BENEMERITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE MEDICINA

LICENCIATURA EN BIOMEDICINA

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS

MICROBIOLÓGICAS-ICUAP

“Purificación y caracterización bioquímica parcial de la proteína Fur de *Gluconacetobacter diazotrophicus Pal5*”

TESIS QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

LICENCIADA EN BIOMEDICINA

PRESENTA

ALMA ROSA PÉREZ RODRÍGUEZ

DIRECTOR DE TESIS

D.C LUCÍA SOTO URZÚA

DIRECTOR METODOLÓGICO

D.C LUIS JAVIER MARTÍNEZ MORALES

Puebla, Pue Diciembre 2015

AGRADECIMIENTOS

A mis padres y hermano, quienes con tanto esfuerzo han logrado sacarme adelante, a ustedes todo mi agradecimiento, sin su apoyo esto no habría sido posible, ustedes me han ayudado a mantenerme firme en mis propósitos y son mi motivación para seguir adelante.

A Francisco quien me motiva a ser mejor, por su compañía, paciencia, confianza y apoyo que me ha brindado durante todo este tiempo.

A la DC Lucía Soto Urzúa por la confianza que ha tenido en mí, por sus enseñanzas y paciencia durante la elaboración de este trabajo. Admiro su conocimiento y calidad humana ya que el apoyo que me ha brindado dentro y fuera del laboratorio ha sido invaluable.

Al DC Luis Javier Martínez Morales que también formo parte de este proyecto y de mi formación profesional, agradezco sus consejos y apoyo durante la realización de este trabajo.

A la DC Margarita Ma De la Paz Arenas H. por el equipo prestado durante la realización de este trabajo.

A mis amigos en especial a Fabi quien siempre me ha apoyado. A mis compañeros de Biomedicina y compañeros de laboratorio.

A la Vicerrectoría de Docencia (VD) y a la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP), por el apoyo brindado para asistir al 39° Congreso de Microbiología. Así como a la Facultad de Medicina por el apoyo para asistir al Primer Congreso Internacional de Biomedicina Molecular.

Por último agradecer el apoyo recibido por el Programa Nacional de Becas para la Educación Superior.

"La alegría está en la lucha, en el esfuerzo, en el sufrimiento que supone la lucha, y no en la victoria misma. Nuestra recompensa se encuentra en el esfuerzo y no en el resultado. Un esfuerzo total es una victoria completa."

Mahatma Gandhi

Índice

Resumen iv

1. Introducción. 1

2. Antecedentes generales 3

2.1 *Gluconacetobacter diazotrophicus* 3

2.2 El hierro y el estrés oxidativo 5

2.3 Transporte del Hierro en bacterias 7

2.3.1 Transporte de hierro mediado por sideróforos 8

2.3.2 Transporte de hierro mediante el sistema Feo ABC 10

2.4 La proteína Fur 10

2.5 Oligomerización de la proteína Fur 12

2.6 Función de la proteína Fur 13

3. Antecedentes específicos. 15

4. Planteamiento del problema 18

5. Hipótesis 19

6. Objetivos. 20

6.1. General. 20

6.2. Específicos. 20

7. Material y métodos. 21

7.1 Esquema experimental 21

7.2 Material biológico 22

7.3 Metodología 23

8. **Resultados** 29

9. Discusión. 59

10. Conclusiones. 66

11.- Perspectivas 67

12. Anexos 1

13. Bibliografía. I

Resumen

Gluconacetobacter diazotrophicus, es una α-proteobacteria, Gram negativa, endófita de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), aislada de raíces y tallos de diferentes variedades de caña de azúcar y de otras plantas de interés agroeconómico, fija nitrógeno, produce hormonas del crecimiento vegetal como el ácido indol-3-acético (AIA) y las giberelinas que ejercen efectos positivos sobre el crecimiento de la planta.

El hierro es un nutriente esencial para los seres vivos; participa en numerosos procesos biológicos como la fotosíntesis, fijación de nitrógeno, en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, regulación de genes y biosíntesis de DNA; también es parte importante de moléculas como los citocromos, y es cofactor de diversas enzimas. La homeostasis del hierro se encuentra finamente regulada, ya que si éste elemento está presente en grandes cantidades como hierro libre, genera especies reactivas de oxígeno (ROS) a través de la reacción de Fenton. Esto provoca que las células estén bajo estrés deletéreo oxidativo, que dañan las estructuras celulares. Esta regulación es llevada a cabo por la proteína Fur (ferric uptake regulator), la cual actúa como represor transcripcional gracias a su capacidad de unión a DNA dependiente de hierro. Esta proteína reconoce una secuencia específica en el DNA llamada caja *fur* a la cual se une bloqueando así el acceso de la RNA polimerasa.

Con el fin de analizar la función de la proteína Fur_{1398} de *G. diazotrophicus* se diseñaron iniciadores específicos para amplificar el gen *fur* GDI_1398, se extrajo DNA genómico de *G. diazotrophicus* Pal5, se amplificó por PCR, el amplicón obtenido de 495 pares de bases (bp), se clonó en el vector de expresión pEXP5-CT, el producto clonado se transformó en *E. coli* One Shot TOP10, la selección de las colonias transformantes se realizó en medio LB con 100µg/ml de ampicilina, la confirmación de la orientación 5'-3' del gen fur_{1398} presente en éstas se obtuvo por PCR y digestión enzimática con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Ava*I, la clona pEXP5CT::$fur_{1398\text{-}16}$ que reunía las características se transformó en *E. coli* BL21 (DE3) pLys, se realizó cinética de inducción de la proteína Fur_{1398} recombinante con 0.01, 0.025, 0.05, 0.075, 0.1, 0.25 y 1mM de IPTG y la purificación se llevó a cabo por cromatografía de afinidad Ni-NTA. Para el estudio *in vivo* del estrés oxidativo se utilizaron las células *E. coli* BL21 (DE3) pLys conteniendo el gen fur_{1398} de *G. diazotrophicus*,

observando que Fur_{1398} influye positivamente en la supervivencia cuando las células son estresadas con H_2O_2. Con la proteína Fur_{1398} purificada se realizaron ensayos de oligomerización en los que se observó que esta proteína posee formas oligoméricas que son afectadas en condiciones reductoras y de alta fuerza iónica, lo cual permitió conocer sus propiedades funcionales que en un futuro serán de utilidad en la producción de preparaciones homogéneas de Fur_{1398} que permitirán realizar estudios estructurales de la proteína Fur_{1398} en *G. diazotrophicus*.

1. Introducción.

Las constantes alzas al precio del petróleo y la dependencia de los países latinoamericanos por los combustibles fósiles ha propiciado la búsqueda de fuentes alternativas de energía. El uso de la bioenergía se plantea como una opción con muchas posibilidades de desarrollo. Dentro de los cultivos de los que se pueden obtener materias primas para la producción de biocombustibles como aceite, biodiesel y etanol se encuentran el: piñón (*Jatropha curcas L.*), higuerillo (*Recinus communis L.*), jícaro (*Crescentia alata*), palma africana (*Elaeis guineensis*) y la caña de azúcar (*Saccharum officinarum*). La caña de azúcar es uno de los cultivos agroindustriales más importantes en las regiones tropicales. Es una gramínea tropical con tallos gruesos y fibrosos, éstos contienen una gran cantidad de sacarosa que se procesa para la obtención de azúcar. Se desarrolla mejor en suelos profundos y bien drenados. Se prefieren suelos de pH 7.0, pero se puede cultivar en un rango de 5.5 a 7.8. El principal producto de este cultivo ha sido comúnmente el azúcar, el etanol se considera como un co-producto. Dentro de los subproductos de la caña de azúcar se encuentra el bagazo el cual es utilizado como fuente de energía eléctrica y calórica por medio de la cogeneración. Uno de los subproductos de la fabricación de etanol es la vinaza, la cual es utilizada como fertilizante, y también se le puede dar un tratamiento anaeróbico para la generación de biogás, el cual podría utilizarse para generación de energía eléctrica (Ramírez., 2008). El cultivo de la caña de azúcar es la fuente de etanol más competitiva económicamente, por lo que las formas de mejorar su productividad están bajo investigación (Magnani y cols., 2010).

Las bacterias en raíces y rizósfera son beneficiadas por los exudados de las raíces, pero algunas bacterias llamadas endófitas, son capaces de entrar a las plantas sin causar daño estableciendo una asociación mutualista. Una vez dentro de la planta las bacterias endófitas estimulan el crecimiento de la planta gracias a diversos mecanismos como son: la fijación de nitrógeno, la producción de fitohormonas, el biocontrol de fitopatógenos (mediante la producción de agentes antifúngicos y antimicrobianos, producción de sideróforos,

estimulación de la inmunidad), o mejorando la biodisponibilidad de minerales (Rosenblueth y cols., 2006).

En la caña de azúcar, los endófitos más estudiados son los diazotrofos, de los cuales los más representativos son: *Azospirillum amazonense*, *Herbaspirillum spp*, y *G. diazotrophicus* (Magnani y cols., 2010). *G. diazotrophicus* es una bacteria originalmente aislada de la caña de azúcar; ésta bacteria puede fijar activamente el nitrógeno atmosférico y puede proveer cantidades significativas de nitrógeno a las plantas de la caña de azúcar. Además de la fijación de nitrógeno esta bacteria posee varias características atractivas, como ser de origen monocotiledónea siendo menos específica en las especies de planta que coloniza, además de que no requiere nódulos para establecerse en la planta y fijar nitrógeno (Eskin y cols., 2014).

El genoma de *G. diazotrophicus* ya se encuentra secuenciado (Bertalan y cols., 2009), y se han empezado a investigar diversos procesos de esta bacteria a nivel molecular; principalmente enfocados en la fijación de nitrógeno y más específicamente en la habilidad de la bacteria de proteger su nitrogenasa contra la inhibición producida por el oxígeno. Sin embargo, el oxígeno no es el único inhibidor de la nitrogenasa, las especies reactivas de oxígeno (ROS), los productos intermediarios del metabolismo aeróbico críticos en la producción de ATP para el proceso demandante de energía que es la fijación de nitrógeno, también son inhibidores de la nitrogenasa (Eskin y cols., 2014).

En el genoma de *G. diazotrophicus* se encontraron dos genes que codifican para las proteínas Fur, uno es GDI_1248, y el otro es GDI_1348 (Bertalan y cols., 2009). La proteína Fur es un regulador global que controla la homeostasis de hierro, sin embargo esta proteína también controla directa o indirectamente la expresión de enzimas protectoras del daño que puedan causar las ROS. Fur puede actuar como represor o como activador; su función como activador puede ocurrir mediante tres mecanismos: 1) indirectamente mediante pequeños RNAs, 2) uniéndose a una región *cis* reguladora que permite el reclutamiento de la holoenzima RNA polimerasa (RNAP) y 3) funcionando como anti-represor ya sea removiendo o bloqueando la unión de un represor de la transcripción al DNA (Troxell y cols., 2013).

La proteína Fur ha mostrado ser importante en la mayoría de los organismos, debido a la gran cantidad de genes que se encuentran bajo su regulación. Es por ello que la sobreexpresión y purificación de una de las probables proteínas Fur presentes en *G. diazotrophicus* nos permitirá iniciar el estudio bioquímico de la participación de éste sistema en la capacidad de unión de hierro y otros iones metálicos, así como su papel en la sobrevida de las células *E. coli* BL21(pLys) fur_{1398} en condiciones de estrés oxidativo.

