



# BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA



INSTITUTO DE CIENCIAS  
CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

**“Determinación de la actividad enzimática de diguanilato  
ciclase de la proteína CdgA de *Azospirillum brasilense* Sp7”**

*TESIS*

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

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

*PRESENTA:*

**Q.F.B. LILIA ISELA LÓPEZ LARA**

*DIRECTOR:*

**D. EN C. BEATRIZ EUGENIA BACA**

PUEBLA, PUE.

NOVIEMBRE 2014

|  |    |
|--|----|
| RESUMEN.....   | 3  |
| 1. INTRODUCCIÓN.....   | 4  |
| 1.1 Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR´s).....   | 4  |
| 1.2 Género <i>Azospirillum</i> .....   | 6  |
| 1.3 Genoma de <i>Azospirillum</i> .....  | 6  |
| 1.4 Colonización.....  | 8  |
| 1.5 Biopelículas.....  | 9  |
| 1.6 di-GMPc: un segundo mensajero.....   | 10 |
| 1.7 Importancia del dominio PAS.....   | 12 |
| 2. ANTECEDENTES.....   | 14 |
| 3. ANTECEDENTES DIRECTOS.....  | 15 |
| 4. JUSTIFICACIÓN.....  | 17 |
| 5. HIPÓTESIS.....  | 17 |
| 6. OBJETIVO GENERAL.....   | 18 |
| 6.1 Objetivos específicos.....   | 18 |
| 7. ESQUEMA DE TRABAJO.....   | 19 |
| 8. MATERIAL Y MÉTODOS.....   | 20 |
| 8.1 Material biológico.....  | 20 |
| 8.2 Clonación del gen <i>cdgA</i> .....  | 20 |
| 8.3 Subclonación en el vector pQE-31.....  | 22 |
| 8.4 Ensayo expresión y purificación CdgA.....  | 22 |
| 8.5 Cromatografía de exclusión G-50.....   | 23 |
| 8.6 Cromatografía de afinidad Ni-NTA.....  | 23 |
| 8.7 Desalado y concentración.....  | 24 |
| 8.8 Ensayo de Diguanilato ciclasa.....   | 24 |
| 8.9 Cromatografía capa fina (TLC).....   | 24 |
| 9. RESULTADOS.....   | 26 |
| 9.1 Construcción del plásmido pABcdgA-2.....   | 26 |
| 9.1.1 Diseño de iniciadores.....   | 26 |
| 9.1.2 Obtención del producto de PCR.....   | 27 |
| 9.1.3 Clonación en el vector pCR2.1.....   | 28 |
| 9.1.4 Subclonación en el vector pQE-31.....  | 30 |
| 9.2 Resultados de la secuenciación.....  | 33 |
| 9.3 Alineamiento secuencia en aminoácidos. ....  | 35 |
| 9.4 Inducción de la proteína CdgA.....   | 36 |
| 9.5 Purificación de la proteína CdgA.....  | 39 |
| 9.5.1 Cromatografía de exclusión G-50.....   | 39 |
| 9.5.2 Cromatografía de afinidad Ni-NTA.....  | 40 |
| 9.5.3 Desalado y concentración de la proteína purificada.....  | 41 |
| 9.6 Formación de dímeros.....  | 43 |
| 9.7 Búsqueda <i>in silico</i> de un triptófano conservado (W) en los dominios PAS.....                     | 44 |
| 9.8 Alineamiento del sitio activo, de inhibición y de unión a metal con las secuencias de WspR y PleD..... | 45 |
| 9.9 Reacciones enzimáticas y cromatografía capa fina TLC.....  | 46 |
| 10. DISCUSIÓN.....   | 49 |
| 11. CONCLUSIÓN.....  | 56 |
| 12. PERSPECTIVAS.....  | 56 |
| 13. REFERENCIAS.....   | 57 |
| 14. ANEXOS.....  | 62 |

ÍNDICE

## Resumen:

La interacción bacteria-planta es una relación de convivencia que permite la promoción del crecimiento vegetal, entre los que se destaca la producción de biopelícula como parte esencial en la colonización de las plantas. Esta comunidad cooperativa permite a la planta beneficiarse de productos del metabolismo de los microorganismos, como lo es la producción de fitohormonas, fijación de nitrógeno, solubilización de fosfatos entre otros.

*Azospirillum brasilense* es una rizobacteria promotora del crecimiento vegetal que forma biopelícula, esta matriz polimérica constituida principalmente de exopolisacáridos, DNA exógeno, proteínas, detritos productos de la lisis celular, agua y otros componentes. Se conoce que este proceso es dependiente de un segundo mensajero el di-GMPc, que a su vez depende de la actividad catalítica de dos enzimas, las diguanilato ciclasas que intervienen en la formación y por el contrario las fosfodiesterasas encargadas de la degradación de este.

Con el fin conocer la participación del di-GMPc, en la fisiología de *A. brasilense* se clonó el gen *cdgA* que codifica para la diguanilato ciclasa (CdgA), en un vector de expresión. Se obtuvieron las condiciones de inducción, expresión y purificación de la proteína CdgA, se realizaron ensayos enzimáticos usando [ $\alpha$ - $^{32}$ P] GTP como sustrato, determinando la actividad enzimática por cromatografía en capa fina. Este ensayo permitió mostrar que la proteína CdgA presentó actividad enzimática de diguanilato ciclasa, que requiere de los cofactores  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  y  $FAD^+$  para su actividad, y que se encuentra en condiciones nativas como homodímero.

## 1. Introducción:

En la naturaleza existen diversas interacciones microorganismo-planta y en la última década ha tomado importancia el estudio de las mismas como alternativas en la industria agrícola implementando esta relación en beneficio del crecimiento vegetal y productividad, tales como biocontrol, diseño y producción de nuevos biofertilizantes, así como procesos de biorremediación. Para que estos procesos sean exitosos es indispensable que se realice una eficaz colonización. Un paso inicial de esta interacción es la formación de biopelículas en la que microorganismos son parte esencial y así permitir la colonización a la planta. Este mecanismo de simbiosis asociativa en la cual los microorganismos utilizan como alimento los exudados radiculares de la planta que son ricos en nutrientes propiciando un ambiente adecuado para su sobrevivencia y colonización, y por su parte el microorganismo coopera con alguna función que le es requerida a la planta hospedadora promoviendo el crecimiento.

Estos microorganismos son denominados rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal (PGPRs), entre los organismos más estudiados están las especies pertenecientes a los géneros *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Azospirillum* (Bashan, 2007).

### 1.1 Rizobacterias Promotoras del Crecimiento Vegetal (PGPR's)

La fracción del suelo donde se realiza la mayor proliferación de estos microorganismos por la presencia del sistema de raíces de las plantas se le conoce como rizósfera, microorganismos que a su vez influyen de manera positiva o negativa sobre el desarrollo de la planta hospedera (Cassán *et al.* 2009)

Las diferentes poblaciones bacterianas presentes en la rizósfera, se llaman rizobacterias y aquellas que son benéficas para el crecimiento, se han denominado bacterias promotoras de crecimiento vegetal PGPR (por su siglas en inglés Plant growth promoting rhizobacteria) y tienen la capacidad de colonizar el sistema radicular de las plantas o su entorno más cercano. (Kloepper *et al.* 1989)

Por el sitio de colonización en la planta se clasifican en tres grupos principales, las que pueden colonizar el tejido de la planta formando nódulos (simbióticas), las que se hospedan en estructuras internas de la planta (endofíticas) y las que se encuentran cerca del sistema radicular de la planta (bacterias de vida libre) (Kloepper *et al.* 1989)

Y por su efecto benéfico se clasifican en dos grupos, “bacterias promotoras de crecimiento de plantas”, donde la bacteria afecta a las plantas suprimiendo otros microorganismos o bien utilizando mecanismos a través de su propio metabolismo (solubilizando fosfatos, produciendo hormonas o fijando nitrógeno), afectando directamente el metabolismo de la planta (incrementando la captación de agua y minerales), mejorando el desarrollo radicular, incrementando la actividad enzimática de la planta o en colaboración con otros microorganismos benéficos para que actúen de manera sinérgica sobre las plantas (Bashan y Holguin, 1998). Y en Bacterias promotoras de crecimiento en plantas con capacidad de control biológico, las cuales promueven el crecimiento de la planta al suprimir la presencia de los fitopatógenos. (Bashan *et al.* 2007)

Especies que pertenecen al género *Azospirillum* se han aislado de todo el mundo y de una gran diversidad de ambientes y rizósfera de plantas (Lin *et al.* 2011). Cada especie dentro del género *Azospirillum* interactúa con la raíz de las plantas hospedantes de diversas formas, algunas colonizan predominantemente la superficie de la raíz, mientras que otras pueden infectar la planta colonizando el interior de la raíz. Los estudios que utilizan marcajes con fluorescencia de sondas de oligonucleótidos rRNA-específicas en combinación con la microscopía confocal

de barrido confirmó que la cepa *A. brasilense* Sp7 coloniza sólo la superficie de la raíz (Burdman *et al.* 2000).

## 1.2 Género *Azospirillum*

*Azospirillum* es un microorganismo considerado de gran importancia en el crecimiento de plantas, anteriormente este género era denominado *Spirillum lipoferum* (Tarrand *et al.* 1978) y fue descrito en 1925 por Beijerinck, con las observaciones de Peña-Cabriales y Döbereiner en 1973 se inició la época moderna de esta bacteria (Caballero, 2010).

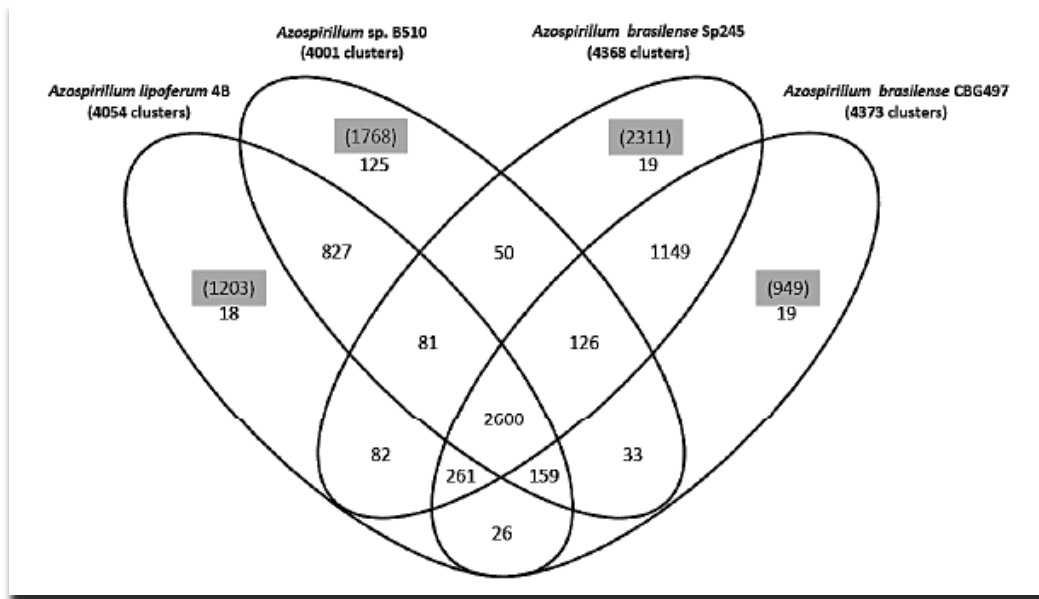
Se han descrito 17 especies, *Azospirillum lipoferum*, *A. brasilense* (Tarrand *et al.* 1978), *A. amazonense* (Magalhães *et al.* 1983), *A. halopraeferens* (Reinhold *et al.* 1987), *A. irakense* (Khammas *et al.* 1989), entre las más estudiadas.

Se caracterizan por ser un microorganismo pleomorfo, es parecido a células vibroides con un solo flagelo polar, Gram negativo, catalasa y oxidasa positivo, aeróbico, flagelado por la presencia de un flagelo polar y varios laterales (Döbereiner, 1983). La temperatura óptima de crecimiento es de 30°C, con un pH en el medio entre 6.0 y 7.0. Se caracteriza también por contener cantidades elevadas de poli-β-hidroxibutirato (PHB), hasta 50% del peso seco celular (Caballero 2010).

## 1.3 Genoma de *Azospirillum*

Se han depositado en NCBI (National Center for Biotechnology Information) cinco genomas de *Azospirillum*, entre ellos se encuentran *Azospirillum lipoferum* 4B, *Azospirillum* sp. B510, *Azospirillum brasilense* Sp. 245, *Azospirillum brasilense*

CBG497 y *Azospirillum brasilense* Az39. Con las secuencias liberadas se ha hecho un análisis para comparar la homología entre proteínas y se ha encontrado que el género comparte una gran cantidad de proteínas pero en cuanto a cepa es mucho mayor la homología (Figura 1).



**Figura1.** Diagrama de Vent. Muestra la distribución de las familias de proteínas en el genoma de *Azospirillum lipoferum* 4B, *Azospirillum* Sp. B510, *Azospirillum brasilense* Sp. 245, *Azospirillum brasilense* CBG497. (Wisniewski-Dyé et al. 2011)

*A. brasilense* Sp245, cepa aislada de trigo en Brasil, contiene siete replicones, con un tamaño de genoma 7.5 Mbp (Wisniewski-Dyé et al. 2011).

Al ser liberado el genoma de *A. brasilense* Sp. 245 se observó que lo conforman un cromosoma de 3.02 Mbp y seis plásmidos de 1.7 Mbp, 0.912 Mbp, 0.778Mbp, 0.690 Mbp, 0.191 Mbp y 0.167 Mbp, con un contenido de G+C de 68.5% y un análisis realizado muestra que contiene alrededor de 7846 ORFs (Wisniewski-Dyé et al. 2012).

El genoma de *A. brasilense* CBG497, una cepa aislada de maíz cultivado en un suelo alcalino al noreste de México, se obtuvo en un análisis comparativo con tres

genomas descritos anteriormente de *Azospirillum*, los cuatro genomas estudiados tienen un tamaño alrededor de 6.5-7.6 Mbp, y se componen de seis o siete replicones; cromidos y plásmidos (que comprenden la mayor proporción del total del genoma de 55,2% a 59,8% (Wisniewski-Dyé *et al.* 2012).

El núcleo del genoma consiste de 2328 genes, que representa entre el 30% y 38% del total de las proteínas codificadas dentro de un genoma y se encuentra principalmente en el cromosoma, se observó que un 74% de genes es de origen ancestral compartido con algunos parientes acuáticos. La parte no ancestral del núcleo del genoma se enriquece con genes implicados en la transducción de señales, en el transporte y el metabolismo de los hidratos de carbono y aminoácidos, y en propiedades de la superficie, características relacionadas con la adaptación al suelo y la rizósfera. Sin embargo, muchos genes específicos de las cepas presentan funciones relacionadas con la colonización de raíces de las plantas (de quimiotaxis, la síntesis de polisacáridos y pilus), para la promoción del crecimiento vegetal (especialmente la biosíntesis de las hormonas) y más en general, a la competencia de la rizósfera (catabolismo de compuestos aromáticos, la absorción de hierro (Wisniewski-Dyé *et al.* 2012).

Por lo tanto parece que cada especie o cepa posee determinantes genéticos únicos, lo que evidencia el nicho específico de adaptación. Además, todos los genomas contienen componentes accesorios relacionados con la plasticidad del genoma que podría promover la adquisición de DNA extraño o reordenamientos entre replicones (Wisniewski-Dyé *et al.* 2012).

## **1.4 Colonización**

Una vez que las bacterias están en las raíces de las plantas, su fijación a la raíz es esencial para la asociación eficiente con plantas y primordial para la posterior colonización. Por ello es importante el primer paso de adhesión, ya que las sustancias excretadas por estas podrían difundirse en el entorno y ser consumidas



rápidamente por otro microorganismo (Bashan y Holguín, 1997). Se ha demostrado que consiste en un proceso bifásico (Michiels *et al.* 1991). La primera etapa consiste en la adsorción primaria la cual es rápida, reversible, más débil y se produce dentro de 2 horas después de la inoculación. La segunda fase de anclaje seguro es irreversible toma 8-16 horas después de la inoculación, es considerada irreversible ya que hay una mayor adhesión, la cual está asociada a la producción de exopolisacáridos de superficie “EPS” y por consecuencia a la formación de biopelícula.

Algunos efectos benéficos de la colonización de *Azospirillum* en las plantas son incremento en altura, área radicular y rendimiento total de la cosecha (Bashan *et al.* 1992; Wisniewski-Dyé, 2011).

## 1.5 Biopelículas

Las biopelículas son comunidades bacterianas en las que las células están incrustadas en una matriz unida a una superficie, se adhieren a superficies inertes o tejidos, formado una capa compuesta por células microbianas, productos celulares tales como los EPS, DNA, proteínas, fimbrias, pilis, iones y detritos resultantes de la lisis celular. Cabe mencionar que cerca del 97% de las biopelículas se encuentra formadas por agua y la composición de los EPS depende de los que produzca el microorganismo (Branda *et al.* 2005).

Esta organización contribuye a proteger a las bacterias de condiciones poco favorables (Davey, 2000) y la formación de biopelículas parece ser un factor importante en el ciclo de patógenos bacterianos animales y plantas (Bogino *et al.* 2013)

Los pasos iniciales para la formación de la biopelícula y su fijación a la una superficie están mediados por proteínas de membrana externa (por ejemplo,

proteínas de unión a calcio), pilus o LPS, posterior a la formación de microcolonias, la producción de señales de detección del quórum sensing es requerido para la formación de una biopelícula madura (Rinaudi y Giordiano, 2010). Los EPS proporcionan la forma arquitectónica de las biopelículas y estabilizan su estructura tridimensional, otro factor que influye en esta estructura tridimensional es el DNAe (DNA exógeno) que mediante la formación de puentes de hidrogeno y otros enlaces débiles, permite estabilizar la estructura (Wu, 2009). La matriz es atravesada por canales, los mismos que permiten que las bacterias intercambien agua, nutrientes, enzimas, y señales, así también como la disposición de metabolitos potencialmente tóxicos (Costerton, 1995; Stanley, 2004). La dispersión de las biopelículas permite que los microorganismos colonicen otras superficies o sustratos, completando así un proceso de desarrollo (Bogino *et al.* 2013).

Estudios recientes han demostrado que la intervención de un segundo mensajero funciona como un transmisor de las señales de la superficie celular a moléculas diana que se encuentran en el citoplasma sea el causante principal de la producción de la biopelícula (Pesavento *et al.* 2009).

