling in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 7(10), 671-679. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2197>
24. Hoch JA. Two-component and phosphorelay signal transduction. *Current Opinion In Microbiology*. 1 de abril de 2000;3(2):165-70. Disponible en: [https://doi.org/10.1016/s1369-5274\(00\)00070-9](https://doi.org/10.1016/s1369-5274(00)00070-9)
25. Jenal, U., Reinders, A., & Lori, C. (2017). Cyclic di-GMP: second messenger extraordinaire. *Nature Reviews Microbiology*, 15(5), 271-284. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.190>
26. Jung K, Fried L, Behr S, Heermann R. Quinasas de histidina y reguladores de respuesta en redes. *Curr Opin Microbiol*. 2012;15(2):118-24. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2011.11.009>
27. Kaczmarczyk, A., Van Vliet, S., Jakob, R. P., Teixeira, R. D., Scheidat, I., Reinders, A., Klotz, A., Maier, T., & Jenal, U. (2024). A genetically encoded biosensor to monitor dynamic changes of c-di-GMP with high temporal resolution. *Nature Communications*, 15(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-024-48295-0>
28. Letunic, I., Doerks, T., & Bork, P. (2015). SMART: recent updates, new developments, and status in 2015. *Nucleic acids research*, 43(Database issue), D257–D260. <https://doi.org/10.1093/nar/gku949>
29. Lin, S.-Y., Liu, Y.-C., Hameed, A., Hsu, Y.-H., Huang, H.-I., Lai, W.-A., & Young, C.-C. (2016). *Azospirillum agricola* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from

- cultivated soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 66(3), 1453–1458.
30. Lin, S.-Y., Liu, Y.-C., Hameed, A., Hsu, Y.-H., Lai, W.-A., Shen, F.-T., & Young, C.-C. (2013). *Azospirillum fermentarium* sp. nov., a nitrogen-fixing species isolated from a fermenter. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt 10), 3687–3692.
 31. Lin, S.-Y., Shen, F.-T., Young, L.-S., Zhu, Z.-L., Chen, W.-M., & Young, C.-C. (2012). *Azospirillum formosense* sp. nov., a diazotroph from agricultural soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 62(Pt 5), 1176–1182.
 32. Liu C, Sun D, Zhu J, Liu W. Two-Component Signal Transduction Systems: A Major Strategy for Connecting Input Stimuli to Biofilm Formation. *Frontiers In Microbiology*. 10 de enero de 2019;9. Disponible en: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03279>
 33. Lu S, Wang J, Chitsaz F, Derbyshire MK, Geer RC, Gonzales NR. CDD/SPARCLE: the conserved domain database in 2020. *Nucleic Acids Research*. 13 de noviembre de 2019;48(D1): D265-8. Disponible en: <https://doi.org/10.1093/nar/gkz991>
 34. Martínez-Méndez R, Camacho-Hernández DA, Sulvarán-Guel E, Zamorano-Sánchez D. A Trigger Phosphodiesterase Modulates the Global c-di-GMP Pool, Motility, and Biofilm Formation in *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal Of Bacteriology*. 13 de abril de 2021;203(13). Disponible en: <https://doi.org/10.1128/jb.00046-21>
 35. Mata AR, Pacheco CM, Pérez JFC, Sáenz MM, Baca BE. Análisis comparativo in silico de proteínas de señalización GGDEF y EAL de los genomas de *Azospirillum*. *BMC Microbiol*. 2018;18(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1157-0>
 36. Mehnaz, S., Weselowski, B., & Lazarovits, G. (2007). *Azospirillum canadense* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from corn rhizosphere. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(3), 620–624.
 37. Morellge G. Un procedimiento de extracción de plásmidos a escala de miniprep. 1989;2(1).
 38. Murray M, Thompson W. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*. 1980;8(19):4321-5.
 39. Okon Y, Creus CM. Manual para *Azospirillum*: Problemas técnicos y protocolos. 2015 ed. Springer; 2015.
 40. Palacios Castañeda FJ. Papel de la Diguanylate ciclase A (*cdgA*) de *Azospirillum brasilense* en la formación de biopelícula y colonización al trigo [Tesis de licenciatura]. Puebla: Benemérita Universidad Autónoma de Puebla; 2014.
 41. Paul R, Abel S, Wassmann P, Beck A, Heerklotz H, Jenal U. Activation of the Diguanylate Cyclase PleD by Phosphorylation-mediated Dimerization. *Journal Of Biological Chemistry* . 1 de octubre de 2007;282(40):29170-7. Disponible en: <https://doi.org/10.1074/jbc.m704702200>
 42. Paul R, Weiser S, Amiot NC, Chan C, Schirmer T, Giese B. Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain. *Genes & Development*. 15 de marzo de 2004;18(6):715-27. Disponible en: <https://doi.org/10.1101/gad.289504>
 43. Peng, G., Wang, H., Zhang, G., Hou, W., Liu, Y., Wang, E.T., & Tan, Z. (2006). *Azospirillum melinis* sp. nov., a group of diazotrophs isolated from tropical molasses