2. Antecedentes generales

2.1 *Gluconacetobacter diazotrophicus*

G. diazotrophicus es una bacteria endófita de la caña de azúcar (*S. officinarum*). Fue aislada por primera vez por Cavalcante y Döbereiner (1988) de raíces y tallos de diferentes variedades de caña de azúcar. La bacteria recibió el nombre de *Sacharobacter nitrocaptans*, posteriormente la bacteria fue renombrada *Acetobacter diazotrophicus* y finalmente después de análisis de secuencias fue denominada *G. diazotrophicus* (Cavalcante & Döbereiner., 1998; Yamada y cols., 1997).

G. diazotrophicus es una bacteria aerobia fijadora de nitrógeno, no forma esporas, no produce nódulos, es un bacilo Gram negativo, aerobio obligado, mide 0.7-0.9 µm por 2µm, vista bajo el microscopio se pueden observar células solas, en parejas y en cadenas. Cuenta con 1-3 flagelos laterales o perítricos. Su crecimiento es óptimo a pH 5.5 a una temperatura de 30°C.

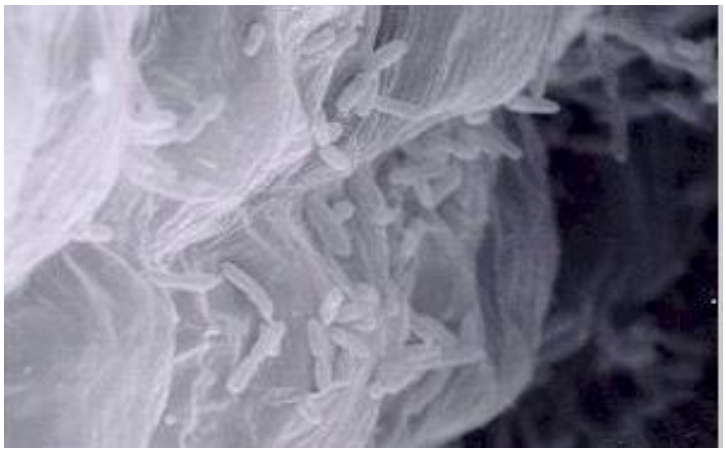


Figura 1. Micrografía electrónica de la raíz de la caña de azúcar colonizada por *G. diazotrophicus*. Cortesía de la Universidad de Arizona.

G. diazotrophicus es capaz de entrar a su hospedero a través de las raíces, tallos y hojas. La entrada a través de las raíces se da en las puntas de las raíces y las células del meristemo, en áreas de nacimiento de las raíces laterales y a través de los pelos radicales. Dentro de los tallos de su planta hospedera, específicamente en la caña de azúcar la bacteria es capaz de entrar a través de las aberturas causadas por la separación en plántulas individuales. Finalmente dentro de las hojas, el lugar de entrada es a través de los estomas dañados, un modo adicional de entrada utilizado por la bacteria es a través de un insecto que sirve como vector, la cochinilla rosada de la caña de azúcar (*Saccharicoccus sacchari*), una vez dentro de la caña de azúcar *G. diazotrophicus* es encontrado principalmente en los espacios apoplásticos intercelulares, el xilema y el parénquima del xilema, las colonias establecidas son capaces de crecer hasta 10^8 UFC por gramo de tejido, los mecanismos de entrada antes mencionados parecen ser asistidos por las enzimas hidrolíticas (Eskin y cols, 2014; Dong y cols., 1994).

Además de la caña de azúcar *G. diazotrophicus* también ha sido encontrado en diversos cultivos como el café, piña, mijo, arroz, camote, té, plátano, ragi y en insectos que infestan la caña de azúcar (Saravanan y cols., 2008; Muthukumarasamy y cols., 2002). La interacción de *G. diazotrophicus* con la caña de azúcar promueve el crecimiento de la planta proporcionando el nitrógeno fijado, esta respuesta depende tanto del genotipo de la bacteria y de la variedad de la caña de azucar. La estimulación del crecimiento de la planta por esta bacteria ha sido atribuida no solo a la fijación de nitrógeno si no también a la producción de las fitohormonas como el ácido indol-3-acético y las giberelinas A1 y A3; al biocontrol de fitopatógenos ya que impide el crecimiento de *Xantomonas albilineans* y también poseé actividad antifúngica contra *Fusarium spp* y *Helminthosporium spp*; la solubilización de los nutrientes minerales como el fósforo y el zinc y la resistencia a las enfermedades como la escaldadura de la hoja. En ensayos de inoculación con *G. diazotrophicus* se observó que es capaz de colonizar arroz y trigo. También se ha encontrado que la inoculación con *G. diazotrophicus* aumentó el peso seco del sorgo, pero no tuvo efecto en el maíz, por otro lado se observó un efecto sinérgico de ésta bacteria con las micorrizas arbusculares en la colonización, por su capacidad de estimular directamente el crecimiento de las plantas a traves de los mecanismos anteriores ha sido considerada una

bacteria promotora del crecimiento vegetal (BPCV) (Luna y cols., 2012; Eskin y cols., 2014).

Dentro de sus principales características fisiológicas, destacan su capacidad de fijar nitrógeno en condiciones microaerofílicas a pH ácido incluso debajo de 3.0, así como en presencia de altas concentraciones de nitratos (10mM) debido a la ausencia de la enzima nitrato reductasa, posee la capacidad de oxidar etanol, crece en concentraciones altas de azúcar (30%), crecen en presencia de nitrato como única fuente de nitrógeno y la fijación de nitrógeno es parcialmente inhibida por la presencia de iones amonio (Saravanan y cols., 2008; Bertalan y cols.,2009).

Fue la primera bacteria de la clase de las Alphaproteobacterias en ser completamente secuenciada actualmente ya hay otros genomas totalmente secuenciados. Su genoma está compuesto por un cromosoma circular de 3.9 Mb con un contenido G+C de 66.19% y dos plásmidos de tamaño de 16.6 y 38.8 Kb respectivamente. Tiene un total de 3,938 secuencias codificantes (CDS), además cuenta con 190 elementos transponibles, más que alguna otra bacterias endófita. El amplio número de elementos móviles puede ser una señal de una reciente evolución debido a un cambio reciente de nicho. Debido a que *G. diazotrophicus* no es tan frecuente en la rizósfera los elementos transponibles pudieron ser adquiridos de otras bacterias que habitan el mismo entorno. (Bertalan y cols., 2009*).*

2.2 El hierro y el estrés oxidativo

El hierro es un nutriente esencial para la mayoría de los seres vivos, incluyendo bacterias, hongos, plantas y animales. Es el cuarto metal de transición más abundante en la corteza terrestre (Moriah y cols., 2009). En condiciones aeróbicas y a pH neutro la concentración de hierro disuelto es aproximadamente de $1x10^{-18}$ M. El nivel requerido de suministro suficiente para la mayoría de los organismos es de 10^{-7} M a 10^{-3} M. (Wittenwiler., 2007).

El hierro es un metal de transición que tiene dos estados de oxidación estables: su forma férrica Fe^{3+}, la cual es insoluble y se forma en condiciones aeróbicas y su forma ferrosa Fe^{2+} la cual es soluble en agua y solo es presente en condiciones anaeróbicas. El potencial redox para llevar a cabo la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} es de +700 mV, sin embargo este potencial puede ser fuertemente influenciado por agentes quelantes. Esto permite que las proteínas que contienen hierro en su centro activo controlen el potencial de reducción y por

ende la catálisis de un gran número de reacciones de óxido-reducción. (Andrews y cols., 2003; Kenneth y cols., 2004; Wittenwiler., 2007). El hierro está presente en el sitio activo de enzimas dependientes de éste metal, las cuales están involucradas en las rutas metabólicas como el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA), la respiración, el transporte de oxígeno, la síntesis de DNA, y la síntesis de metabolitos. (Masse y cols., 2005).

El dioxígeno u oxígeno molecular (O_2) es la forma más oxidada mientras que H_2O representa la forma reducida. Los intermediarios en la reducción de O_2 a H_2O dan lugar a la generación de radicales libres que son un grupo de productos químicos intermediarios de corta duración, los cuales contienen uno o más electrones con un spin desapareado lo cual los hace altamente reactivos debido a que los electrones desapareados tienden a formar pares con otros electrones; desestabilizando a la molécula que perdió su electrón y convirtiéndolo en un radical libre; dentro de estos compuestos altamente reactivos se incluyen el anión superóxido ($O_2^{\cdot -}$), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($HO^{\cdot}$). Estos intermediarios reactivos del oxígeno o especies reactivas de oxígeno (ROS) producen daños en el DNA, la peroxidación lipídica, así como el daño a las proteínas. Mientras que el daño al DNA inhibe la replicación y consecuentemente la división celular, el daño permanente a la membrana plasmática puede causar la muerte celular. El estrés oxidativo es el término aplicado cuando el número de oxidantes supera a la cantidad de antioxidantes provocando la alteración del potencial redox de la célula resultando en el incremento de los niveles de ROS. (Kashmiri y cols., 2014; Yoshikawa y cols., 2002; Storz., 2013). Es atribuido a la presencia tanto de peróxido de hidrógeno y el anión superóxido, o el radical hidroxilo. La formación de estos radicales libres es atribuida a la reacción del oxígeno molecular con los constituyentes celulares reducidos. Cuando el O_2 interactúa con los citocromos reducidos, las flavinas u otro acarreador de electrones que libere un solo electrón, se genera el anión superóxido en forma de $O_2^{\cdot -}$. Las bacterias aeróbicas, microaerofílicas y aerotolerantes producen la enzima superóxido dismutasa para catalizar la reacción entre $O_2^{\cdot -}$ y $2H^+$ para producir H_2O_2. La descomposición del peróxido de hidrógeno a agua es catalizada por la catalasa. (Barton., 2005; Kashmiri y cols., 2014; Yoshikawa y cols., 2002).

En condiciones *in vivo* la química de Fenton y otras reacciones en cadena de radicales libres catalizadas por metales son iniciadas por los subproductos de la respiración aeróbica,

tales como H_2O_2 y el anión $O_2^{\bullet-}$. En experimentos *in vitro* se ha mostrado que el H_2O_2 puede oxidar al Fe^{2+} para producir iones OH^- y el radical hidroxilo (OH•) que son altamente reactivos, ésta reacción es llamada reacción de Fenton (Ecuación 1). Se ha demostrado que el anión $O_2^{\bullet-}$ puede reducir el metal oxidado liberado en la reacción de Fenton (Ecuación 2), y la reacción neta es catalítica y es llamada reacción de Haber-Weiss (Ecuación 3) (Lemire y cols., 2013).

$$Fe^{2+} + H_2O_2 \longrightarrow Fe^{3+} + OH^- + OH\bullet \quad \text{Reacción de Fenton} \quad (1)$$

$$Fe^{3+} + O_2^{\bullet-} \longrightarrow Fe^{2+} + O_2 \quad (2)$$

$$O_2^{\bullet-} + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + OH^- + OH\bullet \quad \text{Reacción Haber-Weiss} \quad (3)$$

2.3 Transporte del Hierro en bacterias

El hierro insoluble Fe^{3+} y el hierro soluble Fe^{2+}, requieren ser adquiridos de forma diferente por las bacterias. El hierro Fe^{3+} debe ser solubilizado por compuestos que formen complejos con él llamados sideróforos, los cuales son sintetizados y secretados por las bacterias y los hongos. En los organismos eucariontes, el hierro es incorporado a los grupos hemo, transportado o almacenado por proteínas como la hemoglobina, la hemopexina, la transferrina, la lactoferrina y la ferritina. Las bacterias han desarrollado mecanismos específicos para movilizar el grupo hemo liberado de las hemoproteínas, así como el hierro liberado de la transferrina y la lactoferrina. Cuando el ión Fe^{3+} es proporcionado por la transferrina y la lactoferrina éste es transportado a través de la membrana citoplásmica (Braun y cols., 2006). El complejo hierro-sideróforo es transportado al citoplasma de la bacteria donde el hierro es liberado de los sideróforos y es incorporado en las proteínas hierro-azufre y los citocromos. El número de sideróforos sintetizados por una bacteria es menor que los sideróforos que necesita; por lo que si una bacteria es incapaz de transportar sideróforos secretados por otros microorganismos puede provocar una deficiencia de hierro, por lo tanto la bacteria necesita un amplio espectro de sistemas transportadores de los complejos Fe^{3+}-sideróforo (Braun y cols., 2006). Estos sistemas transportadores de membrana externa son capaces de unirse y de extraer hierro de la transferrina, la lactoferrina, la hemoglobina y de los grupos hemo, éstos pertenecen a una misma familia de proteínas llamada transportadores dependientes de Ton-B (TBDT). La captación de hierro

es catalizada por la proteína TonB, la cual se extiende a lo largo del periplasma e interactúa con las TBDTs, transfiriendo de este modo energía proveniente de la fuerza protón motriz desde la membrana interna (Schalk, 2013).

