

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**



TESIS

**EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
PROTEÍNAS QUIMÉRICAS DE LA PROTEÍNA SENSORIAL RsbP
DE *Bacillus subtilis* Y LA ENZIMA DIGUANILATO CICLASA**

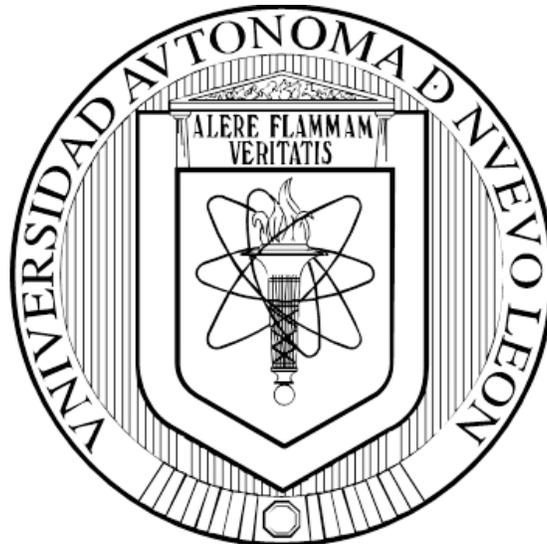
POR

QFB. CLAUDIA JEANNETTE BARAHONA MUNGUÍA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
EN MICROBIOLOGÍA APLICADA**

JUNIO, 2016

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



TESIS

**EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE
PROTEÍNAS QUIMÉRICAS DE LA PROTEÍNA SENSORIAL RsbP
DE *Bacillus subtilis* Y LA ENZIMA DIGUANILATO CICLASA**

POR

QFB. CLAUDIA JEANNETTE BARAHONA MUNGUÍA

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN
EN MICROBIOLOGÍA APLICADA**

JUNIO, 2016

**EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS
QUIMÉRICAS DE LA PROTEÍNA SENSORIAL RSBP DE**

***Bacillus subtilis* Y LA ENZIMA**

DIGUANILATO CICLASA

Aprobación de tesis:

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos

Presidente

Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño

Secretario

Dra. María Elena Cantú Cárdenas

Vocal

**EXPRESIÓN, PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS
QUIMÉRICAS DE LA PROTEÍNA SENSORIAL RSBP DE *Bacillus subtilis* Y LA
ENZIMA DIGUANILATO CICLASA**

Revisión de tesis:

Dr. Xristo Zárate Kalfópulos

ASESOR

Dra. María Elena Cantú Cárdenas

COMITÉ TUTORIAL

Dr. Jesús Alberto Gómez Treviño

COMITÉ TUTORIAL

Dr. José Rubén Morones Ramírez

COMITÉ TUTORIAL

Dra. María Aracely Hernández Ramírez

**SUBDIRECTORA DE ESTUDIOS DE
POSGRADO**

San Nicolás de los Garza, N.L., Junio 2016

TABLA DE CONTENIDO

	Página
NOMENCLATURA	1
RESUMEN	3
AGRADECIMIENTOS	6
DEDICATORIA.....	7
Capítulo	Página
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 Sistemas de transducción de señales	8
1.2 Dominios PAS.....	9
1.3 Estructura de los Dominios PAS	13
1.4 Transducción de señales por los Dominios PAS	16
1.5 Adaptación y supervivencia celular	17
2. ANTECEDENTES	20
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	29
3.1 Hipótesis	29
3.2 Objetivo general.....	29
3.3 Objetivos específicos.....	29
4. METODOLOGÍA DE TRABAJO.....	30
4.1 Material, equipo y su ubicación	30
4.2 Parte experimental.....	31
4.3 Diseño de quimeras.....	32
4.4 Extracción de ADN	36
4.4.1 ADN genómico de <i>Bacillus subtilis</i>	36
4.4.2 ADN plasmídico para las quimeras 2 y 3	36
4.4.3 Amplificación del ADN genómico	36
4.4.4 Electroforesis en gel de agarosa.....	38

4.4.5 Purificación en gel	38
4.5 Construcción de plásmidos	39
4.5.1 Quimera 1: pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASalt	40
4.5.1.1 Digestión y desalinización del vector y RsbP-PAS	41
4.5.1.2 Ligación de pGEX-4T-2 y RsbP-PAS.....	43
4.5.1.3 Transformación de pGEX-4T-2_RsbP-PAS en <i>E. coli</i> DH5 α y obtención de ADN plasmídico	44
4.5.1.4 Análisis de restricción para los transformantes de pGEX-4T-2 y RsbP-PAS.....	46
4.5.1.5 Digestión y desalinización de pGEX-4T-2_RsbP-PAS y PASa	48
4.5.1.6 Ligación de pGEX-4T-2_RsbP-PAS y PASalt.....	50
4.5.1.7 Transformación en <i>E. coli</i> DH5 α y obtención de ADN plasmídico	50
4.5.1.8 Análisis de restricción para los transformantes.....	51
4.5.2 Quimera 2: pGEX-4T-2_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF	52
4.5.2.1 Resuspensión de liofilizado pUC57-RsbP-PAS_Bucle_GGDEF	52
4.5.2.2 Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α para pUC57_RsbP-PAS_bucle_GGDEF y obtención de ADN plasmídico.....	52
4.5.2.3 Digestión y purificación en gel para pGEX-4T-2 y RsbP-PAS_Bucle_GGDEF.....	53
4.5.2.4 Ligación de pGEX-4T-2 y RsbP-PAS_Bucle_GGDEF	55
4.5.2.5 Transformación en <i>E. coli</i> DH5 α para pGEX-4T-2_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF y obtención de ADN plasmídico	55
4.5.2.6 Análisis de restricción para la quimera 2.....	55
4.5.3 Quimera 3: pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF	57
4.5.3.1 Resuspensión de liofilizado pUC57-RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF	57
4.5.3.2 Transformación de <i>E. coli</i> DH5 α para pUC57_RsbP-PAS_PASa_bucle_GGDEF y obtención de ADN plasmídico	57
4.5.3.3 Digestión y purificación en gel para pGEX-4T-2 y RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF	57
4.5.3.4 Ligación de pGEX-4T-2 y RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF	58
4.5.3.5 Transformación en <i>E. coli</i> DH5 α para pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF y obtención de ADN plasmídico	59

4.5.3.6 Análisis de restricción para pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF	59
4.6 Expresión de proteínas	60
4.6.1 Transformación de células <i>E. coli</i> BL21 (DE3)	60
4.6.2 Expresión piloto	60
4.6.3 Evaluación de la expresión de proteínas por SDS-PAGE	61
4.6.4 Análisis de secuenciación para las 3 quimeras	62
4.6.5 Expresión a gran escala	63
4.6.6 Lisis celular y obtención del clarificado	64
4.7 Purificación de proteínas	65
4.7.1 Cromatografía por afinidad y análisis de las fracciones colectadas	65
4.7.2 Cuantificación de proteína por método de Bradford	67
4.7.3 Diálisis	68
4.7.4 Ruptura de la unión proteína de fusión/proteína de interés	68
4.7.5 Remoción de la proteína de fusión.....	69
4.7.6 Diálisis	70
4.7.7 Cuantificación de proteína.....	70
4.8 Determinación de estructura cuaternaria	70
5. RESULTADOS	72
5.1 Diseño de las quimeras.....	72
5.1.1 Quimera 1: RsbP-PAS_PASa	72
5.1.2 Quimera 2: RsbP-PAS_Bucle_GGDEF	73
5.1.3 Quimera 3: RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF	74
5.2 ADN genómico	76
5.2.1 Amplificación del ADN genómico para RsbP-PAS y PASa	76
5.3 Construcción de plásmidos	76
5.3.1 Quimera 1: RsbP-PAS_PASa	76
5.3.1.1 Conteo de colonias transformantes.....	76
5.3.1.2 Obtención de ADN plasmídico para pGEX-4T-2_RsbP-PAS ..	77
5.3.1.3 Análisis de restricción de los transformantes para pGEX-4T-2_RsbP-PAS.....	77

5.3.1.4 Transformación en cepa de <i>E. coli</i> DH5α para pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASa	77
5.3.1.5 Obtención de ADN plasmídico para la quimera 1	78
5.3.1.6 Análisis de restricción para la quimera 1	78
5.3.2 Quimera 2: pGEX-4T-2_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF	79
5.3.2.1 Digestión de pGEX-4T-2 y pUC57_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF	79
5.3.2.2 Análisis de restricción para pGEX-4T-2_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF	80
5.3.3 Quimera 3: pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF	81
5.3.3.1 Digestión de pGEX-4T-2 y pUC57_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF	81
5.3.3.2 Análisis de restricción para pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF	82
5.4 Análisis de secuenciación	83
5.4.1 Quimera 1: pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASa	83
5.4.2 Quimera 2: pGEX-4T-2_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF	85
5.4.3 Quimera 3: pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF	88
5.5 Expresión piloto de proteínas	91
5.5.1 Quimera 1: pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASa	91
5.5.2 Quimera 2: pGEX-4T-2_RsbP-PASBucle_GGDEF	92
5.5.3 Quimera 3: pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF	93
5.6 Purificación de proteínas	94
5.6.1 Cromatografía por afinidad para la quimera 1	94
5.6.2 Cromatografía por afinidad para la quimera 2	95
5.5.3 Cromatografía por afinidad para la quimera 3	96
5.7 Análisis de las fracciones colectadas por cromatografía de afinidad	97
5.7.1 Análisis para las fracciones colectadas quimera 1	97
5.7.2 Análisis para las fracciones colectadas quimera 2	98
5.7.3 Análisis para las fracciones colectadas quimera 3	99
5.8 Ruptura de la unión proteína de fusión/proteína de interés.....	100
5.8.1 Ruptura GST_Proteína de interés quimera 1	100
5.8.2 Ruptura GST_Proteína de interés quimera 2.....	101

5.8.3 Ruptura GST_Proteína de interés quimera 3.....	102
5.9 Remoción de la proteína de fusión por medio de cromatografía por afinidad.....	103
5.9.1 Análisis de las fracciones colectadas para la quimera 1.....	103
5.9.2 Análisis de las fracciones colectadas para la quimera 2.....	104
5.9.3 Análisis de las fracciones colectadas para la quimera 3.....	106
5.10 Cuantificación de proteína pura por método de Bradford.....	107
5.10.1 Quimera 1: _RsbP-PAS_PASa.....	107
5.10.2 Quimera 2: RsbP-PAS_Bucle_GGDEF.....	108
5.10.3 Quimera 3: RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF.....	109
5.11 Determinación de estructura cuaternaria por medio de SEC.....	110
5.11.1 Quimera 1: RsbP-PAS_PASa.....	110
5.11.1.1 SEC para el azul dextran y estándares de bajo peso molecular.....	110
5.11.1.2 SEC para las muestras de la Quimera 1.....	112
5.11.1.3 Análisis por SDS-PAGE para las fracciones colectadas durante SEC.....	113
5.11.1.4 Determinación del estado oligomérico para la Quimera 1.....	116
5.11.2 Quimera 2: RsbP-PAS_Bucle_GGDEF.....	117
5.11.2.1 SEC para el azul dextran y estándares de bajo peso molecular.....	117
5.11.2.2 SEC para las muestras de la Quimera 2.....	119
5.11.2.3 Análisis por SDS-PAGE para las fracciones colectadas durante SEC.....	120
5.11.2.4 Determinación del estado oligomérico para la Quimera 2.....	123
5.11.3 Quimera 3: RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF.....	124
5.11.3.1 SEC para el azul dextran y estándares de bajo peso molecular.....	124
5.11.3.2 SEC para las muestras de la Quimera 3.....	126
5.11.3.3 Análisis por SDS-PAGE para las fracciones colectadas durante SEC.....	128
5.11.3.4 Determinación del estado oligomérico para la Quimera 3.....	131
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	132
7. CONCLUSIONES.....	138

8. PERSPECTIVAS.....	141
9. SEGURIDAD EN EL TRABAJO Y DISPOSICIÓN DE RESIDUOS	142
10. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	148

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Distribución de los dominios PAS en el árbol filogenético	11
2. Proteínas reguladoras con dominios GGDEF, PAS y EAL.....	28
3 Volúmenes utilizados para los componentes de la PCR	37
4 Condiciones para la PCR.....	37
5 Volúmenes de reacción para la digestión del vector (pGEX-4T-2)	41
6 Volúmenes de reacción para la digestión del inserto (RsbP-PAS)	42
7 Volúmenes de reacción para la digestión (Análisis de restricción RsbP-PAS)	47
8 Volúmenes de reacción para la digestión (pGEX-4T-2_RsbP-PAS).....	48
9 Volúmenes de reacción para la digestión (PASa)	49
10 Volúmenes de reacción para la digestión (Análisis de restricción Q1).....	51
11. Volúmenes de reacción para la digestión (pUC57_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF)	54
12 Volúmenes de reacción para la digestión (Análisis de restricción Q2).....	56
13. Volúmenes de reacción para la digestión (pUC57_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF).....	58
14 Volúmenes de reacción para la digestión (Análisis de restricción Q3).....	60
15. Disposición de los residuos generados	143

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Estructura característica de los dominios PAS	12
2. Representación gráfica de las proteínas a expresar y purificar.....	19
3. Proteínas homólogas a RsbP	22
4. Funciones controladas por el di-GMPc.....	26
5. Relación de dominios homólogos a RsbP-PAS.....	32
6. Alineación de proteínas.....	34
7. Secuencias conservadas reportadas en la base de datos ncbi	35
8. Mapa del vector de fusión pGEX-4T-2.....	40
9. Amplificación de las secuencias de interés	76
10. Gel de agarosa para RsbP-PAS	77
11. Análisis de restricción para Q1	79
12. Gel de agarosa para RsbP-PAS_Bucle_GGDEF	80
13. Análisis de restricción para RsbP-PAS_Bucle_GGDEF	81

14. Gel de agarosa para digestión del vector y Q2	82
15. Análisis de restricción para Q2	83
16. Análisis de secuenciación para Q1	85
17. Análisis de secuenciación para Q2.....	87
18. Análisis de secuenciación para Q3.....	90
19. SDS-PAGE (Expresión piloto) para Q1	91
20. SDS-PAGE (Expresión piloto) para Q2	92
21. SDS-PAGE (Expresión piloto) para Q3	93
22. Cargado de muestra – Cromatografía por afinidad para Q1	94
23. Elución de muestra – Cromatografía por afinidad para Q1	94
24. Cargado de muestra – Cromatografía por afinidad para Q2	95
25. Elución de muestra – Cromatografía por afinidad para Q2	95
26. Cargado de muestra – Cromatografía por afinidad para Q3	96
27. Elución de muestra – Cromatografía por afinidad para Q3	96
28. Análisis de fracciones para Q1	97
29. Análisis de fracciones para Q2	98
30. Análisis de fracciones para Q3	99
31. SDS-PAGE para distintos tiempos de incubación con trombina para Q1	100

32. SDS-PAGE para distintos tiempos de incubación con trombina para Q2	101
33. SDS-PAGE para distintos tiempos de incubación con trombina para Q3	102
34. SDS-PAGE para la segunda cromatografía por afinidad para Q1	103
35. SDS-PAGE para la segunda cromatografía por afinidad para Q2	104
36. SDS-PAGE para la tercera cromatografía por afinidad para Q2	105
37. SDS-PAGE para la segunda cromatografía por afinidad para Q3	106
38. Cromatograma por SEC azul dextran y estándares de bajo PM para Q1	110
39. Cromatograma por SEC para las muestras de Q1	113
40. SDS-PAGE para fracciones colectadas por SEC para Q1	114
41. Cromatograma por SEC integrado para las muestras de Q1	115
42. Cromatograma por SEC azul dextran y estándares de bajo PM para Q2	117
43. Cromatograma por SEC para las muestras de Q2	120
44. SDS-PAGE para fracciones colectadas por SEC para Q2	121
45. Cromatograma por SEC integrado para las muestras de Q2	122
46. Cromatograma por SEC azul dextran y estándares de bajo PM para Q3	124
47. Cromatograma por SEC para las muestras de Q3	127
48. SDS-PAGE para fracciones colectadas por SEC para Q3	129
49. Cromatograma por SEC integrado para las muestras de Q3	130

NOMENCLATURA

°C	Grado Celsius
μL	Microlitros
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARNT	Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin Tri Fosfato
BL21(DE3)	Cepa <i>E. coli</i>
BSA	Albúmina de Suero Bovino
Bucle	Bule enrollado de <i>Bacillus sp.</i> B14905
CO	Monóxido de carbono
DGC	Diguanilato ciclasas
DH5α	Cepa <i>E. coli</i>
di-GMPc	Ácido-3,5-diguanisín monofosfato cíclico
dNTP's	Desoxirribonucleótidos
DTT	Ditiotreitol
EAL	Fosfodiesterasa
FAD	Flavín Adenin Di nucleótido
FMN	Flavín Mono Nucleótido
GGDEF	Diguanilato ciclasa de <i>Bacillus sp.</i> B14905
GST	Glutación-S-Transferasa (Proteína de fusión)
HK	Histidina quinasa
Hr	Hora
IPTG	Isopropil-B-D-tiogalactopiranosido
kDa	Kilodaltones
LB/Amp	Caldo Luria Bertani con ampicilina
LOV	Luz-Oxígeno-Voltaje (Subgrupo de la familia PAS)
mAu	Miliunidades de absorbancia
mg	Miligramos

min	Minutos
mL	Millilitros
Mm	Milimolar
Ng	Nanogramos
nm	Nanometros
NO	Monóxido de nitrógeno
PAS	Per-ARNT-Sim
PASa	Dominio PAS alternativo no homologado a RsbP-PAS de PhyA del fitocromo A
PASalt	Dominio PAS alternativo no homologado a RsbP-PAS de PhyA del fitocromo A
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Per	Period Circadian Protein
pGEX-4T-2	Vector de expresión que contiene la secuencia que codifica para GST.
pmoles	Picomoles
PPM	Fosfatasa
PSI-BLAST	Position Specific Iterative Basic Local Alignment Search Tool (Herramienta para la búsqueda de similitud de secuencias)
Q1	Quimera 1: RsbP-PAS_PASalternativo
Q2	Quimera 2: RsbP-PAS_Bucle_GGDEF
Q3	Quimera 3: RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF
RPM	Revoluciones por minuto
RsbP	Regulador de σ^B conectado con fosfatasa
RsbP-PAS	Dominio PAS de RsbP de <i>Bacillus subtilis</i> (cepa 168)
S	Segundos
SAP	Shrimp Alkaline Phosphatase
sGC	Proteína Guanilato ciclasa soluble
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SEC	Cromatografía de exclusión por tamaño o Cromatografía de filtración en gel
Sim	Single-Minded Protein
TAE	Tris-ácido acético-EDTA

RESUMEN

Claudia Jeannette Barahona Munguía

Fecha de Graduación: Junio, 2016

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Químicas

Título del Estudio: Expresión, purificación y caracterización de proteínas quiméricas de la proteína sensorial RsbP de *Bacillus subtilis* y la enzima diguanilato ciclasa

Número de páginas: 167

**Candidato para el grado de Maestría
en Ciencias con Orientación en
Microbiología Aplicada**

Área de Estudio: Microbiología

Propósito y Método del Estudio: Los dominios Per-ARNT-Sim (PAS) son módulos sensoriales y de interacción versátiles en la transducción de señales que les permiten a los organismos adaptarse a cambios en su ambiente externo.

Nuestra hipótesis es que el dominio PAS de RsbP de *Bacillus subtilis* forma estructuras cuaternarias definidas con el dominio de respuesta diguanilato ciclasa, en presencia de un bucle enrollado o de un dominio PAS alternativo. Nuestro objetivo es determinar la estructura cuaternaria por medio de cromatografía de filtración en gel de proteínas quiméricas que contengan diferentes combinaciones de RsbP-PAS, diguanilato ciclasa y diferentes estructuras de unión entre ambos dominios.

Contribuciones y Conclusiones: En el presente estudio se logró el diseño, expresión y purificación de tres proteínas quiméricas con diferente combinación del dominio sensorial PAS de RsbP de *B. subtilis* (RsbP-PAS) y el dominio de respuesta diguanilato ciclasa, también se modificó el tipo de unión entre los dominios: bucle enrollado por un dominio PAS completo y distinto a RsbP-PAS, verificando así la contribución del bucle o del dominio PAS a la estructura cuaternaria.

Las proteínas quiméricas fueron clonadas y expresadas en el vector pGEX-4T-2 que contiene la secuencia que codifica para la proteína de fusión glutatión S-transferasa (GST), esto facilitó las etapas de purificación mediante cromatografía por afinidad y finalmente se determinó su estructura cuaternaria por medio de cromatografía de exclusión por tamaño.

Los resultados obtenidos indican que la quimera 1: RsbP-PAS asociado a un dominio PAS alternativo, mostro una proteína de entre 31-34 kDa, consistente con monómero. La quimera 2: RsbP-PAS, el bucle enrollado de *Bacillus subtilis* y el dominio de respuesta GGDEF, mostró una proteína de entre 74-76 kDa lo que indica la formación de un dímero. La quimera 3: RsbP-PAS, un dominio PAS alternativo, el bucle enrollado de

Bacillus subtilis y el dominio GGDEF, muestra una proteína de entre 46-47 kDa consistente con la formación de un monómero.

Los resultados obtenidos nos muestran como los dominios PAS pueden presentar diferentes estructuras cuaternarias como lo establecimos en nuestra hipótesis, estos cambios en las proteínas oligoméricas originados en un dominio PAS se pueden propagar a través de la interface entre el dominio PAS y el dominio de respuesta permitiendo la interacción entre los dominios.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Facultad de Ciencias Químicas y CONACYT por el apoyo económico, a la división de estudios de posgrado por permitirme hacer uso de los laboratorios para la elaboración y desarrollo de este proyecto. A la Universidad de Arizona por recibirme durante mi período de estancia.

Quiero expresar mi agradecimiento a Dios quien ha sido mi mayor fortaleza por permitirme dar un paso más en mi carrera profesional.

Agradezco infinitamente a mi asesor y amigo el Dr. Xristo Zárate por haber confiado en mí y permitirme ser parte de su equipo, por impulsarme a seguir adelante y por abrir puertas y oportunidades para mí.

A los miembros de mi comité tutorial Dra. María Elena Cantú, Dr. Alberto Gómez y Dr. Rubén Morones gracias por el tiempo que continuamente me dedicaron, por sus sugerencias, identificar mis áreas de oportunidad y darme palabras de aliento.

A cada uno de ustedes con quien compartí momentos inolvidables en el laboratorio y fuera del laboratorio, ustedes que se convirtieron en parte de mi familia Jessi, mi hermana PAS sin vos no lo hubiera logrado, no tengo palabras suficientes para agradecer lo mucho que me ayudaste emocional e intelectualmente, Tere, Isaac, Kike gracias por compartir su tiempo y conocimiento conmigo, Kevin, Huberto y Alex por las actividades extracurriculares que compartieron conmigo. A cada uno de ustedes solo puedo decirles Gracias!!

Quiero agradecer a la Dra. Megan, Trissiani y Kayla por recibirme en la Universidad de Arizona, gracias por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, por recibirme como parte de su equipo y por brindarme su guía y amistad.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia.

Dad, Mom, Bro, Sis, Bodos,

Tío Toño y tía Jeannette

Es gracias a su amor, apoyo y consejos que he llegado al fin de esta etapa en mi formación académica, son ustedes quienes me inculcaron el deseo de seguir mejorando, de seguirme preparando y poner lo mejor de mí en cada etapa. Fueron sus palabras que me mantuvieron firme y fue su confianza la que me motivo y me sigue motivando a seguir adelante.

Family, gracias por siempre estar ahí para mí a pesar de la distancia,

Gracias por siempre creer en mí.

Les amo mucho

Con cariño Lili

CAPÍTULO 1

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Sistemas de transducción de señales

Los organismos tienen sistemas de transducción de señales que les permiten ajustar su comportamiento interno a circunstancias cambiantes en su ambiente externo. Estos sistemas constan de proteínas que poseen estructuras modulares, es decir, contienen dominios sensoriales y dominios de respuesta [1]. Entre estos dominios ocurren interacciones que controlan el flujo de la información obtenida a partir de señales ambientales y la comunican a otras proteínas en una cascada de reacciones bioquímicas generando así una respuesta intracelular [1,2].

Los sistemas de transducción de señales pueden ser visualizados como redes consistentes de múltiples dominios, sensores-transducción que se ensamblan en varias combinaciones con muy pocas restricciones [2]. Los sistemas de señalización incluyen diferentes proteínas sensoriales que se encuentran asociados a un dominio de respuesta y frecuentemente regulan la expresión genética diferencial. Los dominios sensores al monitorear cambios ambientales o intracelulares, transfieren la señal detectada al dominio de salida, lo que genera una variedad de respuestas, incluyendo cambios en la expresión de los genes o niveles de segundos mensajeros y modificación covalente de las proteínas [2].

1.2 Dominios PAS

El análisis de secuencias de reguladores de respuesta codificados por los genomas de bacterias y arqueas ha revelado una arquitectura compleja de los dominios de las proteínas codificadas, algunas de estas proteínas sensoriales contienen dominios PAS. Los dominios PAS, actúan como módulos sensoriales y de interacción versátiles en la transducción de señales [1,2].

Los dominios PAS se encuentran localizados en el citoplasma lo que sugiere que responden a estímulos intracelulares. En proteínas unidas a membranas se han encontrado adyacentes a las regiones transmembranales por lo tanto, es posible que interactúen con dominios de otras proteínas de membrana asociadas respondiendo a cambios en el exterior de la célula [3].

Los dominios PAS son módulos importantes de señalización que pueden detectar estímulos físicos o químicos como cambios de luz, potencial redox, concentraciones de oxígeno, unión de pequeños ligandos o cambios en los niveles energéticos de la célula [3, 21, 22].

Diversos dominios de respuesta son regulados por los dominios PAS. Estos incluyen histidina quinasas, serina/treonina quinasas, fosfodiesterasas, diguanilato ciclasas, factores de transcripción, canales iónicos y proteínas quimio tácticas y se encuentran combinados con una gran variedad de módulos regulatorios en proteínas multidominios. Como resultado, controlan un amplio espectro de respuestas celulares a cambios ambientales y condiciones intracelulares [4, 28, 38].

Entre las respuestas que se conocen que son mediadas por estos dominios esta la fijación de nitrógeno en rhizobia, procesos de fototropismo en plantas, comportamiento del ciclo circadiano en insectos, apertura o cierre de los canales iónicos en vertebrados, regulación de la respuesta a hipoxia y desarrollo embriológico en el sistema nervioso central [4, 6, 7].

También tienen importancia en el ámbito médico como en el caso de la proteína sGC (Guanilato ciclasa soluble) que contiene en su estructura un dominio PAS asociado a la unión de NO (monóxido de nitrógeno) en enfermedades cardíacas [9]. El factor inducible a hipoxia también contiene un dominio PAS y se encuentra involucrado en procesos de hipoxia en el miocardio, isquemia cerebral y en hipoxia tumoral [13]. Análisis de secuencias de amino ácidos indican que alrededor de 43 proteínas contienen dominios PAS en el genoma humano [13].

El término PAS deriva de la primera letra del nombre de tres de las proteínas en las cuales inicialmente fueron identificados, estas son: Per – period circadian protein, ARNT- Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator protein y Sim – single-minded protein. Estos dominios comprenden entre 100 y 120 aminoácidos y se han encontrado distribuidos en proteínas en los 3 reinos de la vida *Bacteria*, *Archaea*, y *Eucarya* [10, 13].

En la tabla 1 se muestra la amplia distribución de los dominios PAS en el árbol filogenético, se muestran algunas proteínas en las cuales se encuentra como su función asociada [3].

Tabla 1. Distribución de los dominios PAS en el árbol filogenético, con sus correspondientes proteínas y funciones.

A la izquierda se muestra la especie, en la segunda columna la proteína y en la tercera columna la función asociada. Modificado de Galperin MY, 2006 [3].

	Proteína	Función asociada
Bacteria		
<i>Sinorhizobium meliloti</i>	FixL	Regulador de la fijación de nitrógeno dependiente de oxígeno
<i>Azorhizobium japonicum</i>	NtrY	Control de los niveles de nitrógeno
<i>Azospirillum brasilense</i>	NtrB	Control de la asimilación de nitrógeno
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	McpA	Transductor en quimiotaxis
<i>Bordetella bronchiseptica</i>	BvgS	Control de virulencia
<i>Escherichia coli</i>	ArcB	Regulador del metabolismo aeróbico dependiente redox
<i>Escherichia coli</i>	PhoR	Control del regulon de fosfato
<i>Pseudomonas putida</i>	TodS	Control de la degradación de tolueno
<i>Azotobacter vinelandii</i>	NifL	Regulación de la fijación de nitrógeno
<i>Bacillus subtilis</i>	KinA	Control de la esporulación
Archae		
<i>Halobacterium salinarum</i>	Bat	Activador bacterio-opsin dependiente de oxígeno
<i>Archaeoglobus fulgidis</i>	AF1034	Transductor en quimiotaxis
Eucarya		
<i>Dictyostelium discoideum</i>	DokA	Control de la respuesta osmótica
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	YB89	Regulador transcripcional
<i>Neurospora crassa</i>	Wc-1	Regulador de la transcripción en respuesta a luz azul
<i>Arabidopsis thaliana</i>	PhyB	Foto transductor del fitocromo
<i>Arabidopsis thaliana</i>	NPH1	Control de procesos de fototropismo
<i>Drosophila melanogaster</i>	EAG	Subunidad del canal de potasio sensible al voltaje
<i>Homo sapiens</i>	h-ERG	Subunidad del canal de potasio sensible al voltaje
<i>Homo sapiens</i>	HIF-1 α	Factor inducible de hipoxia

Los dominios PAS así como otros dominios conservados que se conocen, típicamente forman grandes súper familias proteicas que comparten una estructura tridimensional,

pero a diferencia de otras familias proteicas varía mucho con respecto a su secuencia de aminoácidos y propiedades funcionales.

Las familias proteicas clásicas tienen un sitio activo en común y por lo tanto contienen residuos conservados en el sitio activo, sin embargo, los dominios PAS muestran un alto grado de variación [13] pero comparten una estructura única que se compone por cinco láminas β antiparalelas denotadas $A\beta$, $B\beta$, $G\beta$, $H\beta$ e $I\beta$ flanqueadas por varias α -hélices denotadas $C\alpha$, $D\alpha$, $E\alpha$ y $F\alpha$ como se muestra en la figura 1, [4].

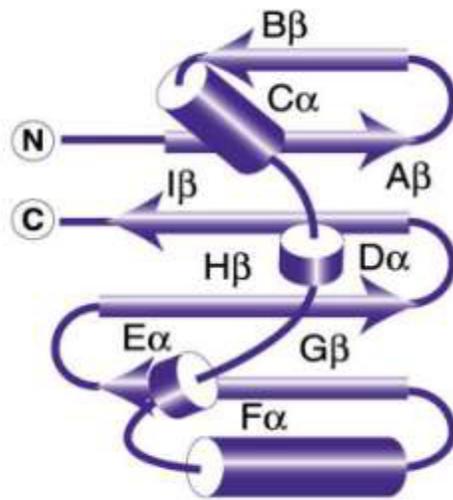


Figura 1 Estructura característica de los dominios PAS, el cual consiste en cinco láminas β antiparalelas flanqueadas por varias hélices alfa [4].

El mecanismo de señalización de los dominios PAS se cree que es natural e inherentemente termodinámico. La presencia de la señal altera ya sea la afinidad intramolecular de una parte de la proteína o dominio a través de un cambio en la dinámica o estructura terciaria; o bien podría alterar la afinidad intermolecular de una proteína o dominio por otra proteína o dominio a través de un cambio en su estructura cuaternaria, o podrían presentarse ambos cambios [4].

Estudios previos han sugerido que el evento de señalización se origina en un núcleo conservado (una lámina β central) que detecta la señal. Esta se transmite a través del

sitio de unión del ligando a la interface del dímero a través de la distorsión de la lámina β , a través de un bucle enrollado y hélices alfa anfipáticas en el extremo N-terminal del núcleo del dominio de respuesta que generalmente son dímeros que se encuentran unidos covalentemente. En respuesta se generan cambios estructurales en la estructura cuaternaria y cambios dinámicos predominantemente en las láminas beta. Pudiera ser que los cambios estructurales propicien la comunicación alostérica [15].

Los cambios en la estructura cuaternaria de los dominios PAS podrían propagarse a la región entre el dominio PAS y el efector y, finalmente, al dominio efector en sí. De esta forma los dominios sensor y efector no están obligados a interactuar estructuralmente entre sí, los cambios en la estructura cuaternaria inducida por la señal le permite a los dominios PAS interactuar y regular una amplia variedad de dominios efectores [15].

1.3 Estructura de los dominios PAS

La identificación de los dominios PAS es complicada por su bajo nivel relativo de secuencias homólogas, en promedio la similitud de secuencias identificada es menor al 20%, de modo que su identificación debe realizarse con base en su estructura característica.

-Láminas β

Estudios enfocados en el análisis estructural de los dominios PAS han revelado que la región más conservada es la estructura de las láminas β , en el núcleo del dominio. Se cree que esta lámina β es de gran importancia para interacciones intra e intermoleculares y que es muy versátil en su habilidad para acomodar homo y heterodímeros entre los monómeros de PAS [15, 16, 25].

-Hélices- α

Las hélices- α varían considerablemente en orientación, tamaño y número, son una región estructuralmente muy poco conservada, esto podría representar un elemento importante en la diversidad estructural entre distintos dominios PAS en una familia que se caracteriza por su similitud estructural. El rol característico de las hélices α , es predominantemente limitado a interacciones con cofactores unidos internamente o con las rutas utilizadas por estos cofactores para unirse a los dominios PAS. Algunas proteínas PAS se asocian así mismas por medio de bucles que se unen a las hélices α en la superficie, pero la relevancia funcional de estas interacciones aún permanecen en general desconocidas, algunos estudios sugieren que las hélices α podrían jugar un rol importante en mediar la regulación de la transcripción por algunas proteínas de la familia PAS [16].

-Interface/ ligando

Entre el dominio PAS y el dominio de respuesta se encuentra una región de aminoácidos que funciona como interface. En la mayoría de las proteínas que contienen dominios PAS asociados a dominios de respuesta tipo histidina quinasa, especialmente en aquellas de origen procariótico, el núcleo del dominio PAS se encuentra unido al núcleo del siguiente dominio por medio de ligandos cortos, usualmente entre 20 y 40 aminoácidos. Cuando estos ligandos han sido analizados se encuentra en ellos poca homología en su secuencia de aminoácidos. Sin embargo, el largo de los ligandos muestra una notable característica de hidrofobicidad en sus residuos y periodicidad en residuos que difieren entre ellos por múltiplos de 7 (Ej 7, 14 o 21), indicando que estos ligandos forman α -hélices anfipáticas y bucles enrollados [4].

Se extendió este análisis a dominios PAS unidos al extremo N-terminal de dominios diguanilato ciclasa (GGDEF), y se encontraron las mismas características de hidrofobicidad y residuos que difieren entre ellos por múltiplos de 7. En aproximadamente 85% de 2074 proteínas analizadas los ligandos entre los dominios PAS y GGDEF tenían un tamaño idéntico, lo que sugiere que los requerimientos estructurales para el ligando son más rigurosos en comparación a otros dominios. El otro 15% de las proteínas con dominios PAS y GGDEF tienen ligandos que se extienden por múltiplos de 7 residuos [4].

El mismo patrón de residuos con múltiplos de 7 se observó para ligandos entre dominios PAS en tándem. En el caso de dominios PAS unidos a otros dominios efectores los ligandos son más cortos o más largos por múltiplos de 3 o 4 amino ácidos que son consistentes con α -hélices como ligandos pero no necesariamente con bucles enrollados. Esto sugiere que los ligandos cortos estructuralmente adoptan la forma de α -hélices y en algunos casos forman bucles enrollados [4].

-Ncap

El Ncap, comprendida en la región flanqueante en el extremo N-terminal juega un rol crítico en la estabilización de los dímeros de PAS. También se ha sugerido que esta región es de importancia para establecer la estructura cuaternaria y función del dominio PAS [15].

-Dominio de respuesta

El dominio de respuesta al cual este asociado el dominio PAS dicta en gran manera el estado oligomérico de los dominios PAS por ejemplo, en la proteína completa *ecDOS* que contiene fosfodiesterasa y un dominio PAS que une un grupo heme como dominio

de respuesta predominantemente forman tetrámeros mientras que en el caso de PAS unidos al grupo heme solamente puede formar dímeros [15, 35, 37].

1.4 Transducción de la señal por los dominios PAS

Aún no se conoce con certeza cómo funciona el mecanismo de señalización de los dominios PAS. La señal puede ser propagada a través de los dominios PAS por medio de una combinación de cambios dinámicos y estructurales [4]. En algunos casos se ha encontrado que los dominios PAS interactúan con pequeños ligandos que desatan el proceso de señalización otras veces el cofactor es el mediador de la detección de la señal [4, 29]. Ligandos o cofactores internos como FAD, FMN o heme son requeridos en algunos casos para traducir fluctuaciones en potencial redox, energía lumínica o concentración de gas en una señal útil [1]. Sin embargo, para la mayoría no se han identificado cofactores específicos [4].

Se ha propuesto en investigaciones previas que el rol de los dominios PAS es de modular la afinidad de las proteínas por proteínas idénticas (homo-oligomerización) o por proteínas distintas (hetero-oligomerización). La oligomerización, promiscuidad estructural y la habilidad de los dominios PAS de homo o hetero-dimerizar provee especificidad y acomodo complejo en el espacio y regularización temporal en redes de señalización celular [10, 20, 36].

El mecanismo de transducción de señales en dominios PAS puede también aplicarse a un grupo más grande de proteínas de señalización modular. Los dominios PAS son capaces de regular la actividad de diferentes dominios efectores, en algunas proteínas naturales de señalización, diferentes dominios sensores tales como PAS, GAF o BLUF se han encontrado que regulan la actividad del mismo tipo de dominio efector como

histidina quinasa o diguanilato ciclasa. Estas observaciones implican que este tipo de dominios sensores son al menos en parte intercambiables y siguen los mismos mecanismos de señalización [4].

1.5 Adaptación y supervivencia celular

Responder a cambios en la concentración de oxígeno, luz, potencial redox o niveles energéticos representan ventajas conocidas para la célula, por ejemplo el oxígeno actúa como ambos aceptor final para el proceso de fosforilación oxidativa con un alto rendimiento de ATP y también como agente tóxico que produce radicales libres dañinos cuando son parcialmente reducidos. Responder a cambios de luz y a longitudes de onda controla respuestas celulares como el fototropismo en plantas y foto taxis en bacterias. Existe evidencia que la disminución de los niveles energéticos en las células impacta primero en una disminución del transporte de electrones y fuerza motriz de los protones que precede un cambio observable en la concentración de ATP. Monitorear estos cambios representa una ventaja para la célula porque la alerta rápidamente para su adaptación y supervivencia [3, 40].

Los dominios PAS se combinan con una gran variedad de módulos sensoriales en proteínas multidominios, un ejemplo de esto son las proteínas microbianas que contienen uno, dos o múltiples (hasta seis) dominios PAS. Como resultado, un amplio espectro de respuestas celulares a cambios ambientales y/o condiciones intracelulares se controla vía receptores que contienen estos dominios [5].

Una de las preguntas que se han investigado es, como pueden los dominios PAS con una estructura rígida definida comunicarse con dominios de respuesta estructuralmente diferentes. Existe un modelo general que explica esto basándose en cambios dinámicos

o cambios en la estructura cuaternaria de proteínas oligoméricas. Se propone que estos cambios son dirigidos en parte por las α -hélices o por el bucle enrollado que en general actúan como palancas para unir al dominio PAS con el dominio de respuesta. Lo atractivo de este modelo es que elimina la necesidad de cambios para adaptar un contacto terciario entre el dominio PAS y los diferentes dominios de respuesta que puede controlar [1].

Evidencia experimental que soporta este modelo viene de proteínas híbridas en las que se reemplaza un dominio PAS por otro uniéndolo a través del bucle enrollado, colocando exitosamente el dominio de respuesta bajo el control de un dominio sensorial diferente [1].

Estas observaciones sugieren que esta clase de dominios sensoriales son intercambiables y sus mecanismos de señalización tienen características comunes. Una vez entendiendo el mecanismo de acción de los dominios PAS puede ser posible el diseño de estructuras base de fotosensores y quimiosensores artificiales que se activen en presencia de un estímulo específico [4].

Con base en esta premisa, se propone en este proyecto la expresión, purificación y caracterización de tres proteínas quiméricas (Figura 2) con fines de obtener un mejor entendimiento del funcionamiento de los módulos sensoriales. Las proteínas quiméricas se diseñaron con diferente combinación de un solo dominio PAS (RsbP-PAS) y el dominio de respuesta diguanilato ciclasa (GGDEF). Determinando las variaciones en las estructuras cuaternarias se espera tener indicios del mecanismo de interacción, es decir, los cambios en la formación de estructuras oligoméricas debido a posibles interacciones de dominios distintos. También se cambió el tipo de unión entre los dominios: bucle

enrollado por un dominio PAS completo y distinto a RsbP-PAS, verificando así la contribución del bucle o del dominio PAS a la estructura cuaternaria.

Proteínas a expresar y purificar en este proyecto:

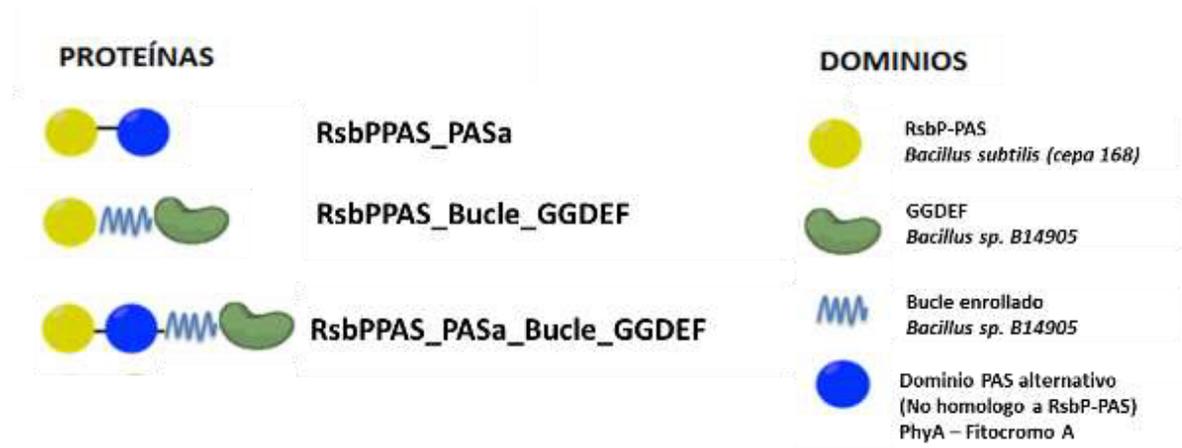


Figura 2. Representación gráfica de las proteínas a expresar y purificar en este proyecto para su estudio. A la izquierda se encuentran las proteínas quiméricas y a la derecha se muestran los distintos dominios de los que estarán compuestas y la bacteria de origen de cada uno de los dominios.