- grass. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 56(6), 1263–1271.
44. Pfiffer V, Sarenko O, Possling A, Hengge R. Genetic dissection of *Escherichia coli*'s master diguanylate cyclase DgcE: Role of the N-terminal MASE1 domain and direct signal input from a GTPase partner system. *PLoS Genetics* 25 de abril de 2019;15(4):e1008059. Disponible en: 301
 45. Ramírez-Mata A, Fernández-Domínguez IJ, Nuñez-Reza KJ, Xiqui-Vázquez ML, Baca BE. Redes de señalización en la producción de biopelículas en bacterias: quorum sensing, di-GMPc y óxido nítrico. *Rev Argent Microbiol.* 2014;46(3):242-55. Disponible en: http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412014000400012&lng=es&tlng=es
 46. Reinhold, B., Hurek, T., Fendrik, I., Pot, B., Gillis, M., Kersters, K., Thielemans, S., & De Ley, J. (1987). *Azospirillum halopraeferens* sp. nov., a nitrogen-fixing organism associated with roots of Kallar grass (*Leptochloa fusca* (L.) Kunth). *International Journal of Systematic Bacteriology*, 37(1), 43–51.
 47. Reyes Jaramillo I. La micorriza arbuscular (MA) centro de la rizosfera: comunidad microbiológica dinámica del suelo P. UAM-Iztapalapa; 2011 Jun 23.
 48. Rico-Jiménez M, Muñoz-Mira S, Krell T, Matilla MA. Relevancia de la quimiotaxis bacteriana para la colonización e infección de plantas. *Alianzas Y Tendencias BUAP.* 2021;143-72. <http://doi.org/10.5281/zenodo.5771451> Siddiqui ZA. Pgpr: Biocontrol and Biofertilization. Springer; 2010.
 49. Sierra Cacho D, Zamorano Sánchez DS, Xiqui-Vázquez ML, Viruega Góngora VI, Ramírez-Mata A, Baca BE. CdgC, una ciclase de diguanilato cíclico de *Azospirillum baldaniorum* involucrada en la internalización en raíces de trigo. *Front Plant Sci.* 2021;12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.748393>.
 50. Simon R, Priefer U, Pühler A. A Broad Host Range Mobilization System for In Vivo Genetic Engineering: Transposon Mutagenesis in Gram Negative Bacteria. *Bio/Technology.* 1 de noviembre de 1983;1(9):784-91. Disponible en: <https://doi.org/10.1038/nbt1183-784>
 51. Skerman, V.B.D., MacRae, I.C., & Kroppenstedt, R.M. (1983). *Azospirillum largimobile* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium from the rhizosphere of tropical grasses. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 33(1), 86–92.
 52. Tarrand, J.J., Krieg, N.R., & Döbereiner, J. (1978). A taxonomic study of the *Spirillum lipoferum* group, with descriptions of a new genus, *Azospirillum* gen. nov., and two species, *Azospirillum lipoferum* (Beijerinck) comb. nov. and *Azospirillum brasilense* sp. nov. *Canadian Journal of Microbiology*, 24(8), 967–980.
 53. Wassmann, P., Chan, C., Paul, R., Beck, A., Heerklotz, H., Jenal, U., & Schirmer, T. (2007). Structure of BeF3--Modified Response Regulator PleD: Implications for Diguanylate Cyclase Activation, Catalysis, and Feedback Inhibition. *Structure*, 15(8), 915-927. <https://doi.org/10.1016/j.str.2007.06.016>
 54. Xie, C.H., & Yokota, A. (2005). *Azospirillum oryzae* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from the rhizosphere of rice. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55(4), 1435–1438.
 55. Xiqui ML, Romero A, Terán E, Soto L, Baca BE. Nuevo sistema de señalización en bacterias mediado por el (3'5') guanosín-monofosfato-cíclico (di-GMPc). *Elementos: Ciencia Y Cultura.* 2010;17(80):21-9.