En contraste el Fe^{2+} difunde a través de la membrana externa y es transportado a través de la membrana citoplásmica. Este proceso es acoplado a GTP, y es catalizado directa o indirectamente por una proteína llamada FeoB (Braun y cols., 2006).

2.3.1 Transporte de hierro mediado por sideróforos

Los sideróforos se encuentran en una gran variedad con la función de quelar Fe^{3+}. Están clasificados como hidroxamatos, catecolatos, policarboxilatos o estructuras combinadas. (Braun y cols., 2006). Son compuestos de bajo peso molecular (< 1000 Da), son secretados en respuesta a una baja concentración de hierro en el ambiente. (Escolar y cols., 1999). Todos los sideróforos son agentes quelantes con una alta afinidad por Fe^{3+} con constantes de estabilidad cerca de 10^{30} por mol (Schalk, 2011). Más de 500 sideróforos diferentes han sido identificados con estructuras químicamente diferentes. La gran afinidad de los sideróforos les permite competir por el hierro disponible con proteínas como la transferrina y la hemoglobina (Schalk, 2013).

En las bacterias Gram negativas la membrana externa, es una barrera semipermeable que protege a la bacteria de las toxinas, las enzimas hidrolíticas y los detergentes. La presencia de porinas en la membrana externa permite la difusión pasiva de solutos con un peso molecular menor a 600 Da. La mayoría de los complejos Fe^{3+}-sideróforo exceden el peso molecular para pasar a través de las porinas, por lo que necesitan receptores específicos para su transporte al espacio periplásmico (Krewulak, 2008). Esta captación del complejo Fe^{3+}-sideróforo por las bacterias Gram negativas involucra la expresión de TBDTs con sitios específicos que reconocen el complejo Fe^{3+}-sideróforo, una vez que éste se une a su TBDT en la membrana externa interactúa con el complejo TonB, el cual está conformado por las proteínas TonB, ExbB y ExbD, este complejo es el encargado de proporcionar la energía necesaria para transportar el hierro al periplasma, después de que el complejo Fe^{3+}-sideróforo es transportado al espacio periplásmico por una proteína de unión periplásmica (PBP) específica que es capaz de reconocerlo y éste es transportado a través de la membrana citoplasmática mediante un transportador de membrana interna tipo ABC a

través del canal formado por sus dos dominios transmembranales (Andrews y cols., 2003; Moriah y cols., 2009). El hierro es liberado en el citoplasma mediante mecanismos que involucran la degradación enzimática, la modificación química del sideróforo o bien la reducción del hierro (Figura 2). Las bacterias Gram positivas no tienen membrana externa, y solo los transportadores ABC están involucrados en la captación de los complejos Fe^{3+}-sideróforo. Estos transportadores están anclados a la membrana celular y son similares a los sistemas ABC presentes en la membrana citoplásmica de las bacterias Gram negativas (Schalk, 2013).

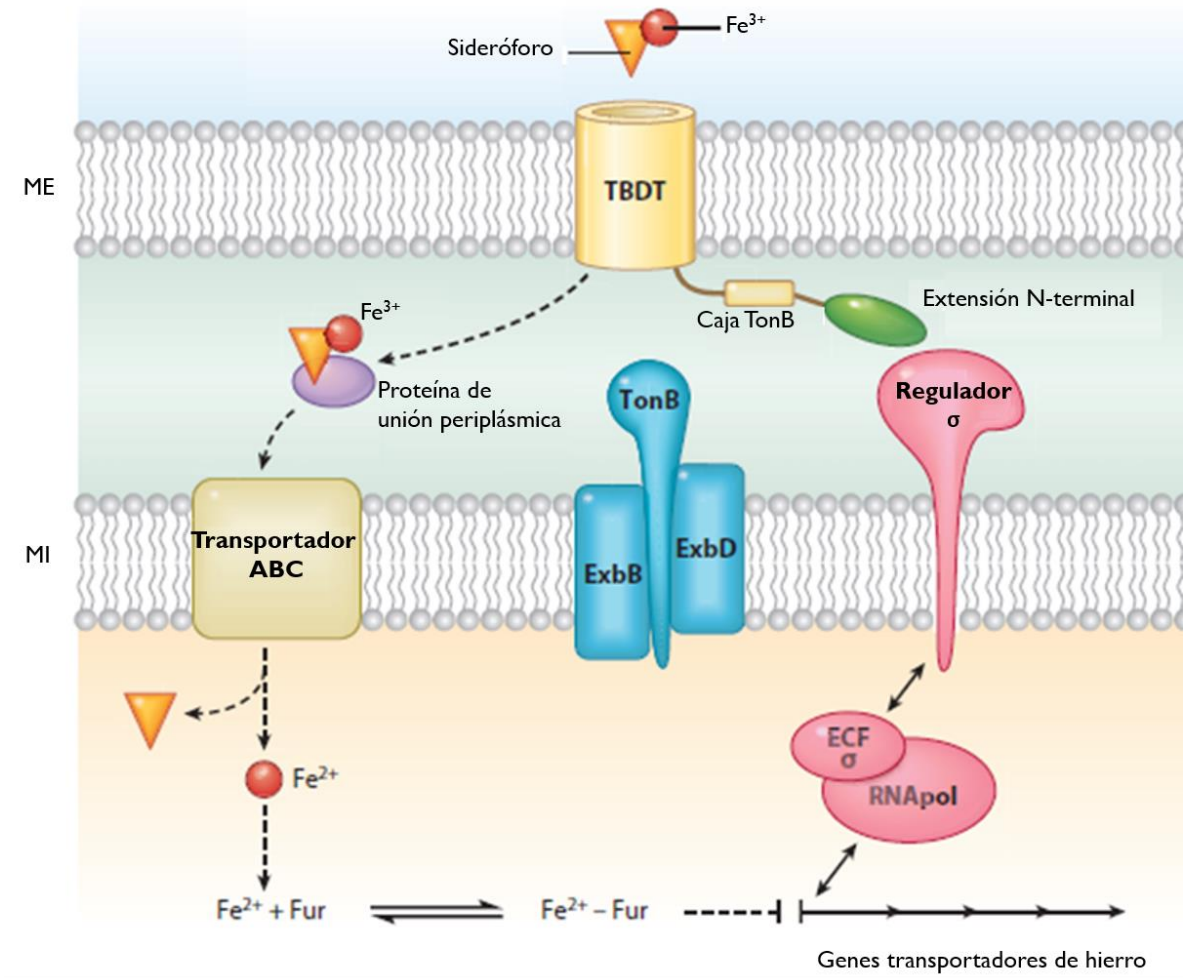


Figura 2. Transporte y regulación de los sideróforos. El transporte de los sideróforos a través de la membrana externa (ME) se deriva de la fuerza protón motriz de la membrana interna (MI). Esto requiere de energía que es provista del complejo TonB (azul) que consiste en las proteínas de

membrana interna TonB, ExbB y ExbD. TonB interactúa con los transportadores de membrana externa (Transportadores TonB dependientes TBDTs) en el motivo de la caja TonB. El transporte de sideróforos a través de la membrana interna requiere de una proteína de unión periplásmica y de un transportador ABC. Una vez que el complejo Fe^{3+}-sideróforo entra al citoplasma, el ion férrico (Fe^{3+}) es reducido a ion ferroso (Fe^{2+}), el cual es destinado para almacenamiento o incorporación a enzimas, el exceso del ión Fe^{2+} (el cual puede inducir la formación de radicales libres dañinos para la células) se une al represor de la proteína Fur, el cual a su vez se une a los promotores blanco e inhibe la transcripción de los genes transportadores de sideróforos. Algunos TBDTs como FecA de *E. coli* también son regulados por factores *σ/antiσ*. Modificado de Noinaj y cols., 2010

2.3.2 Transporte de hierro mediante el sistema Feo ABC

El ion ferroso Fe^{2+} es altamente soluble, comparado con Fe^{3+}, además de que es más estable en condiciones anaeróbicas y a un pH bajo. El Fe^{2+} es transportado a las células mediante un sistema de transporte llamado Feo, el cual está compuesto por una permeasa FeoB y de las proteínas FeoA y FeoC. Este sistema fue descrito por primera vez en *E. coli*. El gen *feo*C codifica para una proteína citoplásmica pequeña que parece estar conservada en las γ-proteobacterias. El componente más importante de este sistema es la permeasa FeoB la cual es una proteína citoplásmica polipeptídica. Tiene un dominio N-terminal citoplásmico con función GTPasa. (Cornelis., 2014).

2.4 La proteína Fur

Las bacterias regulan el metabolismo de hierro en respuesta a la disponibilidad de éste. En *E. coli* y en otras bacterias esta regulación está mediada por la proteína Fur, ésta proteína controla la expresión de más de 90 genes dependientes de hierro. Sesenta genes codifican para la biosíntesis y transporte de sideróforos. Incluyendo sistemas de transporte del grupo hemo encontrados en cepas virulentas de *E. coli*, cerca de 18 genes codifican para proteínas citoplásmicas involucradas en el metabolismo, proteínas del metabolismo de hierro y proteínas de respuesta a estrés oxidativo (Hantke., 2001).

Fur es una metalo-proteína capaz de unirse al DNA, tiene un peso de aproximado de 17 kDa. Tiene dos dominios: el carboxilo terminal que contiene dos sitios de unión a metal, es rico en residuos de histidina y está implicado en la dimerización, y el amino terminal el cual tiene un motivo hélice-giro-hélice y es el sitio involucrado de la unión con el DNA (Escolar y cols., 1999; Andrews y cols., 2003). En *E. coli* un sitio de unión a metal de la proteína Fur está ocupado por Zn^{2+}, el cual está unido tetraédricamente a dos residuos

de cisteína (Cys_{92} y Cys_{95}) y dos átomos de nitrógeno/oxígeno. El sitio de unión del regulador activo de Fe^{2+} en el dominio carboxilo terminal está menos caracterizado y puede estar ocupado en condiciones *in vitro* por Mn^{2+} o Co^{2+} u otros cationes divalentes. Al menos dos histidinas y un carboxilato unen el metal. Un sitio de unión es posiblemente una histidina en el dominio amino terminal, la cual podría ser importante para la unión de DNA (Hantke., 2011).