CAPÍTULO 2

2. ANTECEDENTES

En conjunto el conocimiento genético y herramientas bioinformáticas nos brindan información para un mejor entendimiento de los módulos sensoriales. Una de las herramientas bioinformáticas que más se ha utilizado es el PSI-BLAST (Position-Specific Iterative Basic Local Alignment Search Tool), ésta nos permite la búsqueda de similitud de secuencias de aminoácidos al compararlas con secuencias de proteínas de una base de datos [8].

Por medio del PSI-BLAST se ha realizado el análisis de diversas proteínas, entre ellas la proteína RsbP en *Bacillus subtilis* en la que se encontró, que esta proteína se compone de un dominio PAS en el extremo N-terminal (RsbP-PAS), una región central con capacidad de formar un bucle enrollado y una fosfatasa (PPM) en el extremo C-terminal [1].

Se ha demostrado que RsbP-PAS juega un papel importante en el control de la actividad de la fosfatasa que es necesaria para accionar el factor σ^B bajo condiciones de estrés [1]. Los factores sigma son las unidades de reconocimiento de la ARN polimerasa, por lo tanto el conjunto de genes que es expresado en la célula depende de ello [14, 19].

La actividad de σ^B está gobernada por una vía de transducción de señales con dos ramas distintas. Una rama es específica para estrés de energía, tales como carbono, fósforo, o la limitación de oxígeno, y la otra es específica para el estrés ambiental, como la

presencia de ácido, etanol, calor o estrés alcalino. RsbP interactúa con RsbQ una proteína con actividad hidrolasa α/β , y ambas forman un módulo sensorial que controla a *Bacillus subtilis* en respuesta a limitaciones de energía [7, 18].

Como en el caso de *Bacillus subtilis* en bacterias, RsbP-PAS generalmente se localiza en el extremo N-terminal y se asocia con diferentes dominios de respuesta por ejemplo fosfatasa (PPM) en bacterias Gram positivas, histidina quinasa (HK) en bacterias Gram negativas y diguanilato ciclasa (GGDEF) en ambos casos. Los dominios de respuesta previamente mencionados, son comunes durante el proceso de transducción de señales en bacterias controlando el comportamiento de las mismas para su adaptación y supervivencia [3].

Haciendo uso del PSI-BLAST se realizó una investigación para identificar proteínas homólogas a RsbP-PAS, en la Figura 3 se observan todas las proteínas homólogas identificadas [1]. Los dominios de respuesta se encuentran unidos covalentemente al dominio PAS con un bucle enrollado entre ellos o con uno o más dominios PAS distintos [1].

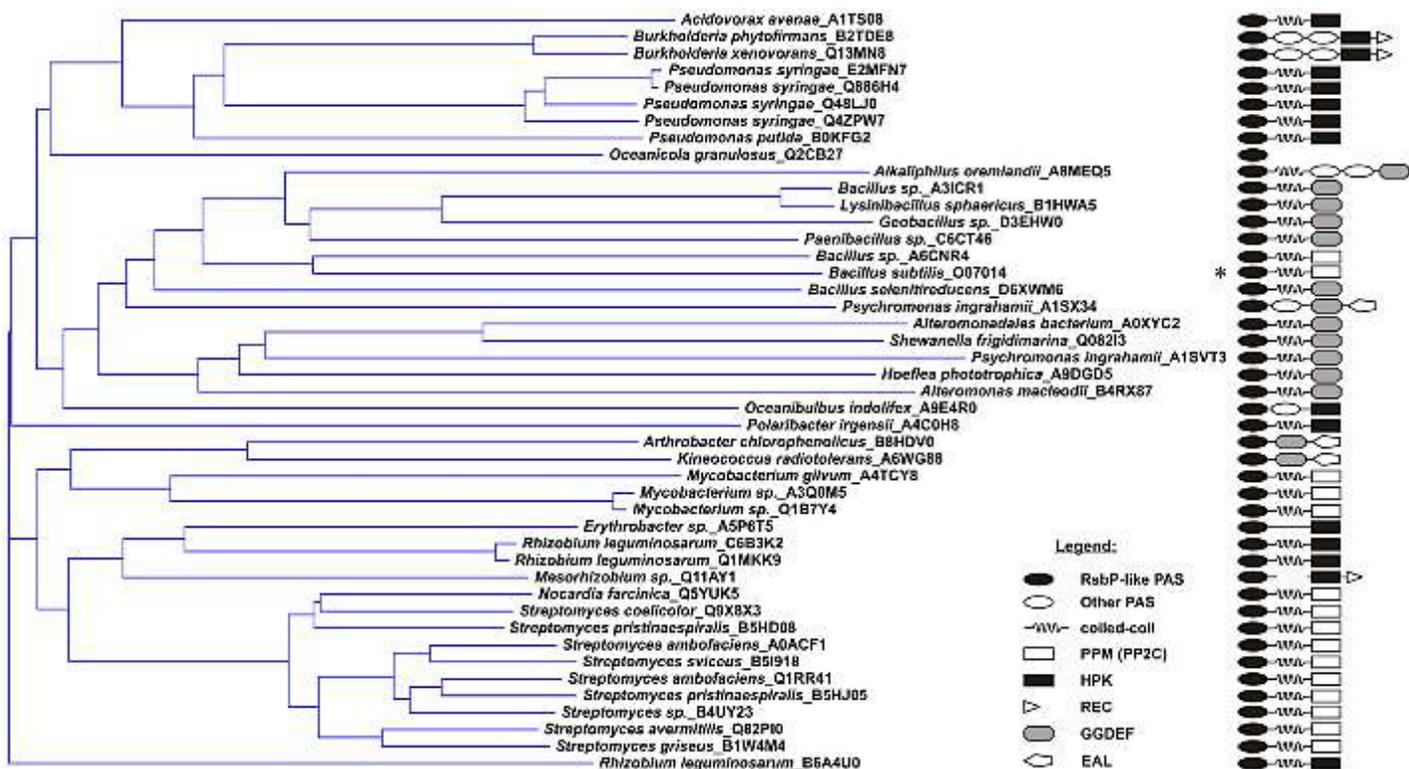


Figura 3 Representación de proteínas homólogas a RsbP. A la izquierda se muestran los géneros y especies de los microorganismos que expresan estas proteínas. A la derecha se muestran los dominios de respuesta que pueden ser activados por el dominio PAS [1].

Aún no se conoce con certeza cómo funciona el mecanismo de señalización de los dominios PAS, algunas investigaciones sugieren que las señales pudieran ser transmitidas a través de una combinación de cambios en la dinámica y en las estructuras terciaria y cuaternaria de las proteínas [4].

Evidencia para este mecanismo de señalización se observa en el dominio fotosensor LOV (Luz- Oxígeno- Voltaje) de YtvA que une Flavín mono nucleótido y regula a *Bacillus subtilis* en respuesta a luz azul. El dominio LOV, forma un subgrupo de la familia PAS y es un ejemplo en el cual cambios en la estructura cuaternaria permiten al dominio PAS regular la actividad del dominio efector [39].

Se observa en esta proteína un ligero pero significativo cambio en su estructura cuaternaria como resultado de la absorción de luz la cual provoca la formación de un enlace covalente entre una cisteína conservada y un átomo de carbono del anillo de FMN que como resultado desencadena una reorganización en el dominio LOV. Este cambio en la estructura cuaternaria es posiblemente un componente del mecanismo por el cual YtvA responde a la luz [15, 26, 31].

Otro ejemplo ampliamente estudiado es la proteína sensorial FixL, esta proteína es capaz de unir oxígeno y otras moléculas diatómicas como CO y óxido nítrico. En rhizobia y en bacterias es responsable de la fijación de nitrógeno, respiración anaeróbica y micro aeróbica y del metabolismo del hidrógeno bajo condiciones de hipoxia.

Estudios cristalográficos de las formas encendida (Sin ligando) y apagada (con ligando) del dominio heme-PAS de FixL en *Bradyrhizobium japonicum* (*bjFixLH*), *Sinorhizobium meliloti* (*smFixLH*) y del sensor directo de oxígeno en *Escherichia coli* (*ecDOSH*) han dado indicios del mecanismo de reconocimiento de la señal y la iniciación del sistema de transducción en los dominios heme-PAS.

Estos estudios sugieren que cambios en la estructura cuaternaria juegan un rol importante. *BjFixL* forma un homodímero y en la ausencia de oxígeno, se autofosforila a la altura de un residuo histidínico que es conservado en sensores tipo histidina quinasa. Este cambio en su estructura cuaternaria reordena relativamente a las subunidades de *bjFixLH* entre ellas para facilitar el proceso de autofosforilación [3, 15].

Muchas proteínas sensoriales con dominios PAS incluyendo FixL existen y funcionan como proteínas oligoméricas. Cambios en la estructura cuaternaria pueden permitir el

sentir y responder a una señal o estímulo, posiblemente mediando la comunicación alostérica [15].

Los cambios en la estructura cuaternaria originados en un dominio PAS pueden propagarse a través de la región de unión o interface entre el dominio PAS y el dominio efector y finalmente al dominio efector mismo. Estos cambios inducidos por una señal adecúan la habilidad de los dominios PAS para regular una gran variedad de dominios efectores [16].

Muchos sistemas de doble componente (sensor y efector) están siendo estudiados y debido a la variedad de respuestas mediadas por estos sistemas se les ha encontrado aplicaciones en diversas áreas.

En la actualidad, el género *Shewanella* ha ganado interés en el área de bioremediación ya que es capaz de descomponer materia orgánica, y de metabolizar manganeso y óxidos de hierro transfiriendo electrones a óxidos de metales sólidos. Es capaz de producir sulfuro a partir de tiosulfato. *Shewanella* es tan versátil que se ha extendido a otros metales aceptores de electrones como uranio, cromo, yodato, tecnecio, neptunio, plutonio, selenito, telurio, vanadato e incluso la reducción de compuestos nitro aromáticos.

Esta diversidad metabólica provee al género un potencial considerable para la bioremediación y por su habilidad para formar biopelículas en superficies minerales también tiene potencial para la producción de celdas de combustible microbianas. El análisis de secuencia del genoma de *Shewanella oneidensis* identificó un gen *pdeB* (proteína de biopelículas de fosfodiesterasa) que codifica para los dominios PAS,

GGDEF (diguanylate cyclase) y EAL (phosphodiesterase) y se cree que esta proteína multidominio está asociada a las características de biorremediación en este género [1, 30, 33].

Alkaliphilus oremlandii, es otro ejemplo de bacterias con potencial para la biorremediación de sitios contaminados. Es capaz de fermentar el glicerol, la fructosa y el lactato utilizando arsenato y tiosulfato como aceptores finales de electrones. Una vez más se cree que estas características podrían estar asociadas a la presencia de una proteína multidominio que se compone por un dominio PAS homólogo a RsbP-PAS, un bucle enrollado, dos dominios PAS no homólogos a RsbP y un dominio de respuesta diguanylate cyclase (GGDEF) [1, 11]

Para determinar el proceso por el cual los dominios PAS perciben y comunican las señales, es necesario identificar mecanismos comunes en las proteínas que poseen dominios PAS [3]. El reacomodo en la estructura del dominio PAS induce un cambio conformacional que se transmite a la superficie de una proteína, donde se propone que altera el sitio de interacción de la proteína [5].

El dominio de respuesta que estaremos utilizando para la creación de las quimeras es GGDEF, presente en la enzima diguanylate cyclase que cataliza la formación del di-GMP cíclico (di-GMPc). El complejo celulosa sintasa es activado de manera alostérica por el di-GMPc, una vez activado, el sistema sintetiza celulosa para los requerimientos bacterianos [2, 34].

En *Acetobacter xylinum*, el di-GMPc es el regulador nucleotídico específico de la β -1,4-glucan sintasa (celulosa). Se ha encontrado que las enzimas diguanylate cyclases (DGC),

catalizan su formación y su contraparte las fosfodiesterasas (PDEA) cataliza su degradación [4].

En general, el di-GMPc estimula la biosíntesis de adhesinas y exopolisacáridos, estructuras que forman la matriz de las biopelículas, e inhibe varias formas de motilidad en las bacterias, controlando la transición de la célula motil a sedentaria. Además, regula funciones asociadas a virulencia en patógenos de animales, humanos y plantas, la progresión del ciclo celular, la producción de antibióticos y otras funciones celulares [2, 12].

A continuación en la figura 4 se muestran las funciones controladas por el di-GMPc.

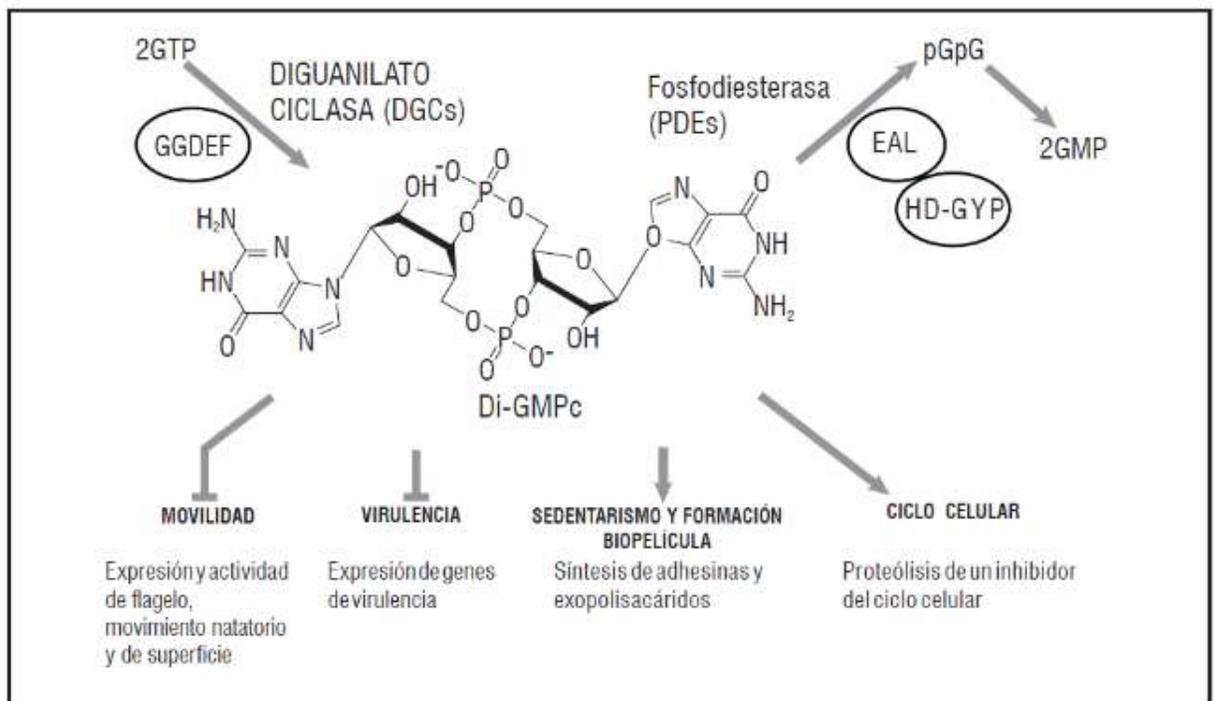


Figura 4 Funciones controladas por el di-GMPc A nivel celular, el di-GMPc es controlado por enzimas con actividad de diguanilato ciclasas DGCs con su motif característico GGDEF y fosfodiesterasas específicas con su motif característico EAL [2].

Una gran variedad de funciones son controladas por el di-GMPc, a nivel celular reduce la motilidad de la célula regulando la expresión de los genes (Ej. *Pseudomonas aeruginosa*) o el ensamblado de las proteínas que conforman la estructura del flagelo (Ej. *Caulobacter crescentus*), o bien interfiriendo con la función motora (Ej. *Escherichia coli*, *C. crescentus*). Una concentración reducida de di-GMPc es requerida para la expresión de genes de virulencia (Ej. *Vibrio cholerae*). Mientras que una elevada cantidad de di-GMPc estimula la producción de funciones asociadas a la producción de la biopelícula, por ejemplo: la síntesis de exopolisacáridos, fimbrias y otras adhesinas. En *C. crescentus* la cantidad de di-GMPc localizada es clave para la progresión del ciclo celular [2]

Los dominios diguanilato ciclasas (GGDEF), se encuentran ampliamente representados en proteínas de algunas bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* que codifica para 17 proteínas GGDEF, *Vibrio cholerae* codifica para 31 proteínas GGDEF y *Escherichia coli* que posee 29 proteínas con dominios GGDEF; mientras que está ausente en otras bacterias como *Helicobacter pylori*, *Mycoplasma pneumoniae* y *Haemophilus influenzae* [2].

Un aspecto que caracteriza a las proteínas diguanilato ciclasas (GGDEF) 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), los cuales unen una variedad de ligandos y pueden también detectar señales citoplasmáticas; se propone que la unión al ligando crea un cambio conformacional que afecta la transmisión de la señal al dominio C-terminal y en respuesta se ven afectadas su estructura y las reacciones enzimáticas [3]. A continuación en la tabla 2 se anotan algunos ejemplos de proteínas reguladoras que catalizan la síntesis e hidrólisis del di-GMPc [2].

Tabla 2 Proteínas reguladoras con dominios GGDEF, PAS y EAL Los dominios de las proteínas incluyen GGDEF y EAL; los dominios PAS; HTH (hélice-vuelta-hélice); TM, (dominio transmembranal); CheY (rec) dominio receptor de fosforilación.

Proteína	Bacteria	Organización de los dominios	Fenotipo asociado
DGC 1,2,3	<i>Gluconobacter xylinus</i>	PAS-GGDEF-EAL	Producción de celulosa
PDEA 1,2,3	<i>Gluconobacter xylinus</i>	PAS-GGDEF-EAL	Producción de celulosa
FIM X	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Chey-PAS-GGDEF-EAL	Motilidad contráctil
Vie A	<i>Vibrio cholerae</i>	Chey-EAL-HTH	Regulación de la producción de la toxina colérica y formación de biopelículas

En *Acetobacter xylinum*, bacteria productora de celulosa el di-GMPc actúa como un efector reversible y altamente específico de la celulosa sintasa, la concentración intracelular del di-GMPc se mantiene por acción opuesta entre las enzimas DGC que cataliza su formación a partir de dos moléculas de GTP, y una fosfodiesterasa A sensible a Ca^{+2} (PDEA), quien en conjunto con la fosfodiesterasa B (PDEB) catalizan su degradación a 5'-GMP [4].

En algunos reguladores de respuesta, los dominios efectores están desprovistos de una actividad enzimática “conocida” y ejercen sus efectos a través de interacciones proteína-proteína. Por ejemplo, los reguladores de respuesta en quimiotaxis. Mientras que en otros dominios como PAS y GAF la transducción de señales implica probablemente interacciones con otros dominios de la proteína, no la unión del ligando per se [3].

CAPITULO 3

3.1 Hipótesis

El dominio PAS de la proteína sensorial RsbP forma estructuras cuaternarias definidas con el dominio de respuesta diguanilato ciclasa, en presencia de un bucle enrollado o de un dominio PAS alternativo.

3.2 Objetivo general

Determinar la estructura cuaternaria de proteínas quiméricas que contengan RsbP-PAS, diguanilato ciclasa y diferentes estructuras de unión entre ambos dominios.

3.3 Objetivos específicos

1. Construir plásmidos para la expresión de las proteínas quiméricas en *Escherichia coli*.
2. Expresar a gran escala y purificar las proteínas por medio de cromatografía de afinidad.
3. Determinar la estructura cuaternaria de las proteínas quiméricas por medio de cromatografía de exclusión por tamaño.

CAPITULO 4

4. Metodología de trabajo

4.1 Material, equipo y su ubicación

Los equipos que se utilizaron para el desarrollo de la presente tesis se encuentran en el Laboratorio de Biotecnología 2, ubicado en la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL y se trabajó también en el departamento de Química y bioquímica en la Universidad de Arizona.

Construcción de plásmidos	de	Expresión y purificación de proteínas	Determinación de la estructura cuaternaria
<ul style="list-style-type: none"> ○ Campana de extracción ○ Microcentrífuga ○ Cámara de electroforesis vertical y horizontal ○ Fuentes de poder ○ Vortex ○ Fotodocumentador ○ Termociclador ○ Reactivos para PCR ○ Cepa DH5α de <i>Escherichia coli</i> 		<ul style="list-style-type: none"> ○ Cepas de expresión BL21 (DE3) ○ Inductor IPTG ○ Microcentrífuga ○ Incubadora con agitación ○ Campana de cultivo microbiano ○ Campana de bioseguridad nivel II ○ Espectrofotómetro UV-VIS ○ Planchas de agitación ○ Microscopios ○ Prensa francesa ○ Micromanipuladores ○ Unidades de enfriamiento ○ FPLC ○ Columna de sefrosa modificada con S-glutatin. 	<ul style="list-style-type: none"> ○ Cámaras de electroforesis vertical ○ Lector de microplacas ○ Columna Superdex 200 Increase 100/300 GL ○ Estándares de calibración para cromatografía de exclusión

Construcción de plásmidos	de	Expresión y purificación de proteínas	Determinación de la estructura cuaternaria
		<ul style="list-style-type: none"> o Columna de intercambio aniónico (Mono Q) 	

4.2 Parte experimental



4.3 Diseño de quimeras

En la figura 5 se muestra la fuente de información para la alineación de proteínas con los dominios de interés PAS y GGDEF.

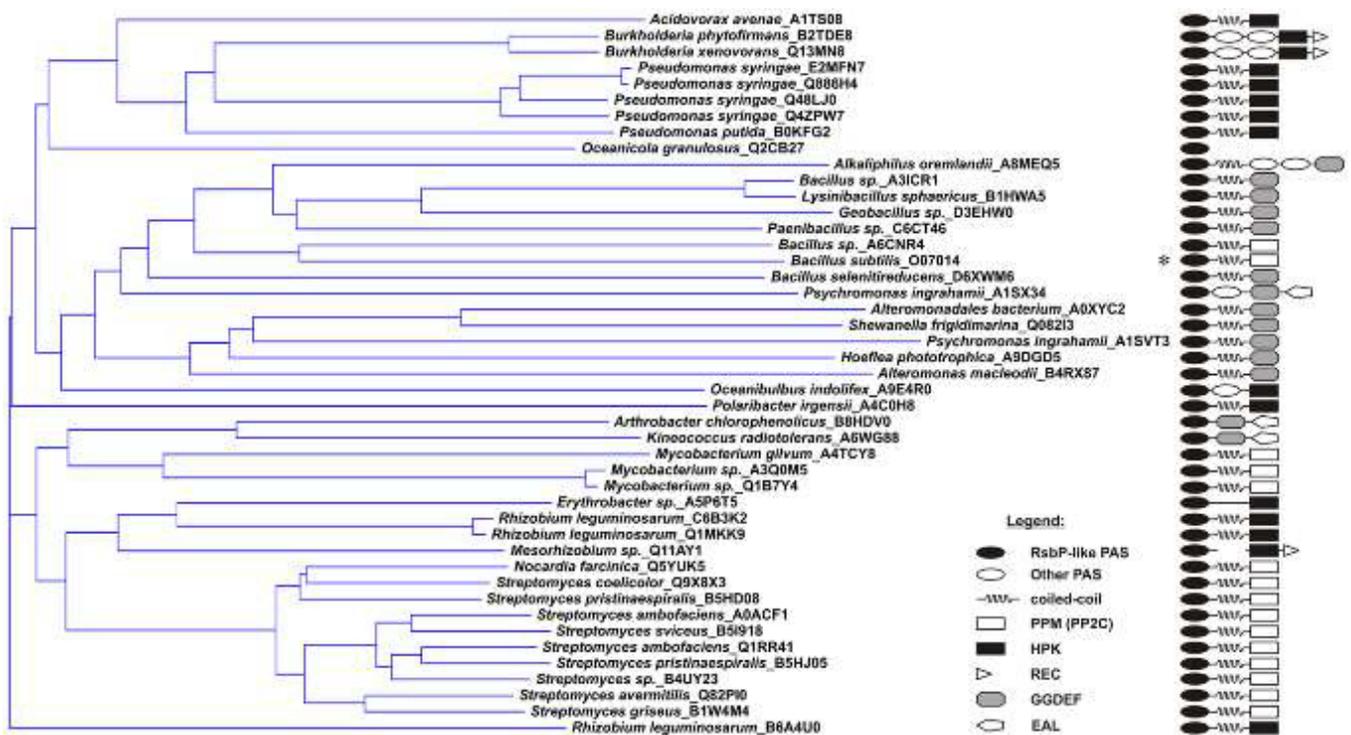


Figura 5 Relación de dominios homólogos a RsbP-PAS. Arquitectura y proteínas de origen para dominios homólogos a RsbP-PAS. Las proteínas se identifican por especie e identificador UniProt.

Para determinar la secuencia de aminoácidos que corresponde a cada dominio de interés se alinearon las proteínas en las cuales el dominio de interés está presente. La secuencia de aminoácidos para cada una de estas proteínas fue determinada por medio de su número identificador UniProt. Haciendo uso del programa Clustal omega

disponible en línea, se realizó la alineación de estas secuencias para poder determinar la similitud y con esto obtener la secuencia de aminoácidos.

A continuación en la figura 6 se muestra la alineación de proteínas en Clustal Omega, para el dominio GGDEF.

```

CLUSTAL O(1.2.1) multiple sequence alignment

tr|A0XY02|A0XY02_9GAMM      -----MVHDSKTRNYKANESALNLFNLKQHSDLNENHFG
tr|B8HDV0|B8HDV0_ARTCA    ---MTGAGGQPVANFESLFHQAPCGYLITDDDGHIAAVNDTFVRWTG-YNRAELLGKRLQ
tr|A6WG88|A6WG88_KINRD    -----MNDDPSAFEALFQQAPCGYLITDADGRVTRVNDTFLHMSG-HRRREDLLGSAFN
tr|A1SX34|A1SX34_PSYIN    -----MTANQTLATMLD-LTLPLDLVGNKLD
tr|A8MEQ5|A8MEQ5_ALKOO    -----MDNRMDFAPCGYIKLTPQGIKEVNYTFLAMTG-YGHEDLLEMHFE
tr|D6XIM6|D6XIM6_BACIE    -----MNEQLNRAPCGYFVWINDAFRMIEANESFASLVK-REHFELLDLNFQ
tr|C6CT46|C6CT46_PAESJ    -----MDTLLNEAPCGYFSITDKGLIQSVNQTLTLMG-YDREELLERHIE
tr|D3EHW0|D3EHW0_GEOS4    -----MDERLNYAPCGYVSITHEGMVAEVNQTFLDMMG-YRLEDVLQKHFE
tr|A3ICR1|A3ICR1_9BACI    -----MEQRLNDAPCGFLSITHEGVIAEVNHTLLNMIG-FEQVDLLQQHLE
tr|B1HWA5|B1HWA5_LYSSC    -----MEQRLNDAPCGFLSITHEGLIAEVNHTLLKWIIG-FEQVDLLQQHLE
tr|A9DGD5|A9DGD5_9RHIZ    -----MDRLERSDLVDVDHFPCGCLVTTMDRKVLFANQYFRDYLG-WDPASLIDKPIK
tr|Q082I3|Q082I3_SHEFN    MITTLKSKPNSHTAFDYSPDNFQCGALVTNASNIIYVNTYFTDELL-WKPGQLIGKNAD
tr|A1SVT3|A1SVT3_PSYIN    -----MKKNVAVPNLNDFFSGHLIVNKARKILYCNVYICDLSQ-QSDKSLIDNPLS
                                     *
                                     :

tr|A0XY02|A0XY02_9GAMM      HIKLTSPLSKKTLTLLQNLFDVYLIPNVQNKVWLEV-----DQTAFLLNLIKFANIT
tr|B8HDV0|B8HDV0_ARTCA    SLL---PVG-----DQILYATHCIPQLGITGSVSEIALDIIIGSDGVRHPALLTASRFAAT
tr|A6WG88|A6WG88_KINRD    RLL---PVG-----DRILWSTHSAQQLSTTGTVSEWVVEIVGADRVRRPALVATRAPVT
tr|A1SX34|A1SX34_PSYIN    VLL---TSS-----NRLLFHLQVMTVLHVQGHIEEISMSLAGAKGIDIPVIFNAVRRNVD
tr|A8MEQ5|A8MEQ5_ALKOO    SFL---SLA-----SKIIFHSLFFPQVCLKGGIDELYLTIKKNKKEEMSVLLIGNMGENN
tr|D6XIM6|D6XIM6_BACIE    QLL---TVA-----SRVYFQTYFEPIMNIQGVRELYLT LKV-DGKSLPVLMSANAYG--
tr|C6CT46|C6CT46_PAESJ    STM---SVA-----NKMFPTFYFYPYIRLYGQVDEMYFSFRTKDGKDLVLLNGIRRNRD
tr|D3EHW0|D3EHW0_GEOS4    AMM---STA-----NKLIFHSYFYPHINLDGHVEELFIRLKNRSGESVPLILNGRKFERE

tr|A0XY02|A0XY02_9GAMM      DGLTNIANRRCFDQTIIDDEIQRCVRYQQPISLLICDIDFFKKYNDSYGHQKGD EALKQVA
tr|B8HDV0|B8HDV0_ARTCA    DSLTGLPNRAGLKRFG EAPPDSAI EGNPLGALFIDLDFKAVNDSLGHGAGDNLVLSVA
tr|A6WG88|A6WG88_KINRD    DPLTGLPNRAGLSVHLES-----ATGTSVGVLVVDLDFAVVNESLGVAA GDELLLTVA
tr|A1SX34|A1SX34_PSYIN    DHLTGLANRR EFD RMLLEMFESSISPVAHVLC CIDLQDFKLINDSCGHFAGDTLLKEIS
tr|A8MEQ5|A8MEQ5_ALKOO    DELTGLYNRHF LVSYLKNEIEKAEAE DQPMTAILDLQDFKLVDN TWGHPVGD EQLKHTA
tr|D6XIM6|D6XIM6_BACIE    DNLTHLKNRRFFEDRLSYLLDLYEKEGVVFFSICLIDVDFEKRFRNDTFGHLAGDFVLKELA
tr|C6CT46|C6CT46_PAESJ    DPLTGLKNRRYFQEQLQKYTELSEQTEAALS LCIVDIDRFK SINDTYGHVPVGDVLVLR LA
tr|D3EHW0|D3EHW0_GEOS4    DKLTGLKNRRFFQERLEEQLMQYMHNRIPLSLFIIDIDHFKRVDN TWGHG YGDEV LFDVA
tr|A3ICR1|A3ICR1_9BACI    DKLTGLKNRRFFQDKLEQLNSYYE SAKPFSLCILDIDHFKKVNDTFGHQVGD VLAQLA
tr|B1HWA5|B1HWA5_LYSSC    DKLTGLKNRRFFQEKLEQLNSYYE SAKPFSLCILDIDHFKKVIDTFGHQVGD VLAQLA
tr|A9DGD5|A9DGD5_9RHIZ    DSLTGVSNRRELEAVLERLFKEADRS DQPLSLLM'DIONFKLINDSYGH DAGOQVLCALA
tr|Q082I3|Q082I3_SHEFN    DELTQLLNRR EMKYRSTLAL EQATRSEQSVGLLLL DIDHFKIINDSFGHLEGRV LKELG
tr|A1SVT3|A1SVT3_PSYIN    DPLTGLLNRR ELQVQAQVTHQAARNLSTFALLFIDIDFFKRVDN TWYGH P AGDKVLI CLA
* * * : * * : * * * * * : * * * *

```



Figura 6 Alineación de proteínas. Alineación de proteínas en Clustal Omega, para el dominio GGDEF. El código de colores representa las características fisicoquímicas de los residuos de aminoácidos. Donde rojo representa residuos hidrofóbicos, azul residuos ácidos, magenta residuos básicos, Verde representa hidroxilos, sulfidrilos, aminos y G. Los asteriscos (*) muestran las regiones conservadas, los dos puntos (:) regiones conservadas por grupos similares y el punto (.) conservación de regiones entre grupos poco similares.

Para corroborar la selección adecuada de la secuencia de aminoácidos de interés se realizó una búsqueda en la página del “National Center for Biotechnology Information”, NCBI, en éste se utilizó la base de datos para proteínas y se realizó una búsqueda de las secuencias conservadas. Finalmente, se cotejó las secuencias establecidas como la secuencia de interés por medio de la alineación en Clustal Omega contra las secuencias identificadas en el NCBI como secuencias conservadas. Se repitió este procedimiento para cada una de los dominios de interés.

En la figura 7 se muestra la información obtenida del NCBI.

List of domain hits

Name	Accession	Description	Interval	E-value
GGDEF	cd01949	Diguanylate-cyclase (DGC) or GGDEF domain; Diguanylate-cyclase (DGC) or GGDEF domain: ...	1479-1635	5.14e-59

Diguanylate-cyclase (DGC) or GGDEF domain; Diguanylate-cyclase (DGC) or GGDEF domain: Originally named after a conserved residue pattern, and initially described as a domain of unknown function 1 (DUF1). This domain is widely present in bacteria, linked to a wide range of non-homologous domains in a variety of cell signaling proteins. The domain shows homology to the adenylyl cyclase catalytic domain. This correlates with the functional information available on two GGDEF-containing proteins, namely diguanylate cyclase and phosphodiesterase A of *Acetobacter xylinum*, both of which regulate the turnover of cyclic diguanosine monophosphate. Together with the EAL domain, GGDEF might be involved in regulating cell surface adhesion in bacteria.

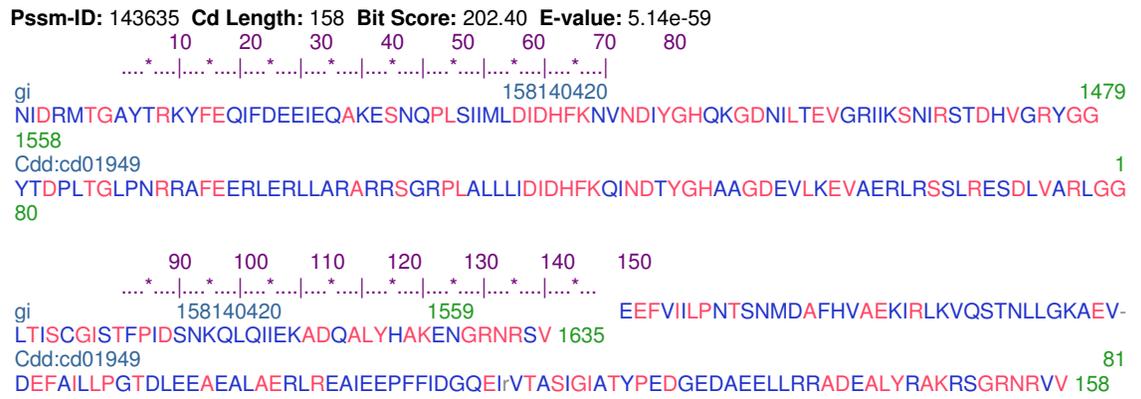


Figura 7 Secuencias conservadas reportadas en la base de datos de ncbi. Secuencia de aminoácidos conservados para el dominio GGDEF.

Finalmente haciendo uso del programa computacional “Charite Christo Protein”, se evaluó la presencia o no del bucle enrollado y con esto se logró diseñar las proteínas quiméricas.

4.4 Extracción de ADN

4.4.1 ADN genómico de *Bacillus subtilis*

De la cepa de *Bacillus subtilis* (ATCC 13542) de la American Type Culture Collection se extrajo el ADN genómico con el kit DNeasy Blood & Tissue De QIAGEN. El laboratorio de Biotecnología II, ya contaba con el ADN genómico, previamente extraído por lo que se inició a partir de la amplificación.

4.4.2 ADN plasmídico para las quimeras 2 y 3

Los genes codificantes para las quimeras 2 y 3, fueron enviados a sintetizar con GenScript en el vector pUC57.

4.4.3 Amplificación del ADN genómico

El ADN genómico se utilizó como molde, se amplificaron las secuencias de ADN pertenecientes a los dominios de interés.

Para obtener un mayor número de copias del fragmento de ADN de interés se llevó a cabo la PCR. Para la PCR se realizó el diseño de primers o iniciadores los cuales se muestran a continuación.

Diseño de Iniciadores:

RsbP-PAS-F	5'-GGA TCC ATG GAC AAA CAA TTG AAT GAT GCA C-3'	BamHI
RsbP-PAS-R	5'-GGA TTC TCG CAT TGG AAT CAG AAC ACA ATC-3'	EcoRI
PAS-Phy-F	5'-GTC GAC GA GGG CTT GCT GAA CTG CAG GC-3'	Sall
PAS-Phy-R	5'-GCG GCC GC TTA AGT CAT ATC TTG GGC AAC AAA GC-3'	NotI

Condiciones para la PCR:

Tabla 3 Volúmenes utilizados para los componentes de la PCR. Para el ADN genómico se tomó 1µL de muestra y para el ADN plasmídico se tomaron 10 µL de muestra.

ADN genómico Bacillus subtilis		ADN plasmídico PAS alternativo	
Componente	Volumen (µL)	Componente	Volumen (µL)
10x amortiguador estándar	5.0	10x amortiguador estándar	5.0
dNTP's	1.5	dNTP's	1.5
RsbP-PAS-R	3.0	PAS-Phy-R	3.0
RsbP-PAS-F	3.0	PAS-Phy-F	3.0
Taq polimerasa	1.0	Taq polimerasa	0.5
DNA molde	10.0	DNA molde	1.0
Agua MQ	26.5	Agua MQ	36.0
Volumen final	50.0	Volumen final	50.0

Tabla 4 Condiciones para la PCR. Se indican las temperaturas y tiempos para cada una de las etapas de la PCR.

Paso	Temperatura (°C)	Tiempo (min)	
Desnaturalización Inicial	95	2	} 30 ciclos
Desnaturalización	95	1	
Alineamiento	59	1	
Elongación	72	1.2	
Elongación Final	72	5	

4.4.4 Electroforesis en gel de agarosa

Para corroborar la correcta amplificación del ADN codificante de las proteínas de interés se llevó a cabo una verificación por medio de electroforesis en gel de agarosa al 0.7%. Se espera obtener bandas a 378 pb para PAS alternativo y 330 pb para RsbP-PAS.

Preparación de gel de agarosa al 0.7%:

El gel de agarosa al 0.7% se preparó disolviendo 0.21g agarosa marca “Bio-Rad” en 30 mL de TAE 1X (Tris-Acetato-EDTA). Se calentó y agitó la solución con el fin de disolver la agarosa. Posteriormente se dejó atemperar y se adicionó bromuro de etidio para una concentración final de 0.5µg/mL. Esta solución fue vaciada en el molde, se colocó el peine y se dejó reposar para su polimerización. Se cargaron 5 µL de marcador y 10 µL de las muestras. El gel se corrió bajo la siguiente condición:

80 V/ 50 min

4.4.5 Purificación en gel

Con el fin de aislar y purificar los fragmentos de interés de ADN obtenidos mediante la PCR. Se lleva a cabo una purificación en gel.

Para la purificación en gel inicialmente se pesó y registró el peso de los tubos Eppendorf a utilizar. Los fragmentos del gel donde se veían las bandas de ADN en el gel de agarosa al 0.7% fueron cortados cuidadosamente y transferidas a los tubos Eppendorf previamente pesados, la diferencia en peso nos permitió calcular el peso del gel.

Se adicionó 3 veces el peso del gel en volúmenes de buffer QG. Se incubó a 50°C/10min, hasta que se disolvió el gel (hicimos uso del vortex marca Sybron, thermolyne para disolver el gel). Se adicionó 1 volumen de isopropanol a la muestra y se mezcló. La muestra se cargó a la columna QIAquick spin. Posteriormente centrifugamos a 13,000 RPM/1 minuto y se descartó el eluido. Para lavar la columna se adicionaron 750µL de buffer PE y centrifugamos a 13,000RPM/1min. Nuevamente se descartó el eluido. Para colectar el ADN se colocó la columna en un tubo Eppendorf de 1.5mL, estéril y etiquetado y se agregaron 30µL de buffer EB al centro de la membrana. Se dejó reposar 5 minutos y finalmente se centrifugó a 13,000RPM/1min. Se almacenó el eluido a -20°C hasta su uso.

4.5 Construcción de plásmidos

El laboratorio de Biotecnología 2 de la Facultad de Ciencias Químicas en la Universidad Autónoma de Nuevo León, cuenta con una colección de distintos vectores de expresión que contienen las secuencias de proteínas de fusión como la proteína de unión a la maltosa (MBP) o la glutatión S-transferasa (GST).

Para este proyecto se decidió trabajar con el vector pGEX-4T-2 que se muestra en la figura 8, este vector es resistente a ampicilina y contiene la secuencia que codifica para la proteína de fusión GST (glutatión S-transferasa), lo que le confiere cualidades a la proteína de interés que mejoran su producción (genera menos cuerpos de inclusión) y facilita su purificación.

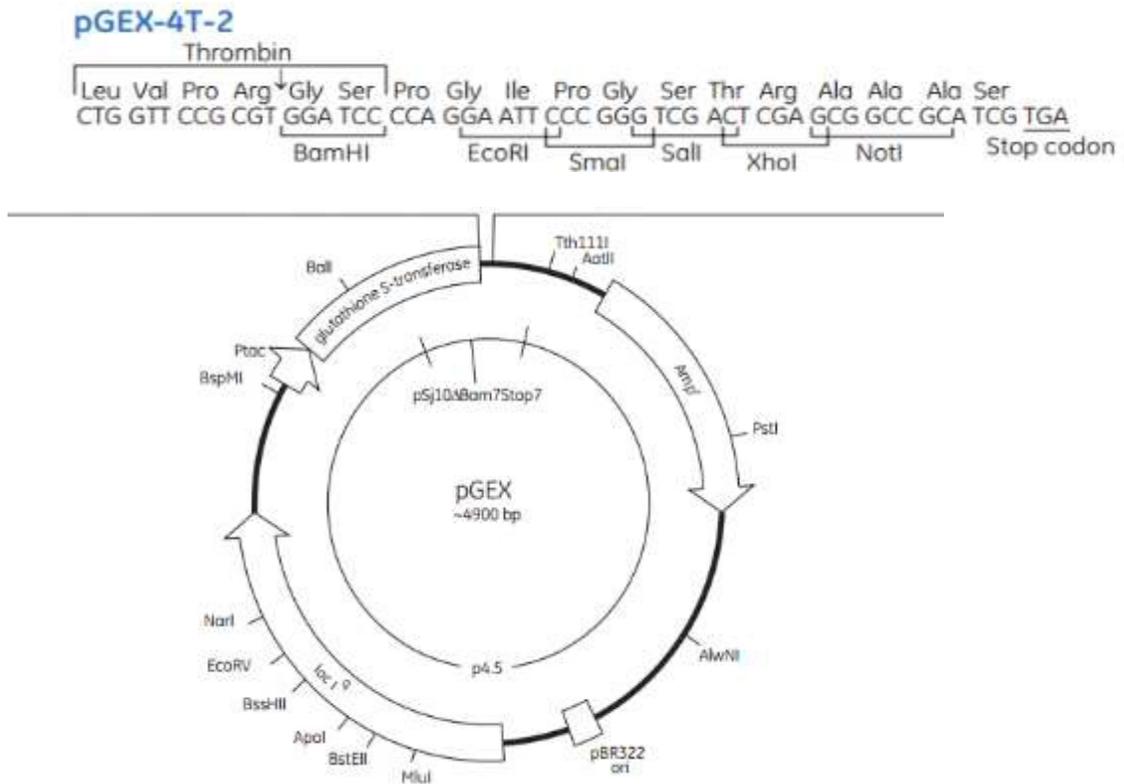


Figura 8 Mapa del vector de fusión pGEX-4T-2 glutatión S- transferasa mostrando marcos de lectura y principales características.

