

ANEXO

Trabajo Fin de Máster

***Estudio del papel de las cisteínas del regulador
transcripcional FurB de cianobacterias.***

“Role of cysteines in the transcriptional regulator FurB from cyanobacteria.”

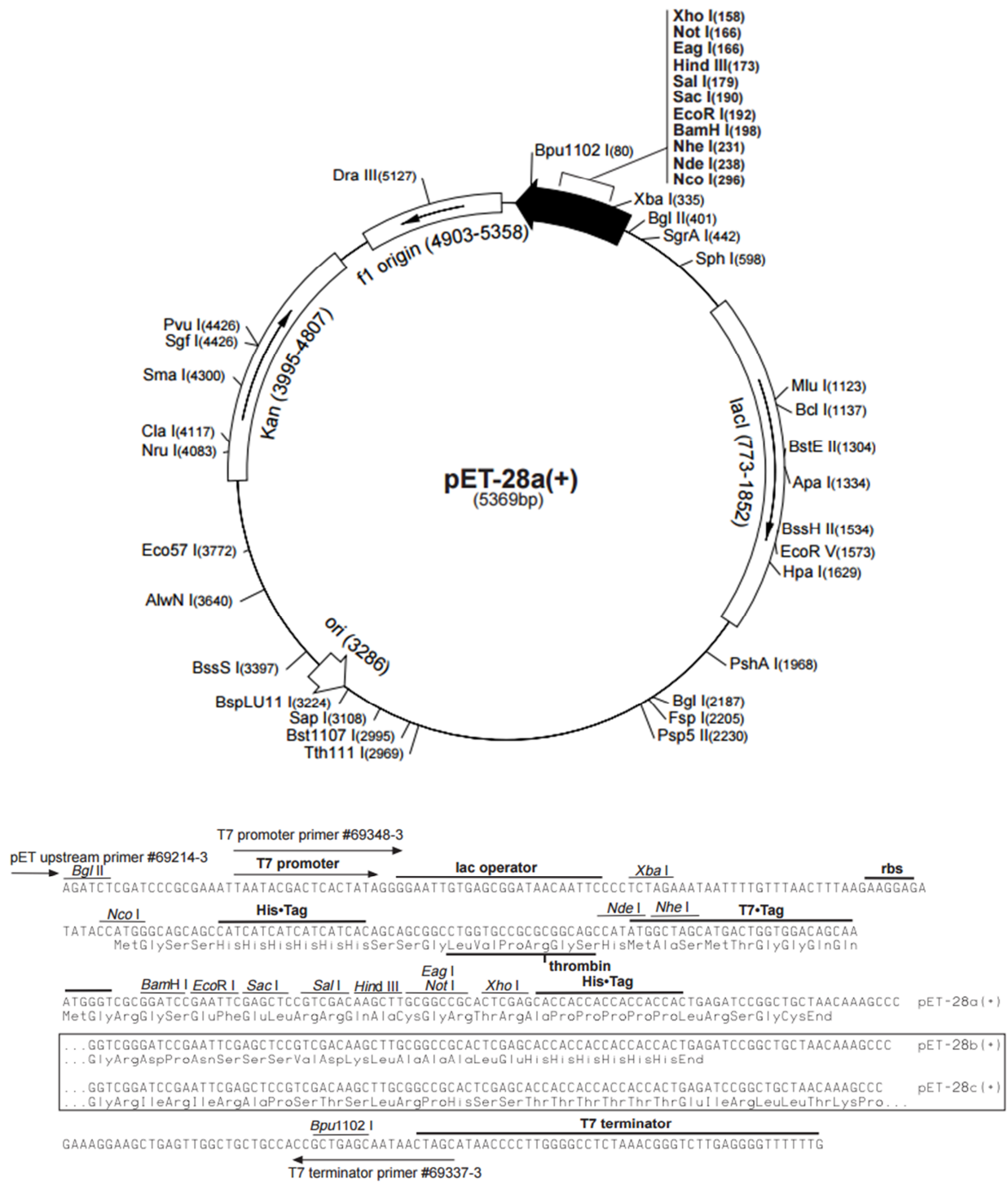


Figura 1. Esquema del plásmido pET28a(+) (Novagen). Este tipo de vectores contienen en su extremo N-terminal la siguiente configuración: cola de histidinas/ trombina/ cola T7; seguida de una secuencia opcional de cola de histidinas (His-Tag) en el extremo C-terminal. Los sitios de corte únicos se muestran en el mapa circular. Debajo del mapa circular se muestra la región de clonación/expressión de la cadena transcrita por la RNA polimerasa del bacteriófago T7. Tiene un origen f1 para la producción de DNA de cadena sencilla. Como marcador de selección posee el gen de resistencia a kanamicina. Además, contiene el operón Lac y su represor y el promotor del bacteriófago T7.