56. Xu Q, Carlton D, Miller MD, Elsliger MA, Krishna SS, Abdubek P. Crystal Structure of Histidine Phosphotransfer Protein ShpA, an Essential Regulator of Stalk
57. Yang, Y., Zhang, R., Feng, J., Wang, C., & Chen, J. (2019). *Azospirillum griseum* sp. nov., isolated from lakewater. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 69(12), 3676–3682.
58. Zhou, H., Zheng, C., Su, J., Chen, B., Fu, Y., Xie, Y., Tang, Q., Chou, S., & He, J. (2016). Characterization of a natural triple-tandem c-di-GMP riboswitch and application of the riboswitch-based dual-fluorescence reporter. *Scientific Reports*, 6(1). <https://doi.org/10.1038/srep20871>
59. Zhou, S., Han, L., Wang, Y., Yang, G., Zhuang, L., & Hu, P. (2013). *Azospirillum humicireducens* sp. nov., a nitrogen-fixing bacterium isolated from a microbial fuel cell. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63(Pt 7), 2360–2365.

Anexos

Anexo 1. Extracción de ADN PLASMIDICO POR LISIS ALCALINA CON SDS (modificado de Gilles Morelle, *et al.*, 1989)

1. Tomar una colonia de un cultivo fresco y crecer la bacteria a 37 °C durante 14-16 hr. con aireación vigorosa a 200 rpm en 5 ml de medio LB en tubos de 16x150mm conteniendo el antibiótico adecuado.
2. Cosechar los cultivos (de 3 a 5 ml) bacterianos por centrifugación a baja velocidad (8,000 rpm por 1 min) en tubos de microcentrífuga (eppendorff de 1.5 ml).
3. Eliminar sobrenadante por decantación y quedarse solamente con el paquete celular.
4. Resuspender en 200µl (300µl) de solución reguladora de lisis (Solución 1) 50 mM de Tris-HCl (pH 8.0) y de EDTA 10 mM previamente esterilizada por 20 minutos a 15 libras y 121 °C; agregar lisozima hecha al momento (4 mg/ml).
5. Mantener el tubo con la solución 1 durante 5 min a T° ambiente. (Dejar 10 minutos en 37°).
6. Después agregar 400µl de la solución de lisis (Solución 2) NaOH 200 mM y (SDS) sodium dodecyl sulfate al 1%, mezclar por inversión suavemente de 3-6 veces y mantener 5 min en hielo, no excederse de ese tiempo.
7. Agregar 300µl la solución de precipitado (Solución 3) de acetato de potasio 3.0 M pH 5.5 ajustado con ácido acético, mezclar suavemente por inversión de 3 a 6 veces.
8. Incubar a -20 °C por 30 minutos para que precipite mayor contenido en proteína, RNA de alto peso molecular y DNA cromosómico.
9. Centrifugar por 15 min a 14,000 rpm y a 4o C. (centrifugar x 10 minutos)
10. Tomar el sobrenadante por aspiración y transferirlo a un segundo tubo limpio y estéril, centrifugar nuevamente a 14000 rpm por 15 minutos.
11. Tomar el sobrenadante por aspiración y transferirlo a otro tubo limpio y estéril, agregar 200 µl fenol saturado con Tris/HCl 0.1 M ajustado a un pH= 8 y 200 µl Cloroformo-alcohol Isoamílico, previamente preparados; mezclar suavemente por inversión durante 5 min y centrifugar a 10,000 rpm por 5 min.
12. Después de haber hecho dos lavados con la mezcla de fenol/cloroformo-alcohol isoamílico hacer un último lavado con Cloroformo- Alcohol-Isoamílico 400 µl para eliminar el exceso de fenol; mezclar por inversión y centrifugar a 10,000 rpm por 5 minutos.