Para la construcción de los plásmidos se siguió el método de clonación clásico: Digestión, ligación, transformación y selección de transformantes para todas las construcciones de ADN.

➤ 4.5.1 Quimera 1: pGEx-4T-2_RsbP-PAS_PASalt

Clonaciones: Primero se clonó el ADN que codifica al dominio PAS de RsbP y la secuencia de aminoácidos intermedia en uno de los extremos del sitio de clonación múltiple (MCS) en pGEX-4T-2.

- **4.5.1.1 Digestión y desalinización del vector pGEX-4T-2 y RsbP-PAS**
- **Digestión del vector pGEX-4T-2**

Enzimas de restricción a utilizar:



Procedimiento para digestión del plásmido (pGEX-4T-2)

Tabla 5 Volúmenes de reacción para la digestión del vector Se muestran los volúmenes de los componentes utilizados para la digestión del plásmido a utilizar (pGEX-4T-2).

Volúmenes de reacción	(μ L)
pADN	12.0
10x amortiguador estándar	2.0
BSA	2.0
EcoRI	1.0
BamHI	1.0
Agua MQ	1.0
SAP	1.0
Volumen final	20.0

En tubo eppendorf de 1.5ml, se adicionaron los reactivos y volúmenes indicados en la tabla 5 (excepto por BamHI y el SAP). Posteriormente se incubó a 37°C/2 hrs. Pasadas las 2 horas de incubación se adicionaron BamHI y SAP. Se incubó a 37°C/2 hrs.

- **Digestión de RsbP-PAS**

Enzimas de restricción a utilizar:



Procedimiento para digestión del inserto (RsbP-PAS)

Tabla 6 Volúmenes de reacción para la digestión del inserto Se muestran los volúmenes de los componentes utilizados para la digestión de la secuencia que codifica para el dominio RsbP-PAS.

Volúmenes de reacción	(μ L)
pADN	6.0
10x amortiguador estándar	2.0
BSA	2.0
EcoRI	1.0
BamHI	1.0
Agua MQ	8.0
Volumen final	20.0

Para la digestión se utilizó una concentración de ADN de 1000ng/ μ L.

En tubo eppendorf de 1.5ml, se adicionaron los reactivos y volúmenes indicados en la tabla 6. Posteriormente se incubó a 37°C/1 hr.

- **Desalinización de pGEX-4T-2 y RsbP-PAS**

Con el fin de eliminar enzimas y sales del producto de la digestión se llevó a cabo una desalinización o cambio de amortiguador, haciendo uso del QIAquick Gel Extraction Kit de QIAGEN.

Para la desalinización se adicionaron 3 volúmenes de buffer QG, de acuerdo al volumen que se tenía de muestra o de gel y se mezcló. Se adicionó 1 volumen de muestra de isopropanol y se cargó la muestra a la columna QIAquick spin, se centrifugó a 13,000 RPM/1 min y se descartó el eluido. Para lavar la columna se adicionó 750µL de buffer PE y se centrifugo a 13,000RPM/1min, se descartó el eluido. Finalmente para eluir el ADN se colocó la columna en un tubo Eppendorf de 1.5mL, estéril y etiquetado. Se agregó 30µL de buffer EB al centro de la membrana y se dejó reposar 5 minutos. Se centrifugó a 13,000RPM/1min. El eluido se almacenó a -20C hasta su uso.

- **4.5.1.2 Ligación de pGEX-4T-2 y RsbP-PAS**

Se lleva a cabo para poder introducir el inserto RsbP-PAS digerido al pGEX-4T-2 lineal. La reacción se llevó a cabo con un volumen fijo de 2µL del plásmido lineal y diferente concentración del inserto. La T4 DNA ligasa utilizada fue de la marca Invitrogen, esta ligasa no requiere desactivación.

Para la ligación se realizaron pruebas variando el volumen (la concentración) del inserto a 0, 2, 4 y 6 µL, el volumen del plásmido lineal se mantuvo de 2 µL en cada prueba, se adicionó 1 µL de solución amortiguadora 10X y 1µL de la T4 ADN ligasa, se llevaron todas las muestras a un volumen final de 10µL.

Una vez preparadas las muestras en tubo eppendorf de 1.5mL, se incubó la reacción a 37°C/1hra. Posteriormente se dejó atemperar y se incubó a 4°C/16hrs.

- **4.5.1.3 Transformación pGEX-4T-2_RsbP-PAS en cepa *E. coli* DH5α y obtención de ADN plasmídico**

La transformación es un proceso por el cual las células captan ADN libre presente en el medio. Para que la transformación tenga lugar de forma eficiente se utilizó la cepa de *E. coli* DH5α rubidio-competentes, las bacterias en estado de competencia, presenta alteraciones en su pared y membrana celular que permiten la entrada de ácidos nucleicos en la célula.

Para la transformación de células competentes inicialmente se descongelaron las células *E. coli* DH5α rubidio-competentes en hielo. Se utilizó para cada transformación 25µL de células DH5α y 5µL del producto de la ligación y se colocaron en eppendorf de 1.5mL

Posteriormente se incubó la reacción en hielo durante 30min y se sometieron las células a un choque térmico colocando los tubos en baño de agua a 44°C/ 45s. Inmediatamente después se colocaron los tubos en hielo durante 2 minutos. Se retiraron los tubos del hielo y se adicionó 800uL de caldo LB, previamente esterilizado en autoclave. Se incubaron los tubos a 37°C/60min con agitación a 120 RPM. Se centrifugaron los tubos a 13000 RPM/5min para obtener el pellet bacteriano. Se removió el sobrenadante, dejando aproximadamente 50uL del mismo para la resuspensión del pellet. Una vez resuspendido el pellet se vació este volumen con pipeta en placas de LB ampicilina y se realizó siembra por extensión en placa. Finalmente se incubaron las placas a 37°C/16hrs.

En tubos de vidrio para cultivo celular se colocaron 6mL de caldo LB y 6 uL de ampicilina (para una concentración final de ampicilina de 1 mM), esto se realizó por duplicado, un tubo para cada colonia seleccionada. Se seleccionaron 2 colonias. Con aplicador de madera se tomó la colonia, se resembró en placa con LB/Amp y posteriormente se dejó caer el aplicador en el tubo de vidrio para el crecimiento de la colonia seleccionada. Esto se realizó de la misma forma 2 veces, una para cada colonia. Los tubos se incubaron a 37°C/16hrs a 120RPM y la placa de resiembra se incubó a 37°C/16hrs sin agitación para preservación de las colonias.

- **Obtención de ADN plasmídico para pGEX-4T-2_RsbP-PAS miniprep**

Para la obtención del ADN plasmídico, pasadas las 16hrs de incubación, se utilizó el kit de QIAGEN QIAprep Spin Miniprep. Los tubos fueron retirados de la incubadora y se dejaron atemperar. Se colectó el pellet bacteriano centrifugando a 13000 RPM/2min hasta coleccionar el pellet de los 6mL. Se descartó el sobrenadante.

El pellet se resuspendió en 250uL de amortiguador P1. A continuación, se adicionó 250uL de amortiguador P2 (lisis alcalina), el contenido de los tubos fue mezclado invirtiendo el tubo hasta obtener una solución clara, viscosa, blanca. Sin dejar pasar más de 5 minutos se llevó a cabo la reacción de neutralización con 350uL de amortiguador N3 y se mezcló con el contenido invirtiendo el tubo para detener la lisis alcalina. Se centrifugaron los tubos a 13000 RPM/10min. El sobrenadante fue cargado a la columna QIAprep Spin y centrifugado a 13000 RPM/1min.

Para el lavado de la columna se adicionaron 750uL de amortiguador PE, se centrifugó a 13000 RPM/ 1 min. Se descartó el eluido y para asegurar el lavado de la columna se

centrifugó una vez más a 13000RPM/5min. Se colocó la columna en un tubo Eppendorf de 1.5mL estéril para coleccionar el ADN plasmídico. Para eluir se adicionaron 50uL de amortiguador EB tratando de dejarlo caer sobre la membrana al centro de la columna. Se dejó reposar durante 5 minutos y finalmente se centrifugó a 13000RPM/1 min. Haciendo uso del nanodrop 2000, marca “Thermo scientific”, se realizaron lecturas de la concentración de ADN plasmídico.

- **4.5.1.4 Análisis de restricción de los transformantes para pGEX-4T-2_RsbP-PAS**

Comprobación de la presencia del ADN recombinante en los transformantes

Con el objetivo de comprobar que los transformantes seleccionados sean portadores del ADN recombinante se llevó a cabo un análisis de restricción.

Enzimas de restricción a utilizar



Procedimiento para la digestión del inserto (RsbP-PAS)

Tabla 7 Volúmenes de reacción para la digestión. Se muestran los volúmenes de los componentes utilizados para la digestión de la primera parte de la construcción

Volúmenes de reacción (μL)		
Componente	Colonia 1	Colonia 2
pADN (1000ng)	7.0	4.0
10x amortiguador estándar	2.0	2.0
BSA	2.0	2.0
EcoRI	1.0	1.0
BamHI	1.0	1.0
Agua MQ	7.0	10.0
Volumen final	20.0	

Para realizar la digestión se busca tener una concentración de DNA de 1000ng/uL.

Cálculos realizados:

	(ng/uL)	Volumen para 1000 ng
pGEX-4T-2_RsbP-PAS colonia 1	149.8	7 uL
pGEX-4T-2_RsbP-PAS colonia 2	270.3	4 uL

Una vez realizados los cálculos se adicionó las cantidades indicadas en la tabla anterior en tubo eppendorf de 1.5ml. Se incubó a 37°C/1hra y se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7% como se indicó en la sección 4.6

Una vez obtenido un resultado positivo para el primer inserto (pGEX-4T-2_RsbP-PAS) se repitieron los pasos anteriores para el segundo inserto de la construcción es decir, la secuencia que codifica para el dominio PAS alternativo (Phy A - Fitocromo A).

○ **4.5.1.5 Digestión y desalinización de pGEX-4T-2_RsbP-PAS y PAS alternativo**

Enzimas de restricción a utilizar



Procedimiento para digestión del plásmido (pGEX-4T-2_RsbP-PAS)

Cálculos realizados:

Tabla 8 Volúmenes de reacción para la digestión. Se muestran los volúmenes de los componentes utilizados para la digestión de la primera parte de la construcción.

Volúmenes de reacción (µL)	
pADN	4.0
10x amortiguador estándar	2.0
Not I	1.0
Sal I	1.0
SAP	1.0
Agua MQ	11.0
Volumen final	20.0

Para la digestión se utilizó una concentración de ADN de 1000ng/uL.

En tubo eppendorf de 1.5ml, se adicionaron los reactivos y los volúmenes indicados en la tabla 8, excepto Sal I y SAP. Se incubó a 37°C/1 hr. A la reacción anterior se le adicionó la segunda enzima de restricción Sal I y para evitar que los extremos obtenidos por la digestión se unan se adiciona el SAP. Se incubó a 37°C/1hr.

- **Digestión de PAS alternativo**

Enzimas de restricción a utilizar



Procedimiento para digestión del inserto (PASalt)

Tabla 9 Volúmenes de reacción para la digestión. Se muestran los volúmenes de los componentes utilizados para la digestión del segundo inserto PAS alternativo.

Volúmenes de reacción (µL)	
pADN	4.0
10x amortiguador estándar	2.0
Not I	1.0
Sal I	1.0
Agua MQ	12.0
Volumen final	20.0

En tubo eppendorf de 1.5ml, se adicionó todos los componentes y volúmenes indicados en la tabla 9. Se incubó a 37°C/1hr.

- **Desalinización de pGEX-4T-2_RsbP-PAS y PAS alternativo**

Se repitió el proceso de desalinización, descrito previamente en la sección 4.5.1.5.

- **4.5.1.6 Ligación de pGEX-4T-2_RsbP-PAS y PASalt**

Esta etapa se lleva a cabo para poder introducir el inserto PASalt lineal a la primera construcción (pGEX-4T-2_RsbP-PAS). La reacción se llevó a cabo con diferente volumen (concentración) del inserto a 0, 2, 4 y 6 μL , con un volumen fijo de 2 μL de la primera construcción lineal, 1 μL de la solución amortiguadora 10X y 1 μL de la T4 ADN ligasa de la marca Invitrogen, esta ligasa no requiere desactivación y finalmente se llevó con H_2O destilada a un volumen final de 10 μL . Se adicionaron en tubo eppendorf de 1.5mL, se incubó la reacción a 37°C/1hr. Posteriormente se dejó atemperar y se incubó a 4°C/16hrs.

- **4.5.1.7 Transformación en cepa E. coli DH5 α y obtención de ADN plasmídico para pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASalt**

- **Transformación en cepa E. coli DH5 α para pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASalt**

La transformación se llevó a cabo utilizando 25 μL de células DH5 α y 5 μL del producto de la ligación. Se repitió el proceso para la transformación descrito en la sección 4.5.1.3.

- **Obtención de ADN plasmídico para pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PAS alternativo - miniprep**

En tubos de vidrio para cultivo celular se colocaron 6mL de caldo LB y 6 μL de ampicilina, esto se realizó por duplicado, un tubo para cada colonia seleccionada. Se seleccionaron 4 colonias de la placa D. Con aplicador de madera se tomó la colonia, se sembró en placa con LB/Amp y posteriormente se dejó caer el aplicador en el tubo de vidrio para el crecimiento de la colonia seleccionada. Esto se realizó de la misma forma para cada

colonia. Los tubos se incubaron a 37°C/16hrs con agitación a 120RPM y la placa de resiembra se incubó a 37°C/16hrs sin agitación para preservar las colonias.

Para obtener el ADN plasmídico se hizo uso del kit QIAprep Spin Miniprep de QIAGEN y se repitió el procedimiento para minipreps de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Con el objetivo de comprobar que los transformantes seleccionados sean portadores del ADN recombinante se llevó a cabo un análisis de restricción haciendo uso del ADN plasmídico.

○ **4.5.1.8 Análisis de restricción para pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASa**

Con el propósito de cortar tanto el primer como el segundo inserto las enzimas de restricción a utilizar son:



Procedimiento para el análisis de restricción de pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASalt

Tabla 10 Volúmenes de reacción para la digestión. Se muestran los volúmenes de los componentes utilizados para el análisis de restricción para la quimera 1.

Volúmenes de reacción (µL)				
Componente	Colonia 1	Colonia 2	Colonia 3	Colonia 4
pADN (1000ng)	6.0	6.0	4.0	4.0
10x amortiguador estándar	2.0	2.0	2.0	2.0
Not I	1.0	1.0	1.0	1.0
BamHI	1.0	1.0	1.0	1.0

Agua MQ	8.0	8.0	10.0	10.0
BSA	2.0	2.0	2.0	2.0
Volumen final	20.0			

Se adicionó las cantidades indicadas en la tabla 10 en tubo eppendorf de 1.5ml. Se incubo a 37°C/1hr. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7%

➤ **4.5.2 Quimera 2: pGEX-4T-2_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF**

○ **4.5.2.1 Re suspensión de liofilizado de pUC57_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF**

Se recibieron 4µg de liofilizado, estos fueron re suspendidos en 20µL de H₂O libre de RNasas. Se agitó en vortex durante 1 min y se centrifugó a 4000 RPM/30s.

○ **4.5.2.2 Transformación en cepa *E. coli* DH5α para pUC57_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF y obtención de ADN plasmídico**

- **Transformación en cepa *E. coli* DH5α para pUC57_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF**

La transformación se llevó a cabo utilizando 50 µL de células DH5α y 5 µL de los Genes sintetizados por GenScript para pUC57_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF. Se repitió el proceso de transformación descrito en la sección 4.5.1.3.

- **Obtención de ADN plasmídico para pUC57_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF miniprep**

En tubos de vidrio para cultivo celular se colocaron 6mL de caldo LB y 6 uL de ampicilina, esto se realizó por duplicado, un tubo para cada colonia seleccionada. Seleccionó 1 colonia de cada placa. Con aplicador de madera se tomó la colonia, se resembró en placa con LB/Amp y posteriormente se dejó caer el aplicador en el tubo de vidrio para el crecimiento de la colonia seleccionada. Esto se realizó de la misma forma para cada colonia. Los tubos se incubaron a 37°C/16hrs con agitación a 120RPM y la placa de resiembra se incubó a 37°C/16hrs sin agitación para preservar las colonias. Para obtener el ADN plasmídico se hizo uso del kit QIAprep Spin Miniprep de QIAGEN y se repitió el procedimiento para minipreps de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

Con el objetivo de comprobar que los transformantes seleccionados sean portadores del ADN recombinante se llevó a cabo un análisis de restricción haciendo uso del ADN plasmídico.

- **4.5.2.3 Digestión y purificación en gel para pGEX-4T-2 y RsbP-PAS_Bucle_GGDEF**

- **Digestión de pGEX-4T-2**

Se repitió el procedimiento descrito en la sección 4.5.1.1.

- **Digestión de pUC57_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF**

Enzimas de restricción a utilizar:



Procedimiento para digestión de RsbP-PAS_Bucle_GGDEF.

Tabla 11 Volúmenes de reacción para la digestión. Se muestran los volúmenes de los componentes utilizados para la digestión de RsbP-PAS_Bucle_GGDEF.

Volúmenes de reacción	(μ L)
pADN	20.0
10x amortiguador estándar	5.0
EcoRI	1.0
BamHI	1.0
Agua MQ	3.0
Volumen final	30.0

En tubo eppendorf de 1.5ml, se adicionaron los reactivos y volúmenes indicados en la tabla 11 (excepto por BamHI). Posteriormente se incubó a 37°C/2 hrs. Pasadas las 2 horas de incubación se adicionó BamHI. Se incubó a 37°C/2 hrs.

Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.0% de la misma manera descrita en la sección 4.4.4.

- **Purificación en gel de pGEX-4T-2 y RsbP-PAS_Bucle_GGDEF**

El proceso de purificación en gel sigue los mismos pasos que el proceso de desalinización, utilizado previamente descrito en la sección 4.4.5.

- **4.5.2.4 Ligación de pGEX-4T-2 y RsbP-PAS_Bucle_GGDEF**

Esta etapa se lleva a cabo para poder introducir el inserto RsbP-PAS_Bucle_GGDEF lineal al vector pGEX-4T-2. La reacción se llevó a cabo con diferente volumen (concentración) del inserto a 0, 2, 4 y 6 μL , un volumen fijo de 2 μL del vector lineal, 1 μL de solución amortiguadora 10X y 1 μL de la T4 ADN ligasa de la marca Invitrogen, esta ligasa no requiere desactivación. Finalmente se adicionó H_2O destilada para completar un volumen final de 10 μL en tubo eppendorf de 1.5mL. Se incubó la reacción a 37°C/1hr. Posteriormente se dejó atemperar y se incubo a 4°C/16hrs.

- **4.5.2.5 Transformación en cepa *E. coli* DH5 α para pGEX-4T-2_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF y obtención de ADN plasmídico**

- **Transformación en cepa *E. coli* DH5 α para pGEX-4T-2_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF**

La transformación se llevó a cabo utilizando 25 μL de células DH5 α y 5 μL del producto de la ligación. Se repitió el procedimiento de transformación descrito en la sección 4.5.1.3.

- **Obtención de ADN plasmídico para pGEX-4T-2_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF miniprep**

Se repitió el procedimiento descrito en la sección 4.5.2.5.

- **4.5.2.6 Análisis de restricción para pGEX-4T-2_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF**

Con el propósito de verificar que la secuencia de interés estuviera presente en las colonias transformantes se utilizaron las siguientes enzimas de restricción:

RsbP-PAS-R
•EcoRI

RsbP-PAS-F
•BamHI

Procedimiento para el análisis de restricción de pGEX-4T-2_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF

Tabla 12 Volúmenes de reacción para la digestión. Se muestran los volúmenes de los componentes utilizados para el análisis de restricción de la quimera 2 de RsbP-PAS_Bucle_GGDEF.

Volúmenes de reacción (µL)					
Componente	Colonia 1	Colonia 2	Colonia 3	Colonia 4	Colonia 5
pADN (1000ng)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
10x amortiguador estándar	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
EcoRI	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
BamHI	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Agua MQ	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Volumen final	10.0				

Se adicionaron las cantidades indicadas en la tabla 12 en tubos eppendorf de 1.5ml. Se incubó a 37°C/1hr. Posteriormente se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.0% como se describió previamente en la sección 4.4.4.

➤ **4.5.3 Quimera 3: pGEX-4T-2_ RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF**

- **4.5.3.1 Re suspensión de liofilizado de pUC57_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF**

Se recibieron 4µg de liofilizado, estos fueron re suspendidos en 20µL de H₂O libre de RNasas. Se agitó en vortex durante 1 min y se centrifugó a 4000 RPM/30s.

- **4.5.3.2 Transformación en cepa *E. coli* DH5α para pUC57_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF y obtención de ADN plasmídico**
- **Transformación en cepa *E. coli* DH5α para pUC57_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF**

La transformación se llevó a cabo utilizando 50 µL de células DH5α y 5 µL del gen sintetizado por GenScript para pUC57_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF.

- **Obtención de ADN plasmídico para pUC57_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF miniprep**

Se siguió el procedimiento descrito en la sección 4.5.2.2.

- **4.5.3.3 Digestión y purificación en gel de pGEX-4T-2 y de pUC57_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF**

- **Digestión de pGEX-4T-2**

Se siguieron los pasos descritos en la sección 4.5.1.1.

- **Digestión de pUC57_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF**

Enzimas de restricción a utilizar:

RsbP-PAS-R
•EcoRI

RsbP-PAS-F
•BamHI

Procedimiento para digestión de RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF

Tabla 13 Volúmenes de reacción para la digestión. Se muestran los volúmenes de los componentes utilizados para la digestión de RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF.

Volúmenes de reacción	(μ L)
pADN	20.0
10x amortiguador estándar	5.0
EcoRI	1.0
BamHI	1.0
Agua MQ	3.0
Volumen final	30.0

Se siguieron los pasos descritos previamente en la sección 4.5.2.3.

- **Purificación en gel de pGEX-4T-2 y RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF**

El proceso de purificación en gel y desalinización son los pasos descritos en la sección 4.4.5.

- **4.5.3.4 Ligación de pGEX-4T-2 y RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF**

Esta etapa se lleva a cabo para poder introducir el inserto RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF lineal al vector pGEX-4T-2. La reacción se llevó a cabo con diferente volumen (concentración) del inserto a 0, 2, 4 y 6 μ L, un volumen fijo de 2 μ L del vector lineal, 1 μ L de solución amortiguadora 10X y 1 μ L de la T4 ADN ligasa de la marca Invitrogen y se siguieron los pasos descritos en la sección 4.5.2.4.

- **4.5.3.5 Transformación en cepa *E. coli* DH5α para pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF y obtención de ADN plasmídico**
 - **Transformación en cepa *E. coli* DH5α para pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF**

La transformación se llevó a cabo utilizando 25 µL de células DH5α y 5 µL del producto de la ligación para pGEX-4T-2_RsbP-PAS__Bucle_GGDEF, se siguieron los pasos descritos en la sección 4.5.2.5.

- **Obtención de ADN plasmídico para pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF miniprep**

Se siguieron los pasos descritos en la sección 4.5.2.5.

- **4.5.3.6 Análisis de restricción para pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF**

Con el propósito de verificar que la secuencia de interés estuviera presente en las colonias transformantes se utilizaron las siguientes enzimas de restricción:



Procedimiento para el análisis de restricción de pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF

Tabla 14 Volúmenes de reacción para la digestión. Se muestran los volúmenes de los componentes utilizados para el análisis de restricción de la quimera 3 de RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF.

Volúmenes de reacción (µL)					
Componente	Colonia 1	Colonia 2	Colonia 3	Colonia 4	Colonia 5
pADN (1000ng)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
10x amortiguador estándar	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
EcoRI	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
BamHI	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Agua MQ	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Volumen final	10.0				

Se siguieron los pasos descritos en la sección 4.5.2.6.

4.6 Expresión de proteínas

➤ 4.6.1 Análisis de secuenciación de nucleótidos para las tres quimeras

Para corroborar que los transformantes seleccionados sean portadores del ADN recombinante se enviaron las muestras a “Eton Bioscience Inc.”, para llevar a cabo un análisis de secuenciación y determinar la identidad molecular de las construcciones.

Una vez confirmada la secuencia correcta se realiza un escalamiento de la expresión de proteínas.

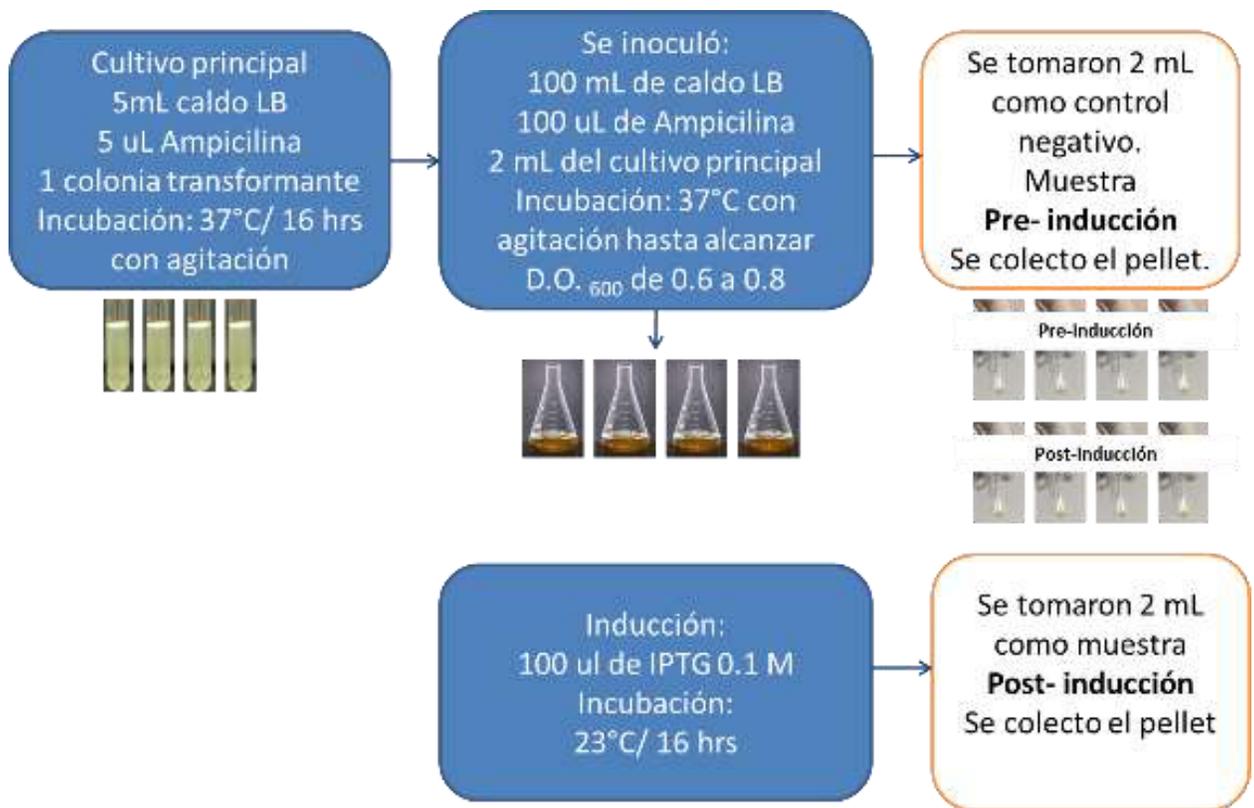
➤ 4.6.2 Transformación de células *E. coli* BL21(DE3)

Este procedimiento se utilizó a partir del pADN obtenido para las 3 quimeras. Inicialmente se descongelaron las células de *E. coli* BL21(DE3) en hielo. Se diluyó 1µL de pADN a

razón de 1:20 tomando 1 μ L del pADN obtenido en el miniprep con 19 μ L de agua MQ. Se tomaron los volúmenes indicados en la tabla 14 y se colocaron en eppendorf de 1.5mL, se siguieron los pasos para transformación de células DH5 α , descritos en la sección 4.5.1.3. con 20 μ L de células BL21(DE3) y 1 μ L del ADN plasmídico diluido.

➤ 4.6.3 Expresión piloto

Para evaluar la expresión de proteínas posterior al crecimiento de colonias transformantes se realizó una prueba piloto para determinar las condiciones de expresión para cada una de las proteínas quiméricas.



➤ **4.6.4 Gel de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante (SDS-PAGE) al 10%.**

En la técnica de SDS-PAGE, se mezclan las proteínas con un detergente anionico para formar complejos desnaturalizados, cargados negativamente. La relación final carga/masa queda constante para las distintas proteínas y estas van a ser separadas en el gel poroso con base en sus diferencias de peso molecular (PM): a menor tamaño, mayor movilidad de la proteína, y viceversa.

Preparación del gel separador (Inferior)	
Componente	Para 10mL Gel al 10% (uL)
H2O MQ	4100
Acrilamida al 30%	3300
Amortiguador 1.5M Tris-HCl pH 8.8	2500
10% SDS	100
10% APS	50
TEMED	5

Preparación del gel compactador (Superior)	
Componente	Para 10mL Gel al 10% (uL)
H2O MQ	4100
Acrilamida al 30%	3300
Amortiguador 0.5M Tris-HCl pH 6.8	2500
10% SDS	100
10% APS	50
TEMED	10

Preparación del gel separador (Inferior):

Se mezclaron las cantidades indicadas en la tabla previa adicionando por último el APS y el TEMED ya que estos permiten la polimerización del gel. Se vertió el gel en el molde y se añadieron 50uL de 2-butanol, para eliminar burbujas. Se dejó reposar hasta que polimerizó. Se retiró el 2-butanol por inversión y se enjuaga con agua destilada.

Preparación del gel compactador (Superior):

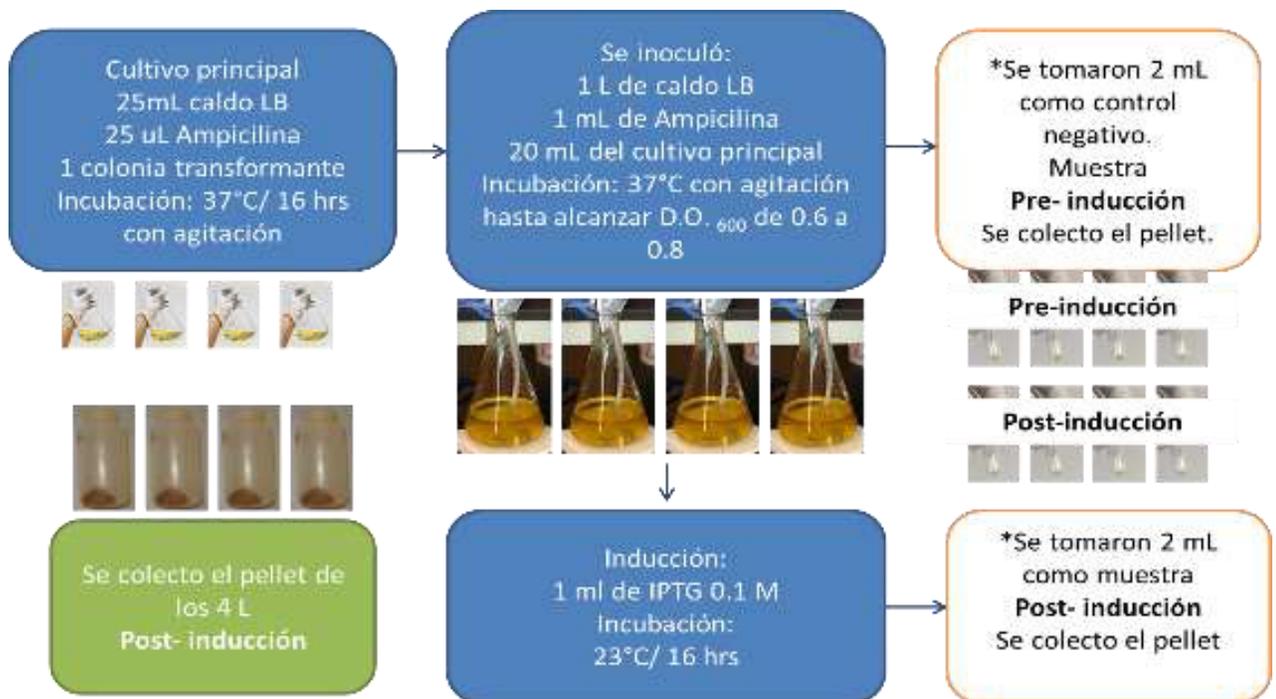
Se mezclaron las cantidades indicadas en la tabla previa adicionando por último el APS y el TEMED Se vertió el gel en el molde y se agregan los peines. Se dejó reposar hasta que polimerizó. Para utilizarlos se colocaron en la cámara electroforética.

Preparación de muestras

A partir del pellet que fue recolectado y resuspendido en agua, se adicionaron 25uL del amortiguador de muestra 4x. Los tubos se colocaron en agua hirviendo durante 10 minutos y posteriormente se dejaron atemperar. Finalmente se centrifugaron los tubos a 13000 RPM/10 min y se cargaron 10uL de muestra al gel de poliacrilamida al 10%.

➤ 4.6.5 Expresión a gran escala

Una vez definidas las condiciones de expresión se realiza el escalamiento.



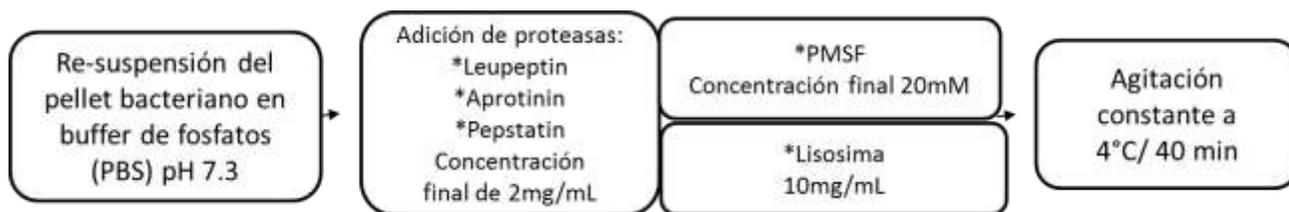
➤ 4.6.6 Lisis celular y obtención del clarificado

Una vez colectados los pellets bacterianos se llevó a cabo la extracción de la proteína de interés por medio de la obtención de un clarificado. La proteína de interés en un inicio estará ligada a nuestra proteína de fusión GST (Glutación S-Transferasa) en el interior de las células. La lisis celular generalmente conlleva junto a la liberación de la proteína, a la liberación de enzimas proteolíticas propias de las células que pueden digerir nuestra proteína de interés por lo que es necesario adicionar proteasas que inhiban a esas enzimas. Para la lisis celular se preparó una solución amortiguadora (PBS 1X) de fosfatos.

PBS 1X pH 7.3	
Componente	Concentración
NaCl	140 mM
KCl	2.7 mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1.8 mM
*DTT	10 mM

*Opcional

Procedimiento para llevar a cabo la lisis celular:



Pasados los 40 min y manteniendo todo en hielo se sometieron las células a ultra presión haciendo uso de la prensa francesa, la muestra fue pasada 4 veces hasta que se obtuvo una solución poco viscosa.

Obtención del clarificado

El lisado se centrifugó a 15000 x g durante 60 minutos a 4°C. Se colectó el sobrenadante. Se tomaron 100uL de muestra para posterior análisis en SDS-PAGE.

4.7 Purificación de proteínas

➤ 4.7.1 Cromatografía por afinidad y análisis de las fracciones colectadas

La purificación se llevó a cabo por medio de cromatografía por afinidad. Se utilizó el FPLC, “Akta Prime Plus”, de GE y la columna GSTrap FF 1mL de GE Healthcare, esta columna esta pre-empacada con glutatión y un ligando de 10 carbonos que permite la unión de proteínas con GST como proteína de fusión, producidas a partir de los vectores de expresión de la serie pGEX como es el caso de pGEX-4T-2, vector utilizado en nuestra clonación.

Las soluciones utilizadas para la cromatografía por afinidad se muestran a continuación:

PBS 1X pH 7.3	
Componente	Concentración
NaCl	140 Mm
KCl	2.7mM
Na ₂ HPO ₄	10 mM
KH ₂ PO ₄	1.8 mM
*DTT	10 mM

*Opcional

Tris HCl/NaCl pH 8.0	
Componente	Concentración
Tris-HCl	50 mM
NaCl	200mM
*DTT	10 mM

Primero se realizó un lavado de la columna y las líneas A y B del equipo con agua MQ, fría y previamente filtrada para poder eliminar el etanol al 20% en el cual se conservan la columna y las líneas del FPLC. Para las líneas se utilizaron 50mL de agua para el lavado y para la columna se utilizaron 15 volúmenes de columna.

Para realizar el equilibrio de la columna se pasaron 10 volúmenes de columna de PBS1X pH 7.3. Esta solución se hizo también pasar por la línea B, en la cual fue alimentada la muestra posteriormente. Para cargar la muestra se utilizó un flujo de 0.5ml/min.

Se colectó la fracción No Unida a la columna para poder corroborar que no se estuviese perdiendo la proteína. Una vez que la muestra se había pasado por la columna se realizó un lavado con 10 volúmenes de columna con PBS1X pH 7.3, hasta que ya no se veía muestra en el efluente. Se colectaron fracciones de lavado para posterior análisis en SDS-PAGE.

Para la recuperación de la proteína se utilizó el buffer de elución 50mM Tris-HCl con 10mM glutatión reducido pH 8.0 y flujo de 0.5ml/min. Se colectaron fracciones de 5mL para poder recuperar la proteína. Una vez eluida la proteína, se repitió el proceso de lavado con agua MQ fría y filtrada para la columna y las líneas A y B del FPLC utilizando las mismas cantidades que en un inicio. Finalmente se hizo pasar etanol al 20% por la columna y por las líneas A y B para su correcto almacenamiento.

Análisis de las fracciones colectadas

Para corroborar que los picos obtenidos en el cromatograma correspondan a la proteína de interés se analizaron las fracciones colectadas por medio de una electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE al 15% o 10%). Las fracciones en las cuales se encuentra la proteína de interés fueron colectadas en un tubo eppendorf de 15mL.

➤ 4.7.2 Cuantificación de proteína por método de Bradford

La cuantificación de proteína en todas las distintas etapas se llevó a cabo por medio del método de Bradford.

El reactivo de Bradford se preparó de la siguiente manera:

Compuesto	Cantidad
Azul de Coomassie G-250	5 mg
Etanol	2.5 mL
Ácido Fosfórico	5 mL
H ₂ O	Completar hasta 50 mL
Disolver y filtrar	

Preparación de curva estándar:

La curva estándar en todos los casos se preparó utilizando como referencia BSA 0.5mg/mL (Albúmina de Suero Bovino) y se preparó como se muestra a continuación:

Preparación estándares (Volumen final 1 mL)				
Standard	H ₂ O (uL)	BSA (uL)	Reactivo de Bradford (uL)	Concentración final (µg/mL)
1	800	0	200	0
2	790	10	200	5
3	780	20	200	10
4	770	30	200	15
5	760	40	200	20
6	750	50	200	25

Para realizar la cuantificación de la proteína de interés se adicionaron en cubetas desechables marca "Brand", la cantidad de H₂O, BSA y el reactivo de Bradford indicados en la tabla superior. Posteriormente se utilizó el vortex para mezclar los componentes en cada cubeta y se dejó reposar durante 5 minutos. La medición se realizó por triplicado para la curva estándar, haciendo uso del espectrofotómetro UV-visible marca "Cary 50 Bio" a 595nm.

Preparación de las muestras

Por triplicado, se tomaron 20uL de muestra y se diluyeron en 780uL de agua MQ se adicionaron 200uL del reactivo de Bradford, las muestras se agitaron en el vortex y se dejaron reposar durante 5 minutos previo a la medición en el espectrofotómetro.

➤ **4.7.3 Diálisis**

Para eliminar el exceso de glutatión reducido se realizó un cambio de solución amortiguadora por medio de una diálisis. La proteína de interés se encuentra en solución amortiguadora Tris-HCl, 50mM glutatión reducida, y se dializa contra PBS1X pH 7.3.

Para la diálisis se hizo uso de un casete de 10kDa marca "Thermo scientific" con capacidad para 12mL de solución. Antes de cargar la muestra se hidrató la membrana del casete sumergiéndolo durante 10 minutos en la solución amortiguadora para diálisis. Los cambios de la solución amortiguadora se realizaron a las 3, 18 y 21 horas, todo el tiempo se mantuvo la muestra en refrigeración a 4°C.

➤ **4.7.4 Ruptura de la unión proteína de fusión/proteína de interés**

Con el propósito de obtener la proteína de interés y eliminar la proteína de fusión Glutatión S- transferasa (GST) es necesario romper el sitio de unión es decir la secuencia de aminoácidos que existe entre GST y la proteína de interés, esta ruptura se realiza haciendo uso de una proteasa específica, la trombina.

La trombina con una concentración de 500 unidades (U) fue resuspendida en 500 µL de PBS 1X obteniendo como concentración final 1 U/µL. La recomendación del proveedor

para el uso de la trombina es de 1U de trombina por cada 100ug de proteína de fusión-proteína de interés.

En un tubo Falcon de 15mL, se colocó 2mL de muestra con 60uL trombina a temperatura ambiente, 22 °C durante 16 horas. Se hicieron muestreos de 50 µL a las 1, 2, 4, 6 y 16 horas de incubación. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE al 15%.

➤ **4.7.5 Remoción de la proteína de fusión**

Con el fin de separar la proteína de fusión GST de la proteína de interés, se llevó a cabo una segunda cromatografía por afinidad, utilizando la resina comercial Glutathione Sepharose 4B de GE Healthcare.

El equilibrio de la columna se llevó a cabo con 5 volúmenes de columna de PBS1X. Se cargó la muestra y se dejó incubar durante 40 minutos para aumentar el tiempo de contacto entre GST y la resina a temperatura ambiente.

Finalmente se colectaron las fracciones al pasar la muestra, donde se espera encontrar la proteína de interés, fracciones de lavado con PBS 1X y fracciones de lavado con la solución amortiguadora de elución donde se espera encontrar solamente a GST.

Las fracciones se analizaron por medio de SDS-PAGE.

Para limpiar la columna se pasaron 10 volúmenes de columna de agua MQ y 10 volúmenes de columna con etanol al 20% para almacenar y preservar la resina para usos posteriores.

➤ **4.7.6 Diálisis**

Para poder realizar un cambio de solución amortiguadora y preparar la muestra para la cromatografía de exclusión por tamaño se realizó una diálisis.

La solución amortiguadora para diálisis (Tris/HCl/NaCl) se preparó como se muestra a continuación:

Tris HCl/NaCl pH 8.0	
Componente	Concentración
Tris-HCl	50 mM
NaCl	200mM
*DTT	10 mM

Para la diálisis se siguió el procedimiento descrito en la sección 4.7.3

➤ **4.7.7 Cuantificación de proteína**

La proteína pura fue cuantificada por el método de Bradford siguiendo los pasos descritos en la sección 4.7.2.