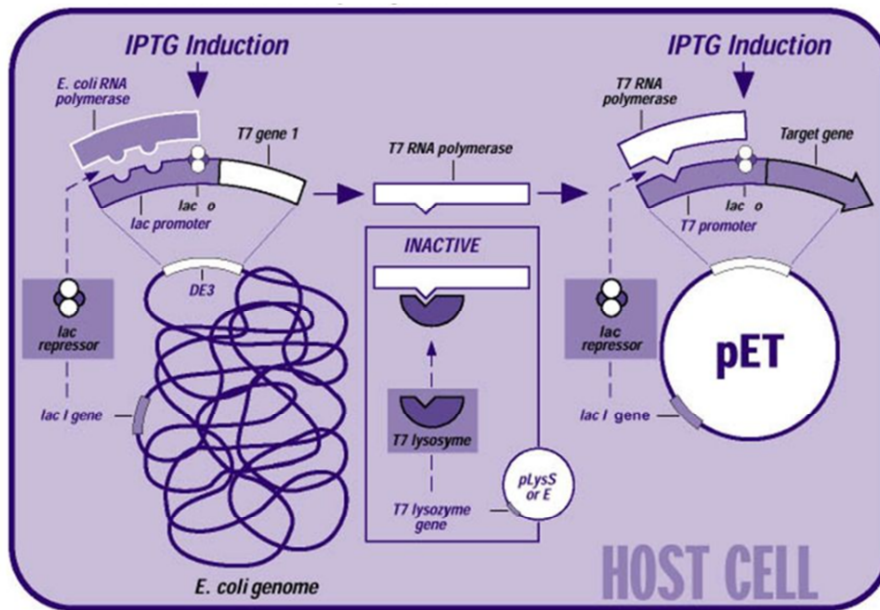


Figura 2. Esquema del proceso de inducción con IPTG en el plásmido pEt28a. Los plásmidos pEt28a contienen el operón Lac y su represor. La expresión de los genes clonados en este tipo de vectores está bajo el control del promotor lac, que se induce ante la presencia de isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG). El IPTG es un análogo de la alolactosa capaz de unirse a la proteína represora de LacI provocando en ella un cambio conformacional que disminuye su afinidad por la región operadora del operón Lac. De esta forma se posibilita la unión de la RNA polimerasa y el comienzo del proceso de transcripción. Tras la inducción el IPTG se expresará en la proteína clonada.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100								
<i>E.coli</i>	-----	MEKTTTQ	ELLAQA	EKICQR	NVRLTP	QRLEVL	RRLMSL	Q-DGAI	SAYD	LLDLLR	EAEPPQ	---AKPPT	VYRALD	FLLEQ	GFVHK	---		
<i>K.pneumoniae</i>	-----	MDKSPS	QEMLA	HAEKLC	AQRGVRL	TPQRLE	VLRLMS	LQ-QGAI	SAYD	LLDLLR	EKEPPQ	---AKPPT	VYRALD	FLLEQ	GFVHK	---		
<i>Y.pestis</i>	-----	MMNPIN	QEKLL	QAESLC	QRNVRL	TPQRLE	VLRLMA	QQ-PGAI	SAYD	LLDLLR	VAEPPQ	---AKPPT	VYRALD	FLLEQ	GFVHK	---		
<i>P.aeruginosa</i>	MYKIAP	KTPPLAC	-QPHDHS	QCVSTAL	AEADAL	CARQGV	RLELRRR	VLELVW	QS-HKPL	GAYDIL	AVLSE	TDGR-RA	APPTVY	RALDFL	QESGLV	HVR---		
<i>P.putida</i>	---MSI	TPLAN	-RPHDHS	CHVSALA	AEADAL	CTRQGL	RLTALRRR	VLELVW	QS-HKPL	GAYDIL	AVLSE	QDGR-RA	APPTVY	RALDFL	LENGLV	HVR---		
<i>P.syringae</i>	---MPN	TPLAS	-RPHDHS	CHVSALA	AEADAL	CAKQGL	RLTALRRR	VLELVW	QS-HKPL	GAYDIL	AVLSE	DEDGR-RA	APPTVY	RALDFL	LENGLV	HVR---		