13. Aspirar el sobrenadante y transferirlo a un tubo nuevo y estéril tratando de estimar la cantidad obtenida para calcular la cantidad de isopropanol a utilizar.
14. Añadir 0.6 volúmenes de Isopropanol e incubar a T° ambiente por 10 min para precipitar el DNA que se encuentra en el sobrenadante.
15. Centrifugar por 30 min a 14,000 rpm a 4° C.
16. Eliminar el sobrenadante por decantación cuidando no perder la pastilla que se encuentra en el fondo del tubo que presenta un aspecto, que va de transparente a blanco.
17. Posteriormente eliminar las sales que puedan haber precipitado junto con la pastilla, con un mililitro (400µl) de etanol al 70%, mezclar suavemente por inversión de 2-3 veces y centrifugar por 5 min a 10,000 rpm a 4° C en la centrífuga refrigerada, repetir el proceso 2 veces.
18. Poner los tubos invertidos sobre un papel filtro para secar la pastilla y eliminar el exceso de etanol hacerlo por 15 minutos a T° ambiente.
19. Resuspender la pastilla en 50µl de una solución de RNAsa e incubar a 37 °C por 20 minutos.

Anexo 2. Transformación de células de *E. coli* quimiocompetentes
(Modificado de Sambrook, *et al.*, 1989)

1. Colocar un vial de células competentes en hielo
2. Colocar del MIX de ADN (eg. 2-10 uL de reacción de ligación) en 50-100 uL de KCM frio. (4°C)
3. Agregar suavemente 50-100 uL de células competentes (el mismo volumen del KCM usado en el paso 2)
4. Mantener en hielo por 30 min.
5. Llevar a choque térmico a 42°C por 2 min exactamente. Regresar al hielo durante 5 min.
6. Agregar 300-500 uL de LB e incubar en agitación a 37°C por 1 hr

7. Centrifugar por 3 min a 10000 rpm, obtener pellet y resuspender con 100 uL de LB
8. Trasferir en placas de agar LB y dispersar por la superficie del medio con ayuda de un triángulo de vidrio estéril.
9. Incubar las placas toda la noche a 37 °C.

Anexo 3: Obtención de células quimiocompetentes
(Modificado de Mendel e Higa, *et al.*, 1970)

1. Crecer células en medio LB o 2xYT hasta alcanzar una DO de 0.3-0.6
2. Colocar los matraces con las células en crecimiento en hielo y trasferir a tubos limpios/estériles.
3. Spin por 10 minutos a 4600 rpm a 4°C
4. Re suspender las células en hielo con un volumen 1/20 de medio frio 2Xyt-CC
5. Colocar en hielo por 10 min
6. Hacer alícuotas en tubos eppendorf, colocar en hielo.
7. Resguardar las células a -70°C

Anexo 4. Extracción de DNA de bacterias Gram positivas y Gram negativas, método de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB)
(Modificado de Murra, *et al.*, 1980)

1. Inocular 5 ml de medio LB con una sola colonia bacteriana. Incubar durante 16-18 h a 37°C en agitación constante (150 rpm).
2. En un tubo Eppendorf estéril centrifugar 3-5 ml del cultivo a 10000 rpm durante 1 min a 4°C o temperatura ambiente. Remover el resto de medio de cultivo mediante aspiración con una micropipeta hasta que quede sólo el paquete celular.
3. Resuspender el paquete celular en 500 µl de buffer TE. Agregar 40 ul de SDS 20%.