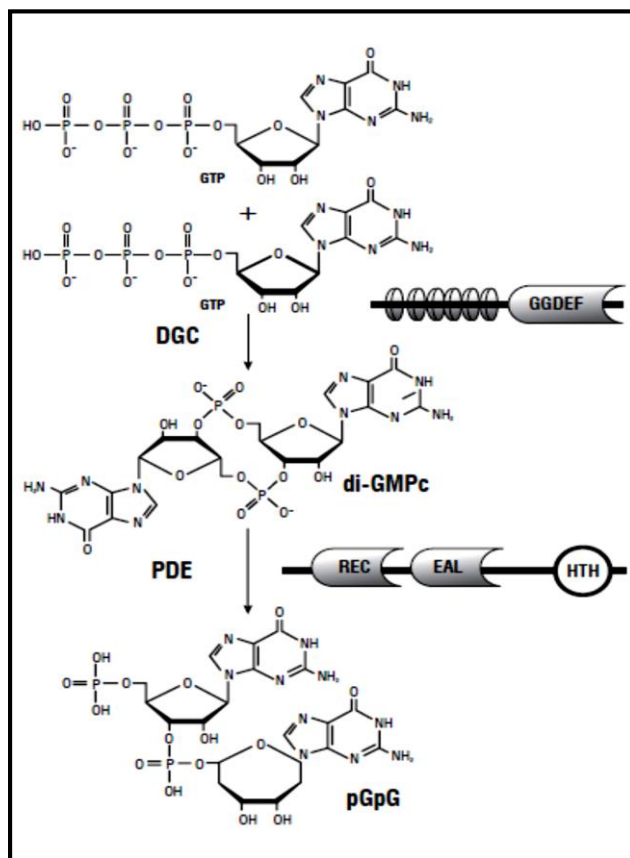
## 1.6 di-GMPc: un segundo mensajero

El 3'5'guanósín-monofosfato-cíclico (di-GMPc) fue identificado originalmente por Benziman en 1987, como un activador alostérico necesario en la biosíntesis de la celulosa en *Gluconacetobacter xylinus*. Su estructura molecular se compone básicamente de dos moléculas de GMP unidas por un enlace 3', 5' fosfodiéster (Ross *et al.* 1987).

La síntesis y degradación del di-GMPc está asociado a dos proteínas que incluyen en su estructura a los dominios GGDEF (recibe este nombre debido al patrón de secuencia conservado glicina, glicina, aspartato, glutamato y fenilalanina) y EAL

(se denomina así por sus residuos conservados glutamato, alanina y leucina (Xiqui *et al.* 2010).

El di-GMPc se forma por la ciclación de dos moléculas de GTP mientras que la hidrólisis del di-GMPc con una fosfodiesterasa con dominio EAL tiene como producto la formación del producto 5'pG-p-G lineal y con una fosfodiesterasa con dominio HD-GYP se obtienen dos moléculas de GMP como se muestra en la Figura 2 (Xiqui *et al.* 2010).



**Figura 2.** Estructura del di-GMPc y esquema de las proteínas con actividad de diguanilato ciclasa DGC con dominios GGDEF y de fosfodiesterasa que incluyen los dominios EAL (Xiqui *et al.* 2010)

El di-GMPc, está implicado en la regulación de procesos moleculares, incluyendo la transcripción, el control post-transcripcional y actividades enzimáticas celulares responsables de la biosíntesis de las moléculas que participan en la formación de la matriz de la biopelícula. Varios estudios lo señalan como regulador en la señalización célula-célula, movilidad, virulencia y en la formación de biopelícula, figura 3 (Jenal *et al.* 2009; Méndez, 2005; Galperin, 2006).

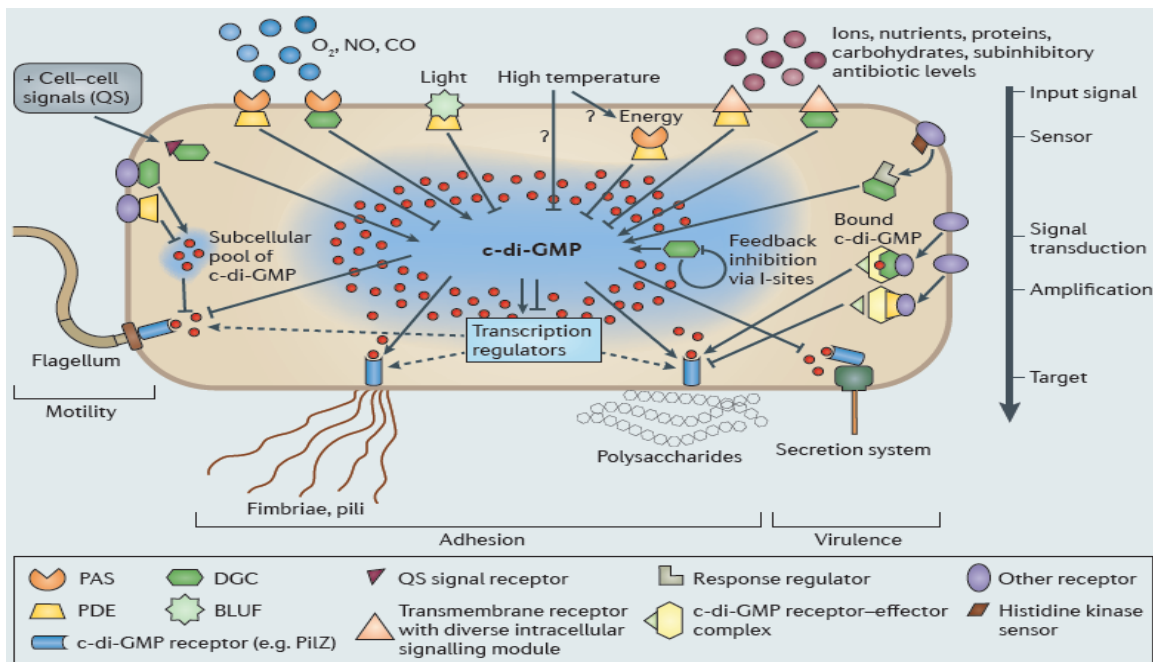


Figura 3. di-GMPc y la regulación de la dispersión de la biopelícula (Méndez, 2005; Galperin, 2006).

## 1.7 Importancia del dominio PAS

Los dominios PAS son módulos de señalización importantes para la detección de los cambios en la luz, el potencial redox, oxígeno, pequeños ligandos y el nivel general de energía de una célula, las proteínas con dominios PAS se encuentran en el citosol, por lo que pueden detectar los factores ambientales que atraviesan la membrana celular y afectan el metabolismo celular.

Su nombre se debe a que fue descubierto como una entidad conservada de la estructura secundaria de la proteína del periodo circadiano (PERIOD); así como en la proteína movilizadora nuclear aryl hidrocarbonada (ARNT) y la proteína de la mosca *Drosophila* (SIM), Per-Arnt-Sim o PAS (Huang *et al.* 1993). Se han identificado en las proteínas de los tres dominios de la vida: *bacterias, arqueas y eucariotas*.

Los dominios PAS se encuentran asociados a cofactores como el grupo hemo y el nucleótido flavina-dinucleótido (FAD) o flavin-mononucleótido (FMN). Algunos dominios PAS que ligan el grupo hemo se han relacionado con la unión de moléculas gaseosas (Xiqui *et al.* 2010).

Los dominios PAS se combinan con una variedad de módulos de regulación en proteínas multidominio. Estos incluyen histidina y serina / treonina cinasas, quimiorreceptores y fotorreceptores para taxis y tropismo, proteínas del reloj circadiano, canales iónicos activados por voltaje, fosfodiesterasas de nucleótidos cíclicos, y los reguladores de las respuestas a la hipoxia y el desarrollo embriológico del sistema nervioso central (Barry *et al.* 1999).

Estudios recientes sugieren que un dominio PAS comprende una región de aproximadamente 100 a 120 aminoácidos. PAS y PAS-A-B con repeticiones corresponden a la mitad N-terminal de los dominios PAS respectivos (Barry *et al.* 1999).

## 2. Antecedentes

Los dominios GGDEF, EAL y HD-GYP están ampliamente representados en proteínas de algunas bacterias, mientras que están ausentes en otras. Por ejemplo, el genoma de: *Pseudomonas aeruginosa* codifica para 17 proteínas GGDEF, 5 EAL, 3 HD-GYP y 16 GGDEF-EAL; el de *Vibrio cholerae* para 31 proteínas GGDEF, 22 EAL, 9 HD-GYP y 10 GGDEF-EAL; *Escherichia coli* posee 29 proteínas con dominios GGDEF o EAL, mientras que *Mycobacterium tuberculosis* 1, 2, y 0 respectivamente; en tanto que, en los genomas de *Helicobacter pylori*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* no están presentes. Por otra parte, no se encontraron estos dominios en proteínas codificadas por genomas de arqueas. En *A. brasilense* se han localizado 18 secuencias que codifican para las ORFs con homología a DGCs y a PDEs (Xiqui *et al.* 2010; Romero, 2012; Karatan *et al.* 2009).

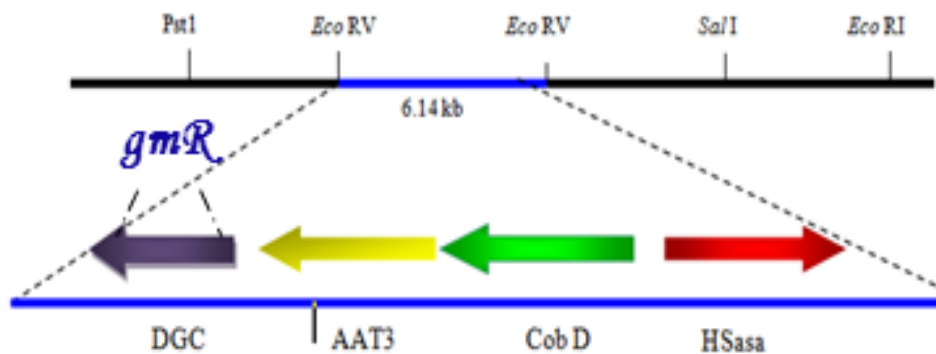
Un aspecto que caracteriza a las proteínas diguanilato ciclasas es su organización modular con la presencia de otros dominios de entrada generalmente localizados hacia el N-terminal (entre 50 hasta 150 aminoácidos de longitud), i. e. PAS, REC (dominio de respuesta que es fosforilado), entre otros, los cuales unen una variedad de ligandos. Y pueden detectar también señales citoplasmáticas; se propone que la unión al ligando crea un cambio conformacional que afecta la transmisión de la señal al dominio C-terminal (Figura 3).

### 3. Antecedentes Directos

En el laboratorio de Interacción Bacteria-Planta del CICM ICUAP, se identificó una secuencia codificante de una diguanilato ciclasa putativa, a partir de una banca genómica de *A. brasilense* Sp7 Xiqui *et al.* (2008).

Romero en 2012 realizó un análisis *in silico* en la cepa de *A. brasilense* Sp245, donde encontró un total de 30 proteínas putativas que podrían participar en la síntesis y degradación de di-GMPc, de las cuales: 15 proteínas tiene dominios **GGDEF**, 4 tienen dominios **EAL** y 11 poseen dominios **GGDEF/EAL**.

Con el fin de determinar si el papel de la diguanilato ciclasa putativa localizada por Xiqui *et al.* (2008) interviene en la formación de biopelícula, se obtuvo la mutante de la *dgcA::gm<sup>R</sup>* por medio de remplazo alélico en la cepa de *A. brasilense* Sp7 y su complementación genética de la mutante 1428-A incorporando por conjugación al plásmido pAB4.2dgcA (Romero, 2012).



**Figura 4.** Mapa de genético del fragmento que contiene la secuencia de genes putativos para las enzimas: Homoespermidina sintasa (HSase), Diguanilato ciclasa secuencia parcial (DGC), Aromático aminotransferasa (AAT3), Proteína de síntesis de cobalamina (Cob D). Xiqui *et al.* 2008; Romero 2012.

Romero observó una disminución significativa (59.17%) en la producción de la biopelícula, en la cepa mutante *A. brasilense* 1428-A en comparación con la cepa silvestre, sugiriendo que la CdgA putativa es relevante.

Así también observo la contribución del gene *cdgA* a la regulación de la producción de EPS, por medio de la determinación de producción de EPS, la mutante 1428-A presentó una disminución del 21.05 % comparada con la cepa silvestre.



## 4. Justificación

Para una colonización eficiente de las raíces de las plantas por *Azospirillum* son relevantes su movilidad y su capacidad para formar biopelículas. No se tienen suficientes referencias que demuestren la función y participación de las diguanilato ciclasas y de las fosfodiesterasas de *A. brasilense* y su intervención en la transición de una célula móvil a fase sésil. Por lo cual es oportuno realizar estudios para dilucidar la señalización y el mecanismo por el cual el segundo mensajero di-GMPc producto de la actividad de dichas enzimas interviene en la formación de la biopelícula, conocer estas redes de señalización y el flujo de información nos permitirá entender mejor los mecanismos por los cuales se produce esta interacción entre *Azospirillum* y las plantas que son colonizadas por esta bacteria.

## 5. Hipótesis

La proteína CdgA que presenta el dominio GGDEF y PAS/PAC presenta actividad de diguanilato ciclasa e interviene en la formación del di-GMPc en *A. brasilense*.

## 6. Objetivo general

Determinar la actividad enzimática específica de diguanilato ciclasa (proteína CdgA) de *A. brasilense* Sp7.

### 6.1 Objetivos específicos:

- Clonación en un vector de expresión del gene *cdgA*
- Purificación por cromatografía de afinidad de la proteína CdgA.
- Determinación de la actividad enzimática de la proteína CdgA.

## 7. Esquema de trabajo



## 8. Material y métodos

### 8.1 Material biológico:

| Cepa                               | Referencia                 |
|------------------------------------|----------------------------|
| <i>Azospirillum brasilense</i> Sp7 | Tarrand <i>et al.</i> 1978 |
| <i>E. coli</i> XL1-Blue            | Stratagene                 |
| Plásmidos                          |                            |
| pCR 2.1 Topo                       | Invitrogen                 |
| pQE-31                             | Qiagen                     |

### 8.2 Clonación del gen *cdgA*

Se diseñaron iniciadores con sitios de restricción *SalI* y *HindIII* flanqueando el gen desde el ATG hasta el TGA (Codón de paro).

|                   |   |            |                             |
|-------------------|---|------------|-----------------------------|
| LQ1F<br>(Forward) | CGTCCGTCGACATGCTGGATTGCGTTGGTTC<br><i>SalI</i>      | Tm: 53.8°C | Promedio Tm<br><br>55.05 °C |
| LQ1R<br>(Reverse) | CGTCCAAGCTTTCACATGCCTGGTTCGTAAACC<br><i>HindIII</i> | Tm: 56.3°C |                             |

Se creció la cepa de *A. brasilense* Sp7 en medio Difco durante 16 horas y se realizó extracción de DNA genómico por el método de CTAB de Sambrook (1989).

Se amplificó el gen *cdgA* de *A. brasilense* Sp7, con las siguientes condiciones:

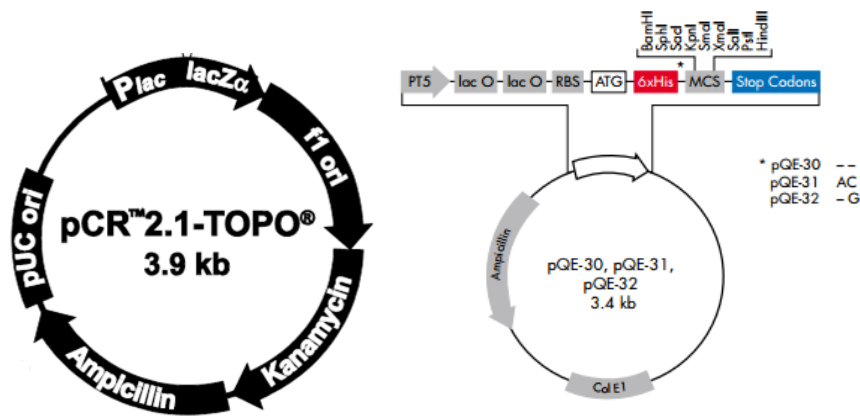
| Componente               | Volumen (µL) |
|--------------------------|--------------|
| Agua                     | 7.65         |
| DMSO                     | 1.0          |
| Buffer MgCl <sub>2</sub> | 2.5          |
| MgCl <sub>2</sub>        | 1.25         |
| dNTP's                   | 4.0          |
| Oligo LQ1F               | 0.7          |
| Oligo LQ1R               | 0.7          |
| DNA                      | 2.0          |
| Taq Platinum             | 0.2          |
| <b>Vol. Total</b>        | <b>20.0</b>  |

|               |         |             |           |
|---------------|---------|-------------|-----------|
| <b>Fase 1</b> | 95°C    | 5 minutos   | 1 ciclo   |
| <b>Fase 2</b> | 95°C    | 30 segundos | 30 ciclos |
|               | 55.5 °C | 1 minuto    |           |
|               | 72°C    | 2 minutos   |           |
| <b>Fase 3</b> | 72°C    | 10 minutos  | 1ciclo    |
| <b>Fase 4</b> | 4° C    |             | ∞         |

Se purificó el producto de PCR por una columna Microcon de Millipore para retirar los excesos de sales y se clonó en el vector pCR 2.1 TOPO como lo indica el proveedor (Invitrogen), la clonación se transformó en células quimiocompetentes de *E. coli* XI1-Blue y se crecieron en placas con medio LB a 37°C durante 12 horas. Se seleccionaron las clonas por resistencia a Ampicilina a 50 µg/ml.

### 8.3 Subclonación en el vector PQE-31

Se creció la cepa que contenía el plásmido de la clonación anterior en medio LB líquido suplementado con Ap a 50 µg/ml a 37°C durante 12 horas, se realizó la extracción de DNA plasmídico (Sambrook *et al.* 1989), se comprobó por análisis de restricción, PCR y secuenciación. Posteriormente se extrajo el fragmento correspondiente al gen *cdgA* por medio de los sitios de restricción que flanquean el gen y se subclonó en el vector de expresión pQE-31 (Qiagen). El plásmido se transformó en células competentes de *E. coli* XI1-Blue en medio LB Ap a 50 µg/ml a 37°C durante 12 horas y las clonas se confirmaron por un análisis de restricción, PCR y secuenciación.



**Figura 5.** Mapas genéticos de los plásmidos utilizados para la clonación y subclonación. Izquierda pCR2.1-TOPO (Invitrogene) y Derecha pQE-31(Qiagen).

### 8.4 Ensayo expresión y purificación CdgA.

Se realizó un precultivo de 12 horas de incubación en medio LB (Luria Bertani) con Ap (50 µg/ml). Se toman 6 ml del precultivo y se inoculó un matraz con 300 ml de medio LB Ap (50 µg/ml), se incubó con agitación a 37°C, hasta obtener un

D.O.<sub>600</sub> 0.5 a 0.7. Y se induce con una concentración 1 mM de IPTG durante 2 horas a 30°C, se centrifuga el cultivo a 6,000 RPM durante 8 minutos para separar el paquete celular del sobrenadante (Almacenar paquete celular a -80°C).

Se resuspende el paquete celular en 30 ml de la solución de lisis (1% de Sarcosyl, Anexo 5) y se agita en vórtex, se deja incubar en refrigeración durante media hora. Se sónica 2 minutos a 60 Hertz y 2 minutos a 80 Hertz (hasta eliminar la viscosidad en la solución), posteriormente se centrifuga a 12000 RPM durante 10 minutos a 4°C, se almacena el sobrenadante y el paquete celular a -80°C.