La proteína Fur es abundante con 5000 copias por célula en *E. coli* durante la fase exponencial y aumenta a 10000 copias en la fase estacionaria. La razón de estos altos niveles de proteína puede deberse a la tendencia de Fur de oligomerizar a lo largo de la doble cadena de DNA. Un gran número de genes (más de 90) son controlados por Fur en *E.coli,* o puede ser que ésta proteína tenga una función adicional como "buffer" ferroso uniéndose al hierro libre en la célula. La afinidad de Fur por Fe^{2+} es de aproximadamente 10 µM la cual coincide con los niveles estimados de hierro libre en la célula (Andrews., 2009).

La proteína Fur medía la represión de los genes blanco bajo condiciones de exceso de hierro Fe^{2+}, en esta condición se une a un monómero de Fur provocando un cambio conformacional en la proteína, la unión del Fe^{2+} con Fur aumenta la afinidad de este complejo por el DNA hasta 100 veces. Una vez que el Fe^{2+} se unió a Fur este complejo Fe^{2+}-Fur se une a una secuencia de DNA específica llamada caja Fur que consiste en una secuencia palindrómica de 19 pb llamada caja Fur (GATAATGATAATCATTATC) en las regiones -35 y -10 de los promotores de los genes implicados (Won, 2007; Gesine y cols., 2006). La unión del complejo Fur-Fe^{2+} a la caja Fur, da lugar al bloqueo de la transcripción ya que se impide el acceso de la RNA polimerasa a los promotores de los genes corriente abajo (Escolar y cols., 1999).

La caja Fur puede ser interpretada como una secuencia palindrómica en la que hay tres repeticiones de hexámeros de la secuencia 5´-GATAAT-3´, o bien como dos secuencias sobrepuestas invertidas (Figura 3) (Gesine y cols., 2006). Un modelo sugiere que los sitios de unión a Fur están solapados en motivos "6-1-6", este tipo de arreglo permite a los dímeros Fur unirse a la caja Fur en lados opuestos de la cadena de ADN (Lavrrar y cols., 2003)

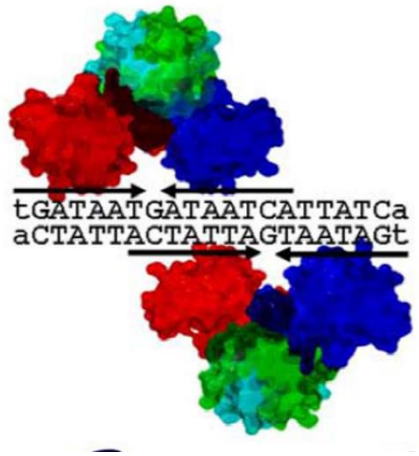


Figura 3. Modelo de interacción de la proteína Fur con el DNA de *Pseudomonas aeuroginosa*. El dominio N-terminal encargado de la unión con el DNA están en rojo y azul, el dominio C-terminal encargado de la dimerización se muestra en color verde. Modificado de Won y cols., 2007

2.5 Oligomerización de la proteína Fur

Las proteínas raramente actúan solas, usualmente se unen a otras biomoléculas incluyendo otras proteínas para generar una respuesta biológica. Un gran porcentaje de proteínas parecen asociarse entre ellas para formar dímeros y oligómeros de alto orden (Matthews y cols., 2012). Las proteínas oligoméricas comprenden la asociación de dos o más cadenas polipeptídicas, representando una fracción significante de las proteínas celulares. La amplia categoría de proteínas oligoméricas puede ser clasificada por tipo de subunidad, fuerza, avidez y duración de asociación de las subunidades. La oligomerización de proteínas puede conferir diversos y diferentes ventajas estructurales y funcionales a las proteínas, incluyendo un mejoramiento en su estabilidad, regulación de su actividad e incremento en su complejidad también puede ser una característica ventajosa desde la perspectiva de la evolución de proteínas, incluyendo nuevas oportunidades de control funcional, tales como regulación alostérica y el establecimiento de complejos de alto orden (Mayssam y cols.,2005; Matthews y cols., 2012).

La topología de los sitios de unión a la proteína Fur sugiere que el sitio primario de unión de está al DNA blanco involucra la formación un dímero en cada hebra de DNA. Análisis *in vitro* de diversos promotores operados por la proteína Fur como aerobactina en *E.coli* o el de ferritina de *Helicobacter pylori* evidencia la habilidad de este regulador de multimerizarse a lo largo de las secuencias del operador dependiendo de la disponibilidad de hierro. La caracterización de las diferentes formas oligoméricas de la proteína Fur en

E.coli muestra que la dimerización del regulador es inducida por Zn^{2+} después de la reducción de los residuos de cisteína, mientras que la oxidación de los grupos tiol puede bloquearla a un estado monomérico. Sin embargo en la forma monomérica también puede unirse al DNA pero con menor afinidad que en su forma dimérica. Aunque la proteína Fur de *E.coli* aparece principalmente como dímero en solución, ésta forma está involucrada en diversos equilibrios oligoméricos influenciados principalmente por la concentración de la proteína, fuerza iónica y pH (Lostao y cols., 2010).

Muchas veces los sitios de unión de la proteína Fur consisten en dos o más cajas adyacentes o sobrepuestas sugiriendo la unión de varios dímeros de ésta a una región de "alta afinidad" lo que estimula a un sitio Fur adyacente, por lo que parece oligomerizar a lo largo del DNA. Incluso en algunos promotores controlados por hierro pueden unirse diversos dímeros de Fur y extenderse hasta 100 pb (Andrews y cols., 2003).

2.6 Función de la proteína Fur

El prototipo de las proteínas Fur, por ejemplo la de *E.coli*, actúa como represor al formar un complejo con el ión Fe^{2+}. El complejo formado Fe^{2+}-Fur bloquea directamente la transcripción de algunos genes blanco (por ejemplo genes para la captación de hierro) e incrementa la transcripción de otros genes (por ejemplo genes de almacenamiento de hierro); mientras que la forma libre de hierro (Apo-Fur) es inactiva. En estos casos la regulación positiva por Fe^{2+}-Fur es indirecta mediante la represión de la transcripción de un gen que a su vez reprime genes blanco (Choi S y cols., 2011).

La afinidad de la proteína Fur por el ión Fe^{2+} permite censar la acumulación suficiente de hierro intracelular para activar a las proteínas de almacén. Sin embargo, cuando los niveles de hierro son superiores a los necesarios, reprime aún más la absorción y por lo tanto ayuda a prevenir la sobrecarga de hierro. Típicamente, el complejo Fe^{2+}-Fur dificulta el acceso de la ARN polimerasa lo que resulta en la represión de los genes corriente abajo. Este modelo de acción representa una forma de la regulación llevado a cabo por la proteína Fur, sin embargo recientemente se ha encontrado que el potencial regulador contempla diversos mecanismos como la activación de la expresión de los genes ya sea directa o indirectamente mediante los pequeños RNAs. En *H. pylori* la proteína Fur libre de hierro

(apoproteína) también se une al DNA y reprime la expresión de proteínas de almacén como la ferritina (Won., 2007).

La proteína Fur de *E. coli* ha sido implicada en la regulación positiva y negativa de la expresión de genes como el de la aerobactina, la superóxido dismutasa y la catalasa entre otros. Las proteínas superóxido dismutasa (SodB), succinato deshidrogenasa y ferritina requieren una fina regulación entre la proteína Fur y el ión Fe^{2+} para una expresión eficiente. La regulación positiva por la proteína Fur muchas veces es en forma indirecta, mediante la represión de Fur dependiente de los pequeños RNA reguladores antisentido (sRNA). Estos sRNA actúan a nivel post-transcripcional para reprimir la traducción de genes blanco. El sRNA regulado por la proteína Fur mejor caracterizado es RyhB de *E. coli*, es un sRNA de 90 nucleótidos reprimido por ésta de una manera hierro dependiente, bajo condiciones limitantes de hierro la expresión de RyhB es des-reprimida causando una disminución en la cantidad de los mRNAs blanco, incluyendo genes que previamente estaban regulados positivamente por Fur como el gen *acnA* (aconitasa A), *fumA* (fumarasa A), *sdh*CDAB (succinato deshidrogenasa), *bfr* (bacterioferritina), *ftn*A (ferritina y *sod*B (FeSOD). Como resultado *E. coli* es capaz de remodelar su proteoma para usar más eficientemente funciones esenciales bajo condiciones limitantes de hierro (Won., 2007).

En *E.coli* el gen *fur* se encuentra corriente abajo del gen bicistrónico del operón *fldA-fur*, este operón es inducido por el sistema SoxRS en respuesta al superóxido mediado por estrés redox (Andrews y cols., 2003).

El gen *fur* también tiene su propio promotor que es inducido 10 veces por OxyR en respuesta a la presencia de H_2O_2 que media el estrés redox, éste proceso incrementa los niveles de la proteína Fur dos veces (5000 a 10000 copias por célula), esto muestra una relación interesante entre el estrés redox y la regulación de la homeostasis del hierro, el nivel elevado de la proteína Fur tendría como resultado reducir los niveles de hierro lo cual ayudaría reducir su toxicidad (Andrews y cols., 2003).

El gen regulador *fur* también ha sido genéticamente implicado en varios procesos que no están relacionados con la homeostasis del hierro incluyendo la tolerancia a ácido, respuesta a altas concentraciones de sal, quimiotaxis, entre otras (Won., 2007).

3. Antecedentes específicos.

En 1981 un estudio realizado por Hantke seleccionó una mutante en el gen *fur* de *Escherichia coli* la cual expresaba constitutivamente las proteínas de membrana externa y los sideróforos normalmente reprimidos bajo condiciones deficientes de hierro. Esta mutante fue llamada *fur* y su comportamiento mostraba que, una represión metal dependiente era la base del control ejercido por el hierro en los genes regulados por este (Hantke., 1981; Escolar y cols., 1999). Desde entonces se han realizado estudios que han demostrado que en *E. coli* la proteína Fur controla la expresión de más de 90 genes, incluyendo a genes que no están relacionados directamente con la adquisición y almacén del hierro (Andrews y cols., 2003). Debido al gran número de genes que se encuentran bajo la regulación de Fur, diversos homólogos han sido encontrados en bacterias como *Yersinia, Salmonella, Vibrio, Pseudomonas, Helicobacter pylori, Bordetella, Campylobacter, Acinetobacter baumannii, Legionella, Neisseria, Haemophilus,* etc (Escolar y cols., 1999).

Abdul-Tehrani en 1999, encontró que el contenido de hierro en las cepas de *E. coli* mutantes en el gen *fur* está reducido en un 70%. El 50% de esta disminución se debe a la falta de las proteínas de almacén de hierro (Abdul-Tehrani., 1999).

En *Pseudomonas aeruginosa* un análisis global mostró que 205 genes son regulados por el hierro de los cuales 118 son inducidos por limitación de hierro y 87 son reprimidos. Esto representa el 4% de los genes de *P. aeruginosa* lo cual confirma que la disponibilidad de hierro puede tener su principal influencia en la expresión génica en las bacterias (Andrews y cols., 2003).

En algunas bacterias como *Rhizobium leguminosarum* y *Synechococcus* el gen *fur* parece ser esencial ya que no se han podido obtener mutantes del gen *fur* (Andrews y cols., 2003).