4.8 Determinación de la estructura cuaternaria

La estructura cuaternaria de las proteínas se determinó por medio de cromatografía de exclusión por tamaño. Se empleó la columna Superdex 75 10/300 GL utilizando el equipo Äkta Primeplus.

La solución amortiguadora utilizada contiene 50mM Tris-HCl y 200mM NaCl. Su preparación se describió en la sección 4.7.6.

Los estándares utilizados fueron:

Estándares utilizados	
Standard	Peso Molecular
Aprotinina	6500
Ribonucleasa A	13700
Anhidrasa carbonica	29000
Ovalbuina	44000
Canalbumina	75000
Azul dextran	Void volume (Vo)
Volumen de columna	(Vc) 24MI

Primero se realizó un lavado de la columna con agua MQ, fría y filtrada, esto para eliminar el etanol al 20% en el cual se mantiene a la columna almacenada.

La columna se equilibró con 2 volúmenes de columna de la solución amortiguadora para SEC. Para determinar el volumen muerto de la columna (Vo) se pasó el azul dextran y posteriormente se hizo pasar una mezcla con los estándares (indicados en la tabla superior) de peso molecular conocido. Con base en el cromatograma se determinó el volumen de elución para cada uno de los estándares.

Para la determinación del peso molecular de cada una de las proteínas quiméricas, se realizaron 2 preps para un mínimo de cuatro corridas para cada proteína quimérica y poder contar con repetibilidad del resultado.

Para poder determinar que el pico observado en el cromatograma pertenece a la proteína de interés, se colectaron fracciones de 2mL durante la cromatografía de exclusión por tamaño, estas fracciones fueron evaluadas por medio de SDS-PAGE al 15%.

CAPITULO 5

5 Resultados

5.1 Diseño de las quimeras

Características principales, secuencias de aminoácidos y secuencias de ADN de las proteínas a expresar, purificar y caracterizar

➤ 5.1.1 Quimera 1: RsbP-PAS_PASa

PAS_PAS alternativo (Quimera 1)



RsbPPAS_PASa

Peso Molecular (bp): 708

Peso Molecular (Da): 26,111.2

pI: 4.98

DOMINIOS



RsbP-PAS
Bacillus subtilis (cepa 168)



Dominio PAS alternativo
(No homólogo a RsbP-PAS)
PhyA – Fitocromo A

Secuencia de aminoácidos

MDKQLNDAPCGFLALSEEGSIIAANRTLKILDYEPEQVIGQHMMNMLTIPAQLFCQLYFFPLLKLEHHIEEIYISLK
ARDGEEIPVLINAIARHDSGASVFDCVLIPMR
GLAELQAVTSEMVRMETATVPILAVDGNGLVNGWNQKAAELTGLRVDDAIGRHILTLVEDSSVPVVQRMLYL
ALQGKEEKEVRFEVKTHGPKRDDGPVILVVNACASRDLDHVVGVCFVAQDMT

Secuencia de ADN

```
ATGGACAAACAATTGAATGATGCACCATGCGGTTTCCTCGCTTTGTCAGAAGAGGGGTCG
ATCATAGCTGCCAACCGCACCCCTTATCAAGATTCTGGATTATGAACCGGAGCAGGTTATC
GGCCAGCACATGAATATGATGTTGACCATCCCGCGCAGCTTTTCTGCCAGCTTTATTTT
TTCCGCTTTTCAAATTGGAGCATCACATCGAAGAAATACATTTCCCTGAAAGCAAGA
GATGGAGAAGAAATCCCGTCCTTATCAATGCTATTGCGAGACACGATAGCGGGGCTTCT
GTCTTTGATTGTGTTCTGATTCCAATGCGAGGGCTTGCTGAACTGCAGGCCGTGACCAGTCAAATGGTTCGT
CTAATGGAAACAGCAACTGTTCCAATCTTGGCAGTAGATGGCAATGGACTGGTCAACGGGTGGAATCAGAA
AGCAGCGGAGTTGACTGGGCTAAGAGTTGATGATGCAATTGGAAGGCACATACTTACCCTGTGGAGGAC
TCCTCTGTACCAGTTGTCCAGAGGATGCTATATCTAGCTCTGCAGGGTAAAGAAGAGAAGGAAGTTCGATT
TGAGGTAAAGACTCATGGCCCGAAGAGGGATGATGGTCCAGTTATCTTGGTTGTGAATGCTTGTGCCAGTC
GGGACCTTCATGATCATGTTGTTGGAGTGTGCTTTGTTGCCCAAGATATGACT
```

➤ 5.1.2 Quimera 2: RsbP-PAS_Bucle_GGDEF

PAS_bucle enrollado_GGDEF (Quimera 2)



RsbPPAS_Bucle_GGDEF

Peso Molecular (bp): 975
Peso Molecular (Da): 36767.0
pI: 5.16

DOMINIOS



RsbP-PAS
Bacillus subtilis (cepa 168)



GGDEF
Bacillus sp. B14905



Bucle enrollado
Bacillus sp. B14905

Secuencia de aminoácidos (Utilizando el bucle enrollado de A3ICR1 (*Bacillus sp.*))

```
MDKQLNDAPCGFLALSEECSIAANRTLKILDYEPEQVIGQHMMNMLTIPAQLFCQLYF
FPLLKLEHHIEEIYISLKARDGEEIPVLINAIARHDSGASVFDCVLIPMRK
RIDYEQELR SAKKLEAAYQEKEQALANLEQIHVEIEQQQAKLLAVNATLIELSET
DKLTGLKNRRFFQ DKLEQQLNSYYESAKPFLCILDIDHFKKVNDTFGHQVGGDDVLAQLAQLLTQRARKEDTV
ARYGGEEFVMILPETEIAAAKELGEQIRKTVALDHWPAQVVTISIGMATVTS EDTGTTLL
KNADDALYASKNGRNQVTHFFDMK
```

Secuencia de ADN

```
ATGGACAAGCAGCTGAACGATGCGCCGTGCGGTTTCCTGGCGCTGAGCGAGGAAGGCAGCATCATTGCGGCGAAC
CGTACCCTGATCAAAATTCTGGACTIONGAGCCGGAACAAGTGATCGGTCAGCACATGAACATGATGCTGACCATT
CCGGCGCAACTGTTTTGCCAGCTGTACTTCTTTCCGCTGCTGAAGCTGGAGCACCACATCGAGGAAATCTATATT
AGCCTGAAAGCGCGTGACGGCGAGGAAATCCGGTCTGATCAACGCGATTGCGCGTCATGACAGCGGTGCGAGC
GTGTTTCGATTGCGTTCGATCCCGATGCGTAAGCGTATTGATTACGAGCAAGAAGTGCCTAGCGCGAAGAACTG
CTGGAGGCGGCGTATCAAGAGAAGGAACAGGCGCTGGCGAACCTGGAACAGATCCACGTGGAGATTGAACAGCAA
CAGGCGAAACTGCTGGCGGTTAACGCGACCCTGATCGAGCTGAGCGAAACCGACAAGCTGACCGGTCTGAAAAAC
CGTCGTTTCTTCAAGATAAGCTGGAGCAACAGCTGAACAGCTACTATGAAAGCGCGAAACCGTTCAGCCTGTGC
ATCCTGGACATTGATCACTTCAAGAAAGTGAACGACACCTTTGGTCACCAAGTGGGCGACGATGTTCTGGCGCAA
CTGGCGCAGCTGCTGACCCAGCGTGCGCGTAAAGAGGATACCGTGGCGCGTTACGGTGGCGAGGAAATTTGTATG
ATCCTGCCGGAGACCGAAATTGCTGCGGCGAAGGAGCTGGGCGAACAAATCCGTAAAACCGTGGCGCTGGACCAC
TGGCCGGCGGGTCAGGTGACCATCAGCATTGGCATGGCGACCGTTACCAGCGAAGA TACCGGCAACCCCTGCTG
AAGAACGCGGACGATGCGCTGTATGCGAGCAAGAAAAACGGCCGTAACCAGGTTACCCACTTCTTTGATATGAAA
TAA
```

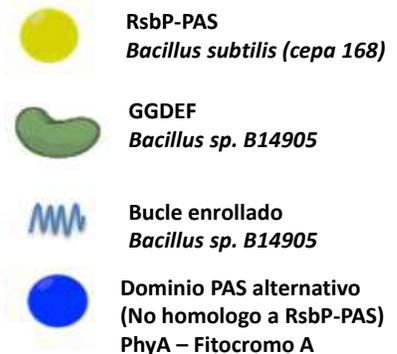
➤ 5.1.3 Quimera 3: RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF

PAS_PAS alternativo_Bucle_GGDEF (Quimera 3)



Peso Molecular (bp): 1263
Peso Molecular (Da): 47100.8
pI: 4.99

DOMINIOS



Secuencia de aminoácidos

```
MDKQLNDAPCGFLALSEECSIIAANRTLKILDYEPEQVIGQHMNMMLTIPAQLFCQLYFFPLLKLEHHIEEIIYISLK
ARDGEEIPVLINAIARHDSGASVDFCVLIPMREFPGRGLAELQAVTSEMVRMETATVPILAVDGNGLVNGWN
QKAAELTGLRVDDAIGRHILTLVEDSSVPVVQRMLYLALQGKEEKEVRFVVKTHGPKRDDGPVILVVNACASRDL
HDHVVGVCFAQDMTRDDYEEELQDIKERLEEAYITDKLTGLKNRRFFQDKLEQQLNSYYESAKPFLCILDIDHF
KKVNDTFGHQVGGDDVLAQLAQLLTQRARKEDTVARYGGEEFVMILPETEIAAAKELGEQIRKTVALDHWPAQG
VTISIGMATVTS EDTGTTLLKNADDALYASKKNGRNQVTHFFDMK
```

Secuencia de ADN

ATGGACAAGCAGCTGAACGATGCGCCGTGCGGTTTCTGGCGCTGAGCGAGGAAGGCAGCATCATTGCGGCGAAC
CGTACCCTGATCAAAAATTCTGGATTACGAACCGGAGCAGGTGATCGGTCAACACATGAACATGATGCTGACCATT
CCGGCGCAGCTGTTTTGCCAACTGTACTTCTTCCGCTGCTGAAGCTGGAACACCACATCGAGGAAATCTATATT
AGCCTGAAAGCGCGTGACGGCGAGGAAATCCGGTCTGATCAACCGGATTGCGCGTCATGACAGCGGTGCGAGC
GTGTTCGATTGCGTTCTGATCCCGATGCGTGAATTTCCGGGTGCTGGCCTGGCGGAGCTGCAGGCGGTGACCAGC
GAAATGGTTCGTCGATGGAGACCGCGACCGTGCCGATTCTGGCGGTTGATGGTAACGGCTGGTGAACGGTTGG
AACAAAAGGCGGCGGAACTGACCGGTCTGCGTGTGACGATGCGATCGGCCGTACATTCTGACCCTGGTGGAG
GACAGCAGCGTTCCGGTGGTTCAGCGTATGCTGTATCTGGCGCTGCAAGGCAAAGAGGAGAAAGAAGTGC GTTTC
GAGGTTAAGACCCACGGTCCGAAACGTGACGATGGCCCGGTGATCCTGGTGGTTAACCGGTGCGCGAGCCGTGAC
CTGACGATCACGTGGTGGTGTGCTTGTGGCGAGGACATGACCCTGACGATTACGAGGAAGAGCTGCAA
GACATCAAGGAGCGTCTGGAAGAGGCGTATATTACCGACAAGCTGACCGGCCTGAAAAACCGTCGTTCTTTCAG
GATAAGCTGGAACAGCAACTGAACAGCTACTATGAGAGCGCGAAACCGTTCAGCCTGTGCATCCTGGACATTGAT
CACTTCAAGAAAAGTTAACGATACCTTGGTACCAAGTGGGCGACGATGTTCTGGCGCAGCTGGCGCAACTGCTG
ACCCAACGTGCGCGTAAAGAAGACACCGTGGCGCGTTACGGTGGCGAAGAGTTTGTATGATECTGCCGAAAACC
GAGATTGCTGCGGCGAAGGAACTGGGCGAGCAGATCCGTAAAACCGTGGCGCTGGATCACTGCGCGCGGGTCAA
GTGACCATCAGCAATTGGCATGGCGACCGTTACCAGCGAGGACACCGGCACCACCOCTGCTGAAGAAGCGCGGACG
ATGGCGCTGTAAGCGAGCAAGAAAAACGGCGGTAAACCAAGTTAGCCACTTCTTTGACATGAAATAA

Fuentes

RsbP (*Bacillus subtilis*)

MDKQLNDAPCGFLALSEECSIIAANRTLKILDYEPEQVIGQHMMNMLTIPAQLFCQLYF
FPLLKLEHHIEEIIYSLKARDGEEIPVLINAIARHDSGASVFDCVLIPMRKRNEYENELL
IARNEAQEALLAKQKANAELIALETLKAKQEELLEINKQNQQFKLNTKRELELARKIQK
NSLTEPIVNDQVQIDSYYNASSELSGDLYGYYQIDEHRYGIIILDVMGHGISSALITMSL
HPLFQRQITQGLSPVKVMKELDRHLHSLFQNDDEARHYCTAIYLEIDIARQRIDYVNAGH
PPALWQDDSGTQHLLHATSPPIGMFEDLEFQSSSLSYTEDGRLLLYTDGVMDPTASCYLF
DLLKDHDPSPADLKEKILTSLQHQKEAHHKSDDECFILVDVK

A3ICR1 (*Bacillus sp.*)

MEQRLNDAPCGFLSITHEGVIAEVNHTLLNWIGFEQVDLLQQHLEVLLSTANKLIFHSYF
YPMINLEQQVEELFIHLKHKEGMAIPFLMNARLYKEDTVERIDCILVKMQKRIDYEQELR
SAKKLLEAAAYQEKEQALANLEQIHVEIEQQQAKLLAVNATLIELSETDKLTGLKNRRFFQ
DKLEQQLNSSYYESAKPFLSLCILDIDHFKKVNDTFGHQVGGDDVLAQLAQLLTQRARKEDTV
ARYGGEEFVMILPETEIAAAKELGEQIRKTVALDHWPAGQVTISIGMATVTS EDTGTTLL
KNADDALYASKKNRNRNQVTHFFDMK

5.2 ADN genómico

➤ 5.2.1 Amplificación del ADN genómico para RsbP-PAS y PAS alternativo

Se obtuvo la secuencia de interés para RsbP-PAS a partir del ADN genómico extraído de *B. subtilis* y para el dominio PAS alt se utilizó una construcción previa. Mediante el gel de agarosa al 0.7% mostrado en la figura 9 se observan las bandas correspondientes a cada una de las secuencias amplificadas. RsbP-PAS tiene un peso molecular de 330pb y PAS alt (PAS1 del PhyA) tiene un peso molecular de 378 pb.

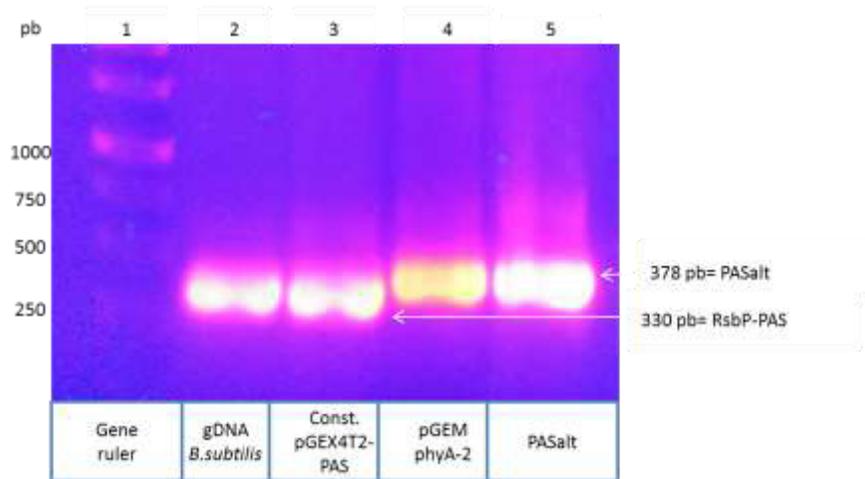


Figura 9 Amplificaciones de las secuencias de interés

En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular. En los carriles 2 y 3 se observa la banda que pertenece a la secuencia de interés del dominio PAS de RsbP. En los carriles 4 y 5 se observa la banda que pertenece al dominio PAS alt.

5.3 Construcción de plásmidos

➤ 5.3.1 Quimera 1: pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PAS alternativo

○ 5.3.1.1 Conteo de colonias transformantes

Conteo celular de las colonias transformantes de pGEX-4T-2_RsbP-PAS en cepa *E. coli* DH5α.

	A (uL) Control negativo	B (uL)	C (uL)	D (uL)
Conteo de colonias	15	90	130	50

○ **5.3.1.2 Obtención de ADN plasmídico para pGEX-4T-2_RsbP-PAS**

Lecturas de concentraciones obtenidas de ADN plasmídico para miniprep, haciendo uso del nanodrop 2000, marca “Thermo scientific”.

✓ pGEX-4T-2_RsbP-PAS colonia 1= 149.8ug/mL

✓ pGEX-4T-2_RsbP-PAS colonia 2= 270.3ug/ML

○ **5.3.1.3 Análisis de restricción de los transformantes para pGEX-4T-2_RsbP-PAS**

Para la verificación del inserto RsbP-PAS en los transformantes se llevó a cabo un análisis de restricción, en la figura 10 se observa el resultado positivo con una banda a 330 pb correspondiente a RsbP-PAS.

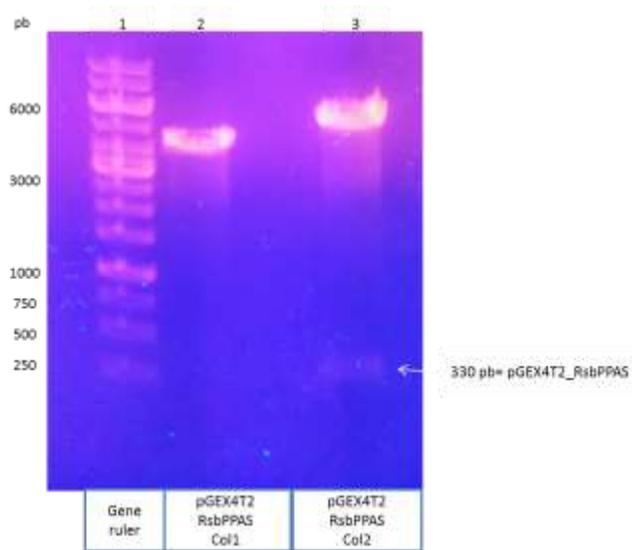


Figura 10 Gel de agarosa para RsbP-PAS.

El carril 1 muestra el marcador de peso molecular, los carriles 2 y 3 corresponden al producto de la digestión del ADN plasmídico para 2 transformantes. Se observa un resultado negativo en el carril 2 y un resultado positivo en el carril 3.

○ **5.3.1.4 Transformación en cepa *E. coli* DH5α para pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASalt**

Una vez obtenidas las colonias transformantes se obtuvo el siguiente conteo celular.

	A (uL) Control negativo	B (uL)	C (uL)	D (uL)	E (uL) Control negativo
Conteo de colonias	95	150	45	118	3

- **5.3.1.5 Obtención de ADN plasmídico para pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PAS alternativo**

Lecturas de concentraciones obtenidas de ADN plasmídico para minipreps, haciendo uso del nanodrop 2000, marca “Thermo scientific”.

La concentración obtenida de ADN plasmídico para cada miniprep:

- ✓ pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASalt colonia 1= 171.0ug/mL
- ✓ pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASalt colonia 2= 179.7ug/mL
- ✓ pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASalt colonia 3= 244.3ug/mL
- ✓ pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASalt colonia 4= 239.5ug/mL

- **5.3.1.6 Análisis de restricción para pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASa**

Con el objetivo de comprobar que los transformantes seleccionados sean portadores del ADN recombinante se llevó a cabo un análisis de restricción haciendo uso del ADN plasmídico. La figura 11 muestra el resultado positivo para 3 de las colonias comprobándose con la banda a 708 pb correspondientes a RsbP-PAS_PASa.

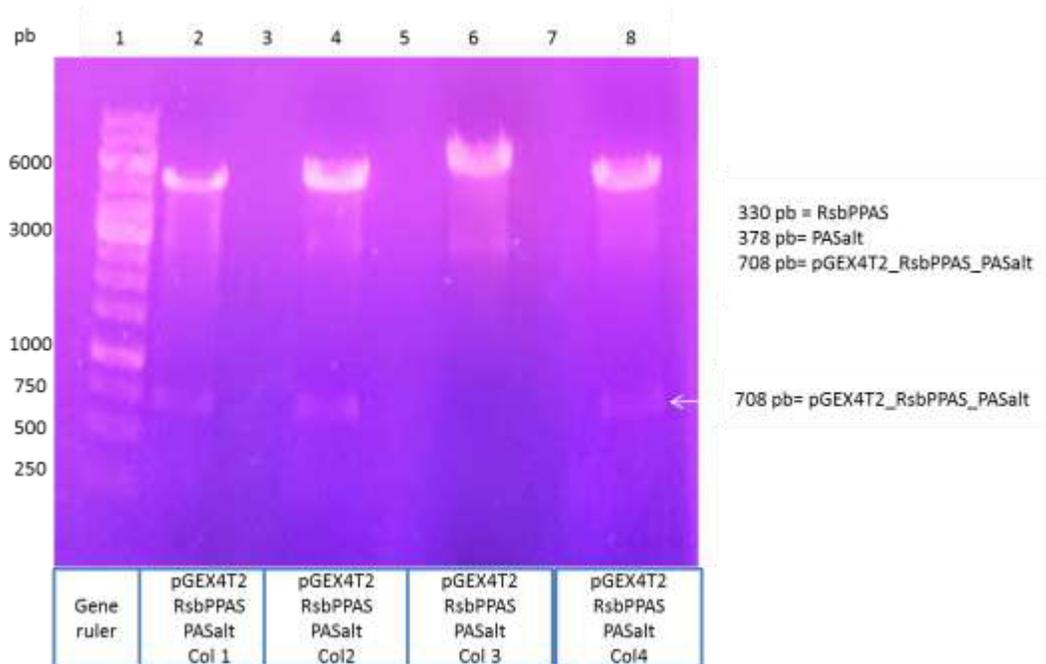


Figura 11 Análisis de restricción para RsbP-PAS_PASalt

En el carril 1 se encuentra el marcador de peso molecular. Los carriles 2,4 y 8 muestran un resultado positivo con la banda a 708pb. El carril 6 se califica como negativo al no mostrar la banda de interés.

➤ **5.3.2 Quimera 2: pGEX-4T-2_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF**

○ **5.3.2.1 Digestión de pGEX-4T-2 y pUC57_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF**

Con el objetivo de comprobar que los transformantes seleccionados sean portadores del ADN recombinante de interés se llevó a cabo una digestión del vector y de pUC57_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF y se corroboró la presencia de los genes por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.0%. En la figura 12 se observa el resultado del análisis.

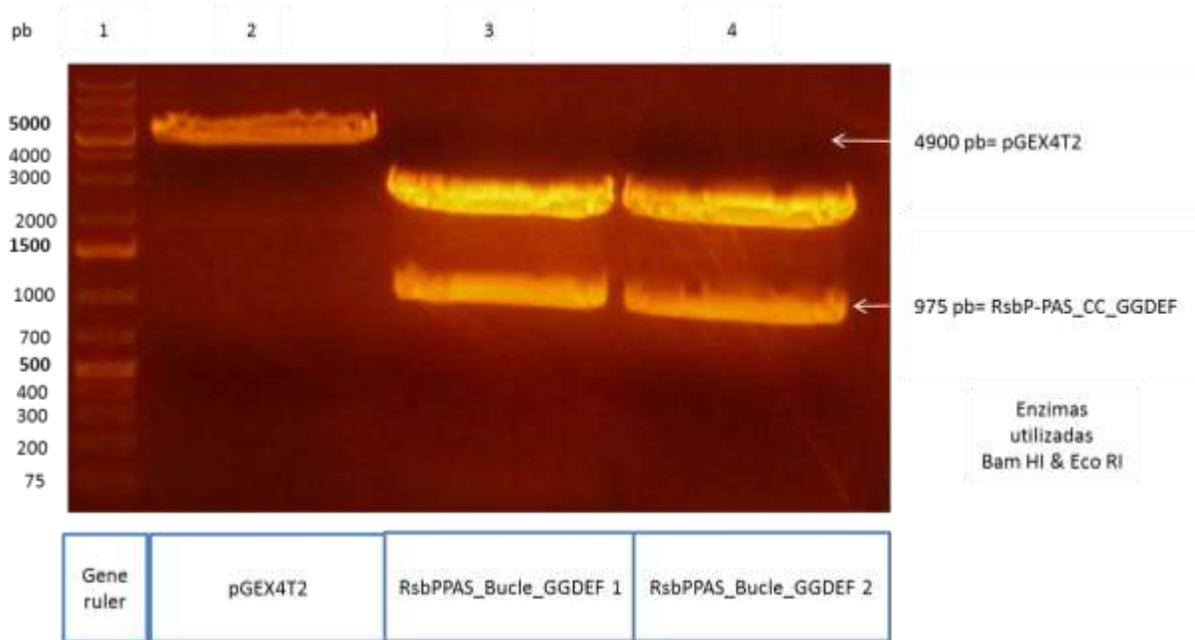


Figura 12 Gel de agarosa al 1.0% RsbP-PAS_Bucle_GGDEF

En el carril 1 se cargó el marcador de peso molecular, en el carril 2 se observa un resultado positivo para la digestión del vector con un peso molecular de 4900pb y en los carriles 3 y 4 se observa un resultado positivo para la presencia de la secuencia de interés para RsbP-PAS_Bucle_GGDEF con un peso molecular de 975pb.

○ **5.3.2.2 Análisis de restricción para pGEX-4T-2_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF**

En la figura 13 se observa el resultado del análisis de restricción para la quimera 2. La banda esperada para la secuencia de interés es de 975 pb.

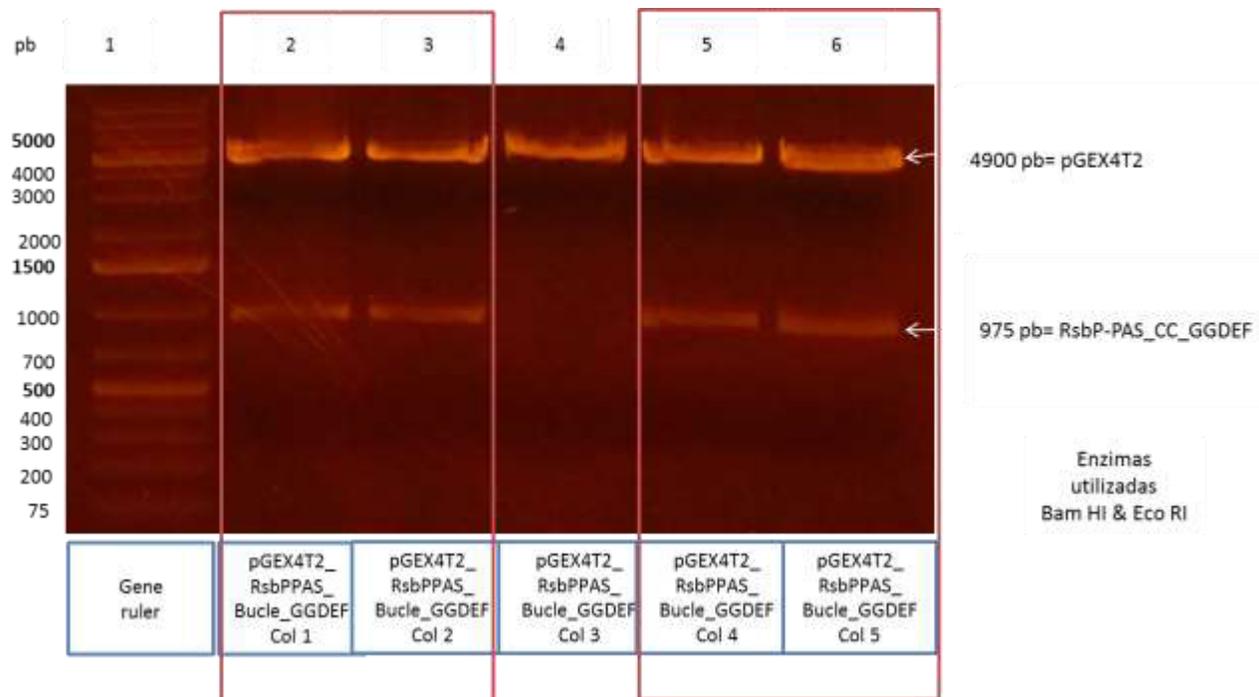


Figura 13 Análisis de restricción para RsbP-PAS_Bucle_GGDEF

En el carril 1 se cargó el marcador de peso molecular en los carriles 2 al 6 se cargó el pADN para las 5 colonias seleccionadas durante el análisis de restricción, se puede observar un resultado positivo para los carriles 2,3,5 y 6.

➤ 5.3.3 Quimera 3: pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF

○ 5.3.3.1 Digestión de pGEX-4T-2 y pUC57_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF

Con el objetivo de comprobar que los transformantes seleccionados sean portadores del ADN recombinante de interés se llevó a cabo una digestión y se corroboró la presencia de los genes por medio de electroforesis en gel de agarosa al 1.0%. En la figura 14 se observa el resultado de la digestión del vector de trabajo y de la secuencia de interés para la quimera 3.

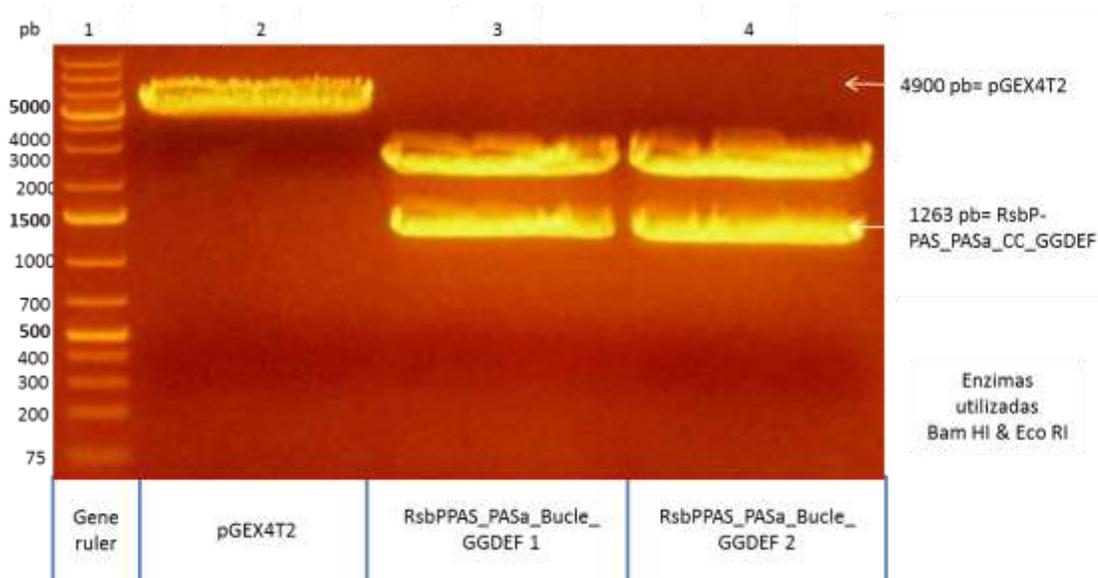


Figura 14 Digestión para pGEX-4T-2 y RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF

En el carril 1 se cargó el marcador de peso molecular, en el carril 2 se cargó el producto de la digestión del vector con un peso molecular de 4900pb y en los carriles 3 y 4 se cargó el producto de la digestión de la secuencia de interés para RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF con un peso molecular de 1263pb.

○ **5.3.3.2 Análisis de restricción para pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF**

En la figura 15 se observa una banda a 4900 pb que corresponde al vector de trabajo y una banda a 1263 pb que corresponde a la secuencia de interés para la quimera 3.

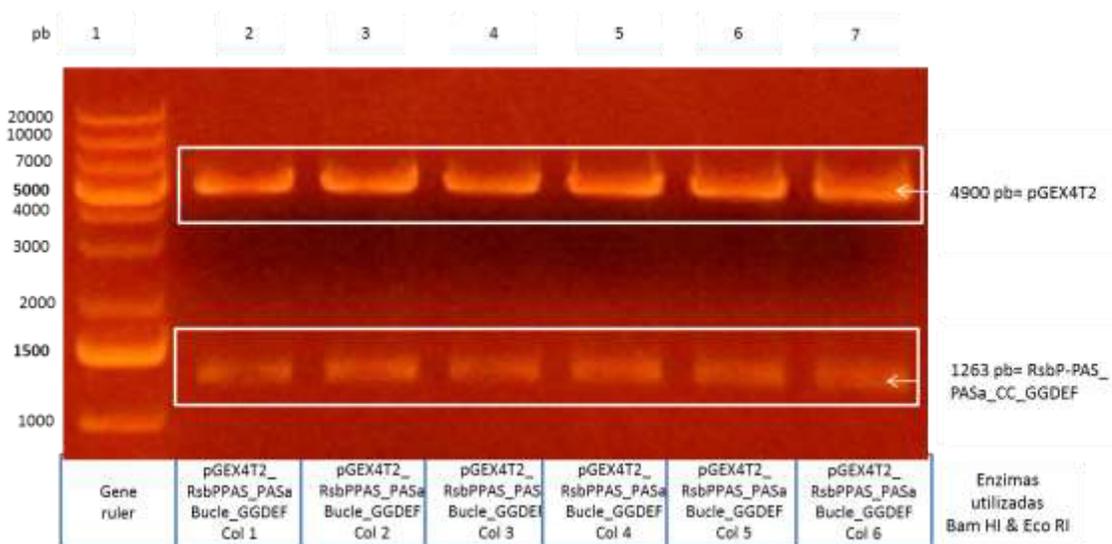


Figura 15 Análisis de restricción para RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF

En el carril 1 se cargó el marcador de peso molecular en los carriles 2 al 7 se observa el resultado positivo para pADN para las 6 colonias seleccionadas.

5.4 Análisis de secuenciación

➤ **5.4.1 Análisis de secuenciación para la Quimera 1:**

pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PAS alternativo

En la figura 16 se observa el resultado positivo para la comparación de la secuencia real vs obtenida (resultado obtenido del análisis de secuenciación de Eton Bioscience Inc.)

En dirección 5' (Se utilizó el programa aPe- A Plasmid Editor)

```
Comparison secuencia real vs secuencia obtenida dirección 5'
Fri Sep 18, 2015 12:21 -0500DNA from 1 to 726to_002_PAS1_5_E07.ab1-- Matches:726; Mismatches:0; Gaps:293; Unattempted:0
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1>ATGGACAACAATTGAATGATGCACCATGCGGTTTCCTCGCTTTGTCAGAAGAGGGGTGATCATAGCTGCCAACCGCACCCCTATCAAGATTCTGGATT>100
35>ATGGACAACAATTGAATGATGCACCATGCGGTTTCCTCGCTTTGTCAGAAGAGGGGTGATCATAGCTGCCAACCGCACCCCTATCAAGATTCTGGATT>134
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
101>ATGAAACCGGAGCAGGTTATCGGCCAGCACATGAATATGATGTTGACCAATCCCGCGCAGCTTTTCTGCAGCTTTATTTTTTTCGCTTTTGAAATTGGA>200
135>ATGAAACCGGAGCAGGTTATCGGCCAGCACATGAATATGATGTTGACCAATCCCGCGCAGCTTTTCTGCAGCTTTATTTTTTTCGCTTTTGAAATTGGA>234
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
201>GCATCACATCGAAGAAATATACATTTCCTGAAAGCAAGAGATGGAGAAAGAAATTCCTGCTTATCAATGCTATTGCGAGACACGATAGCGGGGCTTCT>300
235>GCATCACATCGAAGAAATATACATTTCCTGAAAGCAAGAGATGGAGAAAGAAATTCCTGCTTATCAATGCTATTGCGAGACACGATAGCGGGGCTTCT>334
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
301>GTCCTTGATTGTGTTCTGATTCCAAATGCGAGAATTCCCGGGTCGACGAGGGCTTGCTGAACTGCAGGCCTGACCAATGAAATGGTTCGTCTAATGGAAA>400
335>GTCCTTGATTGTGTTCTGATTCCAAATGCGAGAATTCCCGGGTCGACGAGGGCTTGCTGAACTGCAGGCCTGACCAATGAAATGGTTCGTCTAATGGAAA>434
      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
401>CAGCAACTGTTCCAATCTTGGCAGTAGATGGCAATGGACTGGTCAACGGGTGGAATCAGAAAGCAGCGGAGTTGACTGGGCTAAGAGTTGATGATGC AAT>500
435>CAGCAACTGTTCCAATCTTGGCAGTAGATGGCAATGGACTGGTCAACGGGTGGAATCAGAAAGCAGCGGAGTTGACTGGGCTAAGAGTTGATGATGC AAT>534
```

```

501>TGGAAGGCACATACTTACCCCTTGTGGAGGACT CCTCTGT ACCAGTTG TCCAGAG GATGCTA TATCTAG CTCTGCAG GGTAAAG AAGAGAA GGAAGTT CGA>600
535>TGGAAGGCACATACTTACCCCTTGTGGAGGACT CCTCTGT ACCAGTTG TCCAGAG GATGCTA TATCTAG CTCTGCAG GGTAAAG AAGAGAA GGAAGTT CGA>634

601>TTTGAGGTAAGACTCATGGCCCGAAGAGGGA TGATGGT CCAATTAT CTTGGTT GTGAATG CTTGTGC CAGTCGGGACCTTCA TGATCAT GTTGTGGAG>700
635>TTTGAGGTAAGACTCATGGCCCGAAGAGGGA TGATGGT CCAATTAT CTTGGTT GTGAATG CTTGTGC CAGTCGGGACCTTCA TGATCAT GTTGTGGAG>734

701>TGTGCTTTGTTG--CC-----C--AAG-----AT----A-TGA----->724
735>TGTGCTTTGTTGCCAGATATGCCAAGCGCGCATCGTGATGACTGACGACTCTGCTCGCGCGTTTCGGGATGACGGGGGAAAACCTCTGACACAT>834

724>----->724
835>CCAGTCTCGGAGCGGTCAACGCTTGTCTGTAACCGATGCCGGGATCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCTGGGTGTTGGCGGTGTGGGGGCGCAGCT>934

725>-----CT>726
935>ATGACCCAATCCGTAGCGATAGGGAGGTATATTTCTTGATAACGAAAGGGGCCCGGATACGCCTTTTTTTGGTCTTGTCTTGATATTAAGGGTCT>1032

```

En dirección 3'

Comparación secuencia real vs secuencia obtenida dirección 3'

Fri Sep 18, 2015 12:22 -0500DNA from 1 to 726to_001_PAS1_3_D07.seq-- Matches:726; Mismatches:0; Gaps:374; Unattempted:0

```

1>A-----T-G-----GA--C--AAA-----C-A--AT-----TG--A-A-----TGAT--G-----CA-C-----CA>27
1>AGTTATTCTTTCCAAACTACTGCATGCGAAAATGTTCCAAGATCGTTTTGTCAAAAAACATATTTAAATGGTGATCGTTAAACCACTTGACTTCA>100

28>TG-----C----->30
101>TGTTGTATGCCTCTTGAATGTTGTTTTATACATGGACCCAATGTGCCTGGATGCGTCCCAAAATAGTTTGTTTAAAAAACGTATTGAAGCTATCCCAT>200

30>----->30
201>AAATTGATAAGTACCTTGAAATCCAGCAAATATATAGCATGGCCTTTGCAGGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTGGTGGCGACCATCTTCCAAAATCGGATC>300

31>-----GGTTTCCTCGCTTGTGCAGAAGAGGGGT CGATCAT AGCTGCCAAACCGCA CCC>82
301>TGGTCCGCGTGGATCCATGGACAAACAATTGAATGATGCACCATGCGGTTTCCTCGCTTGTGCAGAAGAGGGGTCGATCATAGCTGCCAAACCGCACCC>400

83>TTATCAAGATTCTGGATTATGAACCGGAGCAGGTTATCGGCCAGCACATGAATA TGATGTT GACCAIT CCCGCGCAGCTTTTTC TGCCAGCTTTTATTT TTT>182
401>TTATCAAGATTCTGGATTATGAACCGGAGCAGGTTATCGGCCAGCACATGAATA TGATGTT GACCAIT CCCGCGCAGCTTTTTC TGCCAGCTTTTATTT TTT>500

183>TCCGCTTTTGAAAATGGAGCATCACATCGAAGAAAATATA CATTCCCTGAAAAGC AAGAGAT GGAGAAG AAAATCCC GTCCTTA TCAATGCTATTGCGAGA>282
501>TCCGCTTTTGAAAATGGAGCATCACATCGAAGAAAATATA CATTCCCTGAAAAGC AAGAGAT GGAGAAG AAAATCCC GTCCTTA TCAATGCTATTGCGAGA>600

```

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
283>CACGATAGCGGGCTTCTGTCTTTGATTGTGT TCTGATT CCAATGCGAGAATTC CCGGGTTC GACGAGGGCTTGCTGAACTGCA GGCOCGTG ACCAGTGAAA>382
601>CACGATAGCGGGCTTCTGTCTTTGATTGTGT TCTGATT CCAATGCGAGAATTC CCGGGTTC GACGAGGGCTTGCTGAACTGCA GGCOCGTG ACCAGTGAAA>700

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
383>TGGTTCGTCTAATGGAACACGCAACTGTTCCAATCTTGG CAGTAGAT GGCAATGGACTGGT CAACGGGTGGAATCA GAAAGCAGCGGAGT TGACTGGGCT>482
701>TGGTTCGTCTAATGGAACACGCAACTGTTCCAATCTTGG CAGTAGAT GGCAATGGACTGGT CAACGGGTGGAATCA GAAAGCAGCGGAGT TGACTGGGCT>800

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
483>AAGAGTTGATGATGCAATTGGAAGG CACATAC TTACCCT TGTGGAGG ACTCCTCTGTACCA GTTGTCC AGAGGATG CTATATCTAGCTCT GCAGGGT AAA>582
801>AAGAGTTGATGATGCAATTGGAAGG CACATAC TTACCCT TGTGGAGG ACTCCTCTGTACCA GTTGTCC AGAGGATG CTATATCTAGCTCT GCAGGGT AAA>900

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
583>GAAGAGAAGGAAGTTGCAATTTGAGG TAAAGACTCATGGC CCGAAGAGGGATGAT GGTCCAGTTATCTT GGTGTGAATGCTTG TGCCAGT CCGGACCTTC>682
901>GAAGAGAAGGAAGTTGCAATTTGAGG TAAAGACTCATGGC CCGAAGAGGGATGAT GGTCCAGTTATCTT GGTGTGAATGCTTG TGCCAGT CCGGACCTTC>1000