### **8.5 Cromatografía de exclusión G25**

El sobrenadante con la solución de lisis, se pasa a través de la columna con la resina G-25 (previamente equilibrada, anexo 7) a 8°C con el fin de eliminar el detergente contenido en el sobrenadante, al término se pasa la solución de equilibrio (NaCl 100 mM, buffer fosfatos de sodio 50 mM pH 8, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, PMSF 100 µM hasta asegurarse que la proteína se eluyó completamente. Se colectan fracciones de 3ml (mantenerlas en hielo) y se analizan en un SDS-PAGE para seleccionar las fracciones con la proteína de interés.

### **8.6 Cromatografía de afinidad Ni-NTA**

Las fracciones con menor cantidad de sales (precipitado) obtenidas de la cromatografía G-50, se mezclan y se dejan interactuar con la resina Ni-NTA durante 2 horas en refrigeración y agitación (Equilibrar previamente la resina durante una hora en agitación con la solución para equilibrar). Colocar la resina de Ni-NTA en una columna, y proceder a realizar los lavados (solución de lavado 20 mM imidazol) hasta retirar la proteína inespecífica (Obtener una D.O.<sub>280</sub> igual a cero). Realizar una segunda serie de lavados con una solución a una concentración

1 M de NaCl (Obtener una D.O.<sub>280</sub> igual a cero), finalmente proceder a eluir la proteína (Solución de elución 250 mM de Imidazol), colectando alícuotas 0.5 ml. Analizar en un SDS-PAGE. (Anexo 8)

### 8.7 Desalado y concentración

Desalar las alícuotas de las eluciones con el fin de eliminar la mayor cantidad de imidazol, concentrándolas en un microcono de Millipore 30K sustituyendo la solución de elución con el buffer de reacción (50 mM de Tris-HCl (pH 7,6) 10 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM de EDTA y 50 mM de NaCl). Anexo 9 y 10.

### 8.8 Ensayo de Diguanilato ciclasa

La reacción se inicia con la adición 33.3 nM [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]-GTP a 50  $\mu$ l del buffer de reacción con una concentración de proteína establecida y se incuba a 30°C. Se toman alícuotas a los 30, 60, 90, 120 min, se agrega un volumen de 5  $\mu$ l de 0.5 M EDTA para detener la reacción, seguido de la desnaturalización de la enzima a 99°C por 15min. Se separa el sobrenadante de la reacción, centrifugando a 16,000 X g durante 2 min. (Anexo 13)

### 8.9 Cromatografía capa fina (TLC)

Como fase estacionaria se marcó en la placa de PEI-TLC celulosa (previamente lavada con LiCl 0.5 M) una línea de partida a una distancia de 1.5 cm de la orilla inferior de la membrana y una línea de finalizado a 2 cm de la orilla superior. Se colocan en la línea de partida de 2 a 4 $\mu$ l por muestra con un espacio entre ellas de alrededor de 1.5 cm, se dejaron secar a temperatura ambiente (T.A.). Posteriormente las placas se fijaron en metanol por 5min y se dejaron secar a T.A. Se realizó la corrida de las muestras en una cámara para TLC, con una fase móvil



compuesta de una solución 2:3 V/V 4.0 M  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (pH 3.6) y 1.5 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (pH 3.5). Finalmente se revela la placa en una película autoradiográfica.

## 9. Resultados

### 9.1 Construcción del plásmido pABcdgA-2

#### 9.1.1 Diseño de iniciadores

A partir de la secuencia utilizada por Romero en 2012 de *A. brasilense* Sp7, se diseñaron los iniciadores flanqueando el marco de lectura abierto (ORF) del gene *cdgA* y se seleccionaron dos enzimas de restricción presentes en el sitio múltiple de clonación del vector pQE-31, los cuales fueron *SalI* y *HindIII* cuyos sitios de corte no se encontraban presentes en la secuencia correspondiente al ORF de *cdgA*. En la tabla siguiente se muestran los iniciadores diseñados y el sitio de corte incluido en cada uno de estos para la su posterior clonación en el vector pQE31, así como la temperatura de alineamiento ( $T_m$ ) de cada uno de ellos y el promedio de las dos temperaturas.

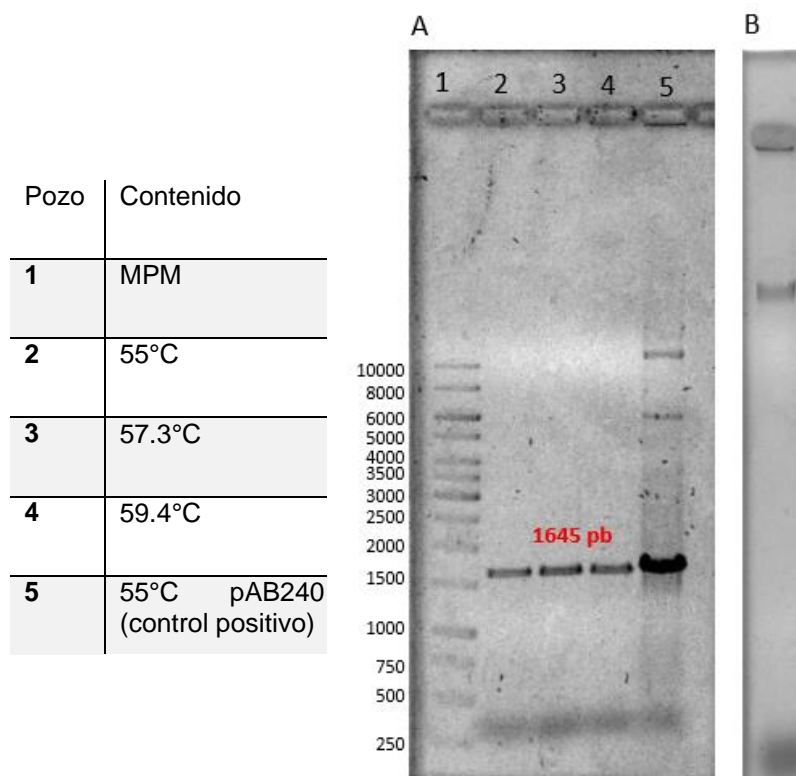
|                           |  |                   |               |
|---------------------------|--|-------------------|---------------|
| <b>LQ1F<br/>(Forward)</b> | CGTCC <b>GTCGAC</b> ATGCTGGATTCGGTTGGTTC     | <i>SalI</i>       | $T_m$<br>53.8 |
| <b>LQ1R<br/>(Reverse)</b> | CGTCCA <b>AAGCTT</b> TTCACATGCCTGGTTCGTAAACC | <i>HindIII</i>    | 56.3          |
|                           |  | Promedio<br>$T_m$ | 55.05         |

La temperatura promedio es de 55.05°C y a partir de esta temperatura establecida se decidió realizar un PCR en gradiente tomando como temperatura intermedia la temperatura promedio.

### 9.1.2 Obtención del producto de PCR

Para realizar el amplificado del ORF *cdgA*, se realizó inicialmente un análisis de las temperaturas de alineamiento ( $T_m$ ) de los iniciadores para elegir la temperatura adecuada para la amplificación, se tomó como temperatura de referencia para el gradiente la temperatura promedio establecida en el análisis anterior.

Se realizó un PCR en gradiente con el DNA de *A. brasilense* Sp7 como templado y con tres temperaturas, con la finalidad de establecer la temperatura de alineamiento en la cual no se obtuvieran amplificadas inespecíficas. En la figura 5 se observan los productos de PCR obtenidos con las tres temperaturas.



**Figura 5.** PCR gradiente de temperaturas de *cdgA*. A) Producto de PCR en gradiente de temperatura, en la tabla adjunta indica el contenido de cada carril y la temperatura por cada reacción. B) DNA genómico de *A. brasilense* Sp7 usado como templado en el PCR.

En las tres temperaturas ensayadas se obtuvo una sola banda correspondiente al amplificado esperado de 1645pb, se determinó que bajo la condición de 55°C se

realizarían los amplificadores posteriores a pesar de no encontrar diferencia entre los productos obtenidos, ya que esta temperatura es la promedio.

### 9.1.3. Clonación en el vector pCR2.1

Una vez establecida la temperatura de alineamiento se procedió a amplificar nuevamente bajo esta condición, el amplificado resultante se clonó inicialmente en el vector pCR2.1 TOPO, el propósito de esta clonación era obtener un plásmido que posteriormente serviría como templado para la clonación en el vector de pQE-31 mediante la extracción del fragmento de interés por la digestión con las enzimas de restricción que flanquean el ORF, esta construcción se denominó pABcdgA-1 (Figura 6).

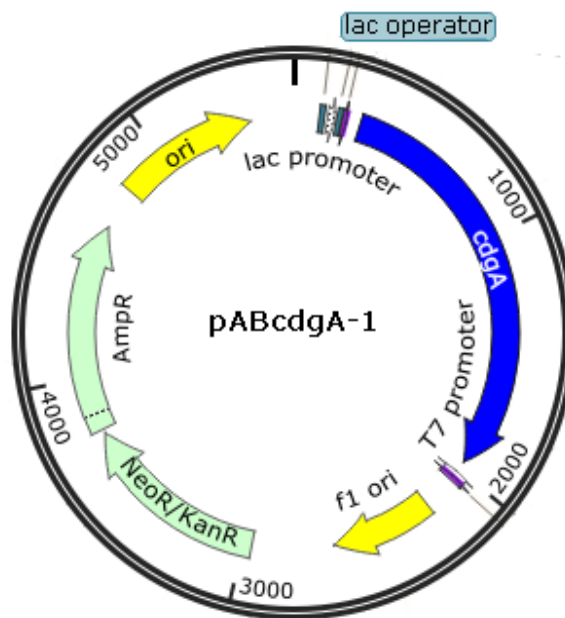
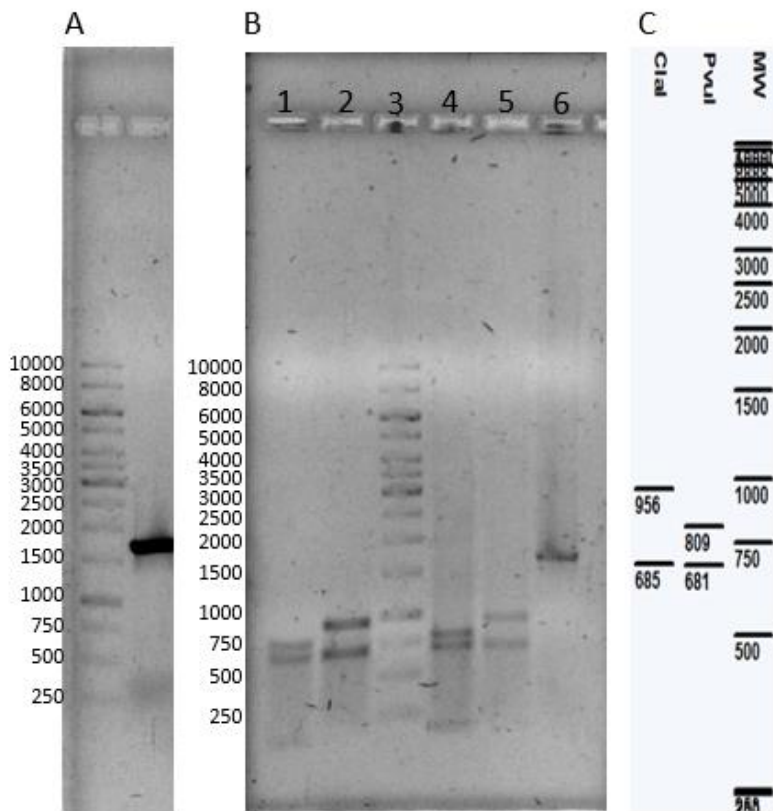


Figura 6. Mapa del plásmido pABcdgA-1.

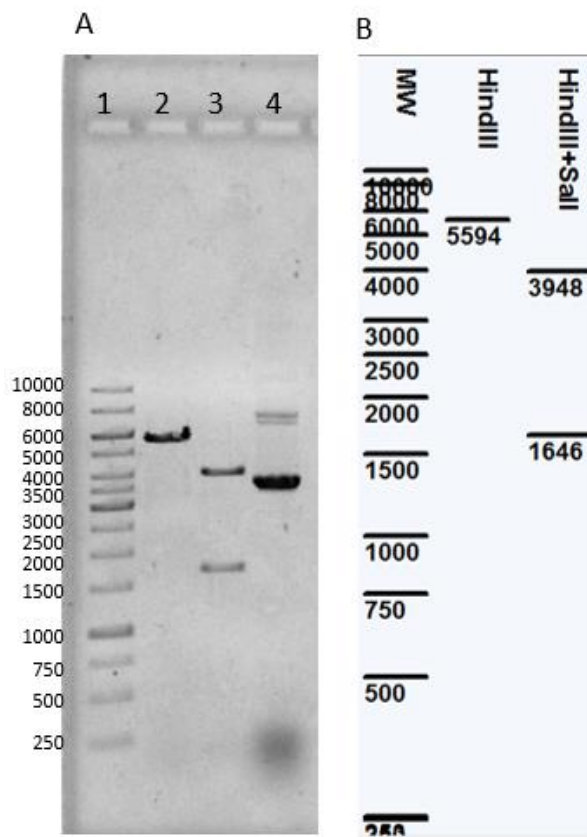
Para la confirmación de que el fragmento correspondiente a *cdgA* no presentaba cambios se realizó un perfil de restricción comparado con el patrón determinado en el programa pDRAW32 y realizando la digestión al amplificado utilizado para la clonación, este análisis se observa en la figura 7.



**Figura 7.** Análisis del amplificado de *cdgA* clonado en pCR2.1 TOPO y del amplificado utilizado para la clonación. A) Amplificado con los iniciadores diseñados del fragmento correspondiente en *cdgA* clonado en el vector pCR2.1. B) Carril 2 y 5: digestión con *Clal* y Carril 1 y 4: digestión con *PvuI* del producto de PCR, Carril 3: MPM y Carril 6: producto de PCR sin digerir. De lado izquierdo del MPM corresponden a las digestiones del amplificado utilizado para la clonación, de lado derecho son digestiones del amplificado posterior a la clonación. C) Análisis *in silico* del patrón de restricción en el programa pDRAW32.

Como se puede observar las digestiones realizadas concuerdan con el patrón esperado en el análisis *in silico* y comparado con el perfil de restricción del amplificado utilizado para la clonación.

Se realizó también una digestión con las enzimas *SalI* y *HindIII* a la construcción obtenida, misma que se evidencia en la figura 8.



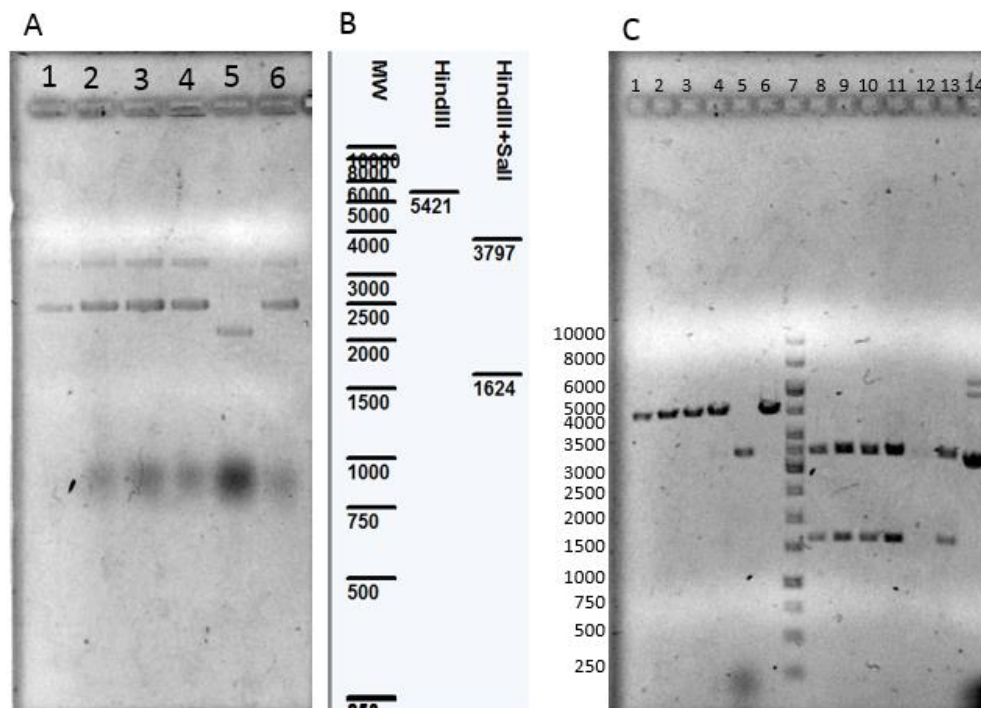
**Figura 8.** Restricción de la construcción pABcdgA-1. A) Restricción del plásmido obtenido posterior a la clonación en el vector pCR2.1; Carril 1: MPM , Carril 2: Corte con *Hind*III, Carril 3: *Sal*I y *Hind*III Carril 4: Plásmido sin digerir B) Análisis *in silico* del patrón de restricción en el programa pDRAW32.

El patrón de restricción coincide con el análisis *in silico* y confirmó la inserción del fragmento clonado en la construcción.

#### 9.1.4 Subclonación en el vector pQE-31

Se realizó la subclonación en el vector de expresión pQE-31 utilizando el producto de digestión con las enzimas *Sal*I y *Hind*III del plásmido pABcdgA-1 y del vector de expresión pQE-31, de tal forma que la clonación es dirigida asegurando que las clonas obtenidas contienen el fragmento correspondiente a *cdgA* en el sentido 5´-3´.