En un estudio realizado por Benson y cols., (2004), se demostró la importancia de la proteína Fur en la interacción simbiótica bacteria planta, donde una mutante *fur* de *Bradyrizhobium japonicum* es incapaz de formar nódulos funcionales para la fijación de nitrógeno en plantas de soya y frijol (Benson y cols., 2004).

En un estudio realizado por Hernández y cols., (2002) encontraron que con respecto al estado de oligomerización de la proteína FurA de *Anabaena* PCC 7119 presentaba

diferentes patrones de oligomerización en condiciones de estrés osmótico, en ausencia de agentes reductores, en presencia de agentes entrecruzantes como el glutaraldehído y de diferentes metales divalentes, se observaron dímeros, trímeros y tetrámeros (Hernández y cols., 2002).

Es bien conocido que el hierro es el principal protagonista en el estrés redox y éste ha sido reportado que en algunas bacterias presentan un incremento en la sensibilidad a agentes que causan estrés oxidativo bajo condiciones repletas de hierro (Andrews y cols., 2003)

Como el efecto tóxico de los radicales libres reactivos es exacerbado por la presencia del hierro, las bacterias para sobrevivir, expresan sistemas finamente regulados capaces de censar y modificar las concentraciones tanto de hierro como de radicales reactivos (Andrews y cols., 2003). Tettelin, y cols., (2000) identificaron un operón putativo NMB1436-38 constituido por 3 genes (NMB1436, NMB1437 y NMB1438 que codificaban para proteínas desconocidas con un peso molecular de 28253, 25897 y 53923 Da respectivamente. Uno de los productos de los genes putativos del operón (el producto del gen NMB1438) tiene similitud con las ferredoxinas bacterianas, proteínas que se sabe juegan un papel en la homeostasis del hierro y en la defensa al estrés oxidativo (Tettelin y cols., 2000). Grifantini y cols., en 2004 mostraron que este operón tiene similitud al perfil de transcripción de los genes involucrados en la homeostasis del hierro y la respuesta al estrés oxidativo, incluyendo al gen de la superóxido dismutasa (*sod*B) y los genes de las bacterioferritinas (*brf*A–*brf*B). Para demostrar que el operón NMB1436-38 estaba involucrado en la protección al estrés oxidativo produjeron una mutante por deleción del operón entero y examinaron su sensibilidad al peróxido de hidrógeno. En presencia de hierro, la mutante fue remarcablemente más sensible al H_2O_2 comparada con la cepa silvestre (Grifantini y cols., 2004).

En estudios realizados por López y cols., 2009, observaron que la sobreexpresión de la proteína Fur incrementó la sobrevida de las células cuando éstas fueron expuestas a H_2O_2 y a metil viológeno (López y cols., 2009).

G. diazotrophicus crece en condiciones aeróbicas estrictas y esta condición lleva al incremento de las especies ROS, esto es de interés porque en la planta de caña de azúcar se

ha descrito que la savia contiene una concentración de hierro de 2.68-9.85 μM (Cunha y cols., 2004), y un pH entre 5.5 y 7.5, lo que un incremento del hierro libre Fe^{2+} vía la reacción Fenton, generaría especies ROS altamente reactivas en la célula, que podrían causar la muerte celular, pudiera pensarse que en esta bacteria están presentes uno o varios reguladores transcripcionales como Fur y Per que interactúan con el hierro para detectar su nivel intracelular o estado de estrés oxidativo, con el fin de controlar de manera eficiente la expresión de una amplia variedad de genes implicados en la adquisición o en la protección frente a las especies ROS (Hernández y cols., 2002).

4. Planteamiento del problema

El hierro es un microelemento esencial para todos los seres vivos, en las bacterias es un importante cofactor para un amplio rango de procesos celulares como la fotosíntesis, la fijación de nitrógeno, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la regulación de los genes y la biosíntesis de DNA; también es parte importante de moléculas como los citocromos, es cofactor de diversas enzimas y juega un papel central en el metabolismo celular. (Moriah y Alison, 2009). La concentración de hierro intracelular libre puede ser tóxica para las células; esta toxicidad del hierro se debe a la habilidad del hierro de generar junto con el oxígeno radicales libres hidroxilos que pueden causar peroxidación de las membranas lipídicas y otros constituyentes celulares por este motivo las bacterias han desarrollado mecanismos para regular los niveles de hierro intracelular (Gesine y cols., 2006).

Esta regulación es realizada por la proteína Fur cuya función es controlar la expresión de las proteínas implicadas en la captación, almacenamiento y uso de hierro según la concentración intracelular de este elemento (Escolar y cols., 1999). *G. diazotrophicus*, es una α-proteobacteria, endófita aislada de la caña de azúcar (*Saccharum officinarum)*, su genoma fue totalmente secuenciado y revelo dos proteínas Fur like codificadas por GDI_{1398} y GDI_{1248} (Bertalan y cols., 2009). Debido a la gran importancia que tiene la proteína Fur en la regulación del hierro y a que se desconoce su participación en la regulación del hierro en este microorganismo, se ha decidido iniciar los estudios de funcionalidad de la proteína Fur de GDI_{1398} en *G. diazotrophicus*.

5. Hipótesis

La proteína Fur_{1398} actúa como regulador del metabolismo del hierro y protege a las células del estrés oxidativo.

6. Objetivos.

6.1. General.

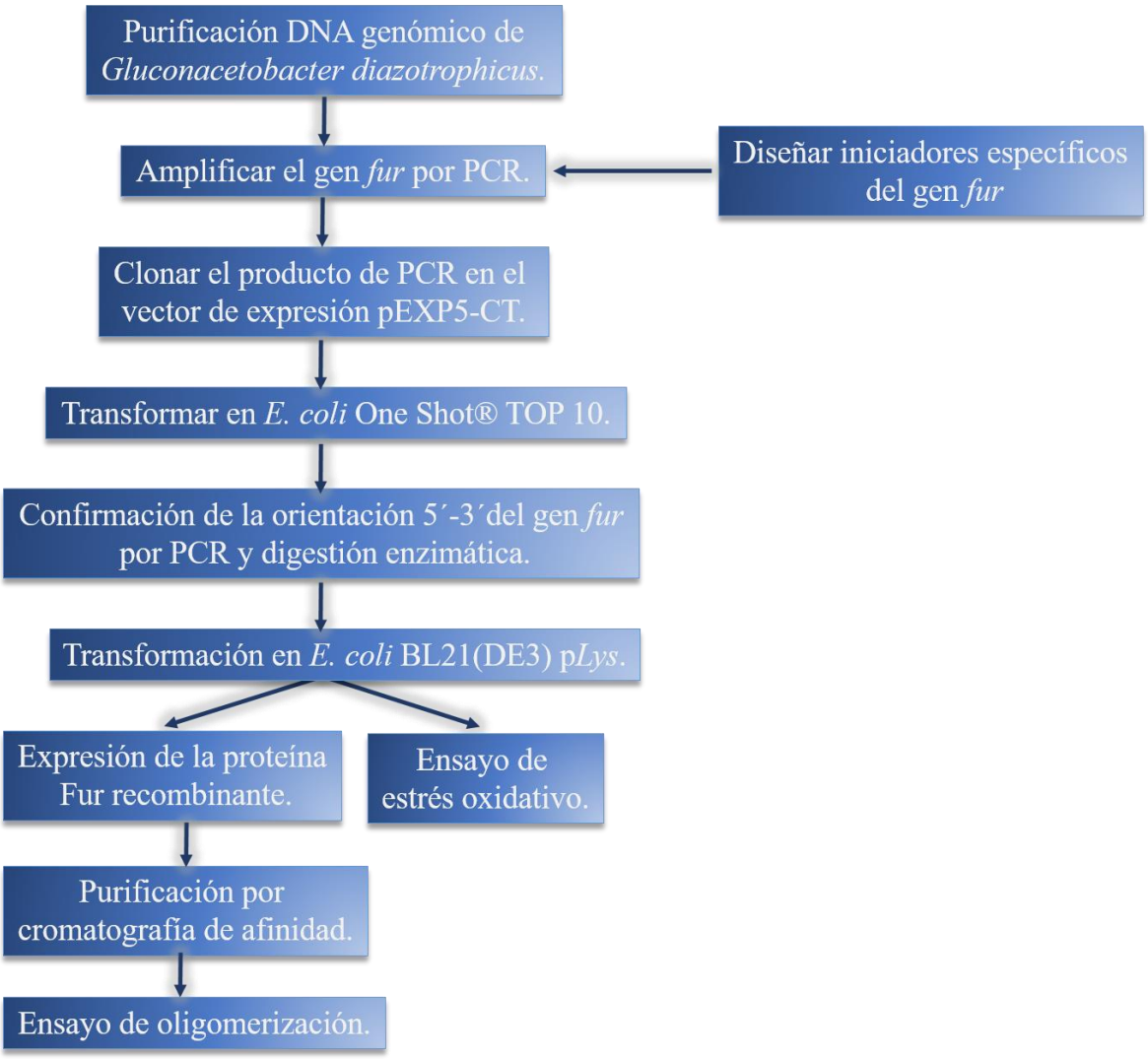
Purificar y caracterizar bioquímicamente la proteína Fur_{1398} de *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal 5.

6.2. Específicos.

- Clonar el gen fur_{1398}
- Sobre-expresión de la proteína Fur_{1398}.
- Purificar la proteína Fur_{1398}.
- Determinar el estado de oligomerización de la proteína Fur_{1398}.
- Determinar los factores que afectan el estado de oligomerización de la proteína Fur_{1398}.
- Determinar la respuesta de la proteína Fur_{1398} a estrés oxidativo *in vivo*.

7. Material y métodos.

7.1 Esquema experimental



7.2 Material biológico

Cepas y plásmidos utilizados

Cepa	**Genotipo**	**Referencias**
Escherichia coli One Shot Top 10	F^- *mcr*A Δ(*mrr-hsd*RMS-*mcr*BC) φ80*lac*ZΔM15 Δ*lac*X74 *rec*A1 *ara*D139 Δ(*ara-leu*) 7697 *gal*U *gal*K *rps*L (Str^R) *end*A1 *nup*G λ-	Invitrogen
Escherichia coli BL21 (DE3) pLys (*Cm*^{R})	F^-, *omp*T, *gal*, *dcm*, *lon*, *hsd* SR(r_B-m_B-)λ(DE3) pLys (Cm^R)	Proporcionada por la Dra. Patricia Sánchez Alonso
Gluconacetobacter diazotrophicus Pal5		ATCC49037
Plasmidos	**Descripción**	
Plásmido pEXP5-CT	Plásmido inducible por IPTG, C-terminal 6xHis, Ap^r	Invitrogen
pEXP5-CT::*fur*	Plásmido pEXP5-CT con el gen fur_{1398}	Este trabajo

Tabla 1. Cepas y plásmidos utilizados en este trabajo.

Vector de expresión pEXP5-CT

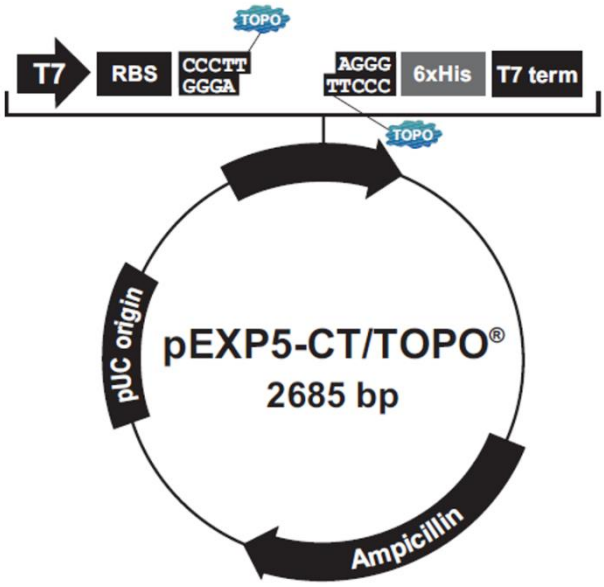


Figura 4. Vector de expresión utilizado en este estudio.