      *      *      *      *
683>ATGATCAAGTTGTTGGAGTGTGCTT TGTGCCC CAAGATA TGACT>72 6
1001>ATGATCAAGTTGTTGGAGTGTGCTT TGTGCCC CAAGATA TGACT>10 44

```

Figura 16 Secuencia real vs secuencia obtenida Quimera 1
 En la línea superior se observa la secuencia esperada, en la línea inferior se observa la secuencia obtenida.

➤ **5.4.2 Análisis de secuenciación para la Quimera 2:**

pGEX-4T-2_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF

En la figura 17 se observa el resultado positivo para la comparación de la secuencia real vs obtenida para la construcción de la quimera 2 (resultado obtenido del análisis de secuenciación de Eton Bioscience Inc.)

En dirección 5' (Se utilizó el programa aPe- A Plasmid Editor)

```
Thu Apr 07, 2016 20:42 -0700
RsbP-PAS_Bucle_GGDEF.str from 1 to 978
Alignment to
AC_001_4_pGEX-F_G01.ab1-- Matches:976; Mismatches:1; Gaps:174; Unattempted:0

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1>-----ATGGACAAGCAGCTGAACGATGCGCCGTGCGGTTTCTGGCGCTGAGCGAGGAAGGCAGCA>61
1>NNANCCNTNCACTCAATCGGACTGGTTCGCGTGGATCCATGGACAAGCAGCTGAACGATGCGCCGTGCGGTTTCTGGCGCTGAGCGAGGAAGGCAGCA>100

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
62>TCATTGGCGCGAACCGTACCGTGATCAAAATTCGGACTACGAGCCGGAACAAGTGATCGGTGAGCAGCATGAACATGATGCTGACCAATCCGGCGCAACT>161
101>TCATTGGCGCGAACCGTACCGTGATCAAAATTCGGACTACGAGCCGGAACAAGTGATCGGTGAGCAGCATGAACATGATGCTGACCAATCCGGCGCAACT>200

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
162>GTTTGGCAGCTGTACTTCTTCCGCTGCTGAAGCTGGAGCAACACATCGAGGAAATCTATATTAGCCTGAAAGCGCGTGACGGCGAGGAAATCCGGTT>261
201>GTTTGGCAGCTGTACTTCTTCCGCTGCTGAAGCTGGAGCAACACATCGAGGAAATCTATATTAGCCTGAAAGCGCGTGACGGCGAGGAAATCCGGTT>300

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
262>CTGATCAACCGGATTGGCGCTCATGACAGCGGTGCGAGCGTGTTCGATTGCGTCTGATCCCGATGCGTAAGCGTATTGATTACGAGCAAGAAGCTGCGTA>361
301>CTGATCAACCGGATTGGCGCTCATGACAGCGGTGCGAGCGTGTTCGATTGCGTCTGATCCCGATGCGTAAGCGTATTGATTACGAGCAAGAAGCTGCGTA>400

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
362>GCGCGAAGAACTGCTGGAGCGCGGTATCAAGAGAAGGAACAGGCGCTGGCGAACCTGGAACAGATCCACGTGGAGATTGAACAGCAACAGGCGAAACT>461
401>GCGCGAAGAACTGCTGGAGCGCGGTATCAAGAGAAGGAACAGGCGCTGGCGAACCTGGAACAGATCCACGTGGAGATTGAACAGCAACAGGCGAAACT>500

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
462>GCTGGCGGTTAACGCGACCCCTGATCGAGCTGAGCGAAACCGACAAGCTGACCGGTGAAAAACCGTCTTCTTCAAGATAAGCTGGAGCAACAGCTG>561
501>GCTGGCGGTTAACGCGACCCCTGATCGAGCTGAGCGAAACCGACAAGCTGACCGGTGAAAAACCGTCTTCTTCAAGATAAGCTGGAGCAACAGCTG>600

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
562>AACAGCTACTATGAAAGCGCGAAACCGTTCAGCCTGTGCATCCTGGACATTGATCACTTCAAGAAAGTGAACGACACCTTTGGTCAACCAAGTGGGCGAGC>661
601>AACAGCTACTATGAAAGCGCGAAACCGTTCAGCCTGTGCATCCTGGACATTGATCACTTCAAGAAAGTGAACGACACCTTTGGTCAACCAAGTGGGCGAGC>700

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
662>ATGTTCTGGCGCAACTGGCGCAGCTGCTGACCCAGCGTGCAGTAAAGAGGATACCGTGGCGGTTACGGTGGCGAGGAAITTTGTTATGATCCTGCCGGA>761
701>ATGTTCTGGCGCAACTGGCGCAGCTGCTGACCCAGCGTGCAGTAAAGAGGATACCGTGGCGGTTACGGTGGCGAGGAAITTTGTTATGATCCTGCCGGA>800

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
762>GACCGAAAATTGCTGCGGCGAAGGAGCTGGGCGAACAAATCCGTAACCCGTGGCGCTGGACCACTGGCCGGCGGTCAGGTGACCATCAGCATT--GGCAT>860
801>GACCGAAAATTGCTGCGGCGAAGGAGCTGGGCGAACAAATCCGTAACCCGTGGCGCTGGACCACTGGCCGGCGGTCAGGTGACCATCAGCATTGGCAT>899

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
861>GGCGACCGTTACCAGCGAAGATACCGGCACCACTGCTGAAGAACCGGACGATGCGCTGTATGCGAGCAAGAAAAACGGCCGTTAACCAGTTAACCAC>960
900>GGCGACCGTTACCAGCGAAGATACCGGCACCACTGCTGAAGAACCGGACGATGCGCTGTATGCGAGCAAGAAAAACGGCCGTTAACCAGTTAACCAC>999

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
961>TTCTTT--GATATGAAATAA----->978
1000>TTCTTTGGATATGAAATAAGAAATCCCGGTCGACTCGAGCGCGCATCCGTGACTGACTGACGATCTGCTCGCGGTTCCGTTGATGACGNGAAAAC>1099

      *      *      *      *      *
978>----->978
1100>CTCTGACACAIGCCAGCTCCCGGGAGACGGTCACAGCTTGNICCTCGGAAG>1150
```

En dirección 3' (Se utilizó el programa aPe- A Plasmid Editor)

```
Ihu Apr 07, 2016 20:49 -0700
RsbP-PAS_Bucle_GGDEF.str from 1 to 978
Alignment to
AC_002_4_pGEX-R_H01.abl-- Matches:977; Mismatches:0; Gaps:138; Unattempted:0

      *
1>--A---TG---G--AC-----A-A-----G--C--A---GC-TGA-----ACGATGCGCCGTGCGGTTT>36
1114<TCASGGCTTGAASACATTGTGGTGGCTGASATCCTCCAAAATGSAATCTCATCCGCSTGATCANGACAAGCAGCTCACGATGCGCCGTGCGGTTT<1016
      *
      *
37>CTGGCGCTGAGCGAGG--AAGGCAGCATCATTGCGGCGAAC--CGTACCCTGATCAAAAATTCTGGACTACGAGCCGGAACAAGTGATCGGTGAGCACATGAA>134
1015<CTGGCGCTGAGCGAGG--AAGGCAGCATCATTGCGGCGAAC--CGTACCCTGATCAAAAATTCTGGACTACGAGCCGGAACAAGTGATCGGTGAGCACATGAA<916
      *
      *
135>CATGATGCTGACCAATTCGCGCGCAACTGTTTTGCCAGCTGTACTTCTTCCGCTGCTGAAGCTGGAGCACCCATCGAGGAAATCTATATTAGCCTGAAA>234
915<CATGATGCTGACCAATTCGCGCGCAACTGTTTTGCCAGCTGTACTTCTTCCGCTGCTGAAGCTGGAGCACCCATCGAGGAAATCTATATTAGCCTGAAA<816
      *
      *
235>GCGCGTGACGGCGAGGAAATTCGGTTCTGATCAACGCGATTGCGCGTCATGACAGCGGTGCGAGCGTGTTCGATTGCGTTCTGATCCCGATGCGTAAGC>334
815<GCGCGTGACGGCGAGGAAATTCGGTTCTGATCAACGCGATTGCGCGTCATGACAGCGGTGCGAGCGTGTTCGATTGCGTTCTGATCCCGATGCGTAAGC<716
      *
      *
335>GTATTGATTACGAGCAAGAACTGCGTAGCGGAAAGAACTGCTGGAGGCGCGTATCAAGAGAAGGAACAGGCGTGGCGAACCTGGAACAGATCCACGT>434
715<GTATTGATTACGAGCAAGAACTGCGTAGCGGAAAGAACTGCTGGAGGCGCGTATCAAGAGAAGGAACAGGCGTGGCGAACCTGGAACAGATCCACGT<616
      *
      *
435>GGAGATTGAACAGCAACAGCGAAACTGCTGGCGGTTAACGCGACCCCTGATCGAGCTGAGCGAAACCGACAAGCTGACCGGTCTGAAAAACCGTCTGTTT>534
615<GGAGATTGAACAGCAACAGCGAAACTGCTGGCGGTTAACGCGACCCCTGATCGAGCTGAGCGAAACCGACAAGCTGACCGGTCTGAAAAACCGTCTGTTT<516
      *
      *
535>TTTCAAGATAAGCTGGAGCAACAGCTGAACAGCTACTATGAAAGCGGAAACCGTTGAGCCTGTGCATCCTGGACATTGATCACTTCAAGAAAGTGAACG>634
515<TTTCAAGATAAGCTGGAGCAACAGCTGAACAGCTACTATGAAAGCGGAAACCGTTGAGCCTGTGCATCCTGGACATTGATCACTTCAAGAAAGTGAACG<416
      *
      *
635>ACACCTTTGGTCAACCAAGTGGCGGACGATGTTCTGGCGCAACTGGCGCAGCTGCTGACCCAGCGTGCCTGTAAGAGGATACCGTGGCGGTTACGGTGG>734
415<ACACCTTTGGTCAACCAAGTGGCGGACGATGTTCTGGCGCAACTGGCGCAGCTGCTGACCCAGCGTGCCTGTAAGAGGATACCGTGGCGGTTACGGTGG<316
      *
      *
735>CGAGGAATTTGTTATGATCCTGCGGAGACCGAAATGCTGCGGCGAAGGAGCTGGGCGAACAAATCCGTAAAACCGTGGCGCTGGACCACTGGCCGGCG>834
315<CGAGGAATTTGTTATGATCCTGCGGAGACCGAAATGCTGCGGCGAAGGAGCTGGGCGAACAAATCCGTAAAACCGTGGCGCTGGACCACTGGCCGGCG<216
      *
      *
835>GGTCAGGTGACCATCAGCATTGGCATGGCGACCGTTACCAGCGAAGATACCGGCACCAACCTGCTGAAGAACGCGGACGATGCGCTGTATGCGAGCAAGA>934
215<GGTCAGGTGACCATCAGCATTGGCATGGCGACCGTTACCAGCGAAGATACCGGCACCAACCTGCTGAAGAACGCGGACGATGCGCTGTATGCGAGCAAGA<116
      *
      *
935>AAAAAGGCGGTAACCGAGTTACCCACTTCTTTGATATGAAATA----->978
115<AAAAAGGCGGTAACCGAGTTACCCACTTCTTTGATATGAAATAAGAAATCCCGGGTGCAGCTCGAGCGGCCGCATCGTACTGACTGACGACTGCCTCGCG<16

      *
978>----->978
15<CGTTTCGTAGAANNNN<1
```

Figura 17 Secuencia real vs secuencia obtenida Quimera 2

En la línea superior se observa la secuencia esperada, en la línea inferior se observa la secuencia obtenida.

➤ **5.4.3 Análisis de secuenciación para la Quimera 3:**

pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF

En la figura 18 se observa el resultado positivo para la comparación de la secuencia real vs obtenida para la construcción de la quimera 3 (resultado obtenido del análisis de secuenciación de Eton Bioscience Inc.)

En dirección 5' (Se utilizó el programa aPe- A Plasmid Editor)

```
Thu Apr 07, 2016 20:58 -0700
rsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF.str from 1 to 1263
lignment to
\B_001_1Q3F_pGEX-For_B03.ab1-- Matches:1238; Mismatches:14; Gaps:82; Unattempted:0

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1>-----ATGGACAAGCAGCTGAACGATGCGCCGTGCGGTTTCTGGCGCTGAGCGAGGAAGGCAGCA>61
1>CGTTCCTCCCTCAAATCGGTCGGTTCCTGGCGTGGTCCATGGACAAGCAGCTGAACGATGCGCCGTGCGGTTTCTGGCGCTGAGCGAGGAAGGCAGCA>100

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
62>TCATTGCGGCGAACCGTACCCGTGATCAAAATCTGGATTACGAACCGGAGCAGGTGATCGGTCAACACATGAACATGATGCTGACCAITCCGGCGCAGCT>161
101>TCATTGCGGCGAACCGTACCCGTGATCAAAATCTGGATTACGAACCGGAGCAGGTGATCGGTCAACACATGAACATGATGCTGACCAITCCGGCGCAGCT>200

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
162>GTTTTGCCAACTGTACTTCTTCCGCTGCTGAAGCTGGAACACCCACATCGAGGAAATCTATATTAGCCTGAAAGCGCGTGACGGCGAGGAAATCCGGTT>261
201>GTTTTGCCAACTGTACTTCTTCCGCTGCTGAAGCTGGAACACCCACATCGAGGAAATCTATATTAGCCTGAAAGCGCGTGACGGCGAGGAAATCCGGTT>300

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
262>CTGATCAACGCGATTGCGCGTCATGACAGCGGTGCGAGCGTTCGATTGCGTTCGATCCCGATGCGTGAATTCGGGTGCTGGCCTGGCGGAGCTGC>361
301>CTGATCAACGCGATTGCGCGTCATGACAGCGGTGCGAGCGTTCGATTGCGTTCGATCCCGATGCGTGAATTCGGGTGCTGGCCTGGCGGAGCTGC>400

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
362>AGGCGGTGACCGGAAATGGTTCGTCTGATGGAGACCGCGACCGTGCCGATTCTGGCGGTTGATGGTAACGGCCTGGTGAACGGTTGGAACCAAAGGC>461
401>AGGCGGTGACCGGAAATGGTTCGTCTGATGGAGACCGCGACCGTGCCGATTCTGGCGGTTGATGGTAACGGCCTGGTGAACGGTTGGAACCAAAGGC>500

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
462>GGCGGAACGACCGGTCTGCGTGTGACGATGCGATCGGCCGTACATTCTGACCCTGGTGGAGGACAGCAGCGTTCCGGTGGTTTCAGCGTATGCTGTAT>561
501>GGCGGAACGACCGGTCTGCGTGTGACGATGCGATCGGCCGTACATTCTGACCCTGGTGGAGGACAGCAGCGTTCCGGTGGTTTCAGCGTATGCTGTAT>600
```

```

* * * * *
562>CTGGCGCTGCAAGGCAAAGAGGAGAAAGAGTGCCTTTCGAGGTTAAGACCCACGGTCCGAAACGTGACGATGGCCCGGTGATCCTGGTGGTTAACCGGT>661
601>CTGGCGCTGCAAGGCAAAGAGGAGAAAGAGTGCCTTTCGAGGTTAAGACCCACGGTCCGAAACGTGACGATGGCCCGGTGATCCTGGTGGTTAACCGGT>700

* * * * *
662>GCGCGAGCCGTGACCTGCACGATCACGTGGTTGGTGTGTGCTTTGTTGCGCAGGACATGACCCGTGACGATTACGAGGAAGAGCTGCAAGACATCAAGGA>761
701>GCGCGAGCCGTGACCTGCACGATCACGTGGTTGGTGTGTGCTTTGTTGCGCAGGACATGACCCGTGACGATTACGAGGAAGAGCTGCAAGACATCAAGGA>800

* * * * *
762>GCGTCTGGAAGAGGCGTATATTACCGACAAGCTGACCGGCCTGAAAAACCGTCTGTTTCTTCAGGATAAGCTGGAACAGCAACTGAACAGCTACTATGAG>861
801>GCGTCTGGAAGAGGCGTATATTACCGACAAGCTGACCGGCCTGAAAAACCGTCTGTTTCTTCAGGATAAGCTGGAACAGCAACTGAACAGCTACTATGAG>900

* * * * *
862>AGCGCGAAACCGTTCAGCCTGTGCATCCTGGACATTGATCACTTCAAGAAAAGTTAACGATACCTTTGGTCACCAAGTGGGCGACGATGTTCTGGCGCAGC>961
901>AGCGCGAAACCGTTCAGCCTGTGCATCCTGACATTGATCACTTCAAGAAAAGTTAACGATACCTTTGGTCACCAAGTGGGCGACGATGTTCTGGCGCAGC>1000

* * * * *
962>TGGCGCAACTGCTGACCCAACGTGCGCGTAAAGAAGACACCGTGGCGGTTACGTTGGCGAAGAG-TTTGTTATGATCCTGCCGAAACCGAGATT-GCT>1059
1001>TGGCGCAACTGCTGACCCAACGTGCGCGTAAAGAAGACACCGTGGCGGTTACGTTGGCGAAGAG-TTTGTTATGATCCTGCCGAAACCGAGATT-GCT>1098

* * * * *
1060>GCGGCGAAGGAACTGGGCGAGCAGATCC-GTAAAAACCGTGGCGCTGGATCACTGCGCCGGCGGTCAAGT-GACCATCAGCATTGGCATGGCGACCGTTAC>1157
1099>GCGGCGAAGGAACTGGGCGAGCAGATCCGTAAAAACCGTGGCGCTGGATCACTGCGCCGGCGGTCAAGT-GACCATCAGCATTGGCATGGCGACCGTTAC>1196

* * * * *
1158>CAGCGAGGACACCGCCACCACCTGCTGAAGAAGCGGACGATGCGC-TGTATGCGAGCAAGAAAACGGCCGTAACCAAG-TTACCCAC--TTCTTTG->1252
1197>CAGCGAGGACACCGCCACCACCTGCTGAAGAAGCGGACGATGCGCTGTATGCGAGCAAGAAAACGGCCGTAACCAAG-TTACCCAC--TTCTTTG->1289

* * * * *
1253>AC--ATGAA-ATAA----->1263
1290>ACTGTGAAATAAAATTCCTCCGGGTTGCACATC>1323

```

En dirección 3' (Se utilizó el programa aPe- A Plasmid Editor)

```

Thu Apr 07, 2016 21:05 -0700
RabP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF.str from 1 to 1263
Alignment to
AB_002_1Q3R_pGEX-Reverse_C03.ab1-- Matches:1229; Mismatches:15; Gaps:110; Unattempted:0

```

```

* * * * *
1>ATGSAAGCAGCTGAACGATG-CGCCGTGCGGTTTCTTGGCGC--TG--AGCGAGGAAGGCAGCATCAT--TCCGCGC--AACCGTACCCGTGATCAAAA>91
1335<-TG--TAGC-SC--C-TGTG-CCCGTGC--TTTCTTGCACATGGAAGCGAGGAAGGCAGC-TCATCAT-TGGCG-NNNNCC-NNNCTTGATC-AAA<1252

* * * * *
92>TTCTGGATTACGAA-CCGGA-GCAGGTGATCGGTCAACACATGAAC-ATGATGCTGACCATTC-GGC-GCAGCTGTTTGGCAACTGTACTTCTTTCCG>186
1251<TTCTGGATTTCGAA-CCGGA-SCAGGTGATCGGTCAACACATGAAC-ATGATGCTGACCATTC-GGC-SCAGCTGTTTGG-CAACTGTACTTCTTTCCG<1153

```

```

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
187>CTGCTGAAGCTGGAACACCACATCGAGGAAATCTATATTAGCCTGAAAGCGCGTGACGGCGAGGAAATCCGGTTCGTATCAACGCGATTGCGCGTCATG>286
1152<CTGCTGAAGCTGGAACACCACATCGAGGAAATCTATATTAGC TGAAGCGCGTGACGGCGAGGAAATCCGGTTCGTATCA CGCGATTGCGCGTCATG<1055

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
287>ACAGCGGTGCGAGCGTGTTCGATTGCGTTCTGATCCCGATGCGTGAATTTCCGGGTCTGGCCTGGCGGAGCTGCAGGCGGTGACCAGCGAAA-TGGTTC>385
1054<ACAGCGGTGCGAGCGTGTTCGATTGCGTTCTGATCCCGATGCGTGAATTTCCGGGTCTGGCCTGGCGGAGCTGCAGGCGGTGACCAGCGAAA TGGTTC<955

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
386>GTCTGATGGAGACCGCGACCGTCCGATTCTGGCGGTTGATGGTAACGGCCTGGTGAACGGTTGGAACAAAAGGCGCGGAACTGACCGGTCTGCGTGT>485
954<GTCTGATGGAGACCGCGACCGTCCGATTCTGGCGGTTGATGGTAACGGCCTGGTGAACGGTTGGAACAAAAGGCGCGGAACTGACCGGTCTGCGTGT<855

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
486>TGACGATGCGATCGGCCCTCACATTCTGACCTGGTGGAGGACAGCAGCGTTCGGTGGTTACGCGTATGCTGTATCTGGCGCTGCAAGGCAAAGAGGAG>585
854<TGACGATGCGATCGGCCCTCACATTCTGACCTGGTGGAGGACAGCAGCGTTCGGTGGTTACGCGTATGCTGTATCTGGCGCTGCAAGGCAAAGAGGAG<755

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
586>AAAGAAGTGCCTTCGAGGTTAAGACCCACGGTCCGAAACGTGACGATGGCCCGGTGATCCTGGTGGTTAACGCGTGCGCGAGCCGTGACCTGCACGATC>685
754<AAAGAAGTGCCTTCGAGGTTAAGACCCACGGTCCGAAACGTGACGATGGCCCGGTGATCCTGGTGGTTAACGCGTGCGCGAGCCGTGACCTGCACGATC<655

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
686>ACGTGGTGGTGTGCTTTGTTGCGCAGGACATGACCCGTGACGATTACGAGGAAGAGCTGCAAGACATCAAGGAGCGTCTGGAAGAGGCGTATATTAC>785
654<ACGTGGTGGTGTGCTTTGTTGCGCAGGACATGACCCGTGACGATTACGAGGAAGAGCTGCAAGACATCAAGGAGCGTCTGGAAGAGGCGTATATTAC<555

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
786>CGACAAGCTGACCGGCTGAAAAACCGTCTTCTTTCCAGGATAAGCTGGAACAGCAACTGAAACAGCTACTATGAGAGCGCGAAAACCGTTCAGCCTGTGC>885
554<CGACAAGCTGACCGGCTGAAAAACCGTCTTCTTTCCAGGATAAGCTGGAACAGCAACTGAAACAGCTACTATGAGAGCGCGAAAACCGTTCAGCCTGTGC<455

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
886>ATCTGGACATTGATCATTCAAGAAAGTTAACGATACTTTGGTCAACCAAGTGGGCGACGATGTTCTGGCGCAGCTGGCGCAACTGCTGACCCAACGTG>985
454<ATCTGGACATTGATCATTCAAGAAAGTTAACGATACTTTGGTCAACCAAGTGGGCGACGATGTTCTGGCGCAGCTGGCGCAACTGCTGACCCAACGTG<355

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
986>CGCGTAAAGAAGACACCGTGGCGGTTACCGTGGCGAAGAGTTTGTATGATCCTGCCGAAACCGAGATTGCTGCGGCGAAGGAACTGGGCGAGCAGAT>1085
354<CGCGTAAAGAAGACACCGTGGCGGTTACCGTGGCGAAGAGTTTGTATGATCCTGCCGAAACCGAGATTGCTGCGGCGAAGGAACTGGGCGAGCAGAT<255

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1086>CCGTA AAAACCGTGGCGCTGGATCACTGGCCGGCGGTTCAAGTGACCATCAGCATTGGCATGGCGACCGTTACCAGCGAGGACACCGGCACCACTGCTG>1185
254<CCGTA AAAACCGTGGCGCTGGATCACTGGCCGGCGGTTCAAGTGACCATCAGCATTGGCATGGCGACCGTTACCAGCGAGGACACCGGCACCACTGCTG<155

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1186>AAGAACCGGACGATGCGCTGTATGCGAGCAAGAAAAACGGCCGTAACCAAGTTACCCACTTCTTTGACATGAAATAA----->1263
154<AAGAACCGGACGATGCGCTGTATGCGAGCAAGAAAAACGGCCGTAACCAAGTTACCCACTTCTTTGACATGAAATAA----->1263