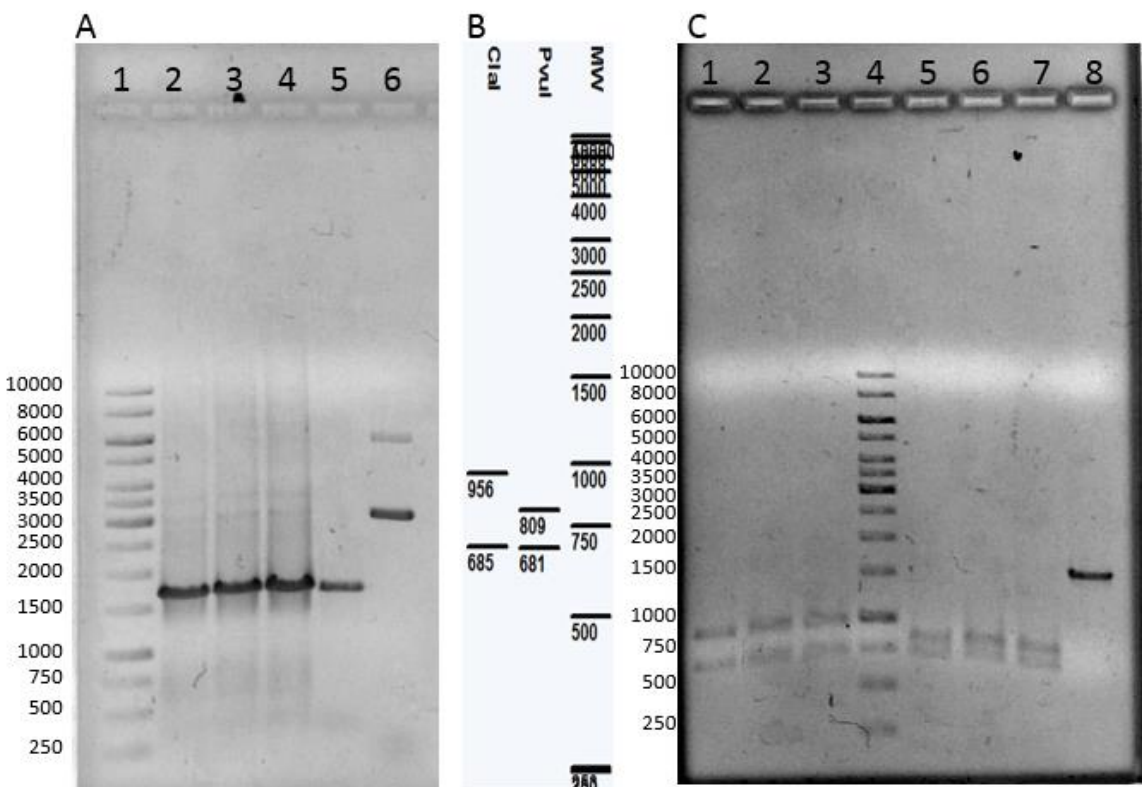
Se seleccionaron seis clonas, las cuales se analizaron por digestión y PCR. En la siguiente figura 9 se muestra un gel de agarosa al 0.7% con el DNA plasmídico de cada una de las clonas analizadas y la digestión de los plásmidos.



**Figura 9.** Análisis de los plásmidos de las 6 clonas obtenidas de la subclonación en pQE-31. A) Extracción de DNA plasmídico de seis clonas a analizar. B) Análisis *in sillico* del patrón de restricción del programa pDRAW32. C) Restricción de los plásmidos obtenidos posterior a la subclonación en el vector pQE-31, Carril 1-6: Digestión *Hind*III clonas 1-6, Carril 7: MPM, Carril 8-13: Digestión doble con *Hind*III y *Sal*I clonas 1-6 y Carril 14: plásmido sin digerir.

De las seis clonas seleccionadas una de ellas no presentaba el mismo patrón de DNA plasmídico, así como el perfil de restricción esperado por lo que se descartó.

El resto de las clonas presentaron el perfil y se continuaron analizando. En el siguiente análisis (Figura 10) solamente se usaron las primeras tres clonas del resultado anterior para amplificar el fragmento correspondiente a *cdgA*.



**Figura 10. Amplificado y digestión de las clonas 1, 2 y 3.** A) Amplificado de las tres clonas analizadas, Carril 1: MPM, Carril 2: Clona 1, Carril 3: Clona 2, Carril 4: Clona 3, Carril 5: Control positivo y Carril 6: Templado de DNA usado en la clonación de pABcdgA-1. B) Análisis *in silico* del patrón de restricción. C) Carril 1-3: Digestión con *Clal*, Carril 4: MPM, Carril 5-7: Digestión *PvuII* del producto de PCR de cada una de las tres clonas y Carril 8: Producto de PCR sin digerir.

Las tres clonas seleccionadas coinciden con el perfil de restricción del programa pDRAW32, por lo que se escogió una de ellas para enviar a secuenciar.

A continuación se muestra el mapa genético de la construcción que se denominó pABcdgA-2 (Figura 11).



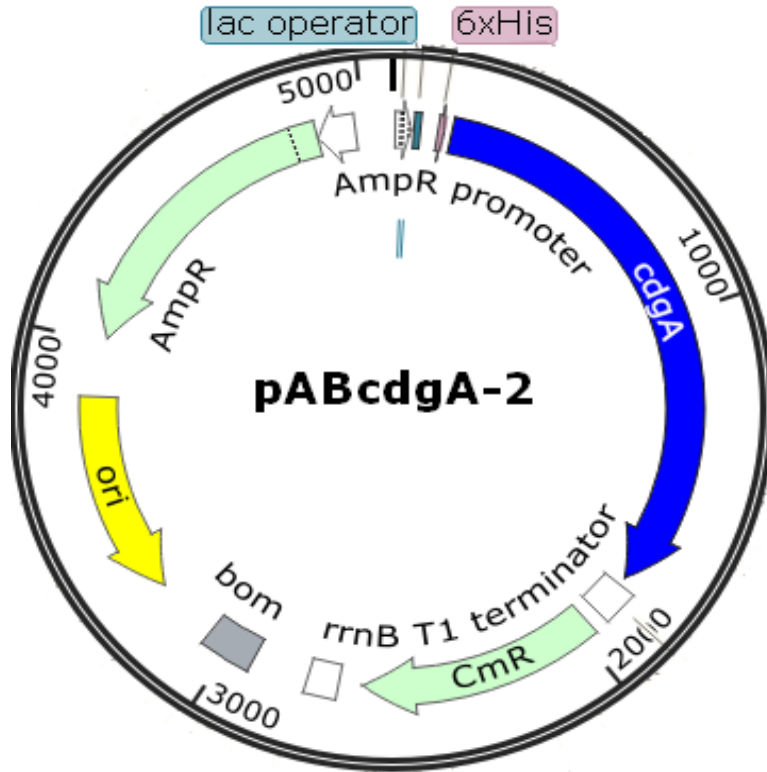
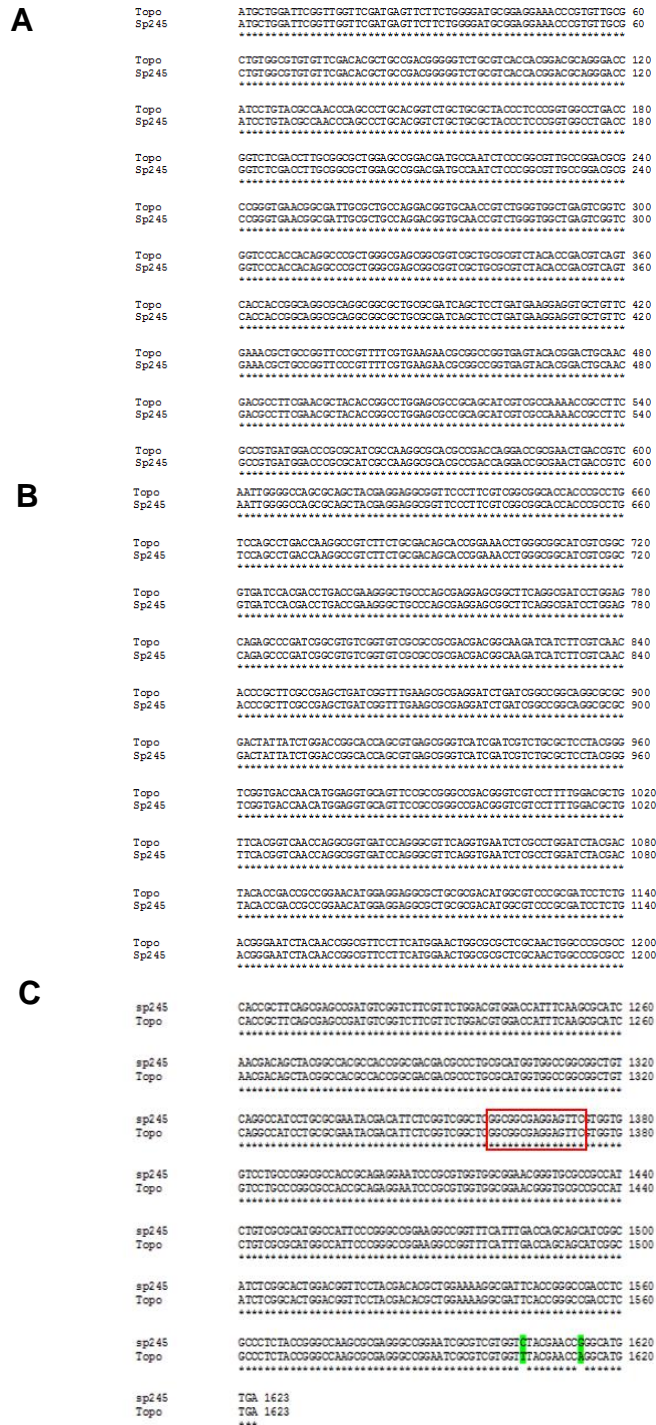


Figura 11. Mapa genético del plásmido pABcdgA-2.

## 9.2 Resultados de la secuenciación

Se envió a secuenciar el amplificado de *cdgA* de la construcción pABcdgA-1 con los iniciadores M13 y *cdgA* la construcción pABcdgA-2 con los iniciadores LQ1F y LQ1R, el resultado de la secuenciación se alineó con la secuencia de *A. brasilense* Sp 245 del NCBI, a continuación se muestra el alineamiento correspondiente a pABcdgA-1 en la Figura 12.

**Determinación de la actividad enzimática de diguanilato ciclasa de la proteína CdgA de *Azospirillum brasilense* Sp7**



**Figura 12.** Alineamientos de los resultados de la secuenciación de la construcción pABcdgA-1, A, B y C: Sp245: secuencia NCBI de *A. brasilense* Sp7, Topo: Secuencias correspondiente a la construcción pABcdgA-1, en sombreado verde: cambios en las bases y cuadro rojo: localización del motivo GGEEF. D) Score del alineamiento entre ambas secuencias.

Se encontraron dos cambios en el alineamiento de las secuencias nucleotídicas, dichos cambios no se encuentran en la región correspondiente al motivo GGEEF.

### 9.3 Alineamiento secuencia en aminoácidos.

Para determinar que los cambios presentes en el análisis anterior no presenten un cambio de aminoácidos se realizó la traducción de la secuencia y se alineo con la secuencia de *A. brasilense* Sp245 del NCBI, la siguiente figura 13 se muestra el resultado del alineamiento.

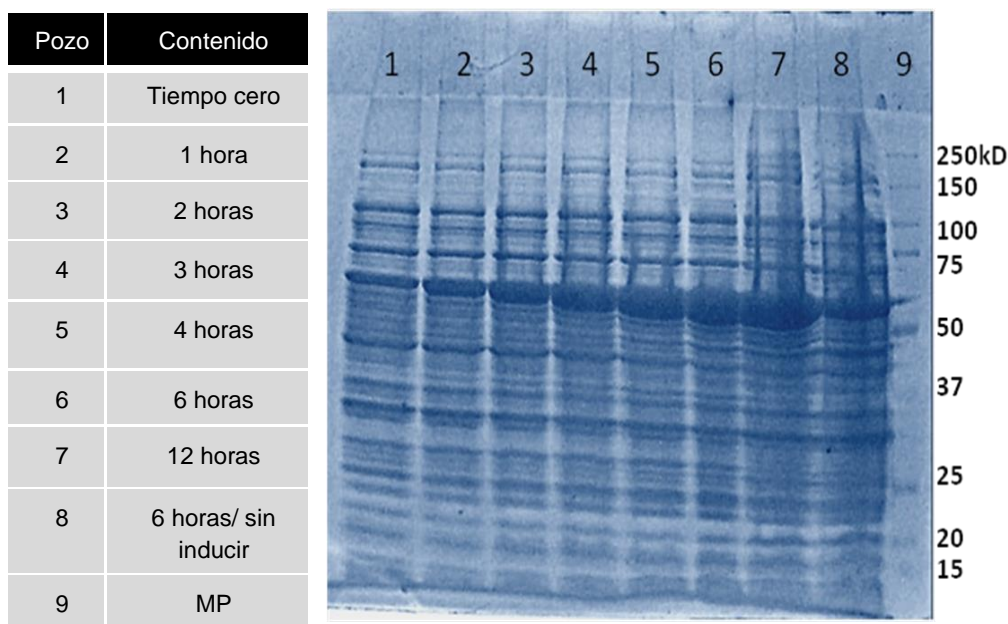


**Figura 13.** Alineamiento de Aminoácidos de ambas secuencias. A) Alineamiento a nivel aminoácidos con respecto a la secuencia liberada de *A. brasilense* Sp 245, sombreado en rojo motivo GGEEF B) Score del alineamiento.

Se encontró que los cambios en las bases codificaban para el mismo aminoácido por lo que no se presentaba problema alguno. Estos cambios podrían deberse a que se trata de dos cepas distintas.

### 9.4 Inducción de la proteína CdgA

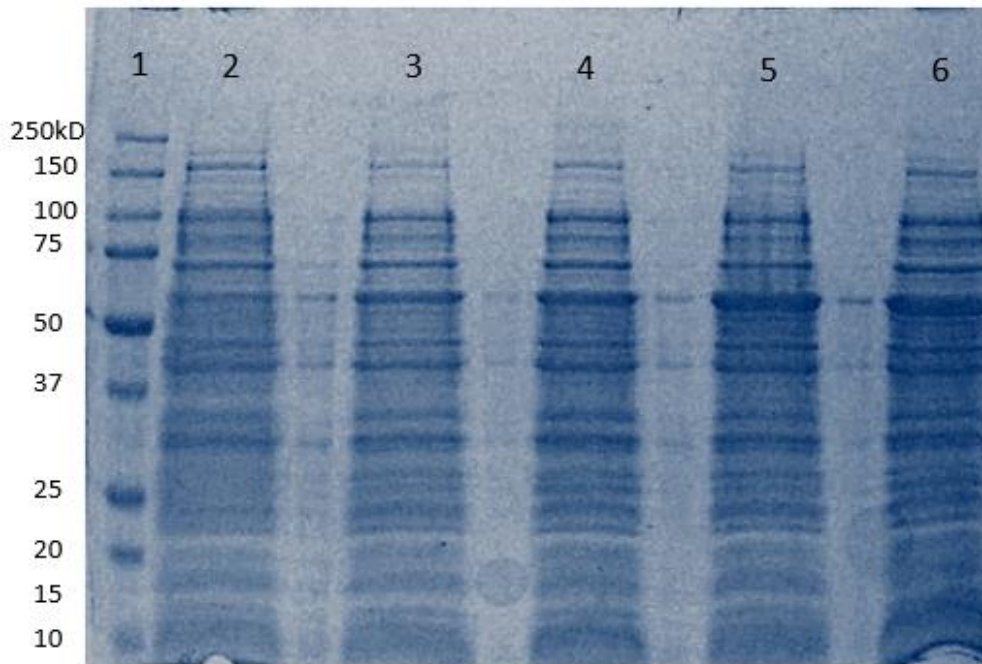
Para determinar las condiciones bajo las cuales se expresa la proteína es necesario modificar concentración del inductor, tiempo de inducción y temperatura. Inicialmente se estableció utilizar 1 mM de IPTG, tras el resultado obtenido en el ensayo (no mostrado), el siguiente paso era establecer el tiempo de inducción y la temperatura que hasta este momento se habían realizado los ensayos a 37°C. En la siguiente figura 14 muestra la determinación del tiempo de inducción, se aprecia el incremento de la proteína con peso molecular de 60KDa con el aumento del tiempo de inducción.



**Figura 14.** Electroforetograma PAGE-SDS de la inducción a 1 mM de IPTG a diferentes horas a 37°C, extracto completo. Distribución de las muestras en la tabla.

Con este ensayo se determinó que el tiempo de inducción de 2 horas era suficiente para la producción de la proteína CdgA, ya que más horas de inducción podrían provocar la formación de cuerpos de inclusión.

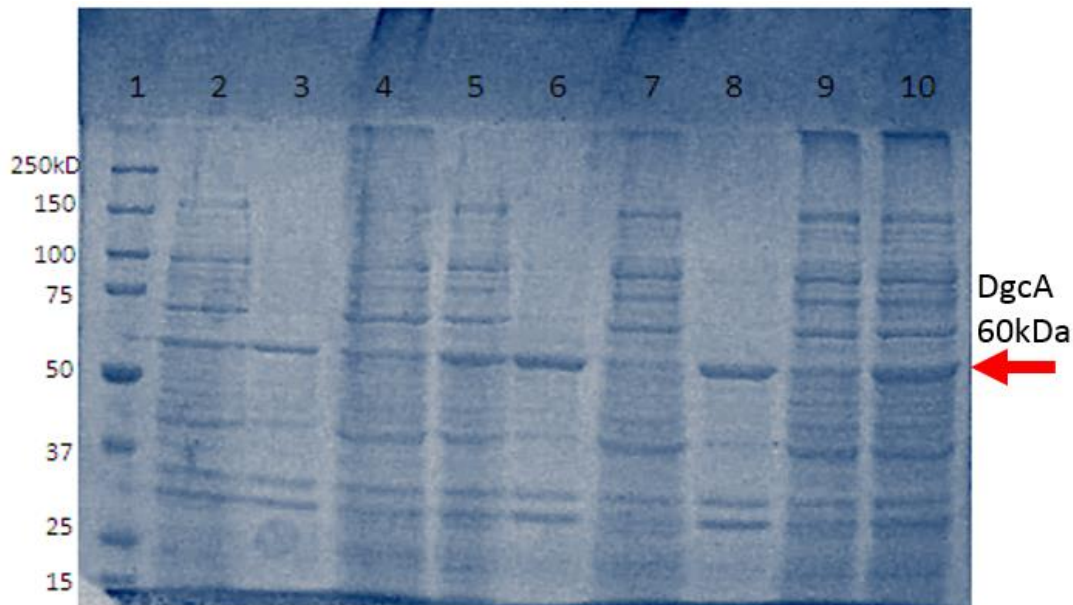
El siguiente paso consistía en separar el extracto en paquete celular y sobrenadante, para ello se liso el extracto por sonicación y la separación se realizó por centrifugación a 20,000 RPM (Figura 15).



**Figura 15.** Electroforetoograma SDS-PAGE 2 y 3 horas de inducción a 37°C 1 mM IPTG posterior la sonicación y centrifugación a 20,000 RPM. 1: MPM, 2: Paquete celular 2H, 3: Sobrenadante 2H, 4: Paquete celular 3H, 5: Sobrenadante 3H y 6: Extracto completo a 3H de inducción.