El plásmido pEXP5-CT es un vector de expresión que cuenta con el promotor del bacteriófago T7 para una producción elevada de la proteína recombinante de interés. En este sistema el gen es clonado detrás de un promotor reconocido por la ARN polimerasa del fago T7 (T7RNAP). Esta polimerasa debe ser proporcionada en otro plásmido o más comúnmente es puesto en el genoma de la bacteria en un profago (λDE3), este sistema puede ser inducido por lactosa o bien por su análogo no hidrolizable IPTG. La expresión basal puede ser controlada mediante la co-expresión de la lisozima T7 ésta lisozima se encuentra en un plásmido (pLys o pLysE) (Rosano y cols., 2014); además contiene una etiqueta de histidinas antes del codón de paro lo que permite la detección de la proteína con anticuerpos, y su purificación por cromatografía de afinidad. Contiene un gen de resistencia a ampicilina permitiendo la selección de las clonas transformantes candidatas en *E. coli*, posee el origen de replicación del plásmido pUC para la biosíntesis de un alto número de copias y su mantenimiento en *E. coli*.

7.3 Metodología

7.3.1 Métodos de biología molecular (Ver Anexo 1)

7.3.1.1 Análisis *in silico* del gen y de la proteína Fur$_{1398}$.

La secuencia del gen *fur*$_{1398}$ se obtuvo utilizando la base de datos del GeneBank (http://www.ncbi.nlm.nih. gov/). Para saber si el gen *fur*$_{1398}$ se encontraba como parte de un operón se utilizó la base de datos DOOR2 (Database of prokaryotic operons)

(http://csbl.bmb.uga.edu/DOOR/). Los alineamientos se realizaron con la herramienta T-COFFEE, y para los dominios conservados de la proteína se utilizó la base de datos CDD (conserved domain database).

7.3.1.2 Extracción de DNA genómico y plasmídico

La extracción del DNA genómico de *G. diazotrophicus* se realizó por la técnica del CTAB (Pedraza RO y cols., comunicación personal).

Para la extracción del DNA plasmídico se utilizó la técnica denominada Miniprep (Sambrook y cols., 2009).

7.3.1.3 Diseño de iniciadores

Se diseñaron iniciadores específicos del gen fur_{1398}, utilizando la secuencia depositada en el GeneBank no.de acceso: 5788842, el programa que se utilizó fue Primer Select del Software DNAstar Inc.

Para comprobar la orientación 5'-3' del gen fur_{1398} se utilizaron los iniciadores correspondientes al fago T7.

Nombre	**Secuencia 5´-3´**	**Longitud**	**Tm**	**G+C%**
Fur-F1	ACACGTCTGATGTTCGGGTTGG	22	68.09	54.5
Fur-F2	CGTCTGATGTTCGGGTTGGG	20	68.15	60.00
Fur-F3	ATGGTAGCGGCAGGCGAG	18	68.22	66.67
Fur-R1	CGCCGTGATTCATCCTTGCT	20	66.45	55.00
Fur-R2	CCGCCGTGATTCATCCTTGC	20	68.15	60.00
T7 delantero	TAATACGACTCACTATAGGG	20	61.35	40.00
T7 reverso	ATCCGGATATAGTTCCTCCTTTC	23	65.11	43.48

Tabla 2. Iniciadores utilizados para amplificar el gen fur_{1398} y para corroborar la orientación 5´-3´del inserto.

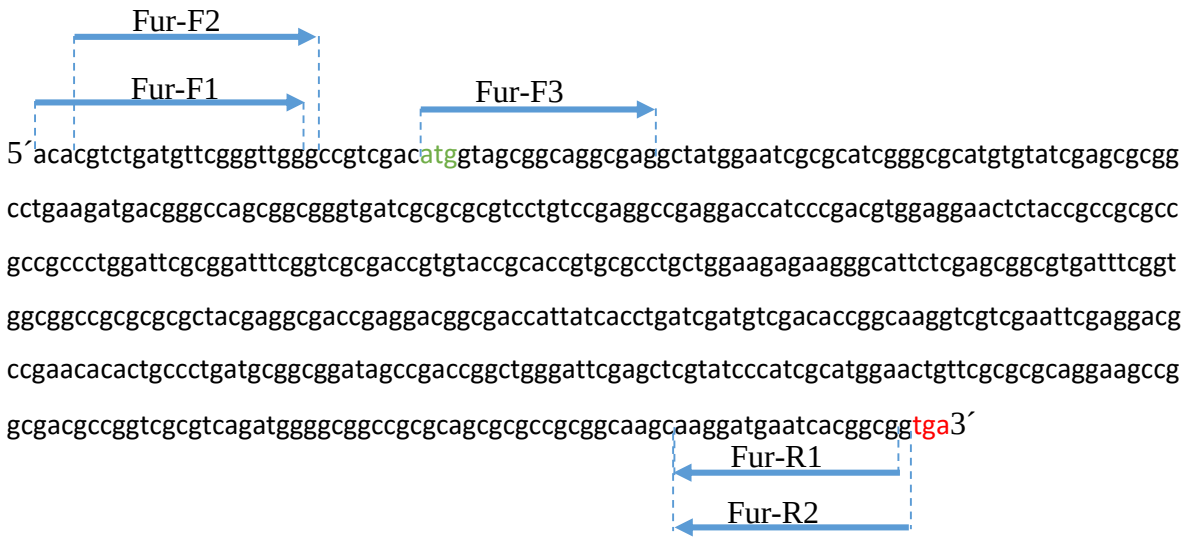


Fig.5. Localización de los iniciadores delanteros y reversos en la secuencia del gen *fur*. El codón de inicio y el codón de paro se indican en letras verdes y rojas respectivamente.

7.3.1.4 Reacción de PCR

Los iniciadores sintetizados se utilizaron para amplificar el gen fur_{1398} se utilizaron las enzimas Taq DNA Polimerasas Recombinante (Invitrogen) y la Taq DNA Polimerasa Phusion de alta fidelidad (Fermentas). Un ciclo donde la temperatura de desnaturalización inicial fue de 95ºC durante 5 minutos, 30 ciclos donde la temperatura de desnaturalización fue de 94°C durante 30 segundos, la de alineación de 66°C 50 segundos y la de extensión de 72°C durante 1 minuto, y finalmente un ciclo de extensión fue de 72°C durante 20 minutos cuando se utilizó la enzima Taq DNA Polimerasa Recombinante. Las condiciones utilizadas al amplificar con la enzima Taq DNA Phusion de alta fidelidad fueron: un ciclo de 98°C durante 3 minutos; 30 ciclos a 94°C durante 10 segundos, 66°C durante 15 segundos y a 72°C 20 segundos, finalmente un ciclo de extensión a 72°C durante 20 minutos. El amplificado obtenido con la enzima Taq DNA Phusion de alta fidelidad fue incubado con la enzima Taq Polimerasa Recombinante a 72°C durante 10 minutos con la finalidad de agregar poliadeninas al extremo del amplificado y así clonarlo en el vector pEXP5-CT.

7.3.1.5 Obtención de la construcción pEXP5-CT::*fur*$_{1398}$

Para generar la construcción pEXP5-CT::*fur*$_{1398}$, se clonó el amplicón con un tamaño de 495 pb del gen *fur*$_{1398}$ en el vector de expresión pEXP5-CT, y el producto de la clonación se transformó en células químicamente competentes *E.coli* One Shot TOP10. Se analizaron aquellas colonias que presentaron resistencia a ampicilina (100µg/ml).

7.3.1.6 Análisis de las transformantes.

El análisis se realizó mediante la PCR (con los iniciadores del vector y del inserto) y digestión enzimática. Para la confirmación de la orientación 5´-3´del inserto mediante PCR se utilizaron las siguientes combinaciones de iniciadores: iniciador delantero del gen *fur*$_{1398}$ y el iniciador reverso del vector pEXP5-CT y los iniciadores reversos del gen *fur*$_{1398}$ y del vector pEXP5-CT. Para las digestiones enzimáticas se utilizaron las enzimas de restricción *Eco*RI que lineariza el plásmido y *Ava*I que corta una vez en el inserto y en el vector.

7.3.2 Métodos de expresión, lisis y purificación de la proteína Fur. (Ver anexo 2)

7.3.2.1 Expresión de la proteína recombinante.

El plásmido pEXP5-CT::*fur*$_{1398}$ se transformó en células químicamente competentes *E. coli* BL21pLys. Se seleccionaron las clonas resistentes a ampicilina (100µg/ml) y cloranfenicol (34µg/ml). La expresión de la proteína se realizó mediante la adición de diferentes concentraciones del inductor IPTG (0.01 hasta 0.1M).

7.3.2.2 Lisis y extracción de proteínas totales.

La obtención de las proteínas totales se llevó a cabo por sonicación de los paquetes celulares previamente inducidos en diferentes concentraciones. Las muestras sonicadas se centrifugaron, el sobrenadante se separó del pellet y fue analizado en PAGE-SDS.

7.3.2.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida, tinciones y detección de la proteína recombinante por Western blot.

Para el análisis de la proteína Fur_{1398} en geles de poliacrilamida se utilizó un sistema electroforético discontinuo y en condiciones desnaturalizantes. Las tinciones utilizadas fueron: Coomassie brilliant blue R-250, Ponceau y Plata. Para el análisis por Western blot se utilizó membrana Hybond ECL de 0.45 μm a la que se transfirieron las proteínas, la detección de estas en la membrana se realizó primero con la tinción Ponceau y posteriormente con anticuerpos monoclonales antipolihistidina (Sigma-Aldrich) conjugados con fosfatasa alcalina.

7.3.2.4 Purificación de la proteína Fur recombinante.

La purificación se realizó por cromatografía de afinidad Ni-NTA (Invitrogen), el soporte de la resina consiste en agarosa derivatizada con ácido nitrilotriacético que actúa como quelante de los iones níquel (Ni^{2+}), de esta manera los iones Ni^{2+} quedan unidos por 4 enlaces a la columna. Una vez que la proteína está unida a la resina puede ser eluída utilizando imidazol que compite por el grupo del agente quelante (Magdeldin y cols., 2012). Para la purificación en condiciones nativas se utilizaron sistemas amortiguadores sin agentes desnaturalizantes. Para la purificación en condiciones híbridas se utilizaron condiciones desnaturalizantes con urea 6 M y 8 M, posteriormente se hicieron lavados con buffer nativo para re-naturalizar la proteína. En ambos casos la proteína se eluyó utilizando diferentes concentraciones de imidazol. En la purificación híbrida modificada al buffer de lisis se le agregó glicerol 0.5% y NP-40 1 mM, se utilizaron condiciones desnaturalizantes con urea 6 M y 8 M, posteriormente se hicieron lavados con buffer nativo para re-naturalizar la proteína. La proteína se almacenó a -20°C.