      *      *      *      *      *      *      *      *      *      *
1263>----->1263
54<GGCCGCATCGTACTGACTGACGATCTGCCCTCGCGCGCTCTGTACTCCTNNCC<1

```

Figura 18 Secuencia real vs secuencia obtenida Quimera 3

En la línea superior se observa la secuencia esperada, en la línea inferior se observa la secuencia obtenida.

5.5 Expresión piloto de proteínas

➤ 5.5.1 Expresión piloto para la Quimera 1:

pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PAS alternativo

Por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante (SDS-PAGE) al 10% se evaluó la expresión de proteínas. En la figura 19 se observa el resultado positivo por medio de una banda a 52 kDa pertenecientes a la proteína de interés.

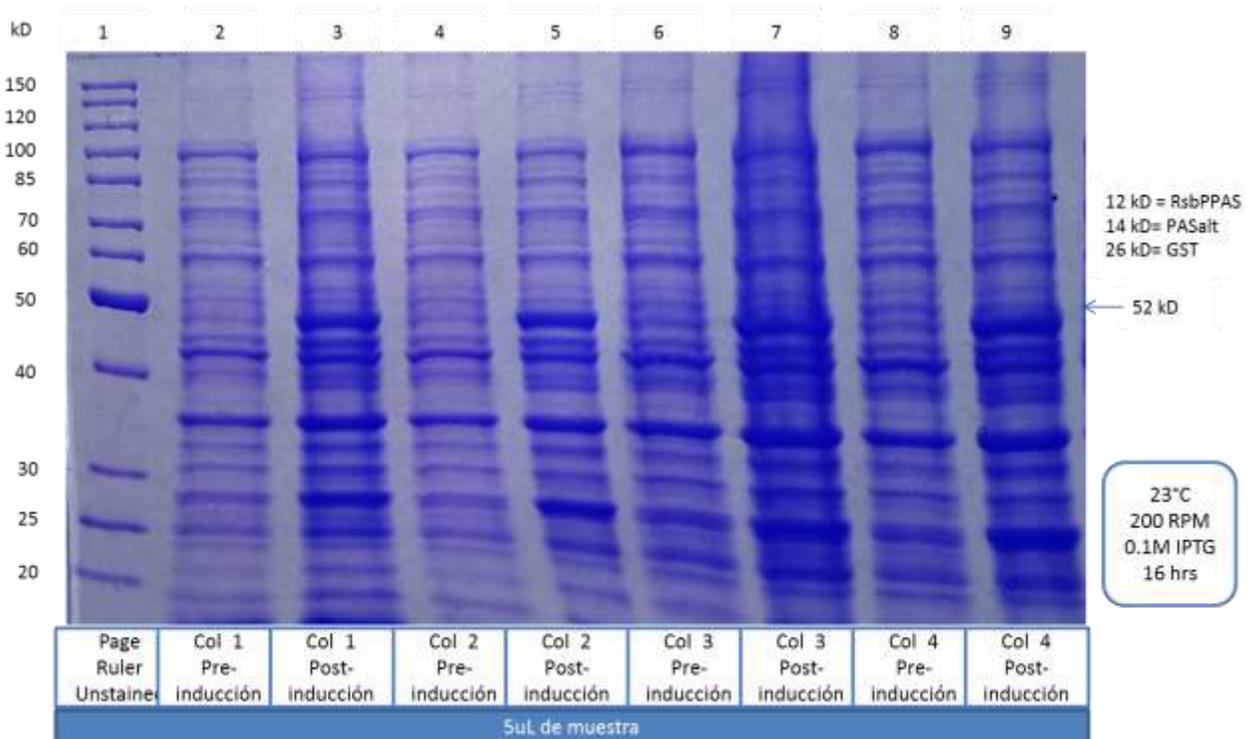


Figura 19 SDS-PAGE para expresión piloto de pGEX-4T-2_RsbP-PAS_Pasalt

En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular. En los carriles 2, 4, 6 y 8 se muestran los controles negativos (muestras tomadas previas a la adición del inductor IPTG 0.1M) los carriles 3, 5, 7 y 9 muestran el resultado positivo para la expresión de la proteína posterior a la adición del IPTG, cuyo peso esperado es de 52kDd. Las condiciones utilizadas se muestran en el recuadro del lado derecho.

5.5.2 Expresión piloto para Quimera 2:

pGEX-4T-2_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF

Por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante (SDS-PAGE) al 10% se evaluó la expresión de proteínas. En la figura 20 se observa el resultado positivo por medio de una banda a 63 kDa pertenecientes a la proteína de interés para la quimera 2.

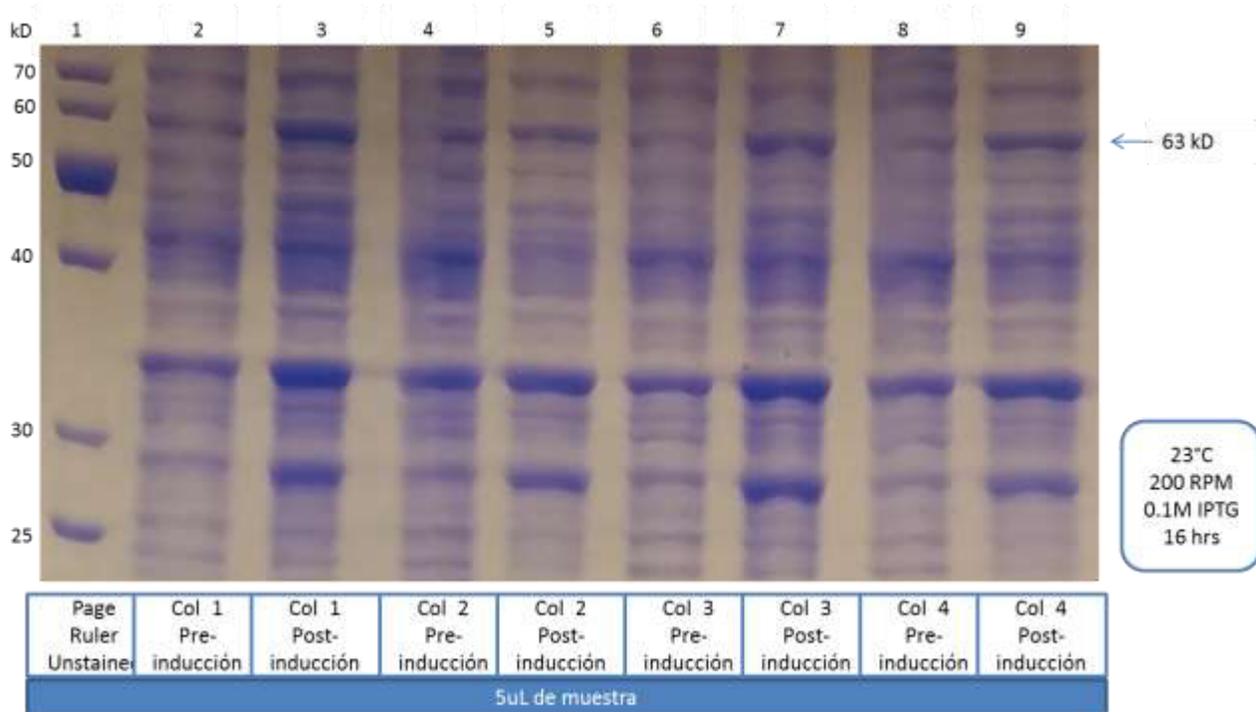


Figura 20 SDS-PAGE para expresión piloto de pGEX-4T-2_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF

En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular. En los carriles 2, 4, 6 y 8 se muestran los controles negativos, en los carriles 3, 5, 7 y 9 muestran el resultado positivo para la expresión de la proteína cuyo peso molecular esperado es de 63 kDa. Las condiciones de expresión de muestras se muestran en el recuadro del lado derecho.

➤ **5.5.3 Expresión piloto para Quimera 3:**
pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF

Por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante (SDS-PAGE) al 10% se evaluó la expresión de proteínas. En la figura 21 se observa el resultado positivo por medio de una banda a 73 kDa pertenecientes a la proteína de interés para la quimera 3.

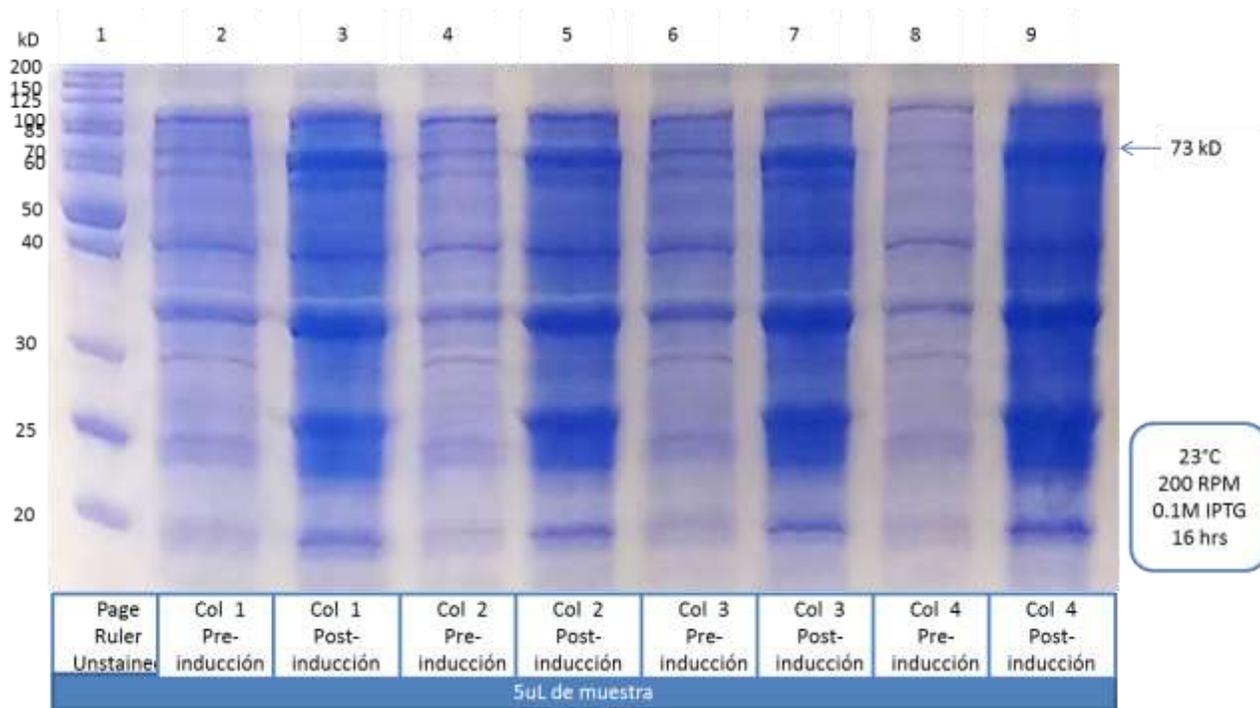


Figura 21 SDS-PAGE para expresión piloto de pGEX-4T-2_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF
 En el carril 1 se observa el marcador de peso molecular. En los carriles 2, 4, 6 y 8 se muestran los controles negativos. En los carriles 3, 5, 7 y 9 muestran el resultado positivo para la expresión de la proteína cuyo peso molecular esperado es de 73 kDa. Las condiciones de expresión se muestran en el recuadro del lado derecho.

5.6 Purificación de proteínas

➤ 5.6.1 Cromatografía por afinidad para la Quimera 1: GST_RsbP-PAS_PAS alternativo

En las figuras 22 y 23 se muestra el cargado y eluido respectivamente de la proteína GST_RsbP-PAS_PASa por medio de cromatografía por afinidad.

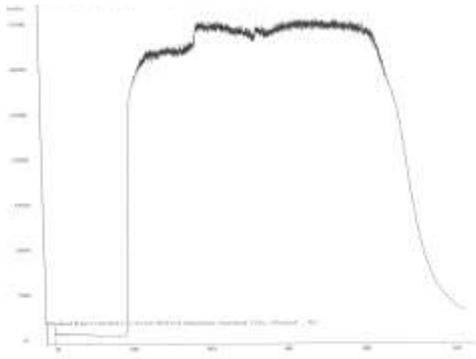
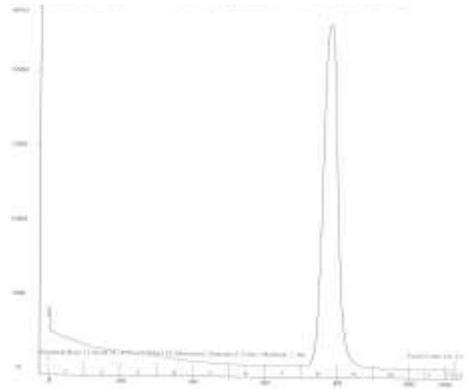


Figura 22 Cargado de muestra

Cromatograma del cargado de la muestra GST_RsbPPAS_PASa a la columna GSTrap FF de 1ml haciendo uso del FPLC, “Akta Prime Plus” de GE.

Figura 23 Elución de la muestra

Cromatograma obtenido durante la elución de la proteína, haciendo uso del buffer de elución 50mM Tris-HCl con 10mM glutatión reducida pH 8.0 y flujo de 0.5ml/min.



➤ **5.6.2 Cromatografía por afinidad para la Quimera 2:**

GST_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF

En las figuras 24 y 25 se muestra el cargado y eluido respectivamente de la proteína GST_RsbPPAS_Bucle_GGDEF por medio de cromatografía por afinidad.

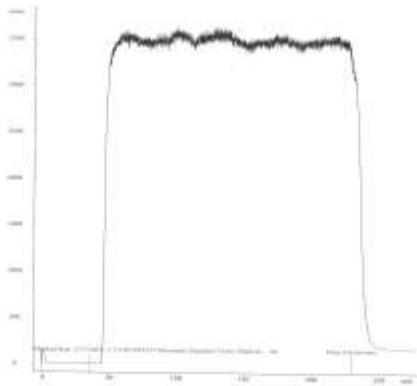
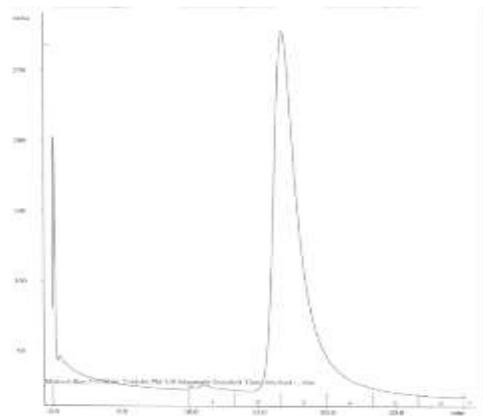


Figura 24 Cargado de muestra

Cromatograma del cargado de GST_RsbPPAS_Bucle_GGDEF a la columna GSTrap FF de 1ml haciendo uso del FPLC, "Akta Prime Plus" de General Electric, Healthcare.

Figura 25 Elución de la muestra

Cromatograma obtenido durante la elución de la proteína, haciendo uso del buffer de elución 50mM Tris-HCl con 10mM glutatión reducida pH 8.0 y flujo de 0.5ml/min.



➤ **5.6.3 Cromatografía por afinidad para la Quimera 3:**

GST_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF

En las figuras 26 y 27 se muestra el cargado y eluido respectivamente de la proteína GST_RsbPPAS_PASa_Bucle_GGDEF por medio de cromatografía por afinidad

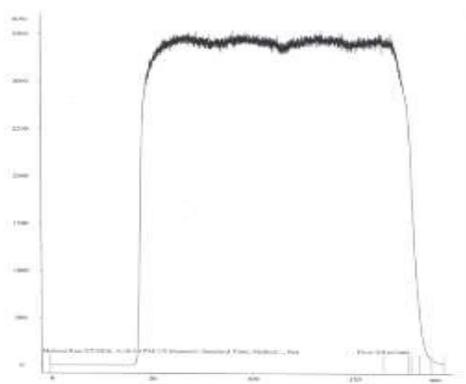


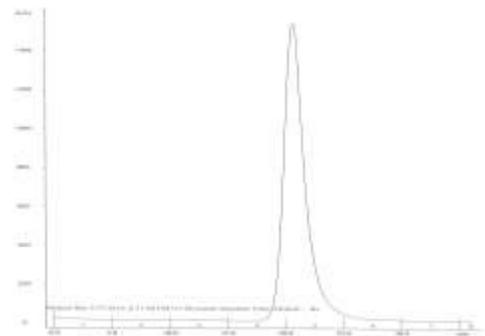
Figura 26 Cargado de muestra

Cromatograma del cargado de GST_RsbPPAS_PASa_Bucle_GGDEF a la columna GSTrap FF de 1ml haciendo uso del FPLC, "Akta Prime Plus" de General Electric,

Healthcare.

Figura 27 Elución de la muestra

Cromatograma obtenido durante la elución de la proteína, haciendo uso del buffer de elución 50mM Tris-HCl con 10mM glutatión reducida pH 8.0 y flujo de 1ml/min.



5.7 Análisis de las fracciones colectadas por cromatografía de afinidad

➤ 5.7.1 Análisis de fracciones para la Quimera 1:

GST_RsbP-PAS_PAS alternativo

En la figura 28 se observa por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante (SDS-PAGE al 15%) el análisis de las fracciones colectadas durante la cromatografía por afinidad se observa en los carriles 8 y 9 la banda a 52 kDa que pertenece a la proteína de interés.

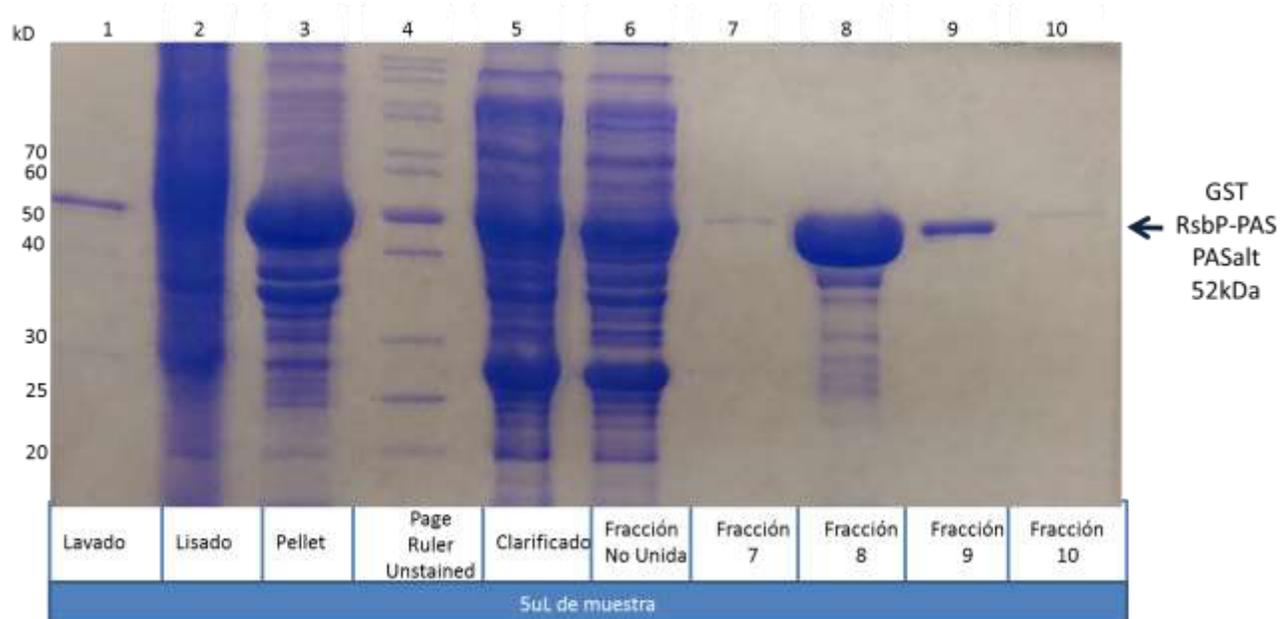


Figura 28 SDS-PAGE al 15% para GST-RsbP-PAS-PASa

En los carriles se cargó las muestras siguientes: 1 lavado, 2 lisado, 3 pellet, 4 el marcador de peso molecular, 5 clarificado, 6 fracción no unida, 7 al 10 fracciones 7 al 10 colectadas durante la cromatografía por afinidad.

➤ **5.7.2 Análisis de fracciones para la Quimera 2:**

GST_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF

En la figura 29 se observa por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante (SDS-PAGE al 10%) el análisis de las fracciones colectadas durante la cromatografía por afinidad se observa en los carriles 7 al 9 la banda a 63 kDa que pertenece a la proteína de interés.

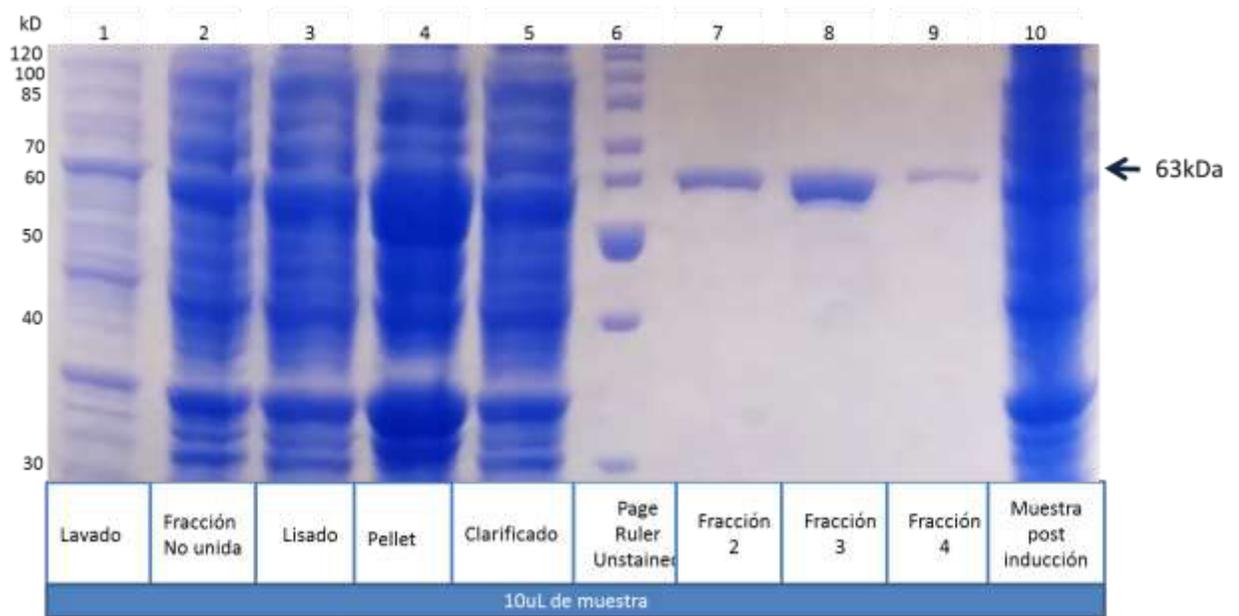


Figura 29 Análisis de fracciones para la quimera 2

En los carriles se cargó las muestras siguientes: 1 lavado, 2 Fracción no unida, 3 Lisado, 4 Pellet, 5 clarificado, 6 Marcador de peso molecular, 7 al 9 fracciones 2 al 4 colectadas durante la cromatografía por afinidad, carril 10 muestra post inducción.

➤ **5.7.3 Análisis de fracciones para la Quimera 3:**

GST_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF

En la figura 30 se observa por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida con gradiente desnaturalizante (SDS-PAGE al 10%) el análisis de las fracciones colectadas durante la cromatografía por afinidad se observa en los carriles 6 al 10 la banda a 73 kDa que pertenece a la proteína de interés.

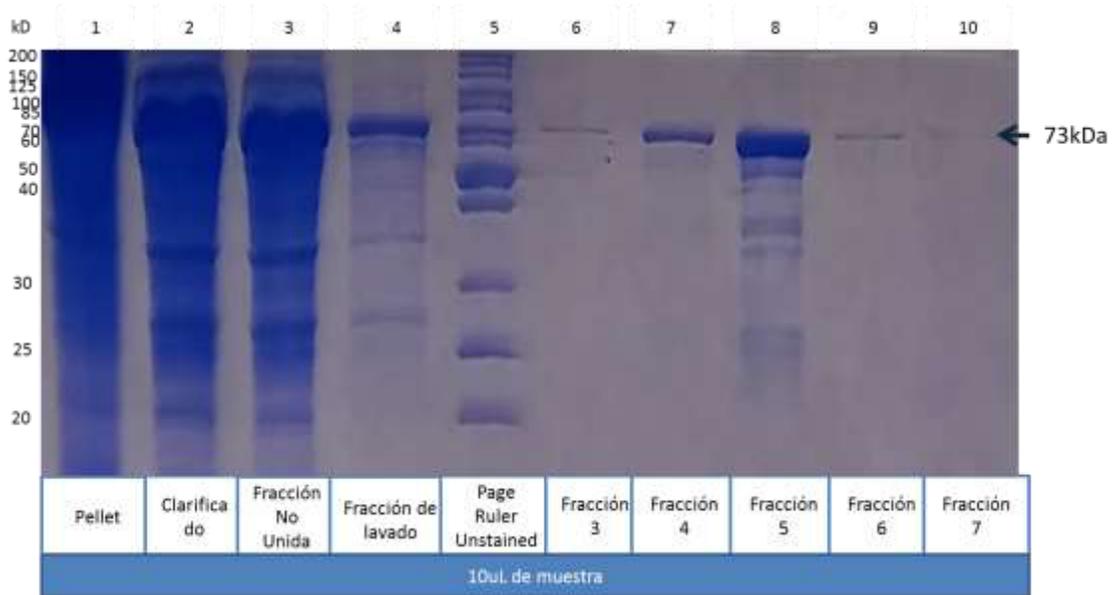


Figura 30 Análisis de fracciones para la quimera 3

En los carriles se cargó las muestras siguientes: 1 Pellet, 2 Clarificado, 3 Fracción no unida, 4 lavado, 5 Marcador de peso molecular, 6 al 10 fracciones 3 al 7 colectadas durante la cromatografía por afinidad.

5.8 Ruptura de la unión proteína de fusión/proteína de interés

➤ 5.8.1 Ruptura GST_Proteína de interés para la Quimera 1: GST_RsbP-PAS_PAS alternativo

En la figura 31 se muestra el resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE al 15%) para 2mL (aprox. 0.6mg de proteína de interés + GST) de muestra que fueron incubados con 60uL de trombina a temperatura ambiente durante 28 horas. Se puede observar que a partir de las 6 horas de incubación, se ha logrado la separación mostrando una banda a los 26 kDa que pertenece a la proteína de interés.

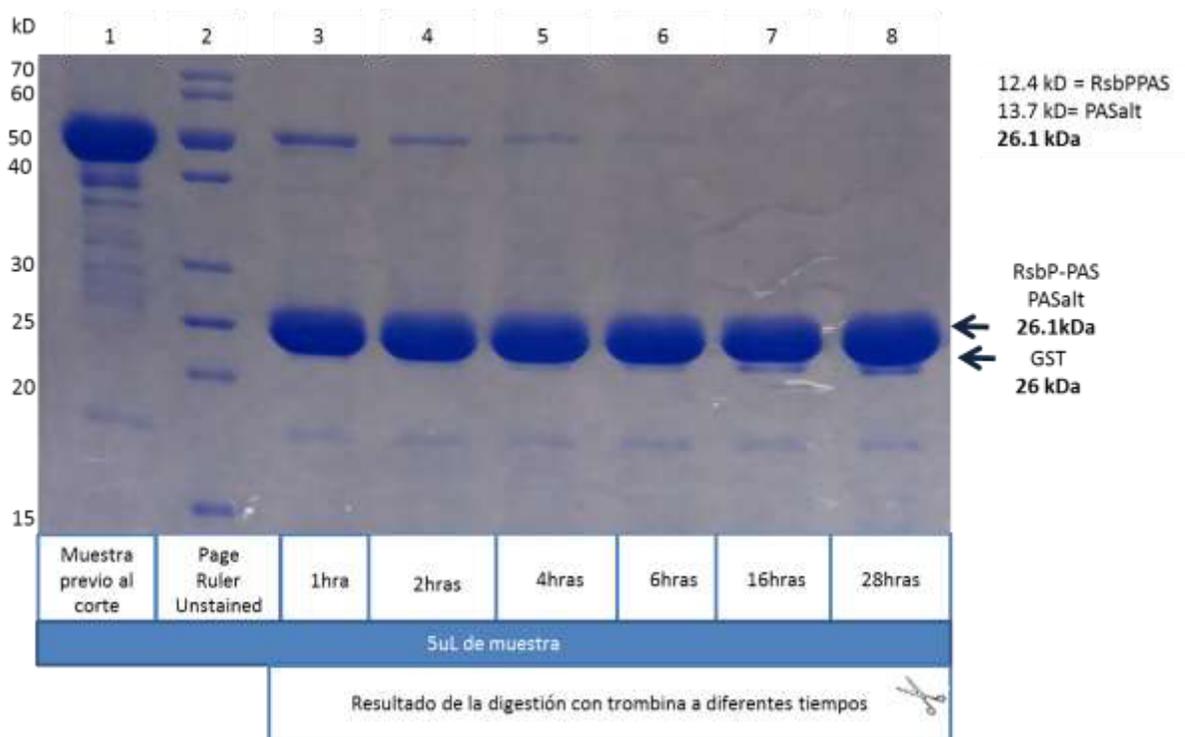


Figura 31 Análisis por SDS-PAGE al 15%, para distintos tiempos de incubación con trombina

En el carril 1 se cargó la muestra previo a la incubación con trombina, en el carril 2 el marcador de peso molecular, en los carriles 3 al 8 muestras a diferentes tiempos de incubación con trombina.

➤ **5.8.2 Ruptura GST_Proteína de interés para la Quimera 2: GST_RsbP-PAS_Bucle_GGDEF**

En la figura 32 se muestra el resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE al 15%) para 2mL (aprox. 0.4mg de proteína de interés + GST) de muestra con 50uL de trombina incubados a temperatura ambiente durante 28 horas. Se puede observar que a partir de las 28 horas de incubación aún no se logra una separación completa, sin embargo se trabajó con esta muestra.

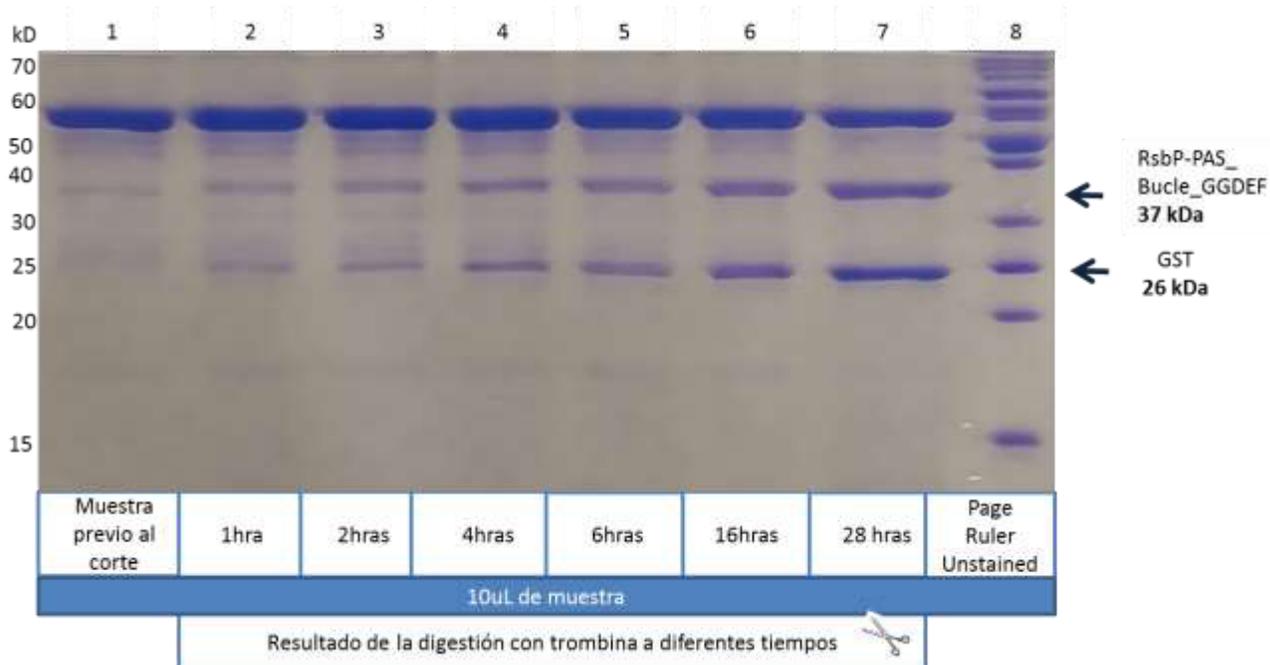


Figura 32 Análisis por SDS-PAGE al 15%, para distintos tiempos de incubación con trombina

En el carril 1 se cargó la muestra previo a la incubación con trombina, en los carriles 2 al 7 se cargaron las muestras tomadas a diferentes tiempos de incubación con trombina, en el carril 8 se cargó el marcador de peso molecular.

➤ **5.8.3 Ruptura GST_Proteína de interés para la Quimera 3: GST_RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF**

En la figura 33 se muestra el resultado de la electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE al 15%) para 2mL (aprox. 1 mg de proteína de interés + GST) de muestra con 60uL de trombina incubados a temperatura ambiente durante 16 horas. Se puede observar que a partir de las 4 horas de incubación se ha logrado la separación completa.



Figura 33 Análisis por SDS-PAGE al 15%, para distintos tiempos de incubación con trombina
En el carril 1 se cargó el marcador de peso molecular en el carril 2 la muestra previo a la incubación con trombina, en los carriles 3 al 7 las muestras tomadas a diferentes tiempos de incubación con trombina.

5.9 Remoción de la proteína de fusión por medio de cromatografía por afinidad

➤ 5.9.1 Análisis de las fracciones colectadas durante la 2da cromatografía por afinidad posterior a la remoción de GST para la Quimera 1: RsbP-PAS_PAS alternativo

En la figura 34 se muestra el análisis de las fracciones colectadas durante la segunda cromatografía por afinidad. Se espera una banda a los 26 kDa para la proteína de interés.

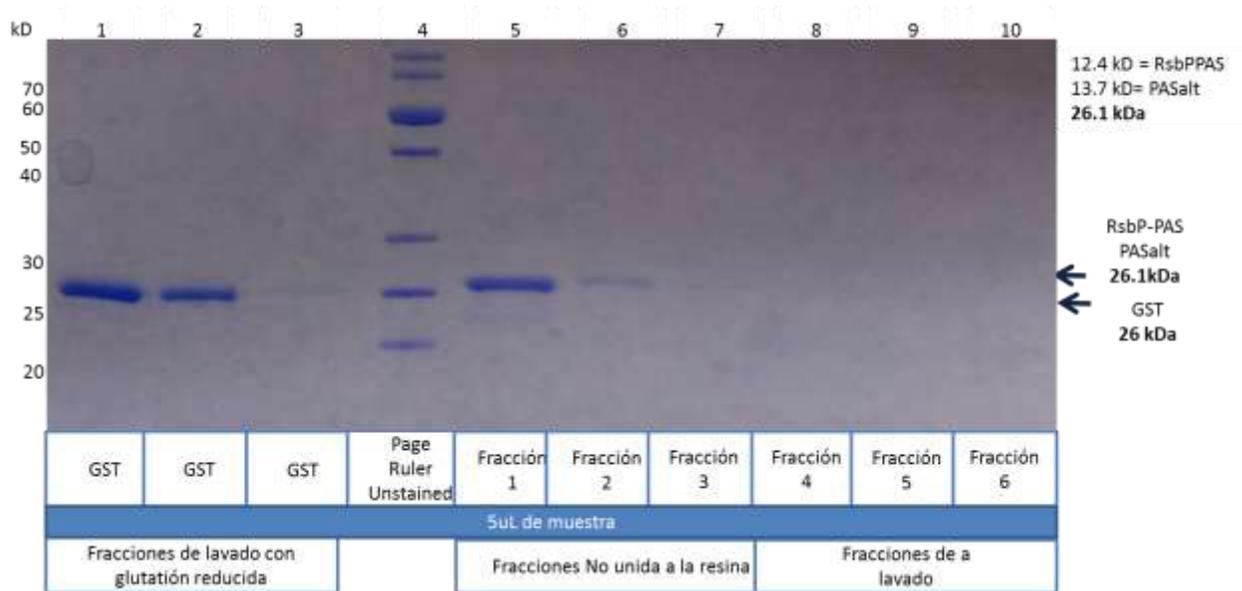


Figura 34 Análisis por SDS-PAGE al 15% para la 2da cromatografía por afinidad para RsbP-PAS_PASa

En los carriles 1,2 y 3 se cargaron las fracciones obtenidas con la solución amortiguadora de elución, por lo que se deduce que esta banda pertenece a GST. El carril 4, muestra el marcador de peso molecular. Los carriles 5 al 10 muestran fracciones donde podríamos encontrar a nuestra proteína de interés con un peso molecular de 26 kDa.

➤ **5.9.2 Análisis de las fracciones colectadas posterior a la remoción de GST para la Quimera 2: RsbP-PAS_Bucle_GGDEF**

En la figura 35 se muestra el análisis de las fracciones colectadas durante la segunda cromatografía por afinidad. Se espera una banda a los 37 kDa para la proteína de interés. En el gel de poliacrilamida se observan bandas de impurezas de modo que se decidió realizar una tercera cromatografía por afinidad.

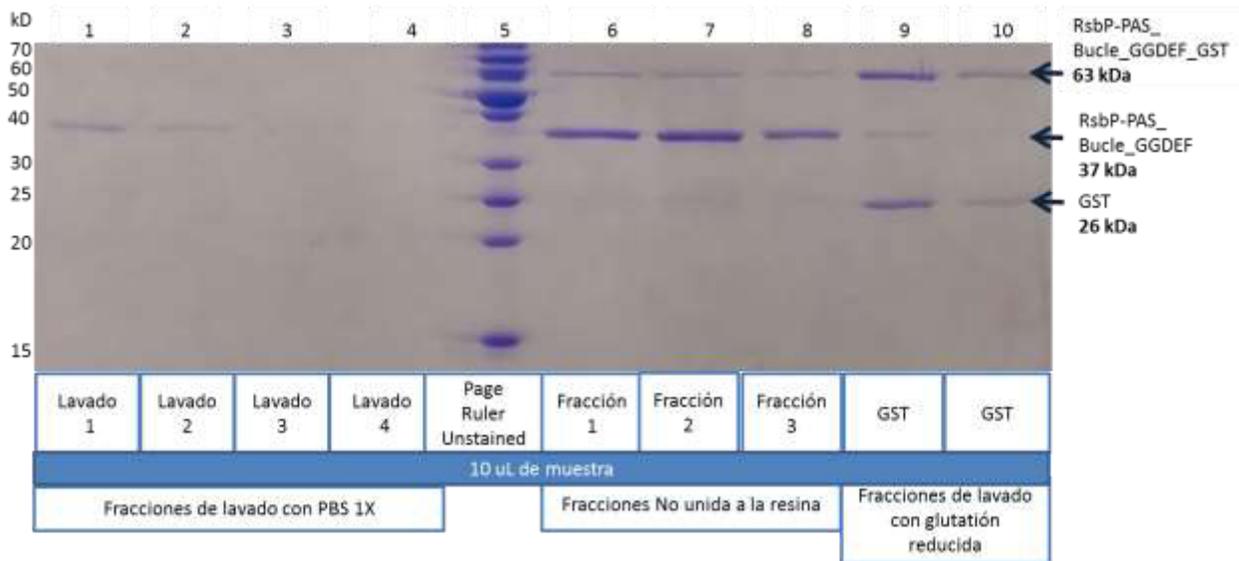


Figura 35 Análisis por SDS-PAGE al 15% para la 2da cromatografía por afinidad para RsbP-PAS_Bucle_GGDEF

En los carriles 1 al 4 se cargaron las fracciones de lavado con PBS1X, por lo que se deduce que esta banda pertenece a la proteína de interés. El carril 5, muestra el marcador de peso molecular. Los carriles 6 al 8 muestran también fracciones donde se encuentra la proteína de interés, fracciones eluidas al momento de pasar la muestra y los carriles 9 y 10 muestran fracciones eluidas con la solución amortiguadora de elución, por lo que se deduce que la banda superior a 63 kDa pertenece a la proteína de interés que no se separó de GST y la banda inferior a 26 kDa pertenece a GST.

Análisis de las fracciones colectadas posterior a la tercera cromatografía por afinidad

En la figura 36 se muestra el análisis por SDS-PAGE al 15% de la tercera cromatografía por afinidad. La banda esperada para la proteína de interés es a los 37 kDa.

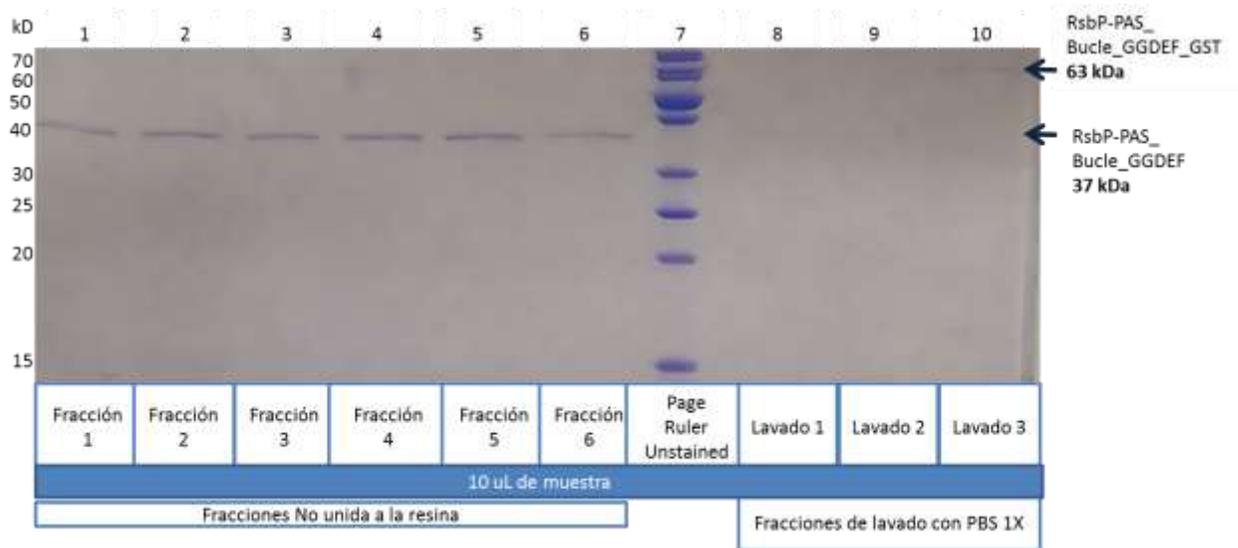


Figura 36 Análisis por SDS-PAGE al 15% para la 3ra cromatografía por afinidad para RsbP-PAS_Bucle_GGDEF

En los carriles 1 al 6 se cargaron las muestras de la proteína no unida a la resina es decir la proteína de interés. En el carril 7 se cargó el marcador de peso molecular y en los carriles 8 al 10 se muestran las fracciones de lavado con solución amortiguadora de fosfatos.

➤ **5.9.3 Análisis de las fracciones colectadas posterior a la remoción de GST para la Quimera 3: RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF**

En la figura 37 se muestra el análisis de las fracciones por SDS-PAGE al 15% colectadas durante la segunda cromatografía por afinidad. Se espera una banda a los 47 kDa para la proteína de interés.



Figura 37 Análisis por SDS-PAGE al 15% para la 2da cromatografía por afinidad para RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF

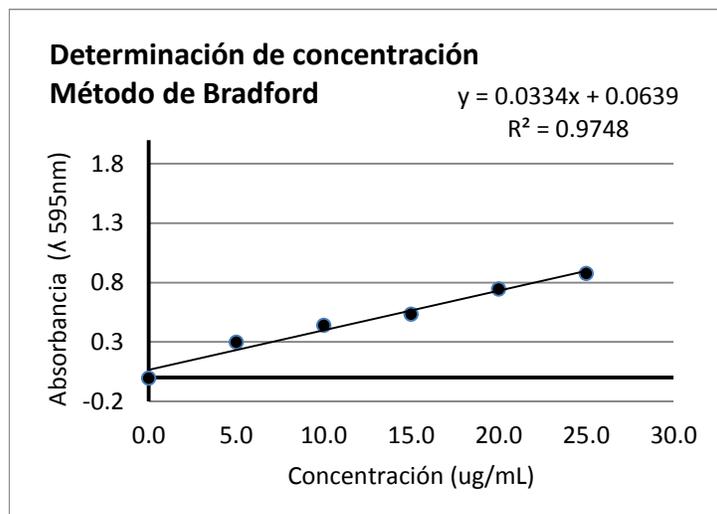
Se cargaron en los carriles 1 y 2 fracciones eluidas con la solución amortiguadora de elución, por lo que se deduce que la banda pertenece a GST. En el carril 3 se cargó el marcador de peso molecular. En los carriles 4 y 5 se observa una banda a los 47kDa que pertenece a la proteína de interés, en los carriles 6 al 10 se cargaron las fracciones de lavado con PBS1X, por lo que también muestra fracciones donde podíamos encontrar a la proteína de interés.

5.10 Cuantificación de proteína pura por método de Bradford

➤ 5.10.1 Cuantificación de Quimera 1: RsbP-PAS_PAS alternativo

Curva Estándar

Curva estándar		
Standard	Concentración (ug/mL)	Abs (λ595nm)
1	0.0	-0.0052
2	5.0	0.2978
3	10.0	0.4396
4	15.0	0.5348
5	20.0	0.7466
6	25.0	0.8761



Muestras:

Muestras (20uL) Dilución 1:50			
Muestra	Abs	Concentración (ug/mL)	Promedio Concentración (ug/mL)
Muestra 1	0.2601	5.9	5.0000
	0.2281	4.9	
	0.2051	4.2	
Primera concentración	0.34	8.3	8.0667
	0.3221	7.7	
	0.3376	8.2	
Segunda concentración	0.4639	12	11.5333
	0.4521	11.6	
	0.4325	11	

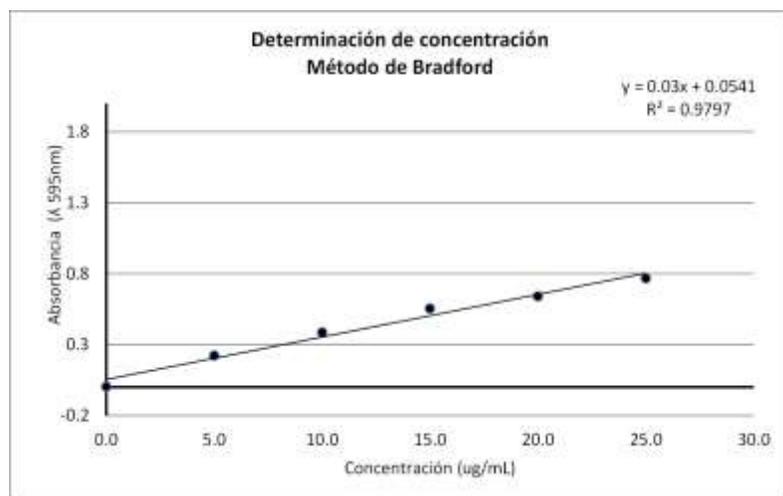
Cálculos realizados:

11.5ug mL	1mg 1000ug	0.0115 mg mL		
4mL	0.0115mg 1 mL	Factor de dilución x 50	2.3mg	RsbP-PAS PASa

➤ 5.10.2 Cuantificación de Quimera 2: RsbP-PAS_Bucle_GGDEF

Curva Estándar

Curva estándar		
Standard	Concentración (ug/mL)	Abs (λ 595nm)
1	0.0	0.0023
2	5.0	0.2224
3	10.0	0.3858
4	15.0	0.5547
5	20.0	0.6402
6	25.0	0.7669



Muestras:

Muestras (20uL) Dilución 1:50			
Muestra	Abs	Concentración (ug/mL)	Promedio Concentración (ug/mL)
Muestra 1	0.1135	2	2.8000
	0.1552	3.4	
	0.1462	3	
Pimera concentración	0.3107	8.6	9.4667
	0.3718	10.6	
	0.3278	9.2	

Cálculos realizados:

9.47ug	1mg	0.00947 mg
mL	1000ug	mL

0.6mL	0.00947mg	Factor de dilución x 50	0.28mg	RsbP-PAS_Bucle_GGDEF
	1 mL			

➤ 5.10.3 Cuantificación de Quimera 3: RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF

Curva estándar

Curva estándar		
Standard	Concentración (ug/mL)	Abs (λ 595nm)
1	0.0	1.1731
2	5.0	1.3734
3	10.0	1.5957
4	15.0	1.7938
5	20.0	1.9507
6	25.0	2.1253



Muestras

Muestras (20uL) Dilución 1:50			
Muestra	Abs	Concentración (ug/mL)	Promedio Concentración (ug/mL)
Muestra 1	1.4526	6.8	6.1667
	1.4326	6.3	
	1.399	5.4	
Primera concentración	1.6426	11.8	12.0000
	1.6555	12.2	
	1.6487	12	

Cálculos realizados:

12.0ug	1mg	0.012 mg
mL	1000ug	

3mL	0.012mg	Factor de dilución	1.8mg	RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF
	1 mL	x 50		

5.11 Determinación de estructura cuaternaria por medio de cromatografía de exclusión por tamaño (SEC)

➤ 5.11.1 Estructura cuaternaria para la Quimera 1: RsbP-PAS_PAS alternativo

Con base en el cromatograma obtenido para el azul dextran y los estándares de bajo peso molecular que se muestran en la figura 38, se determinó el volumen de elución para cada uno de los estándares.

○ 5.11.1.1 SEC para el azul dextran y estandares de bajo peso molecular para Quimera 1

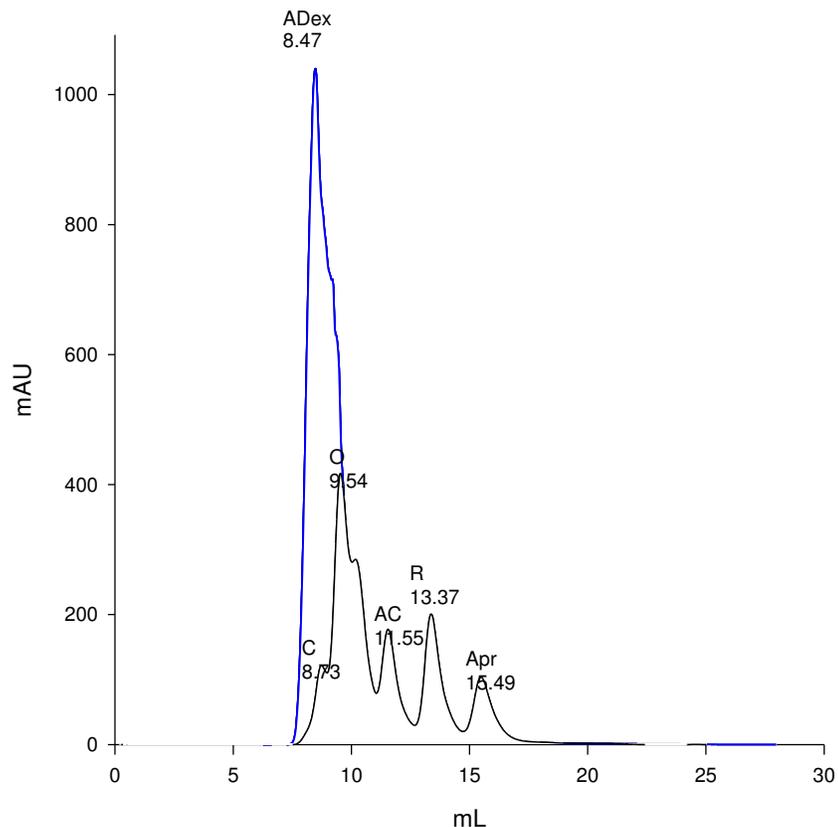


Figura 38 Cromatograma obtenido por SEC para el azul dextran y los estándares de bajo peso molecular

Cromatograma obtenido para el azul dextran y los estándares de bajo peso molecular del kit "Gel filtration calibration kit" de GE Helathcare, donde: Conalbumina (C), Ovalbumina (O), Anhidrasa carbónica (CA), Ribonucleasa A (R) Y Aprotinina (Apr). Este cromatograma fue obtenido por medio del programa sigma plot 13.0.

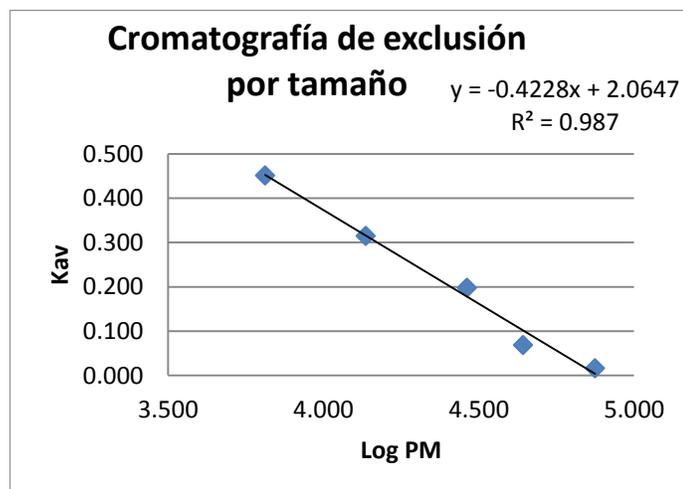
Estándares utilizados		
Standard	Peso Molecular (Da) PM	Volumen de elución (mL) (Ve)
Aprotinina	6500	15.49
Ribonucleasa A	13700	13.37
Anhidrasa carbonica	29000	11.55
Ovalbuina	44000	9.54
Canalbumina	75000	8.73
Azul dextran	Void volume (Vo)	8.47
Volumen de columna	(Vc)	24.00

Para la preparación de la curva de calibración

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_c - V_o}$$

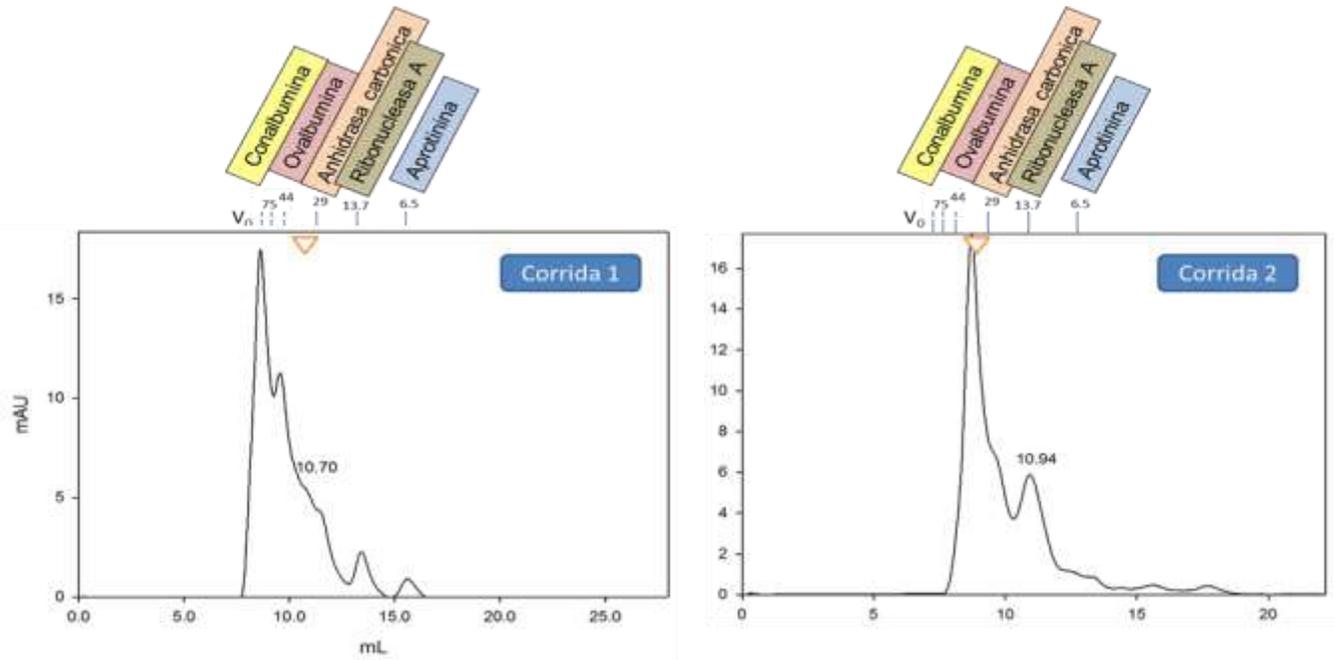
$$K_{av} = \frac{V_e - 8.47}{24.00 - 8.47}$$

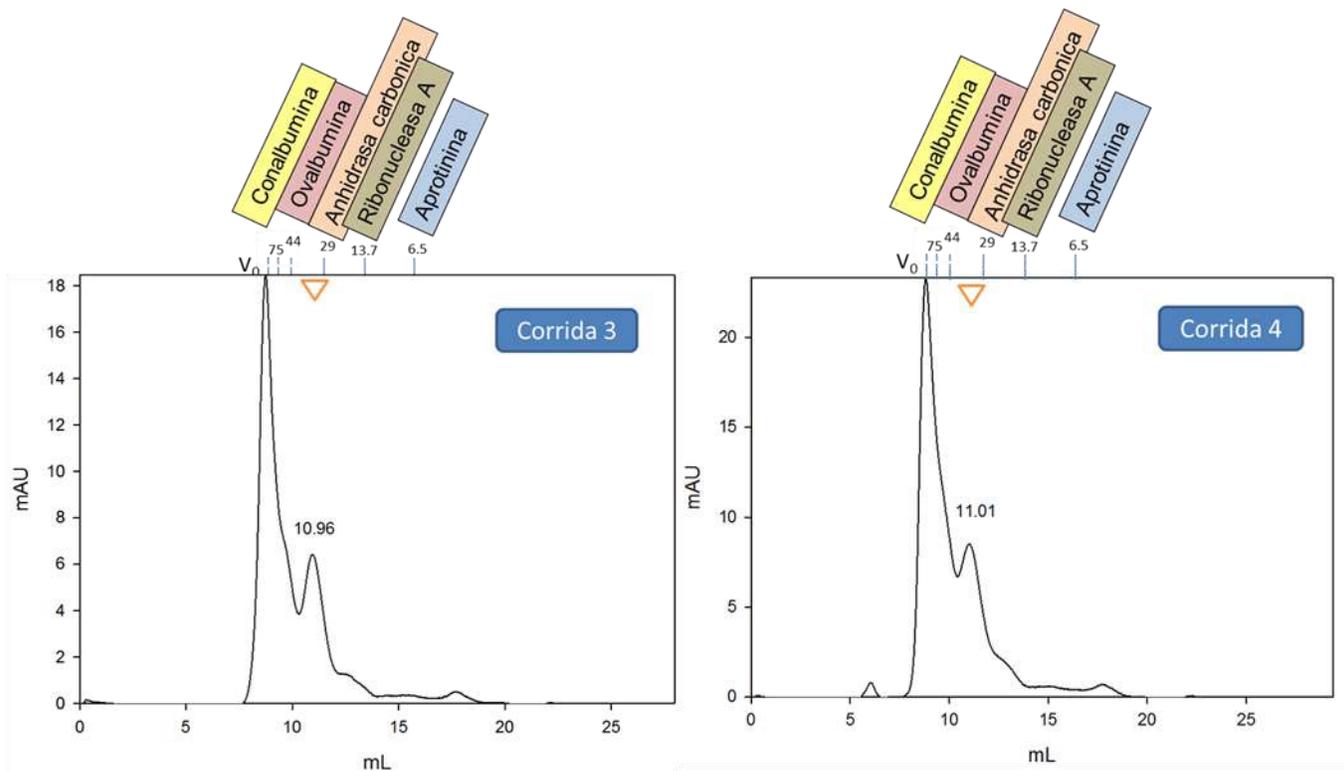
Estándares utilizados		
Standard	Log PM	Kav
Aprotinina	3.813	0.452
Ribonucleasa A	4.137	0.316
Anhidrasa carbonica	4.462	0.198
Ovalbuina	4.643	0.069
Canalbumina	4.875	0.017



○ 5.11.1.2 SEC para las muestras de la Quimera 1: RsbP-PAS_PASa

En la figura 39 se muestran los cromatogramas obtenidos por medio de la cromatografía de exclusión por tamaño para la determinación del peso molecular de la proteína de interés para la quimera 1.





Posición de elución esperado para un monómero de RsbP-PAS-PASa (26.13 kDa; 11.53 ml)

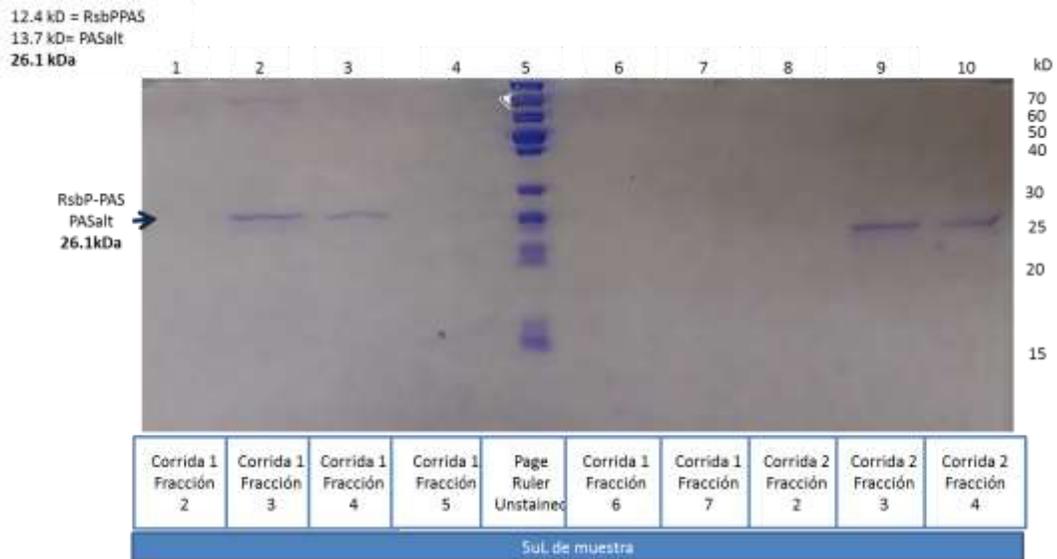
Figura 39 Cromatograma obtenido por SEC para las muestras de la quimera 1: RsbP-PAS_PASa

Cromatogramas obtenidos para las cuatro corridas realizadas para la determinación de la estructura cuaternaria de la proteína quimérica que contiene al dominios PAS de RsbP asociado al dominio PAS alternativo. En la parte superior se muestran los pesos moleculares de los estándares. El triángulo invertido muestra la posición esperada para un monómero de RsbP-PAS_PASa. Sobre el pico perteneciente a la banda esperada se indica el volumen de elución de la proteína de interés, corroborado por medio de SDS-PAGE al 15%, se observa que la proteína de interés eluye entre los 10 y 11 mL. Estos cromatogramas fueron obtenidos por medio del programa sigma plot 13.0.

○ **5.11.1.3 Análisis por SDS-PAGE para las fracciones colectadas durante el SEC para las muestras de la Quimera 1: RsbP-PAS_PASa**

En la figura 40 se observa el análisis de las fracciones colectadas durante el SEC por medio de SDS-PAGE al 15% se logró determinar en qué fracciones se encontraba presente la proteína de interés por medio de una banda esperada a los 26 kDa.

SDS-PAGE para el análisis de las fracciones de las corridas 1 y 2



SDS-PAGE para el análisis de las fracciones de las corridas 3 y 4

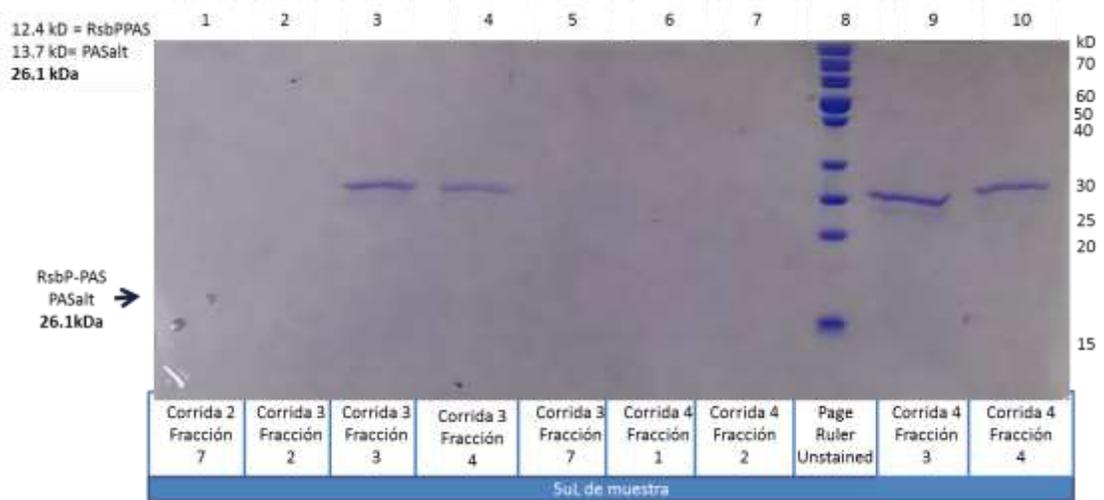


Figura 40 SDS-PAGE al 15% de las fracciones colectadas durante SEC para la quimera 1: RsbP-PAS_PASa

En el gel de poliacrilamida superior se cargaron en los carriles 1 al 4, 6 y 7 fracciones colectadas durante la corrida 1, en los carriles 8 al 10 se cargaron fracciones colectadas durante la corrida 2 y en el carril 5 se cargó el marcador de peso molecular.

En el gel de poliacrilamida inferior se cargó en el carril 1 una de las fracciones colectadas durante la corrida 2 en los carriles 2 al 5 fracciones colectadas durante la corrida 3, en los carriles 6, 7, 9 y 10 fracciones colectadas durante la corrida 4 y en el carril 8 se cargó el marcador de peso molecular.

En la figura 41 se muestra un cromatograma donde se integran los resultados de las cuatro corridas para RsbP-PAS-PASa y se relacionan al resultado obtenido por medio de SDS-PAGE al 15%, se puede observar que en las cuatro corridas la proteína eluye entre los 10 y 11 mL.

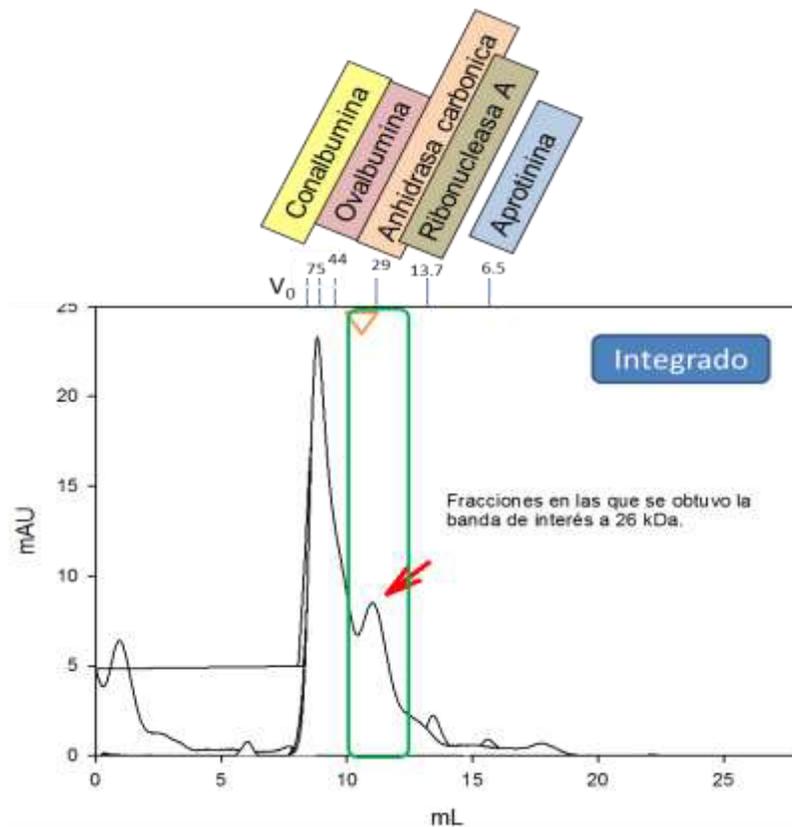


Figura 41 Cromatograma integrado de las 4 corridas por SEC para la quimera 1: RsbP-PAS_PASa
Cromatograma integrado de las 4 corridas para la determinación de la estructura cuaternaria de la proteína quimérica que contiene al dominios PAS de RsbP asociado al dominio PAS alternativo. En la parte superior se muestran los estándares de bajo peso molecular con su respectivo peso molecular. El triángulo invertido muestra la posición de elución esperada para un monómero de RsbP-PAS_PASa. Con la flecha naranja se indica el pico que pertenece a la proteína de interés corroborado por medio de SDS-PAGE al 15%. Se observa que la proteína de interés eluye entre los 10 y 11 mL. Este cromatograma fue obtenido por medio del programa sigma plot 13.0.

- 5.11.1.4 Determinación del estado oligomérico para la Quimera 1:
RsbP-PAS_PASa

Cálculos realizados para la quimera 1: RsbP-PAS_PASa

PAS_PASa		
Corrida	Ve	kav
1	10.70	0.144
2	10.94	0.159
3	10.96	0.160
4	11.01	0.164

$$y = -0.4228x + 2.0647$$

$$R^2 = 0.987$$

	Kav	fomula	formula	Log PM	Antilog	PM/26.12
Corrida	y	m	b	X=(Y-b)/m	PM (kDa)	Estado oligomerico
1	0.144	-0.423	2.065	4.544	34.976	1
2	0.159	-0.423	2.065	4.507	32.153	1
3	0.160	-0.423	2.065	4.504	31.928	1
4	0.164	-0.423	2.065	4.497	31.373	1

➤ **5.11.2 Estructura cuaternaria para la Quimera 2: RsbP-PAS_Bucle_GGDEF**

Con base en el cromatograma obtenido para el azul dextran y los estándares de bajo peso molecular que se muestran en la figura 42, se determinó el volumen de elución para cada uno de los estándares.

○ **5.11.2.1 SEC para el azul dextran y estandares de bajo peso molecular para Quimera 2**

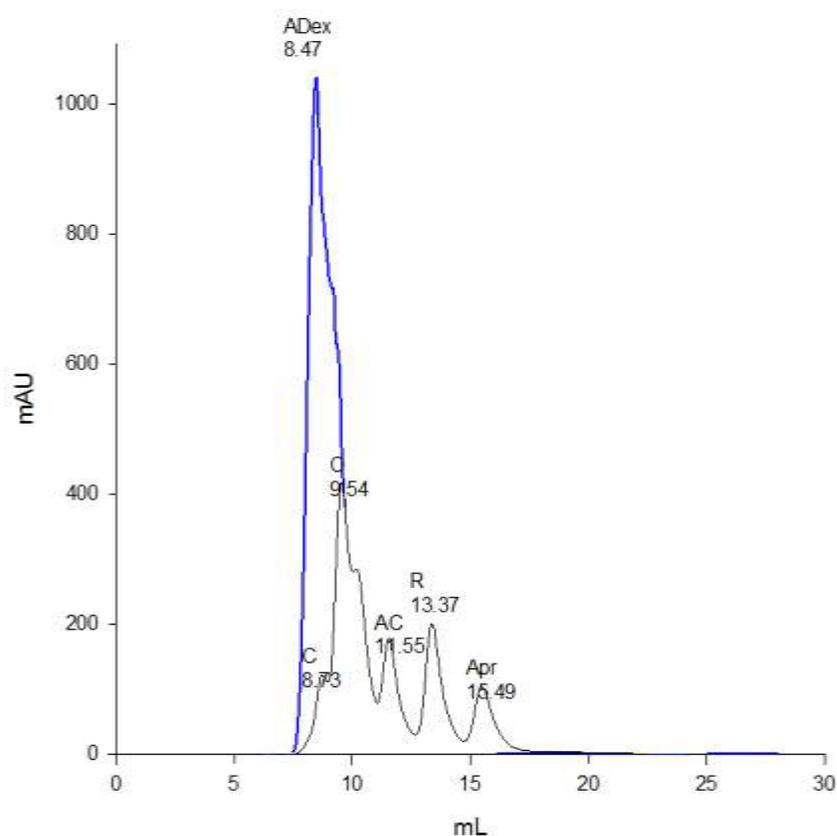


Figura 42 Cromatograma obtenido por SEC para el azul dextran y los estandares de bajo peso molecular

Cromatograma obtenido para el azul dextran y los estándares de bajo peso molecular del kit "Gel filtration calibration kit" de GE Helathcare, donde: Conalbumina (C), Ovalbumina (O), Anhidrasa carbónica (CA), Ribonucleasa A (R) Y Aprotinina (Apr). Este cromatograma fue obtenido por medio del programa sigma plot 13.0.

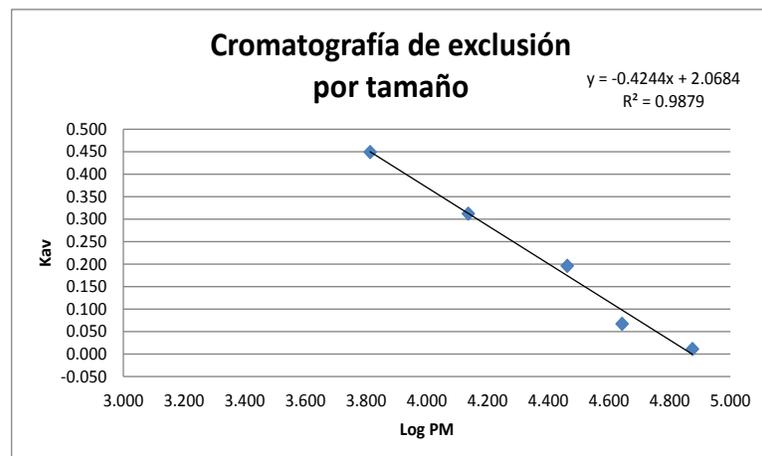
Estandares utilizados		
Standard	Peso Molecular (Da) PM	Volumen de elución (mL) (Ve)
Aprotinina	6500	15.42
Ribonucleasa A	13700	13.28
Anhidrasa carbonica	29000	11.47
Ovalbumina	44000	9.46
Canalbumina	75000	8.59
Azul dextran	Void volume (Vo)	8.42
Volumen de columna	(Vc)	24.00