4. Agregar 100 µl de NaCl 3 M y 80 µl de una solución alcalina de CTAB al 10 % (debido a que es una solución muy viscosa. Mezclar por 2 minutos e incubar 10 minutos a 37 °C.
5. Agregar 150 µl de fenol y 400 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1). Mezclar por 2 min.
6. Centrifugar a 10000 rpm por 10 min.
7. Transferir la fase superior a otro tubo y lavar con 500 µl de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1).
8. Centrifugar 5 min a 10000 rpm.
9. Transferir la fase superior a otro tubo.
10. Agregar 1.5 volúmenes de etanol absoluto concentrado.
11. Incubar a -20°C o -80 °C durante 10 min. En esta etapa el DNA se puede dejar precipitando a -20°C toda la noche.
12. Centrifugar a 10000 rpm durante 15 min a 4°C.
13. Eliminar el sobrenadante por decantación cuidando de no perder el DNA que se visualiza como un precipitado blanco al fondo del tubo.
14. Lavar el DNA agregando 1 ml de etanol al 70%. Mezclar por inversión durante 1 minuto y centrifugar a 10000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Repetir este proceso una vez más.
15. Eliminar por decantación la mayor cantidad posible de etanol.
16. Colocar el tubo con la tapa abierta en un termoblock a 37-50 °C durante 5-10 min hasta evaporar completamente el resto de etanol.
17. Resuspender el DNA en 50-60 µl de una solución de TE con 100 µg/ml de RNasa e incubar a 37 °C durante al menos 20 min.

Anexo 5. Alineamientos resecuenciación.

secuencia-cdgE	TCGAGCCACTCTTCCAGAAGCAGCATCCACGGAGGATGGAATGAATTCGACGATGATCAG	420
cdgE	-----atgaattcgacgatgatcag *****	20
secuencia-cdgE	CGCGTTGAATGACCTCTCGGATCTGGTGACGGAATATCGTGTCATGCTGGGCGAGCTGCT	480
cdgE	cgcgttgaatgacctctcggatctggtagcggaaatctcgtgcatgctgggcgagctgct *****	80
secuencia-cdgE	TGACGACGTCGCCAACCACTGGAAGCGTTTCGAGAACAGCGCAACTGCCCACGAGGCCAC	540
cdgE	tgacgacgtcgccaaccactggaagcgtttcgagaacagcgcaactgcccacgaggccac *****	140
secuencia-cdgE	CCCGCACCTTGACGCACTTACACATTTAGCTCATCGAATCGCGGGCTCCGCTGGCAGTTT	600
cdgE	cccgaccttgacgcacttacacatttagctcatcgaatcgcgggctccgctggcagttt *****	200
secuencia-cdgE	CGGCTTCGAACTGGTCTCGGACGCCGATTGCGCTTGAGCGTCAGTTGCGGCCAATGAT	660
cdgE	cggcttcgaactggtctcggacgccgcatctgcgttgagcgtcagttgcggccaatgat *****	260
secuencia-cdgE	CGAGGGTCCAGGGCACAGCGATGCGGGGAAAGCTGAACTGGCCGGTTTGATCATCGCCTT	720
cdgE	cgagggtccagggcacagcgatgcggggaaagctgaactggccggtttgatcatcgccctt *****	320
secuencia-cdgE	GCTTGAGGCGCGCAAACCGCTCACGACCATGCGGATGCAATCCTTCCCAGCCAAGGCCA	780
cdgE	gcttgaggcgccgcaaaccgctcacgaccatgcggatgcaatccttcccagccaaggcca *****	380
secuencia-cdgE	TTCCGGAACCTTGACGGCGAGCGCACGGAAACCGCTGTTTATCGTCGACCCCCATTGCGA	840
cdgE	ttccggaaccttgacggcgagcgcacggaaaccgctgtttatcgtcgacccccattgcga *****	440
secuencia-cdgE	GCGGGCGTTGCAAACTGCATCGCAAATTGCTCCTTTTCGGATATGAGACCCGGTTGTWCA	900
cdgE	gcgggctgtgcaaaactgcatcgcaaattgctcctttcggatatgagaccgggtgtttca ***** ***	500
secuencia-cdgE	TACCGTCGAGAARGGCTYYYCTTA-----	924
cdgE	taccgtcgaggaggctctcttggcggtttccgaggctctgccctgcgcgattgttaccga ***** * *	560
secuencia-cdgE	-----	924
cdgE	actggagtttccctccggcctgctc gatggcacgaagctggcgtcgcggctggcgggtac	620