7.3.2.5 Condiciones para los ensayos de oligomerización de la proteína Fur

Las fracciones que contenían la proteína Fur_{1398} purificada a homogeneidad se colocaron en una membrana de diálisis; se dializaron contra un buffer acético-acetato pH 4 al que se le agregó 10% de glicerol. Se dejó dializando en agitación toda la noche a 4°C.

7.3.3 Análisis bioquímico de la proteína Fur (Ver anexo 3)

7.3.3.1 Ensayos de estrés oxidativo.

Los ensayos de estrés oxidativo se realizaron con las células *E. coli* BL21 (pLys) que contenían la construcción pEXP5-CT::fur_{1398}, como controles negativos se emplearon las células *E. coli* BL21 (pLys) y *E. coli* BL21 (pLys) con el vector pEXP5-CT. Las cepas anteriores se crecieron en medio LB sin hierro, a 37ºC y con agitación constante 200 rpm toda la noche, posteriormente se hizo una dilución 1:100 de estos cultivos en 50 ml de caldo LB sin Fe, LB con DPD 200 µM, y LB con Fe 37 µM. Los cultivos se dejaron crecer hasta que alcanzaron una DO_{600} de 0.6 y se indujeron durante 2 h con IPTG 0.1 mM. Se tomaron 200 µl de las células inducidas en las diferentes condiciones y se sembraron en placas de LB que contenían IPTG 0.1 mM. Se colocaron discos de papel filtro Sartorius de 0.5 cm de diámetro impregnados con 2 µl de peróxido de hidrógeno a diferentes concentraciones (0.151, 0.303, 0.606, 1.212, 2.425). Se dejaron durante 24 h creciendo a 37ºC, y se midieron las áreas de inhibición (el ensayo se realizó cinco veces en forma independiente).

7.3.3.2 Ensayo de oligomerización.

Para realizar los ensayos de oligomerización se dializó la proteína Fur_{1398} purificada en buffer de acetato acético a pH 4.0 toda la noche. La proteína Fur_{1398} fue incubada durante 20 minutos a temperatura ambiente con 2.5% de glutaraldehído preparado recientemente. Además se analizó el estado oligomérico de la proteína recombinante Fur_{1398} añadiendo agentes reductores, NaCl y metales. Las muestras una vez que reaccionaron se hirvieron durante 10 minutos en condiciones desnaturalizantes y se analizaron por PAGE-SDS al 12%.

8. **Resultados**

8.1 Análisis *in silico* del gen *fur*$_{1398}$

De acuerdo a los resultados arrojados por el programa DOOR (Mao, 2009; Mao, 2013; Dam, 2007) la región codificante del gen *fur*$_{1398}$ de *G. diazotrophicus* se encuentra formando parte de un operón 377303, el cual está constituido por los genes que codifican para: proteína reguladora transcripcional ROS/MucR, proteína reguladora de la captación de hierro Fur, una proteína hipotética, y una proteína carbón nitrógeno hidrolasa Fig. 6.

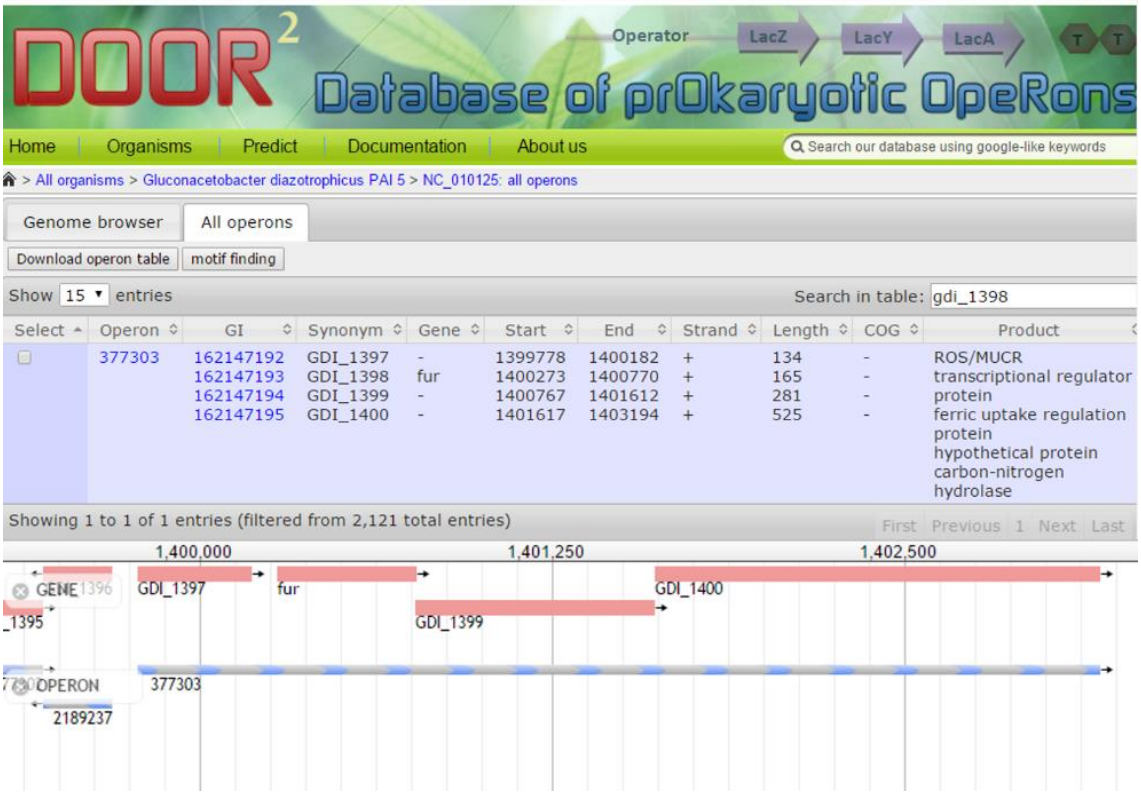


Figura 6. Resultados obtenidos por DOOR. Contexto genético del gen *fur*$_{1398}$ en el que se observa los genes que forman parte del operón 377303.

8.2 Análisis *in silico* de la proteína recombinante Fur_{1398}.

A la secuencia de la proteína Fur_{1398} se le realizó un análisis con el programa DNASTAR. De acuerdo al análisis realizado la proteína Fur tiene un peso de 18.5kDa. También se muestran las características de la proteína Tabla 3, y el análisis del contenido de aminoácidos de la proteína Tabla 4.

Análiss $_{Fur1398}$	
Peso molecular	18541.02 m.w.
Longitud	165
1 microgramo =	53.934 pMoles
Coeficiente de extinción molar	524±5%
1 A(280) =	3.54 mg/ml
Punto isoeléctrico	6.88
Carga a pH 7	-0.25

Tabla 3. Características fisicoquímicas de la proteína Fur_{1398}

Aminoacidos	Total	Frecuencia %	Aminoacidos	Total	Frecuencia %
Cargados (RKHYCDE)	69	41.82	**K Lys**	5	3.03
Ácidos (DE)	30	18.18	**L Leu**	12	7.27
Básicos (KR)	29	17.58	**M Met**	6	3.64
Polares (NCQSTY)	22	13.33	**N Asn**	0	0.00
Hidrofóbicos (AILFWV)	58	35.15	**P Pro**	3	1.82
A Ala	23	13.94	**Q Gln**	2	1.21
C Cys	1	0.61	**R Arg**	24	14.55
D Asp	12	7.27	**S Ser**	8	4.85
E Glu	18	10.91	**T Thr**	7	4.24
F Phe	4	2.42	**V Val**	12	7.27

G Gly	12	7.27	**W Trp**	0	0.00
H His	5	3.03	**Y Tr**	4	2.42
I Ile	7	4.24			

Tabla 4. Composición de aminoácidos de la proteína Fur_{1398}

Se realizó un análisis de los dominios conservados de la proteína utilizando la base de datos de NCBI. Dicho análisis mostró que ésta proteína pertenece a la superfamilia HTH que cuenta con dominios hélice-giro-hélice. La mayoría de los miembros de ésta familia funcionan con dominios de unión a DNA específicos de secuencia, tales como en reguladores de la transcripción. Dentro de los dominios conservados que se encontraron en la proteína Fur_{1398} fueron: dominio de unión a DNA putativa, sitio de oligomerización, dos sitios de unión a metales, y un sitio estructural de unión a Zn^{2+} (Figura 7). También se realizó un alineamiento en el que se muestran los aminoácidos involucrados en dichos dominios. En la figura 8A se muestra el alineamiento de la proteína Fur de *E. coli* con la proteína Fur_{1398} de *G. diazotrophicus.* Y en la Figura 8B se muestra el alineamiento con diversas secuencias de otras proteínas Fur.

A

Interface del dímero [sitio de unión del polipéptido]
Hélice de unión al DNA putativa
Sitio de unión a metal1 [sitio de unión del ion]
Sitio de unión a metal 2 [sitio de unión del ion]
Sitio estructural de unión a Zn^{2+}[sitio de unión del ion]

```
                                 10        20        30        40        50        60        70
                                 |         |         |         |         |         |         |
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

                                                                  #                   ##############
Gluconacetobacter_fur1398  MVAAGEAMESRIGRMCIERGLKMTGQRRVIARVLSEAEDH-PDVEELYRRAAALDSRISVATVYRTVRLLEEKGILERRD
E_coli                     MTDNNTALK--------KAGLKVTLPRLKILEVLQEPDNHHVSAEDLYKRLIDMGEEIGLATVYRVLNQFDDAGIVTRHN
                           *.  . *::        : ***:*  *  * .**.*.::*  ..*:**:*   :...*.:*****.:. ::: **: *::
                           80        90        100       110       120       130       140       150
                                                                                  #
                                                  #                               #
                                   #     #### ##  #    #      # ##        ### #########
Gluconacetobacter_fur1398  FGGGRARYEATEDGDHYHLIDVDTGKVVEFEDAEHTALMRRIADRLGFELVSHRMELFARRKPATPVASDGAAAQRAAAS
E_coli                     FEGGKSVFELTQQHHHDHLICLDCGKVIEFSDDSIEARQREIAAKHGIRLTNHSLYLYGHCAEGDCREDEHAHEGK----
                           * **:: :* *:: .* *** :* ***:**.* .  *  *.** : *:.*..* : *:.:   .    .: *   :

Gluconacetobacter_fur1398  KDESRR
E_coli                     ------
```