Para la preparación de la curva de calibración

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_c - V_o}$$

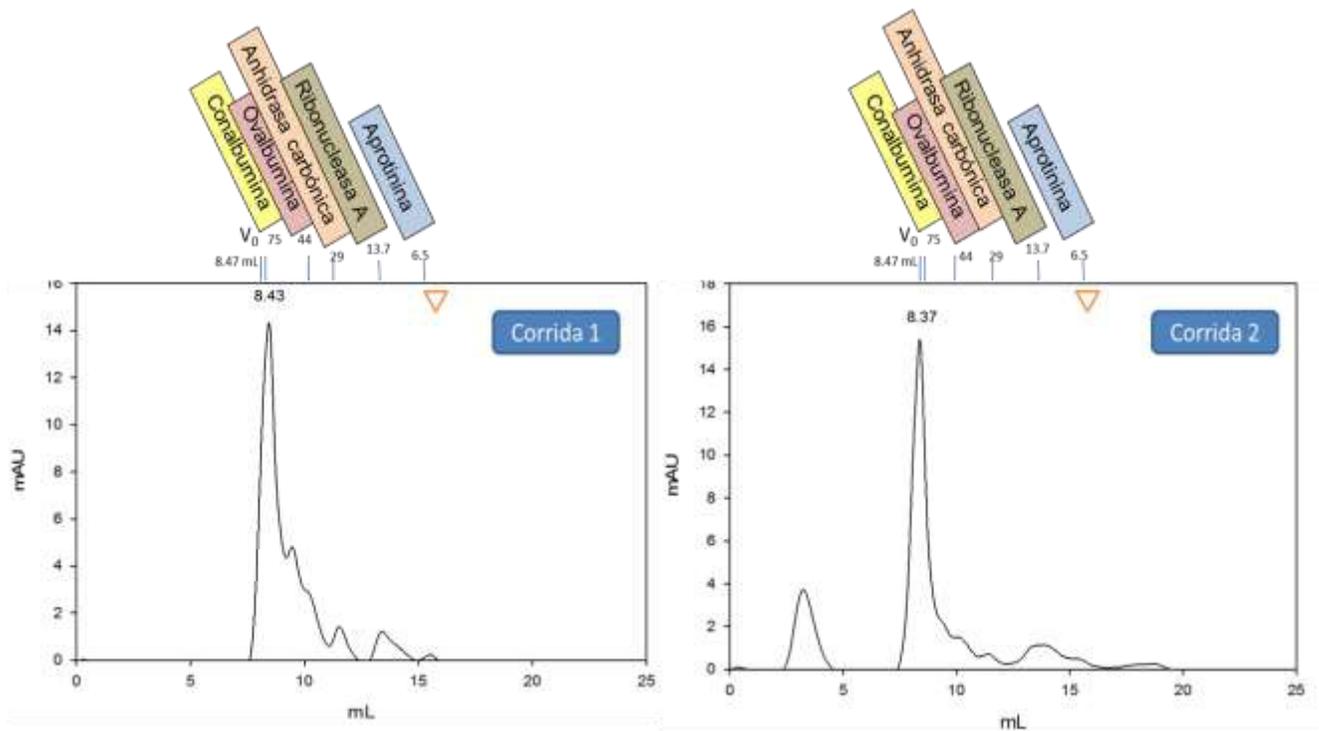
$$K_{av} = \frac{V_e - 8.42}{24.00 - 8.42}$$

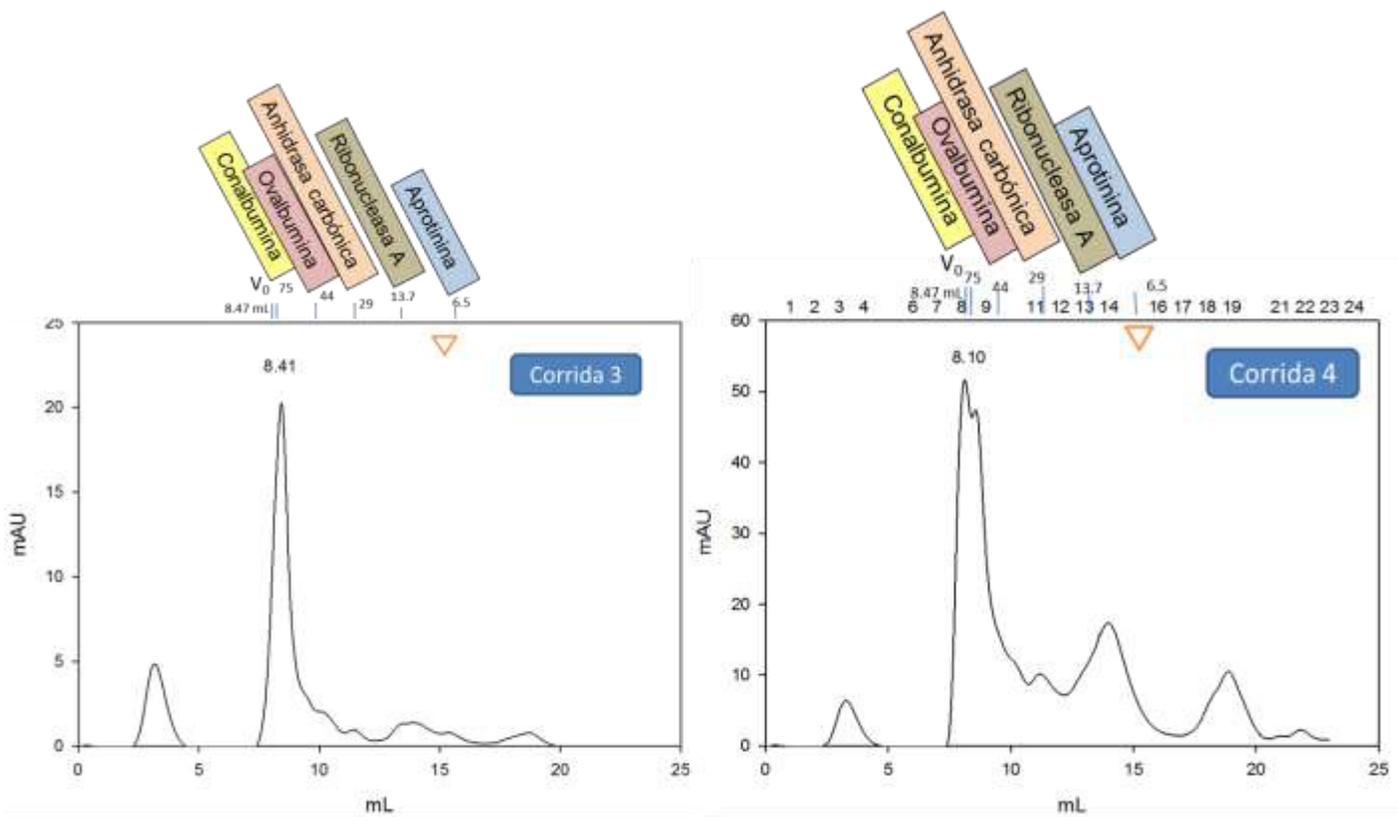
Estandares utilizados		
Standard	Log PM	Kav
Aprotinina	3.813	0.449
Ribonucleasa A	4.137	0.312
Anhidrasa carbonica	4.462	0.196
Ovalbuina	4.643	0.067
Canalbumina	4.875	0.011



○ 5.11.2.2 SEC para las muestras de la Quimera 2: RsbP-
PAS_Bucle_GGDEF

En la figura 43 se muestran los cromatogramas obtenidos por medio de la cromatografía de exclusión por tamaño para la determinación del peso molecular de la proteína de interés para la quimera 2.





▽ Posición de elución esperada para un monómero de RsbP-PAS-CC-GGDEF (36.77 kDa; 15.58 ml)

Figura 43 Cromatograma obtenido por SEC para las muestras de la quimera 2: RsbP-PAS_Bucle_GGDEF

Cromatogramas obtenidos para las cuatro corridas realizadas para la determinación de la estructura cuaternaria de la proteína quimérica que contiene al dominios PAS de RsbP asociado al bucle enrollado y al dominio de respuesta GGDEF. En la parte superior se muestran los pesos moleculares de los estándares. El triángulo invertido muestra la posición esperada para un monómero de RsbP-PAS_Bucle_GGDEF. Sobre el pico perteneciente a la banda esperada se indica el volumen de elución de la proteína de interés, corroborado por medio de SDS-PAGE al 15%. Estos cromatogramas fueron obtenidos por medio del programa sigma plot 13.0.

○ **5.11.2.3 Análisis por SDS-PAGE para las fracciones colectadas durante el SEC para las muestras de la Quimera 2: RsbP-PAS_Bucle_GGDEF**

En la figura 44 se observa el análisis de las fracciones colectadas durante el SEC por medio de SDS-PAGE al 15% se logró determinar en qué fracciones se encontraba presente la proteína de interés, esperando una banda a los 37 kDa.

SDS-PAGE para el análisis de las fracciones de las corridas 2 y 3



SDS-PAGE para el análisis de las fracciones de las corridas 3 y 4



Figura 44 SDS-PAGE al 15% de las fracciones colectadas durante SEC para la quimera 2: RsbP-PAS_Bucle_GGDEF

En el gel de poliacrilamida superior se cargaron en los carriles 1 a 6 fracciones colectadas durante la corrida 2, en el carril 7 se cargó el marcador de peso molecular, en los carriles 8 al 10 se cargó muestras de las corrida 3.

En el gel de poliacrilamida inferior se cargó en los carriles 1 a 3 fracciones colectadas durante la corrida 3 en los carriles 4 a 9 fracciones colectadas durante la corrida 4, en el carril 10 se cargó el marcador de peso molecular.

En la figura 45 se muestra un cromatograma donde se integran los resultados de las cuatro corridas para RsbP-PAS-Bucle_GGDEF y se relacionan al resultado obtenido por medio de SDS-PAGE al 15%, se observa que la proteína de interés eluye entre los 8 y 9 mL.

*De la corrida 1 no se colectaron fracciones.

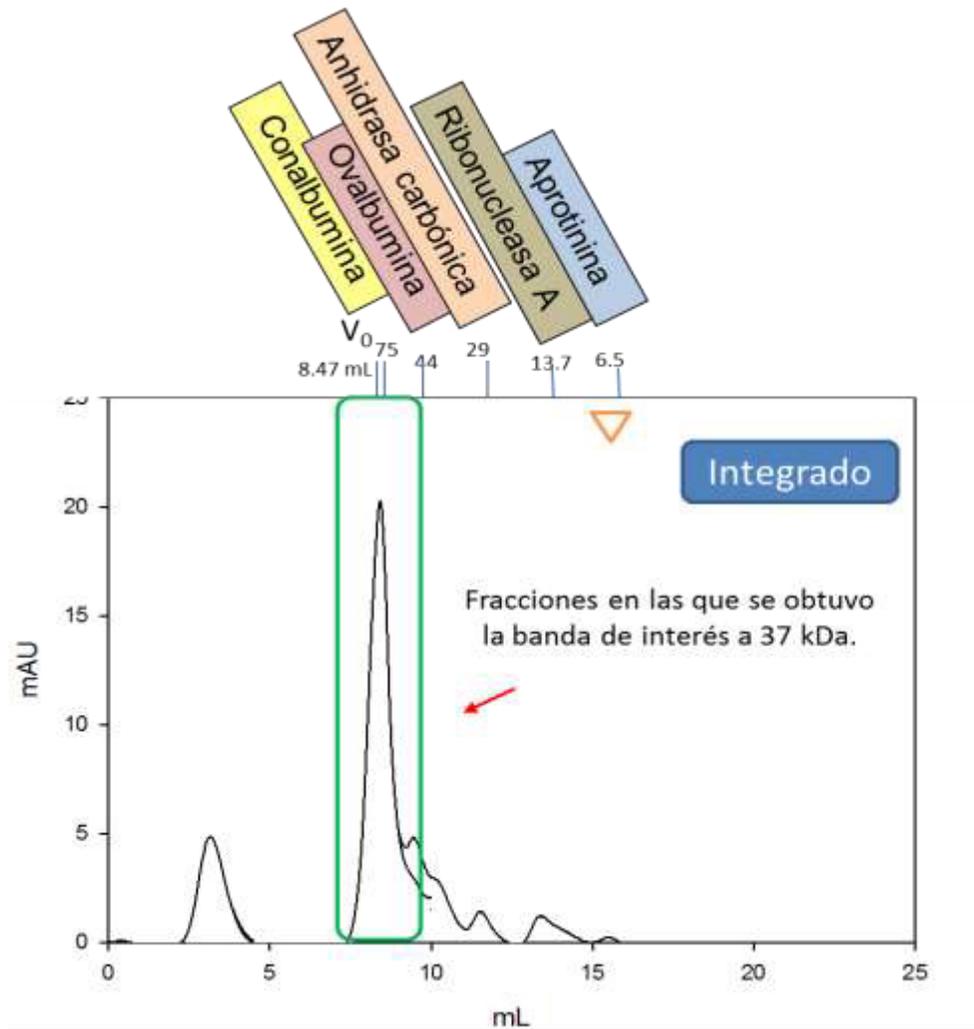


Figura 45 Cromatograma integrado de las 4 corridas por SEC para la quimera 2: RsbP-PAS_Bucle_GGDEF

Cromatograma integrado de las 4 corridas para la determinación de la estructura cuaternaria de la proteína quimérica que contiene al dominios PAS de RsbP asociado al bucle enrollado y el dominio de respuesta GGDEF dominio. En la parte superior se muestran los pesos moleculares de los estándares. El triángulo invertido muestra la posición esperada para un monómero de RsbP-PAS_Bucle_GGDEF. Con la flecha naranja se indica el pico que pertenece a la proteína de interés corroborado por medio de SDS-PAGE al 15%. Se observa que la proteína de interés eluye entre los 8 y 9 mL.

- 5.11.2.4 Determinación del estado oligomérico para la Quimera 2:
RsbP-PAS_Bucle_GGDEF

Cálculos realizados para la quimera 2: RsbP-PAS_Bucle_GGDEF

PAS_Bucle_GGDEF		
Corrida	Ve	kav
1	8.43	0.0006
2	8.37	-0.0032
3	8.41	-0.0006
4	8.1	-0.0205

$$y = -0.4244x + 2.0684$$

$$R^2 = 0.9879$$

	Kav	fomula	formula	Log PM	Antilog	(PM/36.76)
Corrida	y	m	b	X=(Y-b)/m	PM (kDa)	Estado oligomeric
1	0.001	-0.424	2.068	4.872	74.506	2
2	-0.003	-0.424	2.068	4.881	76.079	2
3	-0.001	-0.424	2.068	4.875	75.027	2
4	-0.021	-0.424	2.068	4.922	83.580	2

➤ **5.11.3 Estructura cuaternaria para la Quimera 3: RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF**

Con base en el cromatograma obtenido para el azul dextran y los estándares de bajo peso molecular que se muestran en la figura 46, se determinó el volumen de elución para cada uno de los estándares.

○ **5.11.3.1 SEC para el azul dextran y estándares de bajo peso molecular para Quimera 3**

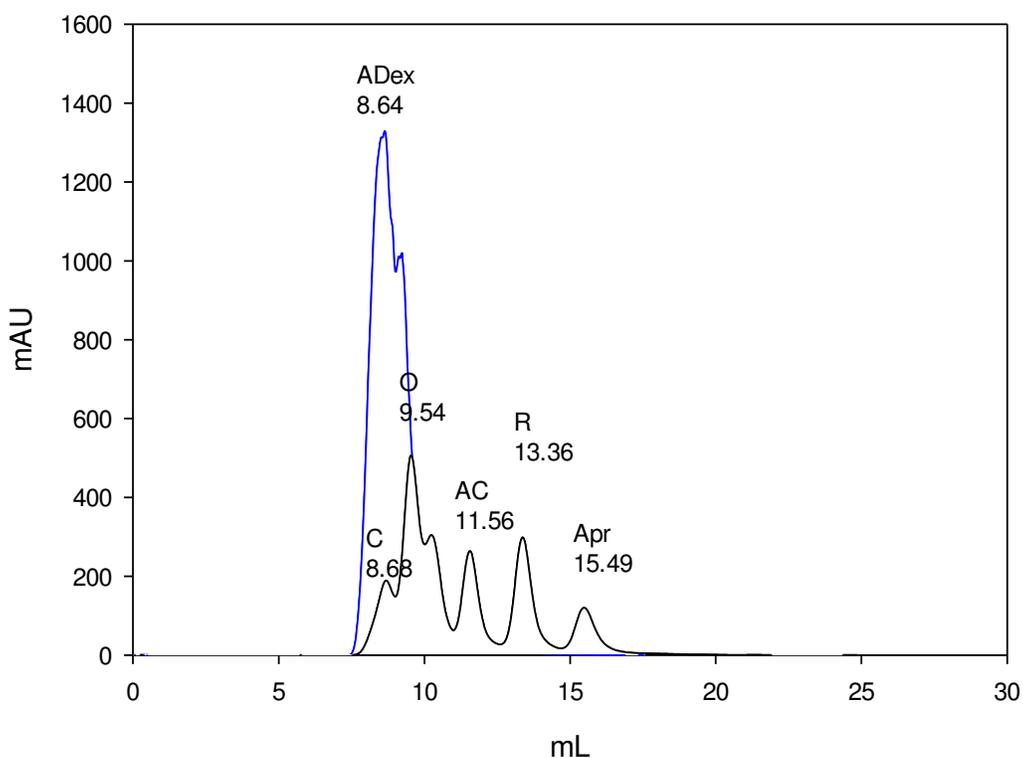


Figura 46 Cromatograma obtenido por SEC para el azul dextran y los estándares de bajo peso molecular

Cromatograma obtenido para el azul dextran y los estándares de bajo peso molecular del kit "Gel filtration calibration kit" de GE Helathcare, donde: Conalbumina (C), Ovalbumina (O), Anhidrasa carbónica (CA), Ribonucleasa A (R) Y Aprotinina (Apr). Este cromatograma fue obtenido por medio del programa sigma plot 13.0.

Con base en el cromatograma obtenido para el azul dextran y los estándares de bajo peso molecular, se determinó el volumen de elución para cada uno de los estándares, los cuales se muestran a continuación:

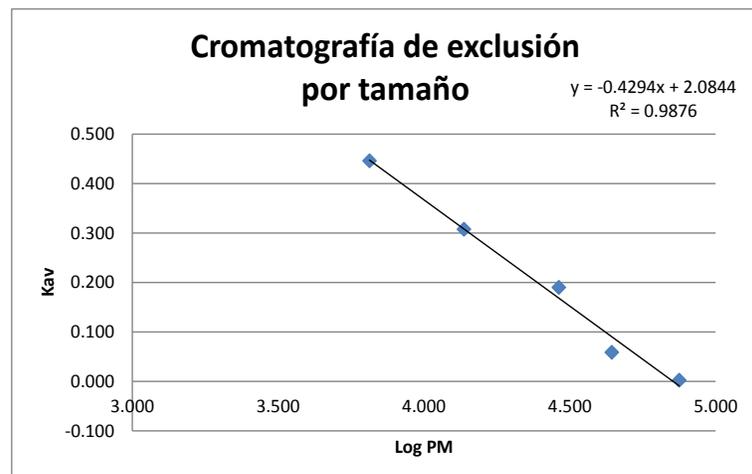
Estándares utilizados		
Standard	Peso Molecular (Da) PM	Volumen de elución (mL) (Ve)
Aprotinina	6500	15.49
Ribonucleasa A	13700	13.36
Anhidrasa carbonica	29000	11.56
Ovalbuina	44000	9.54
Canalbumina	75000	8.68
Azul dextran	Void volume (Vo)	8.64
Volumen de columna	(Vc)	24.00

Para la preparación de la curva de calibración

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_c - V_o}$$

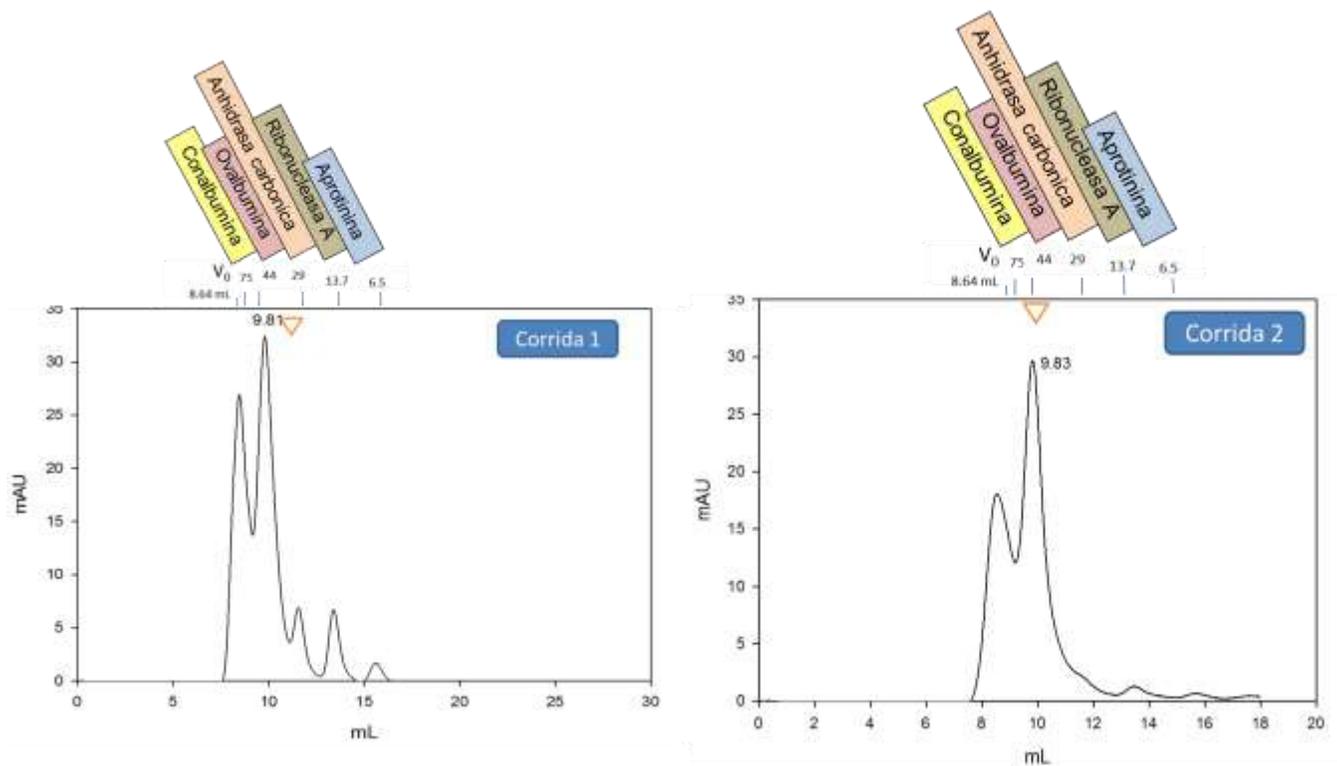
$$K_{av} = \frac{V_e - 8.64}{24.00 - 8.64}$$

Estándares utilizados		
Standard	Log PM	Kav
Aprotinina	3.813	0.446
Ribonucleasa A	4.137	0.307
Anhidrasa carbonica	4.462	0.190
Ovalbuina	4.643	0.059
Canalbumina	4.875	0.003



○ 5.11.3.2 SEC para las muestras de la Quimera 3: RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF

En la figura 47 se muestran los cromatogramas obtenidos por medio de la cromatografía de exclusión por tamaño para la determinación del peso molecular de la proteína de interés para la quimera 3.



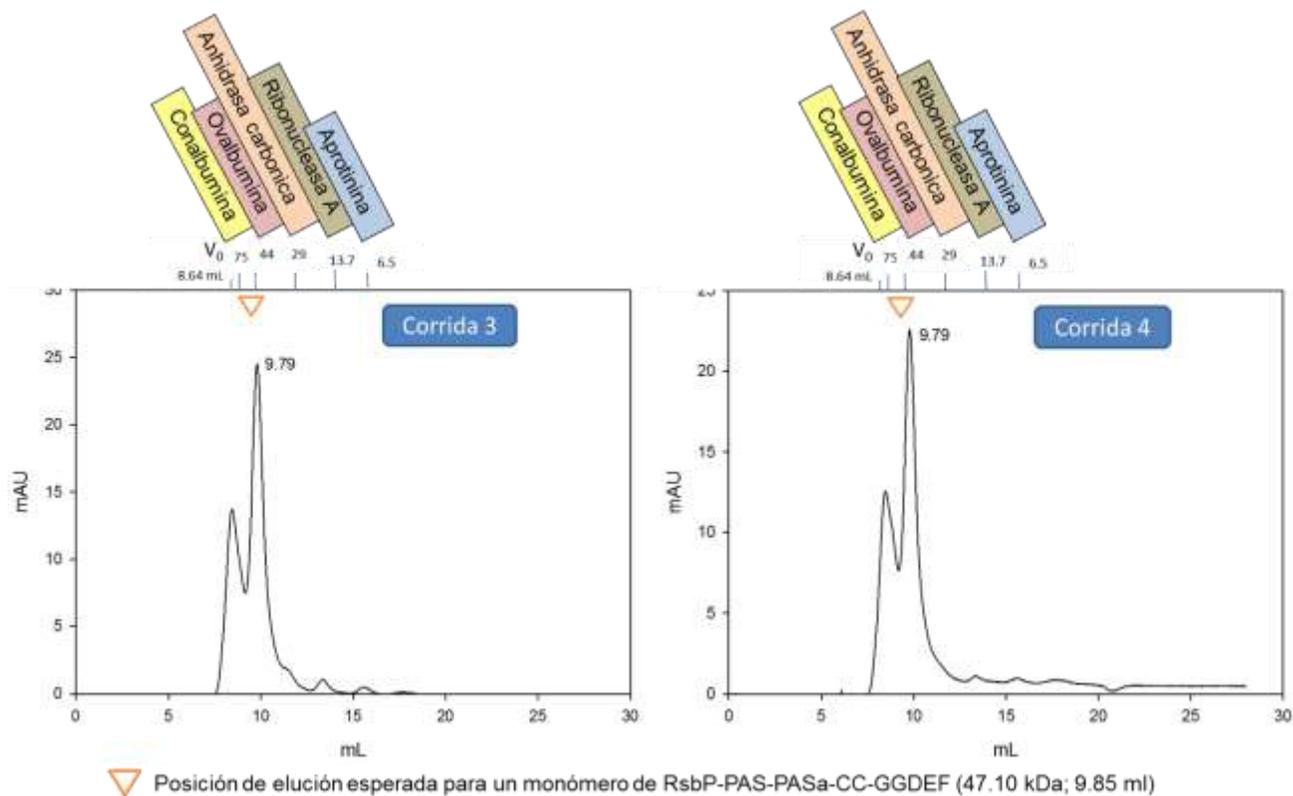


Figura 47 Cromatograma obtenido por SEC para las muestras de la quimera 3: RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF

Cromatogramas obtenidos para las cuatro corridas realizadas para la determinación de la estructura cuaternaria de la proteína quimérica que contiene al dominios PAS de RsbP asociado a un dominio PAS alternativo, el bucle enrollado y al dominio de respuesta GGDEF. En la parte superior se muestran los pesos moleculares de los estándares. El triángulo invertido muestra la posición esperada para un monómero de RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF. Sobre el pico perteneciente a la banda esperada se indica el volumen de elución de la proteína de interés, corroborado por medio de SDS-PAGE al 15%. Se observa que la proteína de interés eluye entre los 9 y 10 mL. Este cromatograma fue obtenido por medio del programa sigma plot 13.0.

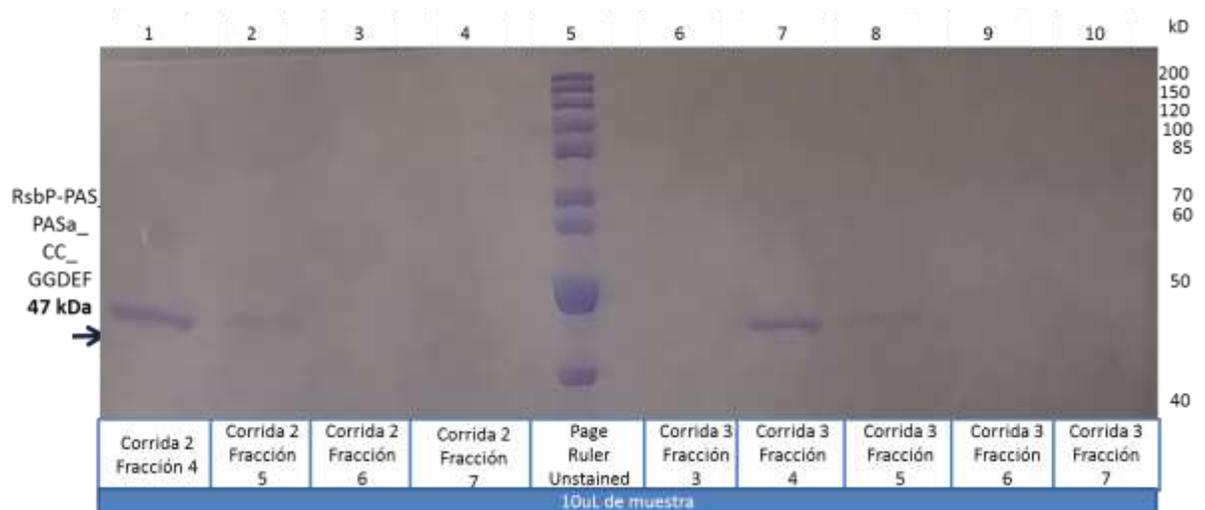
- **5.11.3.3 Análisis por SDS-PAGE para las fracciones colectadas durante el SEC para las muestras de la Quimera 3: RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF**

En la figura 48 se observa el análisis de las fracciones colectadas durante el SEC por medio de SDS-PAGE al 15% se logró determinar en qué fracciones se encontraba presente la proteína de interés, esperando una banda a los 47 kDa.

SDS-PAGE para el análisis de las fracciones de las corridas 1 y 2



SDS-PAGE para el análisis de las fracciones de las corridas 2 y 3



SDS-PAGE para el análisis de las fracciones de las corridas 3, 4 y 5

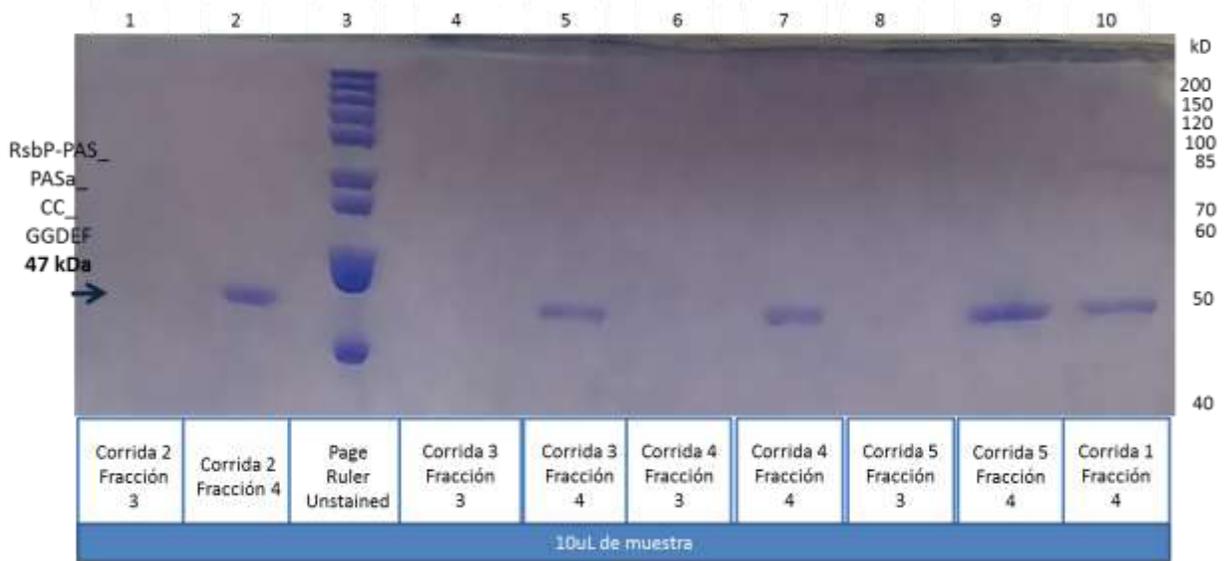


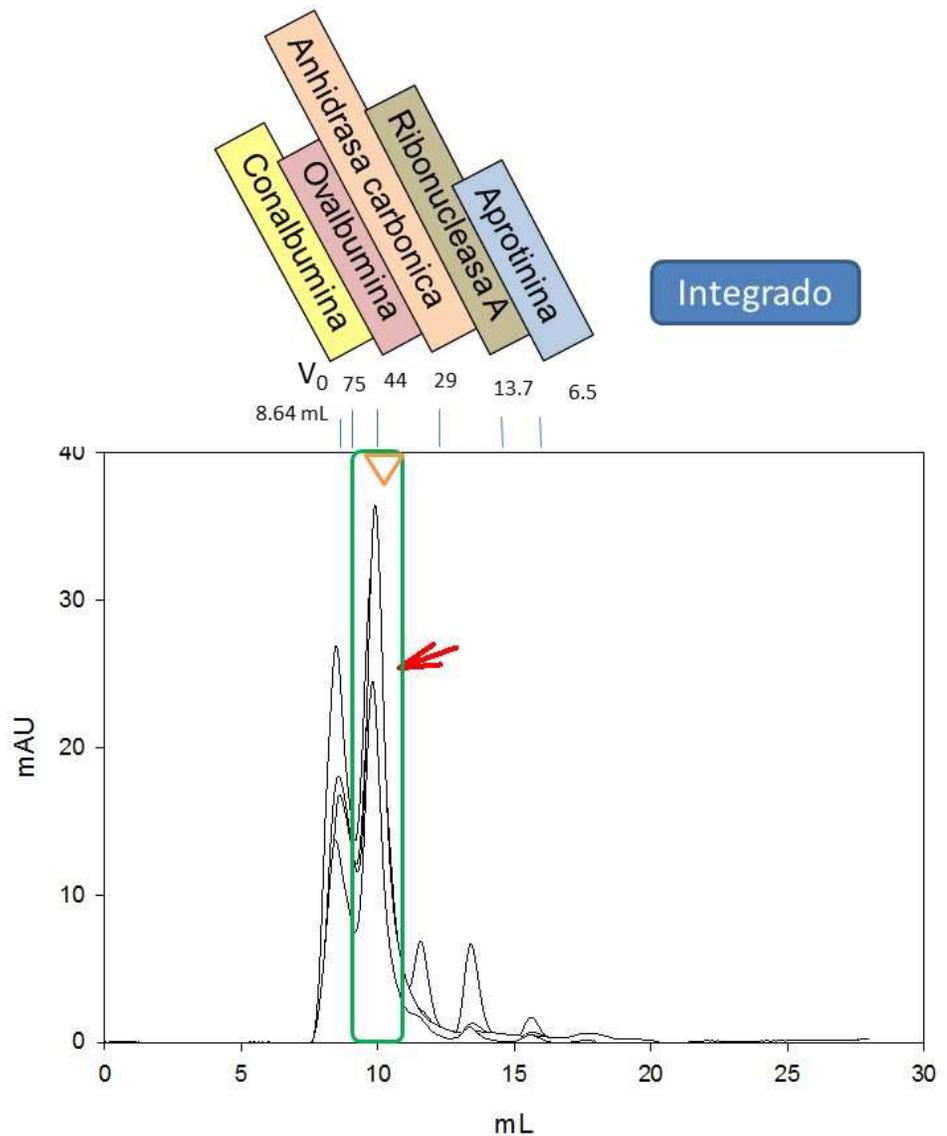
Figura 48 SDS-PAGE al 15% de las fracciones colectadas durante SEC para la quimera 3: RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF

En el gel de poliacrilamida superior se cargaron en los carriles 1 al 8 fracciones colectadas durante la corrida 1, en el carril 9 se cargó el marcador de peso molecular, en carril 10 se cargó una muestra de las corrida 2.

En el gel de poliacrilamida siguiente se cargó en los carriles 1 al 4 fracciones colectadas durante la corrida 2 en el carril 5 se cargó el marcador de peso molecular, en los carriles 6 al 10 se cargaron muestras de las fracciones colectadas durante la corrida 3.

En el gel de poliacrilamida siguiente se cargó en los carriles 1 y 2 fracciones colectadas durante la corrida 2 en el carril 3 se cargó el marcador de peso molecular, en los carriles 4 y 5 se cargó muestras de la corrida 3, en los carriles 6 y 7 se cargaron muestras de la corrida 4, en los carriles 8 al 9 se cargó muestras de la corrida 5 y en el carril 10 se volvió a cargar una muestra de la corrida 1.

En la figura 49 se muestra un cromatograma donde se integran los resultados de las cuatro corridas para RsbP-PAS-PASa_Bucle_GGDEF y se relacionan al resultado obtenido por medio de SDS-PAGE al 15%. Se observa que la proteína de interés eluye entre los 9 y 10 mL.



▽ Posición de elución esperada para un monómero de RsbP-PAS-PASa-CC-GGDEF (47.10 kDa; 9.85 ml)

Figura 49 Cromatograma integrado de las 4 corridas por SEC para la quimera 3: RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF

Cromatograma integrado de las 4 corridas para la determinación de la estructura cuaternaria de la proteína quimérica que contiene al dominios PAS de RsbP asociado al dominio PAS a, el bucle enrollado y el dominio de respuesta GGDEF. En la parte superior se muestran los pesos moleculares de los estándares. El triángulo invertido muestra la posición esperada para un monómero de RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF. Con la flecha naranja se indica el pico que pertenece a la proteína de interés corroborado por medio de SDS-PAGE al 15%. Se observa que la proteína de interés eluye entre los 9 y 10 mL. Este cromatograma fue obtenido por medio del programa sigma plot 13.0.

○ 5.11.3.4 Determinación del estado oligomérico para la Quimera 3:

RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF

Cálculos realizados para la quimera 3: RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF

RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF		
Corrida	Ve	kav
1	9.81	0.0762
2	9.83	0.0775
3	9.79	0.0749
4	9.79	0.0749
5	9.9	0.0820

$$y = -0.4294x + 2.0844$$

	Kav	fomula	formula	Log PM	Antilog	(PM/47.10)
Corrida	y	m	b	X=(Y-b)/m	PM (Da)	Estado oligomeric
1	0.076	-0.429	2.084	4.677	47514.238	1
2	0.077	-0.429	2.084	4.674	47183.639	1
3	0.075	-0.429	2.084	4.680	47847.153	1
4	0.075	-0.429	2.084	4.680	47847.153	1
5	0.082	-0.429	2.084	4.663	46044.554	1

CAPITULO 6

6 Discusión de Resultados

Con el objetivo de determinar cambios en la formación de estructuras cuaternarias de los dominios PAS de RsbP con el dominio de respuesta GGDEF por medio de distintos tipos de unión entre ellos se diseñaron un total de tres proteínas quiméricas haciendo uso de programas bioinformáticos.

Con base en investigaciones previas consideramos clave para el diseño de las quimeras las características reportadas por Taylor y Zuhlín (1999) y complementadas por Möglich y Moffat (2009). De modo que el dominio PAS fue colocado hacia el extremo N-terminal del dominio de respuesta y comprendió una región de 110 aminoácidos en los cuales está contenida su estructura característica compuesta por cinco laminas β antiparalelas, flanqueadas por varias hélices α [4, 5, 17].

El bucle enrollado se diseñó con su patrón característico de heptadas y con un 41% de residuos hidrofóbicos ya que en la revisión bibliográfica se indica que estas características son críticas y estrictas sobre todo si el dominio PAS está asociado con el dominio GGDEF. La secuencia para el dominio de respuesta GGDEF fue obtenida mediante la alineación de 14 proteínas en el programa bioinformático “Clustal Omega”, una vez obtenida la secuencia nos aseguramos de que su motif GGDEF característico estuviera presente [1, 3, 4, 27].

Las proteínas quiméricas fueron diseñadas de la siguiente forma:

La quimera 1, se compone del dominio PAS de RsbP de *Bacillus subtilis* y el dominio PAS 1 del *fitocromo A* como dominio PAS alternativo. Esta quimera se diseñó sin dominio de respuesta asociado de modo que funcionó como quimera control. Se seleccionó el dominio PAS 1 del *fitocromo A*, como dominio PAS alternativo ya que se ha reportado previamente por Kim *et al* (2006) que es un monómero y no interviene con la transducción de señales del fotoreceptor [41].

La quimera 2, se compone del dominio PAS de RsbP de *Bacillus subtilis*, el bucle enrollado y el dominio diguanilato ciclasa (GGDEF) de *Bacillus sp.* Esta quimera se diseñó con base en lo reportado por Moglich, Ayers y Moffat (2009), en el que indicaron que de 2074 proteínas analizadas con la asociación PAS- GGDEF, un 85% mostraron un tamaño de ligando idéntico, lo que sugiere que este ligando debe de cumplir con requerimientos muy estrictos. Para facilitar su diseño utilizamos el bucle enrollado ya unido al dominio GGDEF presente en *Bacillus sp.* y con esta quimera se esperaba poder evaluar cuál es la contribución del bucle enrollado a la formación de la estructura cuaternaria [1,4, 41].

La quimera 3, se compone del dominio PAS de RsbP de *Bacillus subtilis*, el dominio PAS 1 del *fitocromo A*, el bucle enrollado y el dominio diguanilato ciclasa (GGDEF) de *Bacillus sp.* En el diseño de esta quimera se consideró lo reportado por Nadezhdin, Brody y Price (2011) en el cual mediante un BLAST encontraron que en 36 de 45 proteínas analizadas, dominios homólogos a RsbP-PAS se encontraban conectadas al dominio de respuesta por medio de un bucle enrollado de al menos 21 residuos. En aquellas proteínas carentes de un bucle enrollado encontraron uno o dos dominios PAS adicionales. Con esta

quimera se esperaba poder evaluar como modificaciones en la estructura de unión entre el dominio PAS y el dominio de respuesta afectaban la formación de la estructura cuaternaria [1].

A lo largo de las clonaciones se utilizó como vector el pGEX-4T-2. Una de las principales ventajas que ofrece este vector es que contiene la secuencia que codifica para la proteína de fusión GST, que facilita su purificación ya que presenta alta afinidad a glutatión acoplado a una matriz con sefarosa. Esta unión es reversible y fácilmente se puede eluir bajo condiciones no desnaturalizantes con un amortiguador de elución que contenga glutatión reducida. También contiene un sitio específico entre GST y la proteína de interés que puede ser removida mediante una proteasa específica, en este caso trombina [24].

Previo a la expresión a gran escala las quimeras fueron enviadas a “Eton Bioscience”, para análisis de secuenciación y estos resultados obtenidos se compararon en el programa “aPe”, (A plasmid editor) con las secuencias diseñadas, esto con el fin de asegurar una construcción correcta para las distintas quimeras.

Durante la expresión a gran escala se obtuvieron a partir de 2 litros de expresión 2.3, 0.3 y 1.8 mg de proteína pura para las quimeras 1,2 y 3 respectivamente. En la quimera 2 la baja producción de proteína fue debido a la lisis celular ya que se presentaron problemas con la prensa francesa y por lo tanto se perdió una alta cantidad de proteína. La cantidad de 0.3mg de proteína obtenida para la quimera 2 a pesar de ser una cantidad pequeña fue suficiente para su análisis cualitativo y determinación de su estructura cuaternaria

por medio de cromatografía de exclusión por tamaño. Lo que nos indica la sensibilidad del método.

Una de las prácticas que nos permitió obtener altas cantidades de proteína para las quimeras 1 y 3 fue el lisar las células en la prensa francesa de 3 a 4 veces. En un inicio se realizó la lisis haciendo uso del sonicador pero las condiciones utilizadas fueron muy severas (30s de sonicación y 1 minuto de descanso) y posiblemente desnaturalizó una gran parte de la proteína dando rendimientos menores a 0.1mg de proteína total. También ayudo el análisis de las fracciones colectadas durante la primera cromatografía por afinidad en esta, al evaluar las fracciones por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida se pudo observar una gran cantidad de proteína en la fracción no unida, por lo que en las cromatografías por afinidad siguientes se volvió a cargar la fracción no unida 2 o 3 veces para poder permitir una mejor unión a la resina y por ende una mayor cantidad de proteína.

El perfil de elución obtenido mediante la cromatografía de filtración en gel demostró lo siguiente:

Para la quimera 1 se obtuvo una proteína de entre 31-34 kDa consistente con un monómero. El dominio PAS de RsbP asociado a un dominio PAS del fitocromo A es decir, un dominio PAS completo y distinto a RsbP forma un estado oligomérico en forma de monómero tal y como lo esperábamos, ya que aún no hemos asociado ningún dominio de respuesta.

Esta quimera es utilizada como control y el resultado concuerda con los resultados reportados por Vreede *et al* (2003) donde el dominio PAS, se encuentra en forma de

monómero al no tener dominios de respuesta asociados. Ayers y Moffat (2008) también demostraron que propiedades adicionales tales como el dominio efector asociado al dominio PAS influyen el estado oligomérico de la proteína, por ejemplo la proteína completa *ecDOS* con un dominio de respuesta tipo fosfodiesterasa y un dominio heme-PAS resulta en la formación de tetrámeros mientras que el dominio heme-PAS por si solo forma dímeros. Por lo tanto, la estructura cuaternaria puede diferir dependiendo si el dominio PAS está aislado o como parte de una proteína completa [4, 15, 23].

La quimera 2 compuesta por RsbP-PAS_Bucle_GGDEF, mostró un perfil de elución en la cromatografía de filtración en gel consistente con una proteína de entre 74-83 kDa que concuerda con un estado oligomérico en forma de dímero. Este resultado coincide con lo reportado por Nadezhdin, Brody y Price (2011) en el que mencionan que los dominios PAS funcionan como dímeros al estar asociados con histidina quinasa y con diguanilato ciclasas. De igual manera Tan, Rao, Pasunooti *et al* (2013), reportaron que los dominios PAS tienden a dimerizar en un gran número de maneras diferentes presentando una organización paralela, anti paralela o ambas simultáneamente formando homo o heterodímeros en asociación con histidinas quinasas o GGDEF [1, 34].

La quimera 3, compuesta por RsbP-PAS_PASa_Bucle_GGDEF, muestra con su perfil de elución una proteína de entre 46-48 kDa consistentes con un monómero. Contrario a lo que esperábamos ya que estudios previos realizados por Nadezhdin *et al* (2011) y Yaning *et al* (2009) han descrito tras ensayos enzimáticos y análisis estructurales que el dominio PAS unido a histidinas o a diguanilato ciclasas funcionan como dímeros [15, 34].

El resultado obtenido sugiere que quizá el requerimiento para la interacción entre PAS y GGDEF requiera de la presencia de un dominio PAS alternativo o la presencia de un bucle enrollado, pero al presentarse ambos, esta interacción se vea alterada y no se cumplan los requerimientos estrictos para el ligando entre estos dominios. Al comparar el bucle en el diseño de las quimeras 2 y 3 encontramos 56 y 168 residuos de aminoácidos respectivamente, aún se conservan las heptadas pero pudiera ser que un bucle demasiado grande altere la interacción.

Moglich y Moffat (2009), demostraron que la característica de los residuos de aminoácidos de la interface de los dominios PAS unidos al extremo N-terminal del dominio diguanilato ciclasa (GGDEF), mostraban patrón de hidrofobicidad y residuos que difieren entre ellos por múltiplos de 7. En aproximadamente 85% de las proteínas analizadas durante su investigación mostraron ligandos entre los dominios PAS y GGDEF con un tamaño idéntico, lo que sugiere que los requerimientos estructurales para el ligando son más rigurosos entre PAS y GGDEF en comparación a la asociación de PAS con otros dominios de respuesta [4].

Ayers y Moffat (2008) también demostraron que propiedades adicionales tales como la composición de aminoácidos del ligando o interface influyen la formación del estado oligomérico de las proteínas y concluyeron que la plasticidad (flexibilidad) de los monómeros de PAS hace su reacomodo particularmente sensible al contexto. Nadezhdin, Chester y Price (2011) describen que el dominio PAS de RsbP, se encuentra en general conectado al dominio de respuesta por medio de un bucle enrollado y en ausencia del bucle entonces se presentan uno o más dominios PAS alternativos [1, 15, 23].

CAPÍTULO 7

7 CONCLUSIONES

Las quimeras diseñadas cumplieron con distintas funciones, la quimera uno compuesta por el dominio PAS de RsbP y el dominio PAS alternativo funcionó como control, en la segunda quimera utilizamos el dominio PAS de RsbP, el bucle enrollado como interface y el dominio GGDEF, con esta se pudo evaluar el impacto del bucle enrollado sobre la formación de la estructura cuaternaria y en la tercera quimera utilizamos al dominio PAS de RsbP, el dominio PAS alternativo, el bucle enrollado y el dominio de respuesta GGDEF, pudiendo evaluar el impacto sobre la formación de la estructura cuaternaria relacionada a alteraciones en el ligando.

El diseño de las quimeras es posible por medio de programas bioinformáticos disponibles en línea entre ellos, clustal omega, uniprot, expasy y charite christo protein, la alineación de proteínas y la predicción de sus estructuras son fundamentales.

El vector seleccionado pGEX-4T-2 nos permitió la correcta clonación corroborada por medio de análisis de secuenciación, tanto el vector como las condiciones determinadas durante las expresiones piloto fueron adecuadas para la expresión de las tres proteínas

quiméricas las cuales por medio de SDS-PAGE fueron verificadas que coincidieran con el peso molecular predicho.

La cromatografía de exclusión por tamaño fue una técnica efectiva y sensible para la determinación de la estructura cuaternaria de las tres proteínas quiméricas ya que pudimos realizar el análisis cualitativo a partir de 0.3 mg/mL de proteína.