<i>A.beijerinckii</i>	---MTI	PPLAC	-QPHDHR	CHIEQAL	AEAE	TLCARQ	GLRLTALRRR	VLELVW	QS-HKPL	GAYDIL	AVLSE	QDGR-RA	APPTVY	RALDFL	LEHGLV	HVR---		
<i>A.venelandii</i>	---MTT	PPLAC	-RPHDHS	CHISQAL	AEAE	NLCSRQ	GVRLTALRRR	VLELVW	QS-HRPL	GAYDIL	AVLSE	QDGR-RA	APPTVY	RALDFL	LEQGLV	HVR---		
<i>X.citri</i>	MTKHTH	APDLACT	APHHV	DDANGF	VRAVER	ACSERGL	RLTPIRAN	VLRLI	ADA-GKPV	KAYELL	DWVREG	KGVGAD	APPTVY	RALDFL	MANGFV	HK---		
<i>B.erythrophlei</i>	---MSL	AKPTFPA	-PDHDH	GRCTADAL	QHAERV	CAKRAQ	KFTPIRR	QVLEAL	LSS-HRPL	GAYEIE	EELAKS	KPR--PAP	ITVY	RALDFL	MENGLV	HVR---		
<i>S.meliloti</i>	-----	MVTPQ	---LTKN	QSLVMG	LAHS-DG	PMSAYT	IILDKL	RDN	GFR--AP	LQVY	RALDKL	LEGLV	HVR---					
<i>C.acnes</i>	-----	MVENRR	-----	RTTKQR	LAI	RAFDE	-PFFL	TAQV	HDQLR	RNRG	DQ--VGL	ATVY	RNLQ	TMAEDG	ELDA-IR			
<i>B.cereus</i>	-----	MNLTEA	LRLMKD	KGYKHT	GKREEM	LRLFAA	H-NRYL	TAKD	VL	EHMK	DDYPG--LS	FDTI	YRNL	TVFAE	IGVLEQ--T			
<i>B.subtilis</i>	-----	MNVQEA	LNLK	ENGYKY	TNKRED	MLQL	FADS-DRY	LAKN	NV	SALN	DDYPG--LS	FDTI	YRNL	SLYEEL	LGILET--T			
<i>S.aureus</i>	-----	MNTNDA	IKILK	ENGLKY	TDKRR	DMLD	IFVEE-DKY	INAKY	IQQV	MDEN	YPG--IS	FDTI	YRNL	HLFKD	LGIIEN--T			
<i>E.faecalis</i>	-----	MAPVK	TNIEQA	LETMKAS	GLKYTK	KRELL	MSYLI	KR-NRYV	SARE	VEYEF	MNET	FKG--VS	YDTV	YRNL	HDFER	LELLEK--T		
<i>P.acidilactici</i>	-----	MDKSP	IAIAV	KILKANG	YKTR	QRQS	LLEL	LAQS	GDRY	LEL	LDRL	MRLQ	FPK--MS	HNTI	YRNV	KEFAAL	GIVEEN	QN
<i>Anabaena sp.</i>	-----	MRAIR	-----	TRSQR	EILNL	LQTI	-KQG	ISAQ	DIYV	ELRNR	NQS--MGL	ATVY	RSL	EALK	LEGLV	QVR-T		