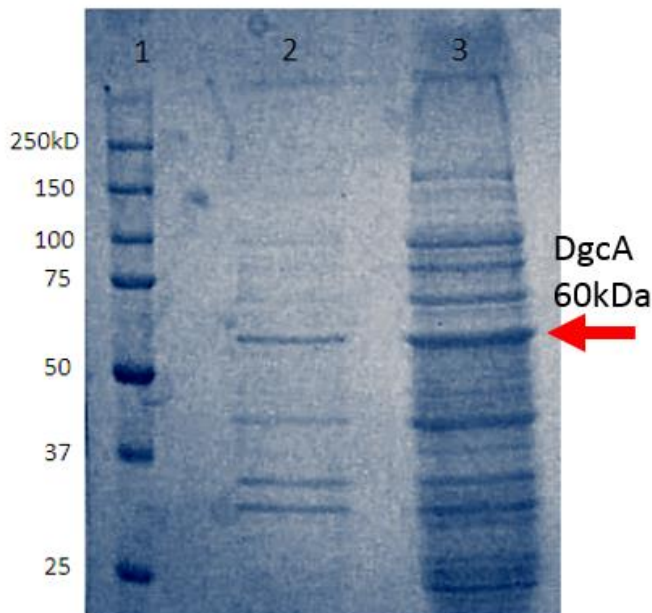
Debido a que la sonicación y centrifugación no era suficiente para obtener la proteína en el sobrenadante, ya que como se aprecia en la figura 15 se encuentran aparentemente en la misma proporción del sobrenadante y el paquete celular a causa de lo que podrían ser cuerpos de inclusión los cuales son agregados proteicos que se encuentran tanto en citoplasma como en periplasma durante los niveles de alta expresión en los sistemas heterólogos, el ambiente reductor del citosol inhibe la formación de enlaces disulfuro y como consecuencia la formación de estos agregados (Singh 2005), los cuales son inactivos catalíticamente (Sørensen 2005).

Por esta situación se decidió usar detergentes para solubilizar los cuerpos de inclusión (Tao *et al.* 2010), estos detergentes fueron Chaps 1.5%, Tritón X-100 1%, Tween20 1% y sarcosyl 1% (Figura 16).



**Figura 16.** Electroforetograma PAGE-SDS con los detergentes utilizados en la lisis. En el carril 1: marcador de peso molecular, 2: extracto completo 0.5H 30°C, 3: paquete celular 2H y 30°C con Chaps 1.5%, 4: sobrenadante 2H y 30°C con Chaps 1.5%, 5: extracto completo 2H a 30°C, 6: paquete celular 2H y 30°C con Tritón 1%, 7: sobrenadante 2H y 30°C con Tritón 1%, 8: paquete celular 2H y 30°C con Tween20 1%, 9: sobrenadante 2H y 30°C con Tween20 1% y 10: sobrenadante 2H y 30°C con sarcosyl 1%.

Se determinó que sarcosyl al 1% era la concentración ideal para la obtención de la proteína en el sobrenadante, ya que concentraciones menores no eran suficientes para la solubilización de los cuerpos de inclusión, así como el resto de los detergentes utilizados, en la siguiente figura se muestra el resultado con sarcosyl 1% del extracto separado en paquete celular y sobrenadante (Figura 17).



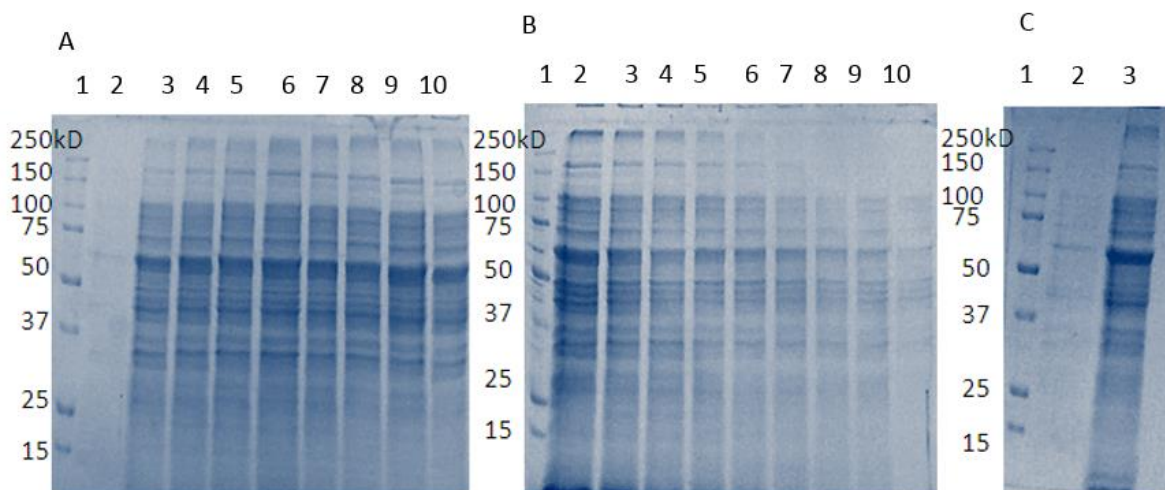
**Figura 17.** Electroforetograma PAGE-SDS. 1: Marcador de peso molecular, 2: Paquete celular 2 horas y 30°C con sarcosyl 1% y 3: Sobrenadante 2 horas y 30°C con sarcosyl 1%.

Aunado al uso de detergentes se disminuyó la temperatura de inducción (Sørensen 2005) con la finalidad de disminuir la replicación, transcripción y traducción en el sistema, afectando la eficiencia del promotor con el objetivo de obtener la mayor cantidad de la proteína en el sobrenadante y como es comprobado en las figuras 15, 16 y 17.

## 9.5 Purificación de la proteína CdgA

### 9.5.1 Cromatografía de exclusión G-50

Para eliminar el detergente utilizado en la lisis, el cual que podría afectar el ensayo enzimático posteriormente, se procedió a utilizar una cromatografía de exclusión molecular G-50. Se colectaron fracciones de 3 ml y se analizaron en un PAGE-SDS mostrado en la figura 18.



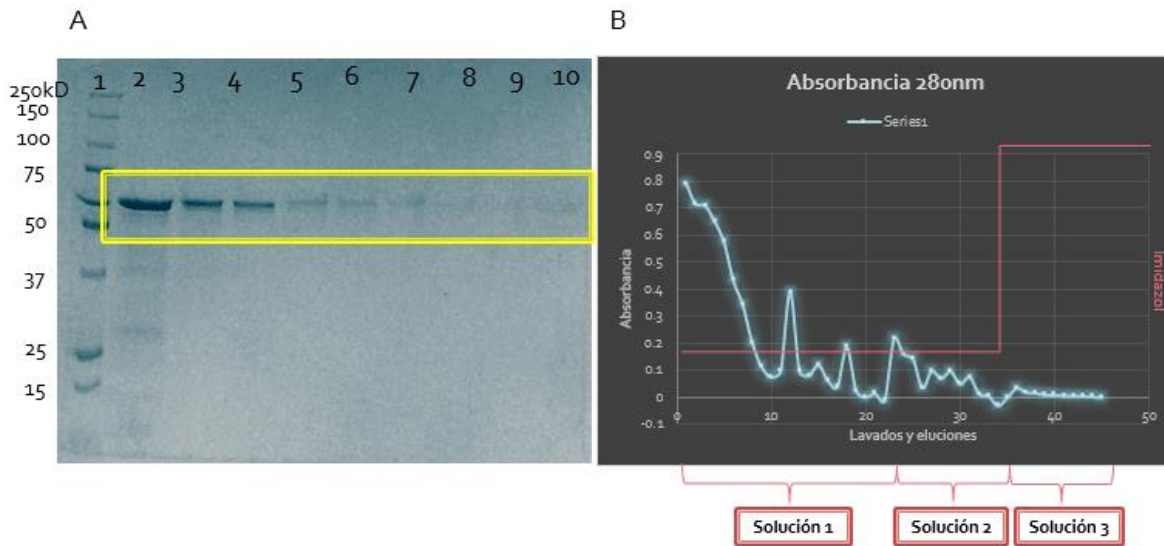
**Figura 18.** ElectroforetoGRAMA PAGE-SDS fracciones obtenidas en cromatografía de exclusión molecular G-50. A) Carril 1: MPM, 2-10: fracciones 1 a 9, B) 1: MPM, 2-10: fracciones 10 a 18 y C) 1: MPM, 2: paquete celular y 3: sobrenadante.

Se seleccionaron las fracciones 8-15 para purificar con la cromatografía de afinidad, ya que estas no presentaban precipitados.

### 9.5.2 Cromatografía de afinidad Ni-NTA

Las fracciones 8 a 15 resultantes de la cromatografía de exclusión molecular G-50 se mezclaron y se dejaron interaccionar con la resina Ni-NTA 2 horas en refrigeración, para posteriormente eluir en la columna con solución de lavado (Solución 1), hasta que la D.O.<sub>280</sub> llegara a cero, posterior a este lavado se realiza una segunda serie de lavados aumentando la concentración de NaCl 1 M (Solución 2) con el fin de eliminar la proteína que quedaba ligada a la resina de forma inespecífica y finalmente se eluyó la proteína CdgA con una solución de imidazol 250 mM (Solución 3), como se muestra en la figura 19 se obtuvieron 9 fracciones.



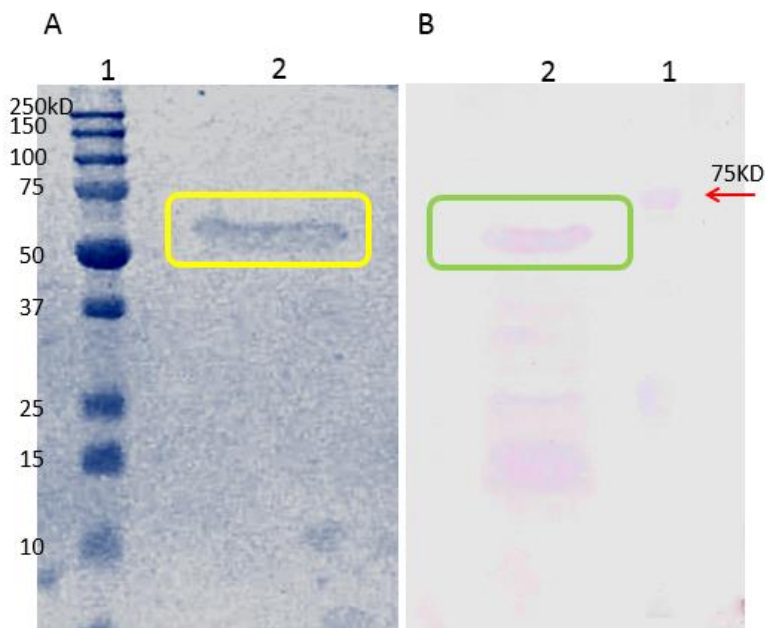


**Figura 19.** Eluciones y absorbancia a 280 nm. A) Electroforetograma PAGE-SDS de las eluciones con 250mM de Imidazol. B) Grafico con las D.O.<sub>280</sub> con cada una de las sesiones de lavados y elución.

Las fracciones con mayor concentración de la proteína CdgA fueron las tres primeras en el electroforetograma PAGE-SDS anterior.

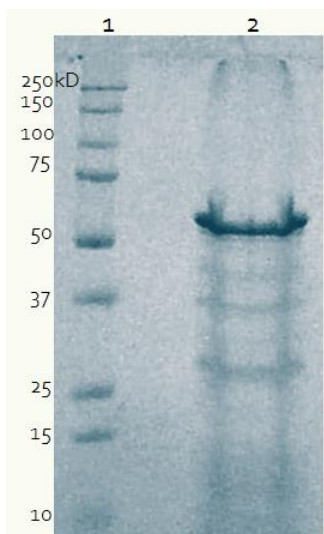
### 9.5.3 Desalado y concentración de la proteína purificada

Para eliminar el exceso de Imidazol en las fracciones eluidas, se procedieron a concentrar en un microcono 30K y se resuspendió el concentrado obtenido en el buffer de reacción requerido para los ensayos enzimáticos. Se realizó el Western Blot de la proteína ya purificada usando anticuerpos Anti-polihistidinas (Monoclonales, Invitrogene) en una dilución 1:25,000 en una solución al 5% de BSA (Figura 20).



**Figura 20.** A) Electroforetograma PAGE-SDS proteína purificada. Carril 1: MPM y Carril 2: CdgA concentrada. B) Western Blot de la proteína purificada Carril 1: MPM y Carril 2: CdgA concentrada.

Como alternativa para desalar y concentrar con el objetivo de recuperar una concentración mayor de proteína, se dializaron las eluciones durante 24 horas usando el buffer de reacción y su posterior concentración con sacarosa, el resultado es el siguiente (Figura 21).

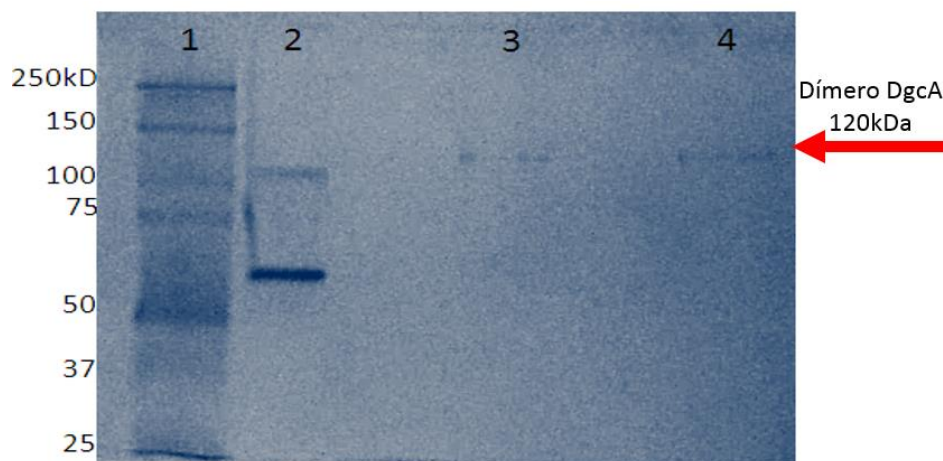


**Figura 21.** Electroforetograma PAGE-SDS posterior a la diálisis. Carril 1: MPM y 2: proteína concentrada por sacarosa.

Sé decidió utilizar la proteína obtenida por diálisis para los siguientes ensayos, ya que se recuperaba una concentración mayor.

## 9.6 Formación de dímeros

De acuerdo a los autores que han estudiado a las diguanilato ciclasas WspR de *P. aeruginosa* (Nabanita 2008) y PleD *C. crescentus* (Paul 2007), estas requieren de la formación de un homodímero que permite la unión de las dos moléculas de GTP por cada homodímero para realizar la catálisis, por ello se realizó un ensayo en un PAGE-Nativo con y sin el sustrato GTP colocando la reacción a 30°C durante 1 hora, que nos permitió explorar la participación del GTP en la formación del dímero (Figura 22).



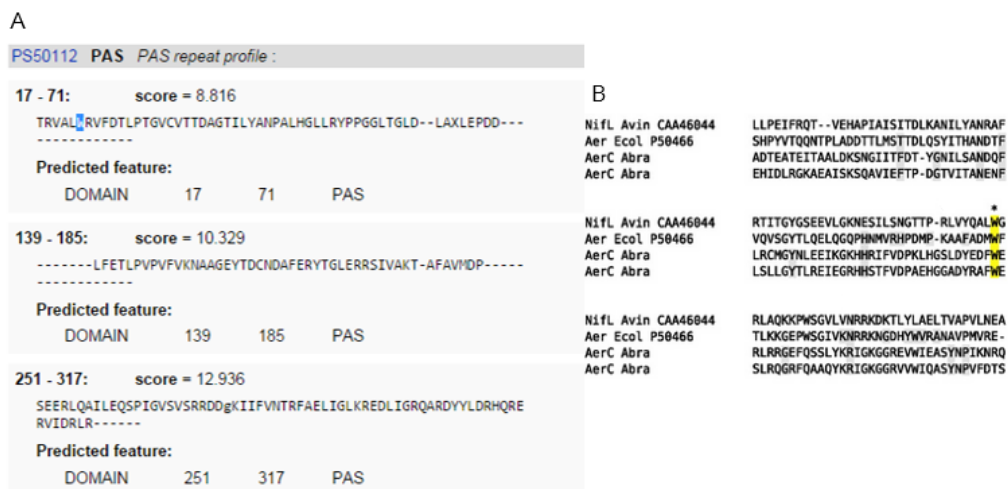
**Figura 22.** Electroforetograma PAGE-Nativo Carril 1: MPM, 2: Albumina 10 µg, 3: reacción 5.6 µg CdgA sin GTP y 4: reacción 5.6 µg CdgA con GTP.

Como se puede visualizar en la figura anterior concluimos que la formación del homodímero no es dependiente de la presencia del sustrato (GTP).

## 9.7 Análisis *in silico* de los dominios PAS

Se realizó un PAGE en condiciones nativas para determinar si CdgA también formaba dímeros y si era indispensable el sustrato GTP para la formación de estos, encontramos que no se requería del sustrato para la formación del dímero, sin embargo se encontró en la bibliografía revisada que los dominios PAS no necesariamente son sitios de unión a pequeños ligandos como lo son hemo, FAD y FMN sino además que pueden participar en la unión proteína-proteína (Chao *et al.* 2013).

Sé realizó una búsqueda *in silico* del aminoácido triptófano (W) en los tres dominios PAS de la proteína CdgA, el cual es el probable sitio de unión del cofactor FAD (Xie *et al.* 2010) y probable responsable del aumento de la actividad de diguanilato ciclasa. Para ello se ingresó en una herramienta bioinformática la secuencia aminoacídica de la proteína y se ubicó el W (Figura 23).



**Figura 23.** Análisis *in silico* de la búsqueda del W. A) Dominios PAS de la proteína CdgA y B) Alineamiento de dominios PAS Xie *et al.* 2010, donde se muestran los W conservados encargados de la unión con el cofactor FAD y aumento de las actividades enzimáticas de estas proteínas.

Como se puede observar en la Figura 23-A, el primero de los tres dominios PAS que se encuentran en tándem en CdgA contiene un triptófano (W), sitio probable de la unión del cofactor FAD<sup>+</sup>.

## 9.8 Alineamiento del sitio activo, de inhibición y de unión a metal con las secuencias de WspR y PleD.

PleD y WspR son diguanilato ciclasas descritas anteriormente por lo que se cuenta con su secuencia en la base de datos del NCBI y de las cuales ya se conoce el sitio activo, sitio de inhibición y sitio de unión a metal (Pirruccello *et al.* 2008; Paul *et al.* 2007). A través de un alineamiento con estas proteínas descritas se determinaron los sitios correspondientes a cada uno de los sitios anteriormente mencionados en CdgA.