En este proyecto la estructura cuaternaria de RsbP-PAS asociado a un dominio PAS alternativo (Quimera 1) resultó en la formación de un monómero; RsbP-PAS asociado a GGDEF a través de un bucle enrollado (Quimera 2) formó un dímero; RsbP-PAS asociado a GGDEF a través de un dominio PAS alternativo y el bucle enrollado (Quimera 3) formó un monómero. En proyectos previos desarrollados en el laboratorio de biotecnología II en la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL dirigidos por el Dr. Xristo Zárate y llevados a cabo por MC. Jessica Gómez se demostró que RsbP-PAS por sí solo forma un monómero mientras que RsbP-PAS en la proteína completa RsbP forma un tetrámero.

Aún no contamos con pruebas suficientes para aceptar o rechazar nuestra hipótesis, sin embargo se observa la plasticidad de los dominios PAS para formar diferentes estados oligoméricos ya sea en forma de monómeros, dímeros y tetrámeros lo que nos proporciona indicios de como los dominios PAS pueden reflejar cambios en su estructura cuaternaria. Estos diferentes estados oligoméricos de los dominios PAS pudieran ser un mecanismo general para la regulación de los dominios efectores. La oligomerización es un componente necesario para la función de los dominios PAS, cambios en su estructura cuaternaria pudieran ser responsables de traducir la señal detectada en una respuesta celular.

La importancia de los dominios PAS radica en su presencia ubicua, formando parte de proteínas sensoriales desde bacterias hasta humanos y es por gran diferencia el dominio sensor más abundante. Dada a la diversidad de respuestas celulares en las que se encuentran asociados una vez entendiendo su funcionamiento se puede lograr desde el diseño de fotosensores y quimiosensores artificiales hasta un mayor entendimiento de algunas enfermedades como las cardiovasculares en las cuales se encuentran involucrados estos dominios.

CAPÍTULO 8

8 PERSPECTIVAS

En este proyecto se logró construir tres proteínas quiméricas y determinar sus estructuras cuaternarias el enfoque a futuro pudiera ser ensayos para la evaluación de la respuesta para estas quimeras. Uno de los retos más difíciles es identificar la señal específica asociada para el dominio sensorial. Los dominios PAS se sabe que son capaces de sentir estímulos físicos y químicos, el dominio de respuesta GGDEF, está directamente asociado a la síntesis de di-GMPc, quien a su vez controla la expresión de genes de virulencia, la formación de biopelículas, entre otros fenotipos, la identificación de la señal que regula a los dominios PAS y en consecuencia el nivel celular de di-GMPc es crucial para entender cómo funciona la asociación entre PAS y GGDEF que en consecuencia nos darán información valiosa de cómo funcionan estos sistemas de señalización en general.

Es importante continuar con el diseño de proteínas quiméricas con el dominio PAS de RsbP, distintos dominios de respuesta y distintos tipos de unión. Cada cambio en la formación de estructuras oligoméricas que vamos identificando para estas proteínas nos van proporcionando un poco más de información, la idea global es entender cómo funcionan estos sistemas para poder lograr el diseño de fotosensores y quimiosensores artificiales y un mejor control sobre aquellas respuestas en las que se encuentran involucrados.

CAPÍTULO 9

9 SEGURIDAD EN EL TRABAJO Y DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

Disposición de los residuos generados

Se manejaron los residuos tanto químicos como biológicos de acuerdo a lo establecido en el reglamento de la Facultad de Ciencias Químicas de la UANL en la tabla a continuación se muestra un resumen detallado de los residuos generados,

Reactivos utilizados				
Entradas	Componentes	Descripción	Colector de desecho	Disposición final
Buffer estándar de Qiagen	1 M Tris Cl pH 7.4 0.5M EDTA pH 8.0	Ningún ingrediente peligroso de acuerdo con el Estándar de Comunicación de Riesgos de OSHA 29CFR 19101200. Según la normativa aplicable no es necesario divulgar ninguno de los componentes.	A: Soluciones salinas de pH 6-8 sales ,ácidos y bases orgánicas	Ofertar el sobrante y las soluciones no-aprovechables a una compañía de vertidos acreditada.
dNTP's	Nucleotidos Tri Fosfato	No es una sustancia o mezcla peligrosa.	No Aplica ya que Son consumidos durante la PCR.	No Aplica
Primers	Oligonucleótidos	No es una sustancia o mezcla peligrosa.	No Aplica Son consumidos durante la reacción.	No Aplica
Taq Polimerasa	Taq DNA Polymerase, de <i>Thermus aquaticus</i> Hidróxido de amonio	No es una sustancia o mezcla peligrosa.	No Aplica Es consumida durante la PCR	No Aplica
Template	DNA	No es una sustancia o mezcla peligrosa.	No Aplica Es consumida durante la PCR	No Aplica
Agarosa	Agarosa en gel, Bromuro de etidio	El gel de agarosa por si solo se reporta lo siguiente: Ningún ingrediente peligroso de acuerdo con el Estándar de Comunicación de Riesgos de OSHA 29CFR 19101200. Según la normativa aplicable no es necesario divulgar ninguno de los componentes. Bromuro de etidio: Clasificación SGA de acuerdo con 29 CFR 1910 (OSHA HCS).	G: Combinaciones orgánicas sólidas	Ofertar el sobrante y las soluciones no-aprovechables a una compañía de vertidos acreditada. Para la eliminación de este producto, dirigirse a un servicio profesional autorizado. Disolver o mezclar el producto con un solvente combustible y quemarlo en un incinerador apto para productos

		Toxicidad aguda, Inhalación (Categoría 3), H331 Mutagenicidad en células germinales (Categoría 2), H341		químicos provisto de postquemador y lavador.
TAE 1X	Tris-Acetate EDTA	Ningún ingrediente peligroso de acuerdo con el Estándar de Comunicación de Riesgos de OSHA 29CFR 19101200. Según la normativa aplicable no es necesario divulgar ninguno de los componentes.	A: Soluciones salinas de pH 6-8, sales, ácidos y bases orgánicas	Ofertar el sobrante y las soluciones no aprovechables a una compañía de vertidos acreditada.
Isopropanol	2-Propanol	Toxicidad para los peces CL50 - Pimephales promelas (Piscardo de cabeza gorda) - 9,640.00 mg/l - 96 h Toxicidad para las dafnias y otros invertebrados acuáticos CE50 - Daphnia magna (Pulga de mar grande) - 5,102.00 mg/l - 24 h Inmovilización CE50 - Daphnia magna (Pulga de mar grande) - 6,851 mg/l - 24 h Toxicidad para las algas CE50 - Desmodesmus subspicatus (alga verde) - > 2,000.00 mg/l - 72 h CE50 - Algae - > 1,000.00 mg/l - 24 h	C: Solvente orgánicos inflamables	Quemar en un incinerador apto para productos químicos provisto de postquemador y lavador, procediendo con gran cuidado en la ignición ya que este producto es extremadamente inflamable. Ofertar el sobrante y las soluciones no aprovechables a una compañía de vertidos acreditada. Para la eliminación de este producto, dirigirse a un servicio profesional autorizado.
Buffer de Lisis	Detergente (dodecil sulfato de sodio) Proteasas	Según la información de el proveedor, no se han investigado adecuadamente las propiedades químicas, físicas y toxicológicas. Por lo que actualmente no se encuentra registrado su información ecológica.	No Aplica Es consumida durante la reacción	Ofertar el sobrante y las soluciones no aprovechables a una compañía de vertidos acreditada. Para la eliminación de este producto, dirigirse a un servicio profesional autorizado.
Células DH5a	Cepa de <i>E. coli</i> modificada con características que permiten la propagación de plásmidos y el mantenimiento de DNA recombinante.	No es una sustancia o mezcla peligrosa.	No aplica. Todo el ADN recombinante se producirá y mantendrá utilizando la cepa DH5α de <i>Escherichia coli</i> .	No aplica

Plásmido (pGEX4T2)	Moléculas de ADN extra cromosómico circular o lineal que se replican y transmiten independientes del ADN cromosómico.	No es una sustancia o mezcla peligrosa.	No aplica.	No aplica
Caldo LB	Extracto de levadura Tryptona Cloruro de sodio	No es una sustancia o mezcla peligrosa.	A: Con el fin de evitar la propagación de enfermedades el caldo LB que entro en contacto con el crecimiento de células se esteriliza.	Ofertar el sobrante y las soluciones no aprovechables a una compañía de vertidos acreditada. Para la eliminación de este producto, dirigirse a un servicio profesional autorizado.
Agar LB	Extracto de levadura Tryptona Cloruro de sodio Agar	Ningún ingrediente peligroso de acuerdo con el Estándar de Comunicación de Riesgos de OSHA 29CFR 19101200. Según la normativa aplicable no es necesario divulgar ninguno de los componentes.	Con el fin de evitar la propagación de enfermedades el caldo LB que entro en contacto con el crecimiento de células se esteriliza.	Ofertar el sobrante y las soluciones no aprovechables a una compañía de vertidos acreditada.
Caldo LB + Ampicilina	Extracto de levadura Tryptona Cloruro de sodio Ampicilina	Ningún ingrediente peligroso de acuerdo con el Estándar de Comunicación de Riesgos de OSHA 29CFR 19101200. Según la normativa aplicable no es necesario divulgar ninguno de los componentes.	Con el fin de evitar la propagación de enfermedades y para inactivar el antibiótico el caldo LB que entro en contacto con el crecimiento de células se esteriliza.	Ofertar el sobrante y las soluciones no aprovechables a una compañía de vertidos acreditada. Para la eliminación de este producto, dirigirse a un servicio profesional autorizado. Disolver o mezclar el producto con un solvente combustible y quemarlo en un incinerador apto para productos químicos provisto de postquemador y lavador.

Buffer P1	Buffer para re suspensión de pellet celular.	No contiene más del 1% de los componentes clasificados como peligrosos y no contiene mas de 0.1 % de los componentes clasificados como carcinogénicos, muta génicos o tóxicos para la reproducción. Por lo tanto QIAGEN no provee SDS para ninguno de los componentes.	No aplica	Se puede verter a la tarja.
Buffer P2	Buffer de lisis. sulfato de sodio y dodecilo, hidróxido de sodio	Nivel de riesgo para el agua 1 (autoclasiicación): escasamente peligroso para el agua En estado no diluido o no neutralizado, no dejar que se infiltre en aguas subterráneas, aguas superficiales o en alcantarillados.	A	Eliminar conforme a las disposiciones oficiales.
Buffer N3 (lisis)	cloruro de guanidinio, ácido acético	Nivel de riesgo para el agua 1 (autoclasiicación): escasamente peligroso para el agua En estado no diluido o no neutralizado, no dejar que se infiltre en aguas subterráneas, aguas superficiales o en alcantarillados.	A	Eliminar conforme a las disposiciones oficiales.
Buffer PE (lavado)	No disponible	No contiene más del 1% de los componentes clasificados como peligrosos y no contiene mas de 0.1 % de los componentes clasificados como carcinogénicos, muta génicos o tóxicos para la reproducción. Por lo tanto QIAGEN no provee SDS para ninguno de los componentes.	No aplica	Se puede verter a la tarja.
Buffer EB (elucion)	No disponible	No contiene más del 1% de los componentes clasificados como peligrosos y no contiene mas de 0.1 % de los componentes clasificados como carcinogénicos, muta génicos o tóxicos para la reproducción. Por lo tanto QIAGEN no provee SDS para ninguno de los componentes.	No aplica	Se puede verter a la tarja.
T4 DNA Ligasa	Polydeoxyribonucleotide Synthase Polynucleotide Ligase T4 DNA Ligase	Ningún ingrediente peligroso de acuerdo con el Estándar de Comunicación de Riesgos de OSHA 29CFR 19101200. Según la normativa aplicable	No Aplica Es consumida durante la PCR	Ofertar el sobrante y las soluciones no-aprovechables a una compañía de vertidos acreditada.

		no es necesario divulgar ninguno de los componentes.		
Células E. coli BL21(DE3)	Cepa de <i>E. coli</i> modificada con características que permiten la expresión de proteínas.	No es una sustancia o mezcla peligrosa.	A	Ofertar el sobrante y las soluciones no aprovechables a una compañía de vertidos acreditada. Para la eliminación de este producto, dirigirse a un servicio profesional autorizado. Disolver o mezclar el producto con un solvente combustible y quemarlo en un incinerador apto para productos químicos provisto de postquemador y lavador.
Gel de Poliacrilamida	Acilamida. SDS	La acrilamida es neurotóxica.	G: Los sobrantes de solución de monómeros no deben ser vertidos en el desagüe, es mejor polimerizarlos y descartarlos en forma de gel (ya que el polímero pierde la toxicidad.	Ofertar el sobrante y las soluciones no aprovechables a una compañía de vertidos acreditada. Para la eliminación de este producto, dirigirse a un servicio profesional autorizado. Disolver o mezclar el producto con un solvente combustible y quemarlo en un incinerador apto para productos químicos provisto de postquemador y lavador.
Azul de Bromofenol (colorante)	3',3'',5',5''-Tetrabromophenolsulfon ephthalein	No es una sustancia o mezcla peligrosa.	Colector de colorantes y lugol	Ofertar el sobrante y las soluciones no aprovechables a una compañía de vertidos acreditada.

Tabla 15. Disposición de los residuos generados. Estos contenedores se encuentran estratégicamente ubicados en el laboratorio de biotecnología 2. El material biológico restante y físico reusable fue esterilizado mediante calor húmedo.

10. Referencias bibliográficas

1. Nadezhdin EV, Brody MS, Price CW: **An α/β hydrolase and associated Per-ARNT-Sim domain comprise a bipartite sensing module coupled with diverse output domains.** *PLoSOne* 2011, **6**:e25418
2. Xiqui MA, Romero A, Terán E, Soto L, Baca B: **Nuevo sistema de señalización en bacterias mediado por el (3'5') guanosín-monofosfato-cíclico (di-GMPc).** *Elementos* 2010, **80**:21-29
3. Galperin MY: **Structural Classification of Bacterial Response Regulators: Diversity of Output Domains and Domain Combinations.** *J Bacteriol* 2006, **12**:4169-4182.
4. Möglich A, Ayers RA, Moffat K: **Structure and signaling mechanism of Per-ARNT-Sim domains.** *Structure* 2009, **17**:1282-1294.
5. Taylor BL, Zhulin IB. PAS Domains: **Internal Sensors of Oxygen, Redox Potential, and Light.** *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 1999, **63**(2):479-506.
6. Rajagopal S, Moffat K: **Crystal structure of photoactive yellow protein from a sensor histidine kinase: Conformational variability and signal transduction.** *ProcNatAcadSci* 2003, **100**:1649-1654.
7. Brody MS, Vijay K, Price CW: **Catalytic function of an α/β hydrolase is required for energy stress activation of the σ^B transcription factor in *Bacillus subtilis*.** *J Bacteriol* 2001, **183**:6422-6428
8. PSI-BLAST Tutorial: Comparative Genomics: Totowa (NJ); 2007.
Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2590/>
9. Cebrián G, Sagarzazu N, Aertsen A, Pagán R, Condón S, Mañas P: **Role of the alternative sigma factor σ^B on *Staphylococcus aureus* resistance to stresses of relevance to food preservation.** *JAM* 2009, **107**:187-196.

10. Paixao VB, Salgueiro CA, Brennan L, Reid GA, Chapman SK, Turner DL: **The solution structure of a tetra heme cytochrome from *Shewanella frigidimarina* reveals a novel family structural motif.** *Biochemistry* 2008, **47**:11973–11980
11. Chovanec P, Stolz JF, Basu P: **A proteome investigation of roxarsone degradation by *Alkaliphilus oremlandii* strain OhLAs.** *Metallomics* 2010, **2**:133–139
12. Tal R, Wong HC, Calhoon R, Gelfand D, Fear AL, Volman G, Mayer R, Ross P, Amikam D, Weinhouse H, Cohen A, Sapir S, Ohana P y Benziman M: **Three cdg operons control cellular turnover of cyclic di-GMP in *Acetobacter xylinus*: genetics organization and occurrence of conserved domains in isoenzymes.** *J Bacteriol* 1998, **180**:4416-4425.
13. Masato Kumauchi, Sandip Kaledhonkar, Andrew F. Philip, James Wycoff, Miwa Hara, Yunxing Li, Aihua Xie, and Wouter D. Hoff: **A Conserved Helical Capping Hydrogen Bond in PAS Domains Controls Signaling Kinetics in the Superfamily Prototype Photoactive Yellow Protein.** *J. Am. Chem. Soc.*, 2010, **132** (44), pp 15820–15830
14. van der Steen, J. B. and Hellingwerf, K. J: **Activation of the General Stress Response of *Bacillus subtilis* by Visible Light.** *Photochem Photobiol.*, 2015, **91**: 1032–1045.
15. Ayers RA, Moffat K: **Changes in quaternary structure in the signaling mechanisms of PAS domains.** *Biochemistry*. 2008, **47**(46):12078-12086.
16. Partch, C. L. and Gardner, K. H: **Coactivator recruitment: A new role for PAS domains in transcriptional regulation by the bHLH-PAS family.** *J. Cell. Physiol.*, 2010, **223**: 553–557.
17. Chapman-Smith, A., Lutwyche, J. K. and Whitelaw, M. L: **Contribution of the Per/Arnt/Sim (PAS) domains to DNA binding by the basic helix-loop-helix PAS transcriptional regulators.** *J. Biol. Chem*, 2004, **279**:5353–5362

18. Kaneko T, Tanaka N, Kumasaka T: **Crystal structures of RsbQ, a stress-response regulator in *Bacillus subtilis***. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*. 2005, **14**(2):558-565.
19. Purohit R, Weichsel A, Montfort WR: **Crystal structure of the Alpha subunit PAS domain from soluble guanylyl cyclase**. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*. 2013, **22**(10):1439-1444.
20. Hao N, Whitelaw ML, Shearwin KE, Dodd IB, Chapman-Smith A: **Identification of residues in the N-terminal PAS domains important for dimerization of Arnt and AhR**. *Nucleic Acids Research*. 2011, **39**(9):3695-3709.
21. Collins, KD; Lacal, J; & Ottemann, KM: **Internal sense of direction: Sensing and signaling from cytoplasmic chemoreceptors**. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2014, **78**(4), 672 - 684.
22. Tan, Edward, Rao, Feng, Pasunooti, Swathi, Thi Huong Pham, Soehano, Ishin, Turner, Mark S., Liew, Chong Wai, Lescar, Julien, Pervushin, Konstantin and Liang, Zhao-Xun: **Solution structure of the PAS domain of a thermophilic YybT protein homolog reveals a potential ligand-binding site**. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, **288** 17: 11949-11959.
23. Vreede J, van der Horst MA, Hellingwerf KJ, Crielaard W, van Aalten DM: **PAS domains. Common structure and common flexibility**. *J. Biol. Chem.* 2003, **278** 18434-18439
24. Harper, S., & Speicher, D. W. **Purification of proteins fused to glutathione S-transferase**. *Methods in Molecular Biology* (Clifton, N.J.), 2011, 681, 259–280.
25. Lindebro MC, Poellinger L, Whitelaw ML. **Protein-protein interaction via PAS domains: role of the PAS domain in positive and negative regulation of the bHLH/PAS dioxin receptor-Arnt transcription factor complex**. *The EMBO Journal*. 1995, **14**(14):3528-3539.

26. Ballario, P., Talora, C., Galli, D., Linden, H. and Macino, G: **Roles in dimerization and blue light photoresponse of the PAS and LOV domains of *Neurospora crassa* white collar proteins.** *Molecular Microbiology*, 1998, **29**: 719–729.
27. Ryjenkov DA, Tarutina M, Moskvina OV, Gomelsky M: **Cyclic Diguanilate Is a Ubiquitous Signaling Molecule in Bacteria: Insights into Biochemistry of the GGDEF Protein Domain.** *Journal of Bacteriology*. 2005, **187**(5):1792-1798.
28. Liu YC, Machuca MA, Beckham SA, Gunzburg MJ, Roujeinikova A: **Structural basis for amino-acid recognition and transmembrane signalling by tandem Per-Arnt-Sim (tandem PAS) chemoreceptor sensory domains.** *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.* 2015, **71**:2127-36
29. Amezcua CA, Harper SM, Rutter J, Gardner KH: **Structure and Interactions of PAS Kinase N-Terminal PAS Domain: Model for Intramolecular Kinase Regulation.** *Science* 2002, **10**:1349-1361.
30. James K Fredrickson, Margaret F Romine, Alexander S Beliaev, Jennifer M Auchtung, Michael E Driscoll, Timothy S Gardner, Kenneth H Neilson, Andrei L Osterman, Grigoriy Pinchuk, Jennifer L Reed, Dmitry A Rodionov, Jorge LM Rodrigues, Daad A Saffarini, Margrethe H Serres, Alfred M Spormann, Igor B Zhulin, James M Tiedje: **Towards environmental systems biology of *Shewanella*.** *Nature Reviews Microbiology* 2008, **8**: 592-603.
31. Möglich, A., & Moffat, K: **Structural Basis for Light-dependent Signaling in the Dimeric LOV Domain of the Photosensor YtvA.** *Journal of Molecular Biology* 2007, **373**(1): 112–126
32. Gilles-Gonzalez MA, Gonzalez G: **Signal transduction by heme-containing PAS-domain proteins.** *American Physiological Society* 2004, **96**(2): 774-783

33. Chao, Lily et al: **PdeB, a Cyclic Di-GMP-Specific Phosphodiesterase That Regulates *Shewanella Oneidensis* MR-1 Motility and Biofilm Formation.** *Journal of Bacteriology* 2013, **195**(17): 3827–3833
34. Yanning Qi, Feng Rao, Zhen Luo, and Zhao-Xun Liang: **A Flavin Cofactor-Binding PAS Domain Regulates c-di-GMP Synthesis in AxDGC2 from *Acetobacter xylinum*** *Biochemistry* 2009, **48**(43): 10275-10285
35. HaJeung Park, Christine Suquet, James D. Satterlee, ChulHee Kang: **Insights into Signal Transduction Involving PAS Domain Oxygen-Sensing Heme Proteins from the X-ray Crystal Structure of *Escherichia Coli* Dos Heme Domain (*Ec* DosH)** *Biochemistry* 2004, **43**(10): 2738-2746
36. Sondermann, H., Shikuma, N. J., & Yildiz, F. H: **Truncated form of the title: Mechanism of c-di-GMP signaling.** *Current Opinion in Microbiology* 2012, **15**(2): 140–146.
37. Alan L. Chang, Jason R. Tuckerman, Gonzalo Gonzalez, Raphael Mayer, Haim Weinhouse, Gail Volman, Dorit Amikam, Moshe Benziman, and Marie-Alda Gilles-Gonzalez: **Phosphodiesterase A1, a Regulator of Cellulose Synthesis in *Acetobacter xylinum*, Is a Heme-Based Sensor.** *Biochemistry* 2001, **40**(12): 3420-3426.
38. Tanaka, A., Takahashi, H., and Shimizu, T: **Critical role of the heme axial ligand, Met95, in locking catalysis of the phosphodiesterase from *Escherichia coli* (*Ec* DOS) toward cyclic diGMP.** *J. Biol. Chem.* 2007, **282**:21301–21307.
39. Christie, J. M., Salomon, M., Nozue, K., Wada, M., & Briggs, W. R: **LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (*nph1*):**

- Binding sites for the chromophore flavin mononucleotide.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999, **96**(15): 8779–8783
40. Rebbapragada, A., Johnson, M. S., Harding, G. P., Zuccarelli, A. J., Fletcher, H. M., Zhulin, I. B., & Taylor, B. L: **The Aer protein and the serine chemoreceptor Tsr independently sense intracellular energy levels and transduce oxygen, redox, and energy signals for *Escherichia coli* behavior.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1997, **94**(20): 10541–10546.
41. Kim J II, Bhoo SH, Han YJ, Zarate X, Furuya M, Song PS: **The PAS2 domain is required for dimerization of phytochrome A.** *Journal of Photochemical and Photobiology A: Chemistry* 2006, **178**:115–121.