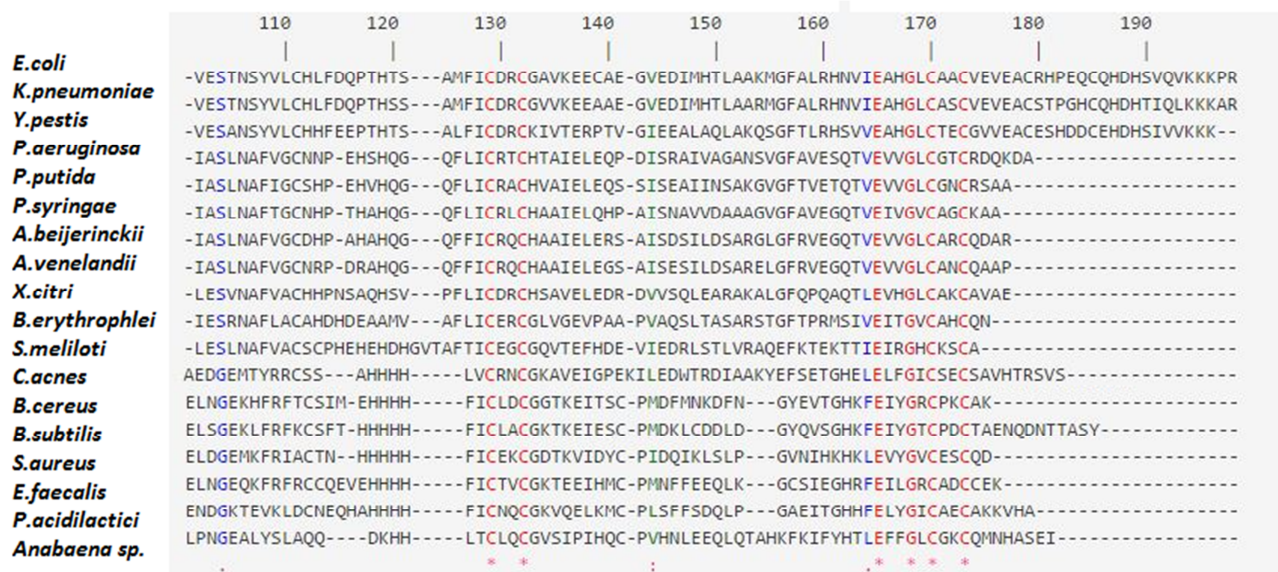


Figura 3. Alineamiento de secuencias de proteínas ZUR (Zinc Uptake Regulator). Se muestra un alineamiento de secuencias realizados con *Clustawl*. Los residuos conservados en todas las secuencias se muestran en rojo. En verde se señalan aquellos residuos altamente conservados entre secuencias y, en azul se muestran los residuos con menor identidad entre las diferentes secuencias.

Tabla 1. Primers/ Oligonucleótidos empleados en los ensayos de EMSA.

Primer/Oligo	Secuencia	Tm (°C)
Pall4725 directo	CTC CGG TGG CAC AGG TAT TGG C	55
Pall4725 reverso	CAG TGT TGC AGT CCG ACG CAA CCG	57
PnifJ directo	GCC TAC TCT GCG AGT TCT CCG	53
PnifJ reverso	GGC CTG TGA GAG TTG CTG CAC	53

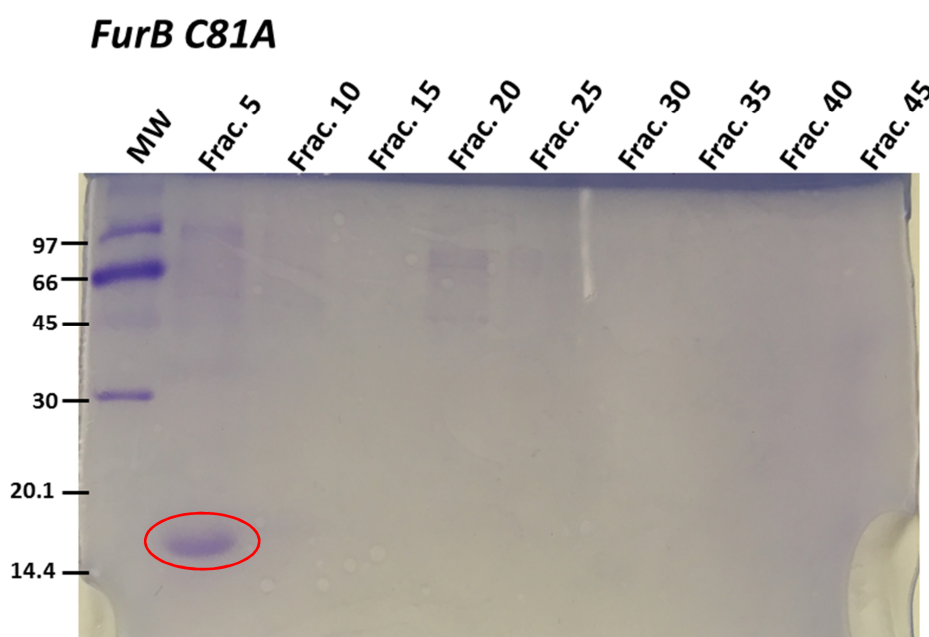


Figura 4. Fracciones eluidas de cinco en cinco de la columna de purificación de la proteína FurB C81A. Se muestra el gel SDS-PAGE 17 % teñido con Azul de Coomassie. Las muestras se sometieron a una electroforesis en condiciones reductoras. El primer carril contiene el marcador de peso molecular, MW (*Low Molecular Weight Calibration kit*, GE Healthcare) en kDa. En rojo se rodea la banda correspondiente a la proteína FurB C81A.