### Sitio activo

```

SitioactivoW      KSYNDFGHVAGDEALRQVAGAIREGCSRSSDLAARYGGEE 41
SitioactivoP      KKINDTFGHDIGDEVLREFALRLAS-NVRAIDLPCRYGGEE 40
SitioactivoCdgA   KRINDSYGHATGDDALRMVAGGCQA-ILREYDILGRLGEE 40
                  *  **:.**  **:.**  *  *  *  *  *  *
    
```

| SeqA | Name         | Length | SeqB | Name         | Length | Score |
|------|--------------|--------|------|--------------|--------|-------|
| 1    | SitioactivoW | 41     | 2    | SitioactivoP | 40     | 55.0  |
| 1    | SitioactivoW | 41     | 3    | itioactivo   | 40     | 50.0  |
| 2    | SitioactivoP | 40     | 3    | itioactivo   | 40     | 45.0  |

### Sitio de inhibición

```

SitioIW           RSSDLAARYGGEFFAMVLPGTSPGGARLLAEK 29
SitioICdgA       REYDILGRLGGEFFVVVLPGATAEESRVVAER 29
SitioIP          RAIDLPCRYGGEFFVIMPDALADALRI AER 29
                  * :  *  ***** .:::*.: :  : ** :
    
```

| SeqA | Name    | Length | SeqB | Name    | Length | Score |
|------|---------|--------|------|---------|--------|-------|
| 1    | SitioIW | 29     | 2    | SitioIP | 29     | 48.28 |
| 1    | SitioIW | 29     | 3    | SitioI  | 29     | 48.28 |
| 2    | SitioIP | 29     | 3    | SitioI  | 29     | 44.83 |

### Sitio de unión a metal

```

SitiometalW      DVDYFKSYNDFGHVAGDEALRQVAGAIREGCSRSSDLAARYGGE 45
SitiometalP      DIDFFKKINDTFGHDIGDEVLREFALRLAS-NVRAIDLPCRYGGE 44
SitiometalCdgA   DVDHFKRINDSYGHATGDDALRMVAGGCQA-ILREYDILGRLGGE 44
                  * : * **  **:.**  **:.**  *  *  *  *  *
    
```

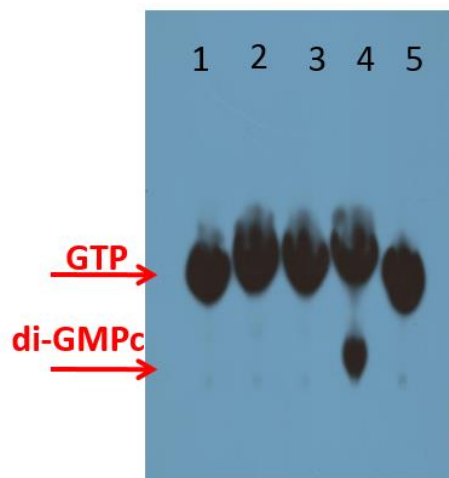
| SeqA | Name        | Length | SeqB | Name        | Length | Score |
|------|-------------|--------|------|-------------|--------|-------|
| 1    | SitiometalW | 45     | 2    | SitiometalP | 44     | 54.55 |
| 1    | SitiometalW | 45     | 3    | Sitiometal  | 44     | 52.27 |
| 2    | SitiometalP | 44     | 3    | Sitiometal  | 44     | 45.45 |

En el sitio activo que corresponde principalmente al motivo GGEEF se encuentra completamente conservado, la primera glicina (G) del motivo es el sitio de unión de las moléculas de GTP (Römling 2013), por otra parte el motivo RxxD que forma parte del sitio de inhibición también se encuentra conservado, lo que podría indicar que realmente tiene esta función. El sitio de unión a metal, donde puede ligarse moléculas de  $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$  principalmente en el aminoácido glutamato (E) también se encuentra conservado (Römling 2013), esta información indicaba que CdgA reunía las características que implicarían confirmar su actividad enzimática.

### 9.9 Reacciones enzimáticas y cromatografía de capa fina (TLC)

Reuniendo la información obtenida del análisis *in silico* y los antecedentes de la mutante *dgcA::gm<sup>R</sup>* de Romero (2012), se propone que CdgA tiene actividad de diguanilato ciclasa, por ello se realizaron ensayos enzimáticos usando el sustrato [ $\alpha$ - $^{32}$ P] GTP marcado radiactivamente y visualizando el resultado en placas de PEI-Celulosa en una TLC evidenciando la migración del sustrato y el producto (di-GMPc) al exponer la placa en un film autoradiográfico.

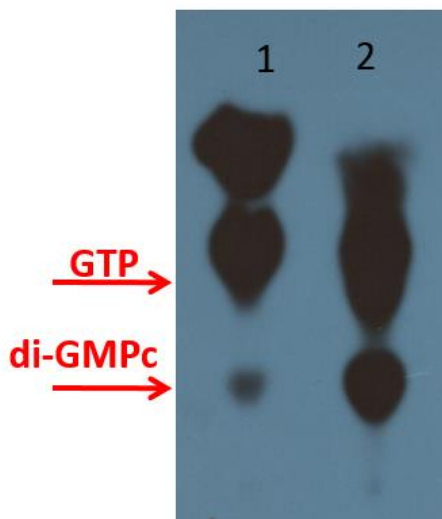
Se realizaron los ensayos enzimáticos incubando durante 1 hora a 30°C y usando 7.2  $\mu$ g de la proteína CdgA purificada, en la figura 24 se aprecia en el cromatograma variando el ion metálico entre magnesio ( $Mg^{+2}$ ), Manganeseo ( $Mn^{+2}$ ), Calcio ( $Ca^{+2}$ ) como inhibidor de la reacción (Römling, 2013) y en conjunto magnesio-manganeseo, así también usando como control negativo la proteína CdgA desnaturalizada, todas las reacciones con el sustrato GTP marcado radiactivamente.



**Figura 24.** PEI-TLC celulosa con diferentes iones metálicos por reacción. 1: Cloruro de magnesio ( $Mg^{2+}$ ) 10 mM, 2: Cloruro de Manganeso ( $Mn^{2+}$ ) 10 mM, 3: Cloruro de Calcio ( $Ca^{2+}$ ) 10 mM, 4: Cloruro de magnesio ( $Mg^{2+}$ ) 5 mM y Cloruro de Manganeso ( $Mn^{2+}$ ) 5 mM y 5: Control negativo (proteína desnaturalizada). 1 hora de incubación a 30°C y  $FAD^+$ .

El resultado del ensayo donde se usaron cloruros de  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y ambos ( $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ ), se determinó que CdgA requiere de la presencia de ambos iones ( $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ ) para mostrar actividad de diguanilato ciclasa.

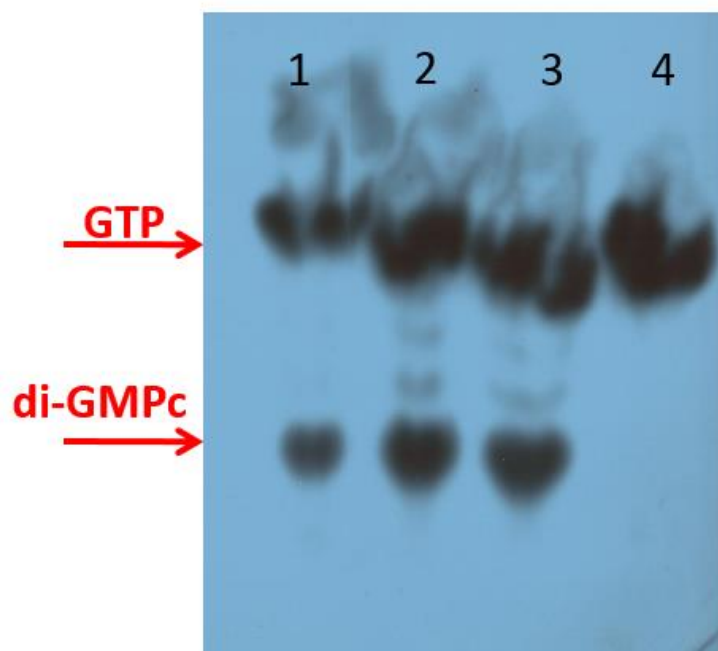
Así también se realizaron ensayos en presencia de  $FAD^+$  (Figura 25) que anteriormente se mencionaba, uno de los dominios PAS contiene un W conservado probable sitio de unión al  $FAD^+$  y responsable del aumento de la actividad.



**Figura 25.** PEI-TLC celulosa con y sin  $FAD^+$ . 1 hora de incubación a 30°C. 1: Cloruro de magnesio ( $Mg^{2+}$ ) 5 mM, sin  $FAD^+$ , 2:  $FAD^+$  1  $\mu M$  sin ion metálico (cloruros).

En este ensayo se concluye que es indispensable el cofactor  $\text{FAD}^+$  para la actividad de la proteína.

Una vez determinado que ambos iones tanto de Magnesio ( $\text{Mg}^{+2}$ ) y Manganeso ( $\text{Mn}^{+2}$ ) se requieren para la actividad enzimática de CdgA y la presencia de  $\text{FAD}^+$ , se procedió a realizar ensayos variando la concentración de proteína a fin de observar si la cantidad de di-GMPc aumentaba con mayor concentración de proteína en la reacción. Se determinó el factor de retención para el GTP es de 0.3 (Figura 26).



**Figura 26.** PEI-TLC celulosa variando concentración de proteína. Carril 1: 8.25  $\mu\text{g}$  de proteína, Carril 2: 13.17  $\mu\text{g}$  de proteína, Carril 3: 17.56  $\mu\text{g}$  de proteína y Carril 4: control negativo (proteína desnaturalizada). 1 hora de incubación a  $30^\circ\text{C}$  y Cloruro de magnesio ( $\text{Mg}^{+2}$ ) 5 mM - Cloruro de Manganeso ( $\text{Mn}^{+2}$ ) 5 mM.

En el ensayo se evidencio que cuando la concentración de la proteína se aumenta hay mayor cantidad de di-GMPc, cabe destacar que hay presencia de posibles intermediarios que se observan entre el GTP y di-GMPc.



## 10. Discusión:

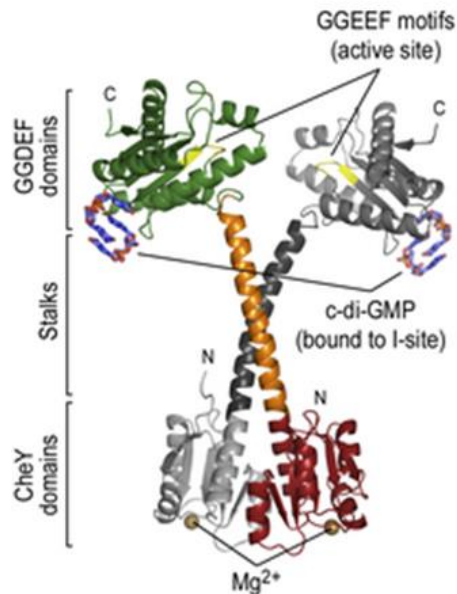
Se han realizado varios estudios que han identificado y confirmado la participación de las DGCs en la formación del di-GMPc y la intervención de este en mecanismos tales como la formación de biopelícula, sin embargo la mayoría se refieren a bacterias patógenas y muy poco se sabe acerca de las bacterias del suelo promotoras del crecimiento vegetal como *Azospirillum*. De la escasa información en cuanto a bacterias del suelo se describió un estudio en *Sinorhizobium meliloti* el cual mediante un análisis bioinformático se identificaron 19 genes, que codifican de manera presuntiva para proteínas con dominios GGDEF y EAL de los cuales 5 genes cuyos producto de traducción presentan los dominios GGDEF, 4 con dominios EAL, y 10 con ambos dominios GGDEF-EAL; se realizaron mutantes de 14 genes, mostrando un crecimiento deficiente en medio mínimo y la movilidad disminuida, mientras que 11 mutantes producen mucho más EPS y presentaron alterado el proceso de nodulación, resultando menos competitivas en la planta huésped (alfalfa), lo que sugiere que las proteínas GGDEF y EAL pueden desempeñar funciones relevantes durante la interacción *S. meliloti* -planta huésped para establecer un proceso de simbiosis eficiente (Wang *et al.* 2010). Sin embargo en este estudio la actividad de las proteínas no fue analizada.

En nuestro laboratorio se ha iniciado el estudio de estos genes correspondientes a las diguanilato ciclasas y su probable participación en varios procesos fisiológicos que intervienen en la interacción bacteria-planta. Como son movilidad y formación de biopelícula, describiendo la función de algunos de los genes presentes en el genoma de *A. brasilense* cepas Sp7 y Sp245. No obstante, la actividad enzimática no había sido evidenciada, es debido a ello que en este trabajo se demostró la actividad de esta diguanilato ciclasa, para lograr el objetivo se clonó el gen *cdgA* que codifica para la proteína CdgA de 540 aminoácidos en un sistema heterólogo, usando el vector de expresión pQE-31 y sobre expresada en células *E. coli* XL1-Blue. A pesar de que la clona que se escogió para trabajar no presentaba

mutaciones como se muestra en el apartado de resultados (ensayos de restricción y secuenciación), se formaron cuerpos de inclusión como se menciona en los ensayos en los que la proteína se encontraba en el paquete celular y no en el sobrenadante del extracto lisado (Fig. 15), por esta situación se usaron detergentes para disgregar y solubilizar los cuerpos de inclusión de acuerdo a lo propuesto por Tao *et al.* (2010) donde recomiendan el empleo de Tritón X-100, Chaps y Sarcosyl, en este estudio el uso de Sarcosyl 1% resulto la concentración ideal para la obtención de la proteína en la fracción soluble, ya que concentraciones menores no resultaron eficientes para la solubilización de los mismos, así como el resto de los detergentes utilizados y se procedió a realizar ensayos enzimáticos.

La formación de protómeros (dímeros y tetrámeros) es una necesidad aparente para el mecanismo catalítico de dos DGCs de patógenos descritas, WspR de *P. aeruginosa* (Pirruccello *et al.* 2008) y PleD de *C. crecentus* (Paul *et al.* 2007). Los estudios cristalográficos y de mutación sitio específica sugieren que se genera un sitio activo simétrico entre dos subunidades en la cavidad catalítica de dos dominios GGDEF y es posible que la promoción o la inhibición de la dimerización sea un mecanismo clave de control en general de la actividad de la diguanilato ciclasa como se muestra en el ejemplo de WspR en la figura 27 (Nabadita *et al.* 2008; Christen *et al.* 2006). Cabe señalar que además se ha determinado que la dimerización es una propiedad común de las proteínas utilizada para proporcionar estabilidad y transmitir señales que modulen la actividad de manera positiva y/o negativa (Christen *et al.* 2006).

Teniendo en cuenta esta información y conociendo las condiciones de expresión y purificación de la CdgA se procedió a realizar un ensayo para determinar si la proteína CdgA se encontraba dimerizada, observando que efectivamente la conformación nativa correspondía a un dímero, esto independiente de la presencia del sustrato y del cofactor FAD<sup>+</sup> (Fig. 23).

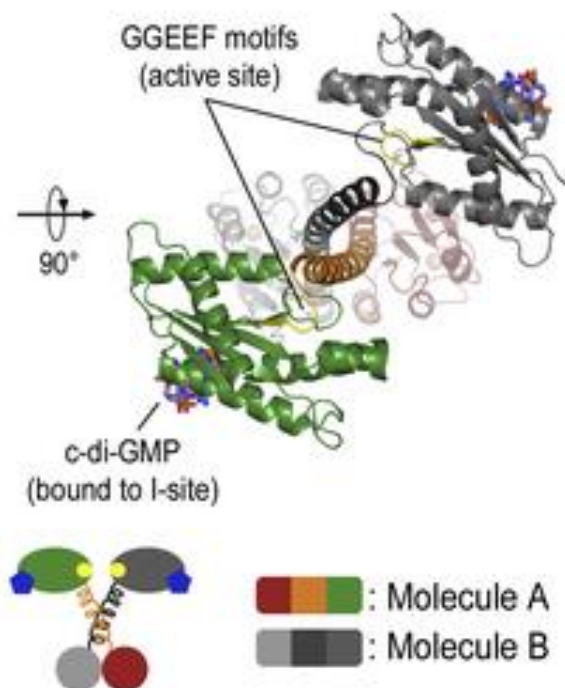


**Figura 27.** Estructura de la diguanilato ciclasa WspR de *Pseudomonas aeruginosa* en estado dimerizado, se observa la posición del sitio activo y del sitio de inhibición Nabadita *et al.* 2008.

Sin embargo, a diferencia de PleD y WspR que dimerizan por sus dominios Rec y CheY respectivamente (Figura 27), CdgA no cuenta con estos dominios. La cristalización de la proteína RpBphP1 de *Rhodospseudomonas palustris*, que contiene en el C-terminal un dominio de transducción de salida (OTD, Out-transducing domain), el cual incluye un dominio PAS/PAC, se estableció que las hélices HI de este dominio están involucradas en la dimerización ya que se encuentran unidas por interacciones Van der Waals entre los residuos 504 a 528, aunado a ello se determinó que también forman puentes de hidrogeno en los extremos permitiendo la interacción entre ambos monómeros (Bellini 2012). Se ha descrito que el motivo bHLH presente en el dominio PAS en el receptor de aril de hidrocarburos (AHR) y el translocador (AHR) se encuentra involucrado en la formación de heterodímeros. Mientras que los dominios PAS ubicados en el N-terminal contribuyen a la formación de tetrámeros en los canales iónicos sensibles al voltaje. Aunque, la intervención de este dominio en la interacción proteína-proteína aún no es claro (Taylor y Zhulin, 1999). CdgA cuenta con tres dominios PAS en tándem y de acuerdo a lo anteriormente citado podrían estar interviniendo

para la interacción proteína-proteína, cabe destacar que para asegurar esta teoría es necesario realizar los ensayos correspondientes para su afirmación.

Las diguanilato ciclasas catalizan la formación de un producto simétrico por condensación de dos moléculas de sustrato (GTP) idénticas (Figura 28), a diferencia de las nucleotidil ciclasas monocíclicas, que forman productos no simétricos (Christen, 2006). Para formar el complejo enzima-sustrato catalíticamente competente (complejo de Michaelis-Menten), dos dominios DGC tienen que alinearse en orientación antiparalela, de tal forma que los grupos 3-OH de los sustratos unidos a cada dominio se coloquen en estrecha proximidad al  $\alpha$ -fosfato de la otra molécula de GTP y son posicionados para formar una molécula intermedia durante el ataque nucleofílico al  $\alpha$ -P, para finalmente formar el enlace fosfodiéster  $\alpha$ P- $\beta$ P (Wassmann *et al.* 2007). Esta actividad puede ser revelada en el ensayo de cromatografía capa fina (TLC), donde se observa la formación de di-GMPc y lo que posiblemente sean intermediarios (Fig. 26).

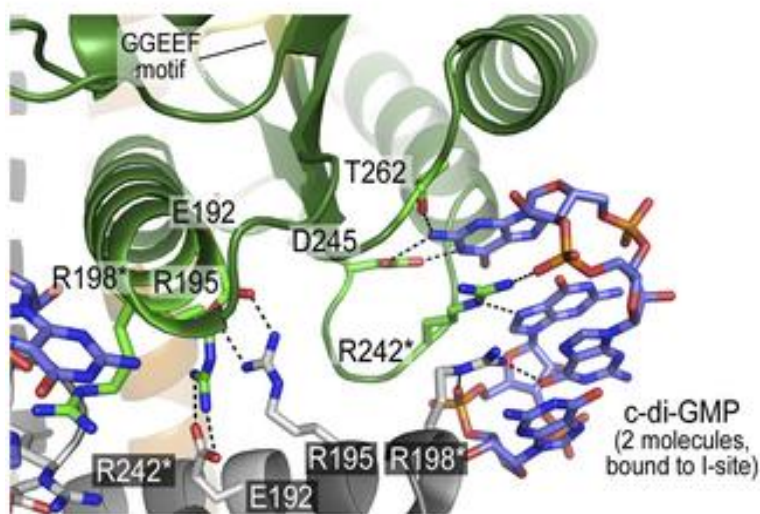


**Figura 28.** Localización de los sitios activos simétricos en el dímero y posición de las moléculas de GTP (círculos amarillos) y di-GMPc (pentágono azul) Nabadita *et al.* 2008.

Paul *et al.* (2007), describieron que aunque la dimerización de PleD es necesaria no es suficiente para la actividad de la enzima; en este estudio se construyó una mutante donde el residuo D del sitio activo A (GG[D/E]EF) se reemplazó por un residuo de Q, la importancia de este cambio radica en que el D en el sitio de unión a metal es el residuo donde ocurre la unión coordinada al  $Mg^{2+}$ , destacando también que el magnesio es requerido para la desprotonación del grupo 3-OH de uno de los dos sustratos de GTP y por consiguiente del ataque nucleófilico en  $\alpha$ -fosfato de la segunda molécula de GTP (Wassmann *et al.* 2007); sin embargo la mutante podía formar dímeros ya que los dominios Rec1/Rec2 se encontraban intactos, demostrando que no solo la formación del dímero es suficiente para la actividad, sino también el sitio de unión a metal es crucial para la actividad catalítica de la proteína. Tomando en consideración estos datos, se realizó el análisis bioinformático alineando el sitio activo, sitio de unión a metal y el sitio de inhibición de la proteína CdgA con las secuencias de WspR (Pirruccello *et al.* 2008) y PleD (Paul *et al.* 2007). Estudio *in silico* que nos permitió inferir que los aminoácidos necesarios se encontraban conservados en CdgA y proponer que la proteína podría ser catalíticamente activa. Para demostrar que el sitio de unión a metal es de interés para la actividad enzimática tomando como ejemplo lo demostrado en PleD, se realizaron ensayos enzimáticos con cloruro de  $Mg^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  y ambos ( $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ ), ya que el sitio de unión a metal promueve un incremento en la actividad de la enzima puede ser ocupado por alguno de estos iones, siendo el Ca un inhibidor de la actividad usado como control negativo (Römling *et al.* 2013), determinando que CdgA requiere de la presencia de ambos iones ( $Mg^{2+}$  y  $Mn^{2+}$ ) para su actividad (Fig. 24).

En cuanto al sitio activo y de inhibición, se destaca la presencia del residuo R conservado (Arg-366 en PleD) que conecta ambos dominios, e incluida en el motivo RXXD indispensable en la inhibición, basado en el modelo de sitio activo, dos mecanismos de inhibición alternativos han sido previstos. En un primer escenario, la unión de di-GMPc a R (Figura 29) y de ese modo perturbar la unión de guanina que resulta en un aumento de la  $K_m$  para GTP. Alternativamente, la unión del inhibidor podría reorganizar el complejo  $Mg^{2+}$ -Carboxilo y por lo tanto

desestabilizar el estado activo provocando un cambio conformacional (Paul *et al.* 2007). En el caso de CdgA se localizó el motivo RXXD conservado, el cual es un indicio de que eventualmente tendría esa función. Por otro lado, en el sitio activo se encuentra el motivo GGEEF completamente conservado en el que la primera G del motivo participa en el sitio de unión de las moléculas de GTP (Römling *et al.* 2013). El análisis realizado nos permitió inferir que CdgA cuya hipótesis planteada en este trabajo fue demostrada con los ensayos de TLC, al menos en lo referente a la actividad enzimática.



**Figura 29.** Acercamiento del sitio de inhibición donde una molécula de di-GMPc se une a R de este sitio para provocar inhibición enzimática. Nabadita *et al.* 2008.

Una vez demostrada la actividad de CdgA, surgió la pregunta de si además del metal se requería de otra molécula que interviniera en la actividad enzimática. Ya que otros estudios han mostrado otra de las funciones de los dominios PAS es la detección de oxígeno, potencial redox y la luz (Taylor y Zhulin, 1999) y no solo la intervención en la interacción proteína- proteína. Xie *et al.* (2009) realizaron alineamientos de dominios PAS (1649 dominios), que permitió separarlos en tres grupos de acuerdo al cofactor capaz de unir respecto al dominio conservado, concluyendo que un residuo de W (Trp87) del dominio PAS de NifL de *Azotobacter vinelandii* es capaz de unir a FAD<sup>+</sup>. También en *Bordetella pertussis* se encontró

que el dominio PAS<sub>Bvg</sub>, un residuo conservado de H es el sitio de unión de un grupo hemo, semejante a los resultados encontrados para las proteínas FixL de *Bradyrhizobium japonicum* y *S. meliloti*. Dicho residuo se encuentra localizado en la hélice larga  $\alpha$  F, y se encontró que cuando es sustituido por un residuo de A en *Bordetella pertussis*, que en condiciones de crecimiento aeróbico es virulenta se inactivaba la proteína BvgS (Dupré *et al.* 2013). Tales estudios nos motivaron a explorar *in silico* los tres dominios PAS de CdgA con la finalidad de encontrar el W que probablemente sería el sitio de unión al cofactor FAD<sup>+</sup>, localizando el residuo W en el primer dominio, por lo que los ensayos siguientes se agregó FAD<sup>+</sup> a la reacción, debido a que el ensayo de TLC no es cuantitativo solo nos permitimos proponer que la molécula incrementa la actividad de la CdgA, de manera visual.

En conclusión el conjunto de los resultados obtenidos en este trabajo, así como los obtenidos anteriormente por Romero (2012), sobre la función del gen *cdgA* que codifica a CdgA, el cual participa en la formación de biopelícula a través de la formación de la molécula señal di-GMPc, proteína modular de señalización citoplasmática, probablemente detecte el estatus redox de la célula por medio de la poza intracelular del FAD<sup>+</sup>, que a su vez aumentaría la actividad de la CdgA.

## 11. Conclusión:

- Se sobreexpresó la CdgA recombinante en *E. coli* y se purificó por IMAC.
- La enzima no requiere de la presencia del sustrato (GTP) para su conformación activa (homodímero).
- Se mostró que la proteína CdgA presenta actividad enzimática de diguanilato ciclasa produciendo di-GMPc, así como la presencia de posibles intermediarios en la formación del di-GMPc.
- Uno de los tres dominios PAS, contiene un W conservado que probablemente es el sitio de unión al cofactor FAD<sup>+</sup> quien aumenta la actividad de la enzima. Por tanto los dominios PAS participarían tanto en dimerización, como en detectar el estado redox de la célula.

## 12. Perspectivas

- ✓ Cuantificar los productos de la reacción por HPLC, permitiría determinar las constantes enzimáticas de la CdgA.
- ✓ Realizar una mutante por delección en alguno de los 3 dominios PAS permitiría evidenciar que estos intervienen en la formación del dímero, como se ha sugerido.
- ✓ Generar la mutante sitio específico en el W del primer dominio PAS, contribuiría a la comprensión de la estructura de esta proteína y sus sitios de unión a los cofactores, descartando o confirmando que este es esencial para unión del FAD<sup>+</sup>.



## 13. Referencias

1. **Aguilar.** 2008. Identificación de los genes que codifican para las enzimas aromático amino transferasas (AATs) de *Azospirillum brasilense* Sp7. Tesis de Maestría. Posgrado en microbiología CICM, ICUAP.
2. **Barry L., Taylor R. and Zhulin I.** 1999. PAS Domains: Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 479–506.
3. **Bashan and Holguin G.** 1997. *Azospirillum*-plant relationships: environmental and physiological advances. *Can. J. Microbiol.* **43**: 103-121.
4. **Bashan Y., Holguin G. and Lifshitz R.** 1992. Isolation and characterization of plant growth-promoting rhizobacteria. In: *Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology*. J.E. Thompson and B.R. Glick, eds. CRC Press, Boca Raton, FL.
5. **Bashan, Y. and Holguin G.** 1998. A proposal for the division of "plant growth-promoting rhizobacteria" into two classifications: biocontrol-plant growth-promoting bacteria and plant growth-promoting bacteria. *Soil Biol. Biochem.* **30**: 1225-1228.
6. **Bellini D. and Papiz M.** 2012. Structure of a bacteriophytochrome and light-stimulated protomer swapping with a gene repressor. *Structure.* **20(8)**:1436–1446.
7. **Bogino P.C., Oliva M., Sorroche F. and Giordano W.** 2013. The Role of Bacterial Biofilms and Surface Components in Plant-Bacterial Associations. *Int. J. Mol. Sci.* **14**: 15838-15859
8. **Bordeleau, E., Fortier L.-C., Malouin F. and V. Burrus.** 2011. c-di-GMP turn-over in *Clostridium difficile* is controlled by a plethora of diguanylate cyclases and phosphodiesterases. *PLoS Genetics*, **7**:e1002039.
9. **Branda SS, Vik S, Friedman L. and Kolter R.** 2005. Biofilms: the matrix revisited. *Trends Microbiol.* **13**: 20-26.
10. **Burdman S., Jurkevitch E. and Okon Y.** 2000, Recent advances in the use of plant growth promoting rhizobacteria (PGPR) in agriculture, in: *Microbial Interactions in Agriculture and Forestry*. N. S. Subba Rao and Y. R. Dommergues, eds., Science Publishers. **2**: 229-250
11. **Caballero J.** 2000. El género *Azospirillum*, Programa de Ecología Molecular y Microbiana, Centro de Investigación sobre Fijación de Nitrógeno, UNAM, Cuernavaca, Mor., México.
12. **Carreño R., Sánchez A., Camargo N., Elmerich C. and Baca B. E.** 2009. Characterization of *chsA*, a new gene controlling the chemotactic response, in *Azospirillum brasilense* Sp7. *R. Arch. Microbiol.* **191**:501-507.
13. **Cassán F., Perrig D., Sgroj V., Masciarelli O., Penna C. and Luna V.** 2009. Corrigendum to "Azospirillum brasilense Az39 and Bradyrhizobium japonicum E109, inoculated singly or in combination, promote seed germination and early seedling growth in corn (Zea mays L.) and soybean (Glycine max L.)" *Eur. J. Soil Biol.* **45**: 28- 35.
14. **Chan C., Paul R., Samoray D., Amiot N., Giese B., Jenal U. and Schirmer T.** 2004. Structural basis of activity and allosteric control of diguanylate cyclase. *Proc Natl Acad Sci USA.* **101(49)**:17084-17089.
15. **Chang, A. L., Tuckerman, J. R., Gonzalez, G., Mayer, R., Weihouse, H., Volman, G., Amikam, D., Benziman, M. and Gilles-Gonzalez, M. A.** 2001. Phosphodiesterase A1, a

- regulator of cellulose synthesis in *Acetobacterxylinum*, is a heme-based sensor. *Biochemistry*. **40**: 3420–3426.
16. **Chao L., Rakshe S., Leff M. and Spormann A.** 2013 .PdeB, a cyclic Di-GMP-specific phosphodiesterase that regulates *Shewanella oneidensis* MR-1 motility and biofilm formation. *J Bacteriol.* **21**:195:3827-33.
  17. **Christen B., Christen M., Paul R., Schmid F., Folcher M., Jenoe P., Meuwly M. and Jenal U.** 2006. Allosteric control of cyclic di-GMP signaling. *J. Biol. Chem.* **281**: 32015–32024.
  18. **Christen, M., Christen, B., Folcher, M., Schauerte, A. and Jenal, U.** 2005. Identification and characterization of a cyclic di-GMP-specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP. *J. Biol. Chem.* **280**: 30829–30837.
  19. **Costerton J.W., Lewandowski Z., Caldwell D.E., Korber D.R. and Lappin-Scott H.M.** 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 711–745.
  20. **Costerton, J., Lewandowski, Z., Caldwell, D., Korber, D. and Lappin-Scott, H.** 1995. Microbial biofilms. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 711-745.
  21. **Davey, M.E. and O'Toole, G.A.** 2000. Microbial biofilms: From ecology to molecular genetics. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**: 847–867.
  22. **De Bashan L.E., Holguin G., Glic B.R. and Bashan Y.** 2007. Bacterias promotoras de crecimiento en plantas para propositos agricolas y ambientales. En: *Microbiologia agrícola: hongos, bacterias, micro y macrofauna, control biológico, planta-microorganismo.* (Eds.) Ferrera-Cerrato, R., and Alarcon, A. Capitulo 8. Edit. Trillas, Mexico City, Mexico. pp. 170-224.
  23. **De N., Pirruccello M., Violinova-Krasteva P., Bae N., Veera-Raghavan V. and Sondermann H.** 2008. Phosphorylation-Independent Regulation of the Diguanylate Cyclase WspR. *Plos One Biology.* **6**: 601-617.
  24. **De N., Pirruccello M., Krasteva P.V., Bae N., Raghavan R.V. and Sondermann H.** 2008. Phosphorylation-independent regulation of the diguanylate cyclase WspR, *PLoS Biol.* **6**(3): e67
  25. **Döbereiner, J.** 1983. *Azospirillum* II: Genetics, physiology, and ecology. ed W. Klingmüller, Birkhauser, Basel Switzerland. **148**: 9-23
  26. **Dupré E., Wohlkonig A., Herrou J., Loch C., Jacob-Dubuisson F. and Antoine R.** 2013. Characterization of the PAS domain in the sensor-kinase BvgS: mechanical role in signal transmission. *BMC Microbiology* **13**: 172:1-12.
  27. **Galperin MY.** 2006. Structural classification of bacterial response regulators: diversity of output domains and domains combinations. *J. Bacteriol.* **188**: 4169-4182.
  28. **González L.E. and Bashan, Y.** 2000. Increased growth of the microalga *Chlorella vulgaris* when coimmobilized and cocultured in alginate beads with the plant growth-promoting bacterium *Azospirillum brasilense*. *Appl. Environ. Microb.* **66**: 1527-1531.
  29. **Huang, Z.J., Ebery, I. and Rosbash, M.** 1993. PAS is a dimerization domain common to *Drosophila* period and several transcription factors. *Nature.* **364**:259–62.
  30. **Jenal, U. and Malone, J.** 2006. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* **40**:385–407.

31. **Karatan E and Watnick P.** 2009. Signals, regulatory networks, and material that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol. Biol. Rev.* **73**: 310-347.
32. **Kloepper, J.W., R. Lifshitz and M.N. Schroth.** 1988, *Pseudomonas* inoculants to benefit plant production. *ISI Atlas Sci.: Anim. Plant Sci.* 60-64.
33. **Lin C.W., Chang W.S., Liu S.H., Tsai T.T., Lee S.P., Tsang Y.C., Shieh C.L. and Tseng C.M.** 2011. Landslides triggered by the 7 August 2009 Typhoon Morakot in Southern Taiwan. *Engineering Geology.* **123**: 3–12.
34. **McDougald, D., Rice, S.A., Barraud, N., Steinberg, P.D. and Kjelleberg, S.** 2012. Should we stay or should we go: mechanisms and ecological consequences for biofilm dispersal. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**: 39-50.
35. **Méndez-Ortiz, M. y Membrillo-Hernández, J.** 2005. Proteínas con dominios GGDEF y EAL: su función en el metabolismo bacteriano. *Rev. Latinoam. Microbiol.* **47 (3-4)**: 130-139.
36. **Michiels K.W., Croes C.L. and Vanderleyden J.** 1991. Two different modes of attachment of *Azospirillum brasilense* Sp7 to wheat roots. *J. Gen. Microbio,* **137**: 2241-2246.
37. **Paul, R., Abel, S., Wassmann, P., Beck, A., Heerlotz, H. and Jenal, U.** 2007. Activation of the Diguanylate Cyclase PleD by Phosphorylation-mediated Dimerization. *Journal of Biological Chemistry* **282**: 29170–29177.
38. **Pesavento C. and Hengge R.** 2009. Bacterial nucleotide-based second messengers. *Curr. Opin. Microbiol.* **12**:170–176.
39. **Petrova, O. E. and Sauer, K.** 2012. PAS domain residues and prosthetic group involved in BdlA-dependent dispersion response by *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *J Bacteriol.* **194**: 5817-5828.
40. **Rakshe S.** 2011. Cyclic Di-GMP Metabolism in *Shewanella Oneidensis* MR-1. Department of chemical and engineering. Stanford University.
41. **Ralf P., Sören A., Wassmann P, Becka A., Heerlotz H. and Jenal U.** 2007. Activation of the Diguanylate Cyclase PleD by Phosphorylation-mediated Dimerization. *J. Biol. Chem.* **282**:29170-29177.
42. **Rinaudi L.V. and Giordano W.** 2010. An integrated view of biofilm formation in rhizobia. *FEMS Microbiol. Lett.* **304**: 1–11.
43. **Romero.** 2012. Estudio de la formación de la biopelícula en *Azospirillum brasilense*. Tesis de Maestría. Posgrado en microbiología CICM, ICUAP.
44. **Römling U., Galperin M.Y. and Gomelsky M.** 2013. Cyclic di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second messenger. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **77**:1-52.
45. **Ross P., Weinhouse H., Aloni Y., Michaeli D., Weinberger-Ohana P., Mayer R., Braun S., de Vroom E., van der Marel G.A., Van Boom J.H. and Benziman M.** 1987. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid. *Nature* **325**:279 – 281.
46. **Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y. Michaeli D., Weinberger-Ohana P., Mayer R., Braun S., de Vroom E., Van der Marel G., Van Boom J.H. and Benziman M.** 1987. Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacterxylinum* by cyclic diguanylate. *Nature.* **325**:279–281.

47. **Ryjenkov D., Tarutina M., Moskvina O. and Gomelsky M.** 2005. Cyclic Diguanylate Is a Ubiquitous Signaling Molecule in Bacteria: Insights into Biochemistry of the GGDEF Protein domain. *Journal of Bacteriology*. **187**: 1792-1798
48. **Schmidt, A.J., Ryjenkov, D.A. and Gomelsky, M.** 2005. The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains". *J. Bacteriol.* **187**: 4774–4781.
49. **Singh, S. M. and Panda, A. K.,** 2005. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body protein. *J. Biosci. Bioeng.* **99**:303-310.
50. **Sorensen H.P. and Mortensen K.K.** 2005. Soluble expression of recombinant proteins in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Microb. Cell Fact.* **4**: 1-8
51. **Stanley, N.R. and Lazazzera B.A.** 2004. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol. Microbiol.* **52**: 917–924.
52. **Tamayo, R., Pratt, J.T. and Camilli, A.** 2007. Roles of Cyclic Diguanylate in the Regulation of Bacterial Pathogenesis, *Ann Rev Microbiol.* 2007. **61**:131–48.
53. **Tao H., Liu W., Simmons B., Harris H., Cox T. and Massiah M.** 2010. Purifying natively folded proteins from inclusion bodies using sarkosyl, triton X-100 and CHAPS. *BioTechniques.* **48**: 61-64.
54. **Tarrand, J.J., Krieg, N.R. and 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* (bejerinck) comb. Nov. and *Azospirillum brasilense* sp. Nov. *Can J Microbiol* **24**: 967-980
55. **Taylor B. and Zhulin I.** 1999. PAS domains: internal sensors of oxygen, redox potential, and light. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 479-506.
56. **Tuckerman J., Gonzalez G., Sousa E., Wan X., Saito J., Alam M. and Gilles-Gonzalez M.** 2009. An oxygen-sensing diguanylate cyclase and phosphodiesterase couple for c-di-GMP control. *Biochemistry.* **48**:9764-74
57. **Upadhyay A.K., Murmu A., Singh A. and Panda A.K.** 2012. Kinetics of inclusion body formation and its correlation with the characteristics of protein aggregates in *Escherichia coli*. *PLoS One.* **7**:e33951.
58. **Wang Y., Xu J., Chen A., Wang Y., Zhu J., Yu G., Xu L. and Luo L.** 2010. GGDEF and EAL proteins play different roles in the control of *Sinorhizobium meliloti* growth, motility, exopolysaccharide production, and competitive nodulation on host alfalfa. *Acta. Bioch. Bioph. Sin.* **42(6)**: 410-417.
59. **Wassmann P., Chan C., Paul R., Beck A., Heerklotz H., Jenal U. and Schirmer T.** 2007. Structure of BeF3<sup>-</sup>-modified response regulator PleD: implications for diguanylate cyclase activation, catalysis, and feedback inhibition. *Structure.* **15(8)**:915-27.
60. **Wisniewski-Dyé F, Borziak K., Khalsa-Moyers G., Alexandre G., Sukharnikov L.O., Wuichet K., Hurst G.B., McDonald W.H., Robertson J.S., Barbe V., Calteau A., Rouy Z., Mangenot S., Prigent-Combaret C., Normand P., Boyer M., Siguier P., Dessaux Y., Elmerich C., Condemine G., Krishnen G., Kennedy I., Paterson A.H., González V., Mavingui P. and Zhulin I.B.** 2011. *Azospirillum* Genomes Reveal Transition of Bacteria from Aquatic to Terrestrial Environments. *PLoS Genetics.* **7**: 1-13.
61. **Wisniewski-Dyé F., Lozano L., Acosta-Cruz A., Borland S., Drogue B., Prigent-Combaret C., Rou Z., Barbe V., Mendoza-Herrera A., González V. and Mavingui P.**

2012. Genome Sequence of *Azospirillum brasilense* CBG497 and Comparative Analyses of *Azospirillum* Core and Accessory Genomes provide Insight into Niche Adaptation. *Genes*. **3**: 576-602.
62. **Wu, J. and Xi, C.** 2009. Evaluation of different methods for extracting extracellular DNA from the biofilm matrix. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 5390–5395.
63. **Xie Z., Ulrich L.E., Zhulin I.B. and Alexandre G.** 2010. PAS domain containing chemoreceptor couples dynamic changes in metabolism with chemotaxis. *Proc Natl Acad Sci.* **2**:2235-2240.
64. **Xiqui M.L. Romero A. Terán E. Soto L. y Baca B.** 2010. Nuevo sistema de señalización en bacterias. *Elementos* **80**: 21-29.

## ANEXOS 14

### ANEXO 1. PREPARACIÓN DE ADN PLASMÍDICO POR LISIS ALCALINA CON SDS

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

#### Método:

1. Tomar una colonia bacteriana y resuspender la en 5 ml de medio LB conteniendo el antibiótico adecuado. Incubar a 37 °C durante 14-16 h con agitación vigorosa a 200 rpm.
2. Centrifugar 3-5 ml del cultivo bacteriano a 6000 rpm por 3 min en tubos Eppendorff de 1.5 ml.
3. Eliminar el sobrenadante por decantación y resuspender en 200µl de solución reguladora de lisis (solución 1) 50 mM de Tris-HCl (pH 8.0) y de EDTA 10 mM. Agregar 200 µl de lisozima preparada al momento (4 mg/ml). Nota: disolver la lisozima en buffer P1.
4. Mantener el tubo con la solución 1 durante 5 min a temperatura ambiente.
5. Agregar 400 µl de solución de lisis (solución 2) (NaOH 200 mM y SDS al 1%) mezclar por inversión suavemente de 3-6 veces y mantener durante 5 minutos en hielo, no excederse de ese tiempo.
7. Agregar 300 µl de 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.
9. Centrifugar por 15 min a 14,000 rpm a 4° C (centrífuga refrigerada).
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 de cloroformo-alcohol isoamílico, mezclar suavemente por inversión durante 2 minutos y centrifugar a 10000 rpm por 5 minutos.
12. Después de dos lavados con la mezcla de fenol/cloroformo-alcohol isoamílico hacer un último lavado con cloroformo-alcohol isoamílico para eliminar el exceso de fenol; mezclar por inversión y centrifugar a 10000 rpm por 5 minutos.
13. Aspirar el sobrenadante y transferirlo a un tubo nuevo y estéril.

14. Añadir 0.6 volúmenes de isopropanol e incubar a temperatura ambiente por 10 minutos.
15. Centrifugar por 30 minutos a 14000 rpm a 4° C.
16. Eliminar el sobrenadante por decantación. Eliminar las sales con 1 ml de etanol al 70%, mezclar suavemente por inversión de 2-3 veces y centrifugar por 5 minutos a 10,000 rpm a 4 °C. repetir el proceso 2 veces.
17. Colocar los tubos invertidos sobre un papel filtro durante 15 minutos para secar la pastilla y eliminar el exceso de etanol.
18. Resuspender la pastilla en 50µl de una solución de RNAsa 1 µg/ml e incubar a 37 °C por 30 minutos.

**ANEXO 2. CONDICIONES PCR PARA LA OBTENCIÓN DEL AMPLIFICADO A USAR EN LA CLONACIÓN EN EL VECTOR PCR 2.1. TOPO. (Invitrogene)**

| Componente               | Volumen (µL) |
|--------------------------|--------------|
| Agua                     | 7.65         |
| DMSO                     | 1.0          |
| Buffer MgCl <sub>2</sub> | 2.5          |
| MgCl <sub>2</sub>        | 1.25         |
| dNTP's                   | 4.0          |
| Oligo LQ1F               | 0.7          |
| Oligo LQ1R               | 0.7          |
| DNA                      | 2.0          |
| Taq Platinum             | 0.2          |
| Vol. Total               | 20.0         |

|                   |  |           |
|-------------------|--|-----------|
| Desnaturalización | 95.0 °C 5 minutos  | 1 ciclo   |
| Hibridación       | 95.0 °C 30 segundos<br>55.0 °C 1 minuto<br>72.0 °C 2 minutos | 30 ciclos |
| Extensión         | 72.0 °C 10 minutos   | 1 ciclo   |
|                   | 4° C   | ∞         |



### ANEXO 3. TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS DE *E. coli* QUIMIOCOMPETENTES

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

#### PROTOCOLO

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

#### ANEXO 4. PROTOCOLO DE INDUCCIÓN DE LA PROTEINA CdgA TEMPERATURA AMBIENTE (Modificado Quiagen, 1992)

- Se realiza un precultivo de 12 horas de incubación en medio LB con Ampicilina (50 µg/ml).
- Se toman 6ml del precultivo para inocular un matraz con 300ml de medio LB y Ampicilina (50 µg/ml).
- Se incuba con agitación a 37°C, hasta obtener un D.O. 0.5 a 0.7.
- Una vez alcanzada la D.O. se induce con una concentración 1 mM de IPTG durante 1 hora a 30°C.
- Centrifugar el cultivo a 6,000 RPM durante 8 minutos para separar el pellet del sobrenadante. (Almacenar pellet a -80°C.
- Centrifugar las células a 8 000 RPM por 15 minutos, y se conserva el paquete celular a -20 °C.

### **ANEXO 5. LISIS CELULAR (Quiagen,1992)**

- Resuspender el paquete celular obtenido de un cultivo celular pastillas a las 1, 2, 3, y 5 horas de inducción en 0.5 ml buffer de lisis I y agregar lisozima a una concentración de 0.5 mg/ml. Incubar a 37 °C.
- El lisado obtenido se lleva a sonicar durante 3 min, a 50 de amplitud y 6 pulsos/seg (Dos veces o hasta que se obtenga una fase transparente).

Nota: utiliza baño de hielo.

- Centrifugar a 8000 rpm por 20 min en frío a (4°C) para separar la fracción soluble de la insoluble. (Sobrenadante y precipitado celular, respectivamente) Las fracciones con proteína se Conservan a -20 °C hasta su utilización.

| <b>Solución de lisis</b>                   |
|--|
| <b>50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b> |
| <b>300 mM NaCl</b>                         |
| <b>10 mM Imidazol</b>                      |
| <b>1 mg/ml Lisozima</b>                    |
| <b>0.1 mM PMSF</b>                         |

## ANEXO 6. IMMUNOBLOTTING (WESTERN BLOT)

- 1) Separar las proteínas presentes en las muestras lisadas usando un gel de poliacrilamida con SDS (PAGE-SDS). Cargar de 20-25µg de la proteína. La cantidad de lisado que es cargado por banda depende del nivel de proteína expresada y puede variar entre experimentos.
- 2) Transferir las proteínas del gel a una membrana de nitrocelulosa (Ver protocolo). Realizar la tinción de Ponceau para verificar la eficiencia de la transferencia.
- 3) Bloquear la membrana por más de 60 minutos (2 horas) usando una solución al 5% de non-fat dry milk ó albúmina sérica bovina BSA (product No A 9647 Sigma Aldrich). En una solución salina de buffer de fosfatos pH= 7.4 (PBS product No. D 8537 Sigma Aldrich).
- 4) Lavar la membrana 3 veces por 5 minutos cada uno en PBS 10 mM a un pH=7.4 conteniendo 0.05% de Tween 20 (product No. P3563).
- 5) Incubar la membrana por 2 horas con el Antipolyhistidine Alkaline Phosphatase conjugado (4°C) como el primer anticuerpo usando una concentración optima de 1/2000 en PBS pH=7.4 conteniendo 1% de albúmina sérica bovina BSA.
- 6) Lavar la membrana 3 veces por 5 minutos cada uno en PBS a 10 mM a un pH= 7.4 conteniendo 0.05% de Tween 20.
- 7) Tratar la membrana con un sustrato de fosfatasa alcalina. (eg. BCIP/NBT product No. 53771).

NOTA: todos los pasos de incubación se realizan a una temperatura entre 18-20 °

PREPARACIÓN DEL SUSTRATO PARA DETECTAR FOSFATASA ALCALINA. Para 5ml de buffer de fosfatos alcalinos (100mM/TRIS/HCL [pH=9], 150 mM NaCl, 1mM MgCl<sub>2</sub>). Adicionar 33 µl NBT y 16.5 µl BCIP. Adicionar primero NBT, mezclar y adicionar el BCIP y seguir mezclando. NBT (nitro blue tetrazolium) formulación: NBT (50 mg/ml) en 70%

dimetilformamida.BCIP (5-Bromo-4Cloro-3indolyl- phosphate) formulación: BCIP (50 mg-ml) en 100% de dimethyformamide). Se almacena a -20 °C.

Colocar la mezcla sobre la membrana cuidando que no le dé la luz directamente tapar la membrana con papel aluminio y agitar; ir observando la membrana para cuando aparecen las bandas aproximadamente 2 minutos enseguida parar la reacción con solución stock (20 mM TRIS/HCL [pH=8.0], 5 mM EDTA).

8) Secar la membrana y almacenar a temperatura ambiente cubierta de la luz.

## ANEXO 7. CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR G-50.

(Modificado de Plumer, 1981)

### Preparación de la resina:

A 1 gramo de resina G-25 se adicionan 5 ml de agua desionizada estéril o buffer de equilibrio para lograr su expansión. Se debe tener en cuenta la cantidad necesaria para llenar dos terceras partes de la columna.

### Equilibrio de la columna

Para expandir y equilibrar la resina G-25 se utiliza el buffer de fosfatos 50 mM con 5 mM MgCl<sub>2</sub>.

Expandida la resina G-25 y vertir a la columna. Dejar sedimentar mínimo 4 horas o toda la noche.

Pasado el tiempo de sedimentación, equilibrar la resina eluyendo 200 ml del buffer fosfatos y dejar sedimentar nuevamente toda la noche (se agrega PMSF al 1 mM y azida de sodio al 0.02 M para evitar degradación por proteasas y contaminación por microorganismos).

### Preparación de la columna con la muestra

A la columna con la resina previamente equilibrada, agregar la muestra de extracto crudo a analizar, y eluir dicha muestra con 60 ml del buffer de fosfatos y recolectar fracciones de 3 ml.

Nota: Tener en cuenta el volumen muerto (Cantidad del buffer que se encuentra en el gel, usualmente son dos terceras partes del volumen). Si la muestra es mayor al volumen muerto, las proteínas salen de la columna y no caen en las fracciones de recolección.

- A partir de las fracciones recolectadas se realiza la lectura de cada una, en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 280 nm, para seleccionar las fracciones con un mayor valor de absorbancia, lo que indica una mayor cantidad proteína.
- A las fracciones seleccionadas con mayor cantidad de proteína se les realiza un corrimiento electroforético SDS-PAGE y posteriormente un WESTERN BLOT.

- Se seleccionan las fracciones que muestran reacción para el western blot y se realizan grupos con un volumen final de 8 ml.

**Solución:**

Cromatografía G-50 pH: 8.0( NaCl al 100 mM+ Fosfatos de sodio al 50 mM+ MgCl<sub>2</sub> al 10 mM+ PMSF al 100 μM)

Nota: Fosfato de sodio al 50 mM: Fosfato de sodio di básico (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) + 7 H<sub>2</sub>O y Fosfato de sodio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) + H<sub>2</sub>O.

## ANEXO 8. PURIFICACION POR CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD.

(Modificado de Invitrogen, 2006)

### Equilibrio de la columna:

- Para un volumen de 8 ml de los grupos obtenidos, utilizar aproximadamente una cantidad de 2 ml de resina Ni<sup>+</sup>.
- Esta cantidad se vierte en una columna de un volumen aproximadamente de 10 ml, dejar sedimentar la resina y eliminar el sobrenadante.
- Dejar sedimentar durante un periodo de 30 min y eliminar el sobrenadante.

### Procedimiento con muestra:

- Una vez equilibrada la resina resuspender con 8 ml de la muestra (conjunto de las fracciones de la cromatografía G-50). Dejar agitando suavemente durante un tiempo de 120 min.
- Dejar sedimentar y eluir el sobrenadante por la resina. conservar esta elución a -20 °C.
- Resuspender la resina con 8 ml de buffer de lavado a 30 mM de Imidazol, se deja asentar y se eluye el sobrenadante, y se conserva a -20 (se repite unas 3 veces más)
- Resuspender la resina con una solución con una concentración 1 M de NaCl, eluir el sobrenadante y conservar las alícuotas a -20°C.
- Resuspender la resina con 15 ml de buffer de elución a 250 mM de imidazol, se deja sedimentar y se eluye el sobrenadante recolectando fracciones de 1.5 ml.
- Realizar un SDS PAGE y western blot.
- Realizar conjuntos de fracciones para dializar y posteriormente concentrar. Cada conjunto contiene 3 fracciones. Las fracciones más contaminadas se analizan por separado.



| Solución Equilibrar   | Solución Lavado 1  | Solución Alta [ ] NaCl 2  | Solución Elución 3  |
|---|--|---|---|
| 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>300 mM NaCl<br>20 mM Imidazol | 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>300 mM NaCl<br>20 mM Imidazol<br>0.1 mM PMSF | 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>1 M NaCl<br>20 mM Imidazol<br>0.1 mM PMSF | 50 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub><br>300 mM NaCl<br>250 mM Imidazol<br>0.1 mM PMSF |

### ANEXO 9. CONCENTRACIÓN DE LA PROTEÍNA.

**Para iniciar con la concentración y cambio de buffer se realiza lo siguiente:**

Desalar las alícuotas de las eluciones, concentrándolas en un microcon de Millipore 30K sustituyendo la solución de elución con el buffer de reacción.

| Buffer de reacción  |
|---|
| 50 mM de Tris-HCl (pH 7,6)<br>10 mM de MgCl <sub>2</sub> ,<br>50 mM de NaCl |

### **ANEXO 10. DIÁLISIS. (Jaskunas *et al.* 1968)**

Las fracciones transferirlas a tubos de diálisis de celulosa con un poro que permite el paso de moléculas de 12,000 Da.

- Se inicia la Diálisis con buffer de fosfatos de sodio 50 mM pH: 8.0 con una incubación de 3 a 4 horas a una temperatura de 4 °C.
- Después se hace un cambio de buffer (se utiliza el mismo buffer) y se deja toda la noche a una temperatura de 4 °C.
- Se conservan los conjuntos a -20 hasta su concentración.
- Posteriormente si se requiere se realiza un corrimiento electroforético SDS-PAGE y se realiza un western blot.

### **ANEXO 11. CONCENTRACIÓN DE LA PROTEÍNA.**

1. Utilizar los tubos obtenidos en la diálisis, transferir a tubos de diálisis nuevamente y sellar.
2. Colocar los sacos en forma de mono-capa y agregar una capa de sacarosa (la cantidad de veces necesarias hasta eliminar el tampón en donde está contenida la proteína).
3. Enjuagar los sacos con agua destilada para eliminar el resto de sacarosa.
4. Abrir cada uno de los sacos, agregar 300 µl de tampón de almacenamiento lavando las paredes de la membrana (buffer de fosfatos 50 mM pH 8.0).
5. Realizar un corrimiento electroforético SDS PAGE y WESTERN BLOT y realizar actividad diguanilato ciclasa.

### **ANEXO 12. DETERMINACIÓN DE CONCENTRACIÓN DE PROTEÍNA POR EL MÉTODO DE BRADFORD (modificado de Bradford, 1976)**

1. Realizar una curva de calibración ASB (Albúmina sérica bovina)
2. Stock 1mg/ml de albúmina.
3. Preparar la muestra blanco con 10 µl de H<sub>2</sub>O, agregar 200 µl del reactivo de Bradford y llevar a un volumen de 1 ml con H<sub>2</sub>O.
4. Tomar de 50-100 µl de muestra, agregar 200 µl del reactivo de Bradford y llevar a un volumen de 1 ml con H<sub>2</sub>O.

5. Calibrar el espectrofotómetro con la muestra blanco.
6. Inmediatamente leer al espectrofotómetro a una D.O<sub>595</sub>.

### ANEXO 13. ENSAYO ENZIMÁTICO

- La reacción se inicia mediante la adición de 33.3 nM [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]-GTP, la mezcla de reacción se incuba a 30°C, se toman alícuotas en los tiempos 30, 60, 90, 120 min.
- A las alícuotas se les agrega un volumen de 5  $\mu$ l de 0.5 M EDTA para detener la reacción, seguido se desnaturalizan por 15 min a 95°C, y se separan por centrifugación a 16,000 X g durante 2 min.
- El sobrenadante se filtra a través de un filtro de 0,22-micras de tamaño del poro y se analiza.(Solo para el HPLC).