B

Interface del dímero [sitio de unión del polipéptido]
Hélice de unión al DNA putativa
Sitio de unión a metal1 [sitio de unión del ion]
Sitio de unión a metal 2 [sitio de unión del ion]
Sitio estructural de unión a Zn^{2+}[sitio de unión del ion]

```
CLUSTAL W (1.83) multiple sequence alignment

                                                                                  #                  #######
Bradirizhobium          MTALKPS---------S--ASKASGIEARCAATGMRMTEQRRVIARVLAEA-V-DHPDVEELYRRCVAVDDKISISTVYR
Rizhobium               MTDLSKT------------------LEELCAERGMRMTDQRRVIARVLQES-A-DHPDVEELYRRSSAVDPRISISTVYR
Burkhordelia            MTNP-----------------------TDLKNIGLKATLPRLKILEIFQQS-PVRHLTAEDVYRNLLHEELDIGLATVYR
Xhantomonas             MNGERM----E-----T----------HDLRKVGLKVTHPRMRILELLEQKSNQHHLSAEDIYRQLLDHGDEIGLATVYR
Pseudomona?putida       MVEN-----------------------SELRKAGLKVTLPRVKILQMLDST-EQRHMSAEDVYKALMEAGEDVGLATVYR
Herbaspirillum          MPNNP----------------------SELKASGLKATLPRLKILEIFQNT-SVRHLSAEDVYKQLLSDNLDVGLATVYR
Anabaena                MR-----------------------------AIRTR-SQDRILTLLKNI-K-QGISAQDMYIELRNRSQNMGLATVYR
Gluconacetobacter_1398  MVAAGE--------------AMESRIGRMCIERGLKMTGQRRVIARVLSEA-E-DHPDVEELYRRAAALDSRISVATVYR
Gluconacetobacter_1248  MTGLSFA---------DRTETWLDNAERLCAARGSRLTDLRRQVLGLVLDA-G-RPVGAYDLLDGLRTDKKSAAPPTVYR
E_coli_BL21             MTDNN----------------------TALKKAGLKVTLPRLKILEVLQEP-DNHHVSAEDLYKRLIDMGEEIGLATVYR
Azospirillum            MAPRIAGHGAATDGKGG--GAMTSRLESLCLEKGLKMTGQRRVISQVLSES-E-DHPDVEEVHRRAVLIDPRISIATVYR
                        *                                . :    :  :  :. .       . ::           . .****

                                                                                                  ##
                                                                                                        ###
                        ########                                 #     ###   #  #    #      # ##         ### #
Bradirizhobium          TVKLFEDAGIIERHD-----------FREGRARYETMRDSHHDHLINLRDGKVIEFTSEEIEKLQAEIARKLGYKLVDHR
Rizhobium               TVKLFEDAGIIERHD-----------FRDGRSRYETVPEHHDHLIDLKNGVVIEFHSAEIEALQEKIAREHGFRLVDHR
Burkhordelia            VLTQFEQAGLLSRSN-----------FESGKAVFELNEGSHHDHLVCLDCGRVEEFFDAEIETRQQSIAKERGFKLQEHS
Xhantomonas             VLTQFEAAGLVLKHN-----------FEGGQAVYELDRGGHHDHMVDVDTGHVIEFESEEIEALQRQIAAKHGYELEEHS
Pseudomona?putida       VLTQFEAAGLVVRHN-----------FDGGHAVFELADGGHHDHMVNVDTSEVIEFMDAEIEKRQREIVAEHGFELVDHN
Herbaspirillum          VLTQFEQAGLLQRNH-----------FETGKAVFELNEGSHHDHLVCLDCGKVEEFFDAEIEKRQLKIAQEHGFEIADHA
Anabaena                SLEALKLEGKVQVRT-----------LANGEALYSLTQQDKH-HLTCLQCGISIPIHQCPVHELEIELQSSHKFKVFYHT
Gluconacetobacter_1398  TVRLLEEKGILERRD-----------FGGGRARYEATEDGDHYHLIDVDTGKVVEFEDAEHTALMRRIADRLGFELVSHR
Gluconacetobacter_1248  ALDFLLEQGLIHKIERLSAFVGCTHALDGTRACGDH--PHAAQFLICTGCGQVTELDDHGILHALVDATRTIGFTVRHST
E_coli_BL21             VLNQFDDAGIVTRHN-----------FEGGKSVFELTQQHHHDHLICLDCGKVIEFSDDSIEARQREIAAKHGIRLTNHS
Azospirillum            TMRLLEDAQVIEKVD-----------LGDGRARYEEASTDHHHHLIDTRSGRIVEFASPELEALKERIARELGYRIVGHR
                         :  :     :               :   .:  .        .:     .    : .                 :

                        #######
Bradirizhobium          LELYCVPLDDDK--PT---------------S
Rizhobium               LELYGVPLKPGE-------------------H
Burkhordelia            LAMYGTCTTENC--PYRK-------------H
Xhantomonas             LVLYVRKKRPR--------------------
Pseudomona?putida       LVLYVRKK--K--------------------
Herbaspirillum          LALYGHCKNCKK--L--K-------------K
Anabaena                LEFFGLCNQCQI--NQGID---N--------S
Gluconacetobacter_1398  MELFARRKPATPVASDGAAAQRAAASKDESRR
Gluconacetobacter_1248  VEAEGLCAACRD--A----------------A
E_coli_BL21             LYLYGHCAEGDC--REDEH---AHEG-----K
Azospirillum            LEIYGVPLDSVS--LDGGDALDGNSGEGGERR
                        :
```

Figura 8. Panel A. Alineamiento de la proteína Fur_{1398} de *G. diazotrophicus* con la proteína Fur de *E.coli*. **Panel B**. Alineamiento de la secuencia de la proteína Fur de diferentes bacterias en las que se indican los dominios conservados de unión a DNA, unión a metal, un sitio estructural de Zn^{2+} y un sitio de unión de polipéptido.

8.3 Amplificación y clonación del gen *fur*$_{1398}$

El DNA genómico de *G. diazotrophicus* Pal5 se utilizó como templado para la amplificación del gen *fur*$_{1398}$ mediante PCR con los iniciadores específicos diseñados como se describió en material y métodos, el amplificado esperado fue de 525 pb al amplificar con los iniciadores Fur-F1 y Fur-R1 y de 523 pb al amplificar con los iniciadores Fur-F2 y Fur-R2 (Figura 9). El producto de PCR obtenido al amplificar con los iniciadores Fur-F1- Fur-R1 y Fur-F2- Fur-R2 fue clonado en el vector pEXP5-CT y transformado en células químicamente competentes *E. coli* One Shot Top10.

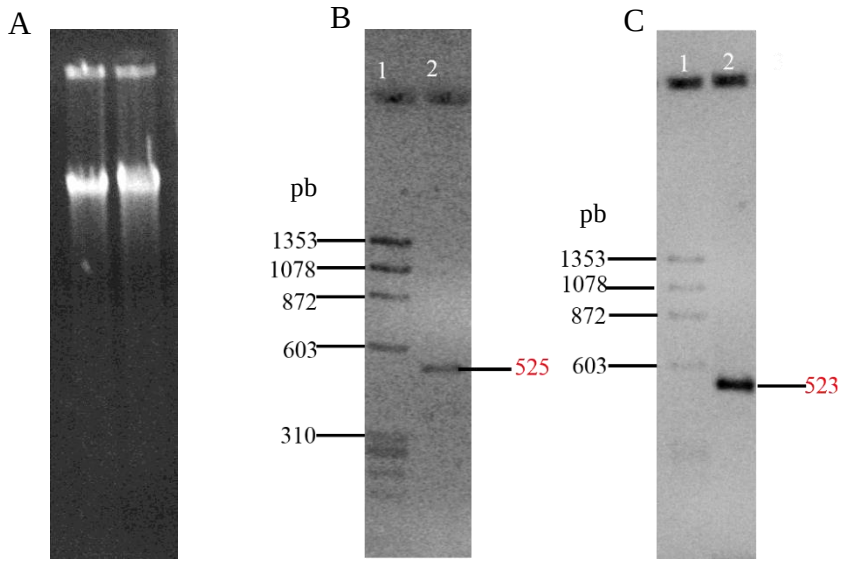


Figura 9. Corrimiento electroforético del DNA genómico de *G. diazotrophicus* Pal5 y productos de PCR en gel de agarosa. **Panel A**: gel de agarosa al 1% DNA genómico de *G. diazotrophicus* Pal5. **Panel B**: gel de agarosa al 1.5% del fragmento obtenido por PCR con la polimerasa Taq Phusion de alta fidelidad, carril 1: marcador de peso molecular φX174 *Hae* III fragmento; carril 2: producto de PCR del gen *fur* con los iniciadores Fur-F1-Fur R1. **Panel C**: carril 1: marcador de peso molécular φX174 *Hae* III fragment; carril 2: amplificado del gen *fur* con los iniciadores Fur F2- FurR2.

8.4 Análisis de la orientación del gen *fur*$_{1398}$

Se tomaron grupos de clonas transformantes y se analizaron por PCR en colonia para corroborar la presencia del fragmento. En la Figura 10A se observa el fragmento presente en las transformantes, correspondientes a la construcción pEXP::*fur*$^{1}_{1398}$ (iniciadores FurF1-FurR1) 525pb, en la Figura 10B se observa el amplificado de las transformantes de la construcción pEXP::*fur*$^{2}_{1398}$ (iniciadores FurF2-FurR2) correspondiente a 523pb.

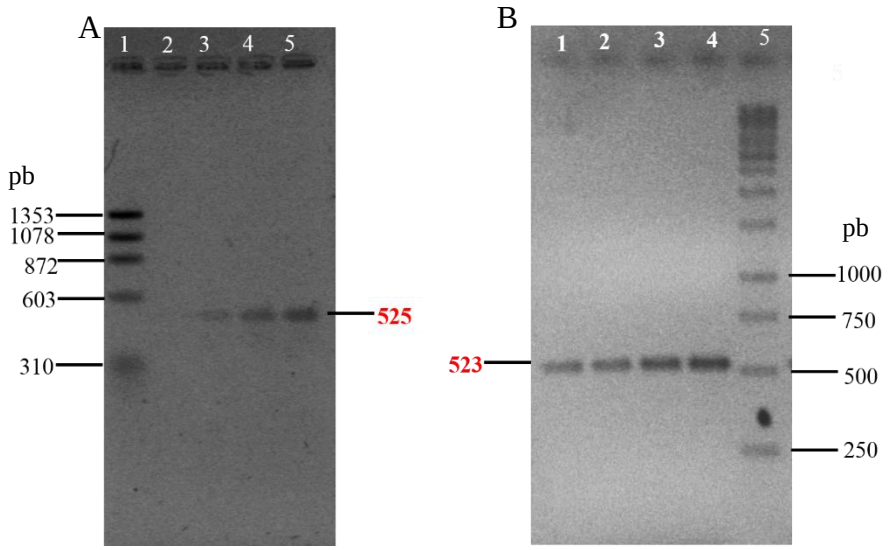


Figura 10. Análisis de las PCR en colonia de grupos de clonas transformantes de *E. coli* One Shot Top 10. **Panel A**: transformantes pEXP::*fur*$^{1}_{1398}$, carril 1: marcador de peso molecular φX174 *Hae* III fragmento; carril 2: clonas (6,7,8,9,10,11); carril 3: clonas (22, 23, 24, 25, 26 y 27); carril 4: clonas (8, 16, 24, 33, 40 y 47); carril 5: clonas (10, 18, 26, 35, 42 y 49). **Panel B**: transformantes pEXP::*fur*$^{2}_{1398}$ carril 1: clonas (1, 7, 23 y 39); carril 2: clonas (2, 16, 33 y 47); carril 3: clonas (3, 17, 34 y 48); carril 4: clonas (4, 10, 18, 26); carril 5: marcador de peso molecular Fermentas 1Kb.

Se seleccionaron las clonas 42 y 49 de la construcción pEXP::*fur*$^{1}_{1398}$, y de la construcción pEXP::*fur*$^{2}_{1398}$ se eligieron las clonas 4, 18, 9 y 25 a las cuales se les extrajo DNA plásmidico (Figura 11). Los iniciadores utilizados para confirmar la orientación del fragmento fueron: T7 delantero, T7 reverso y los iniciadores del gen *fur*$_{1398}$: Fur F1, FurF2, FurR1 y FurR2. En la Figura 12 se muestra un esquema general de la ubicación de los iniciadores. La combinación de los iniciadores y el tamaño esperado del fragmento

amplificado para cada construcción se muestra en la Tabla 5. El análisis del PCR en gel de agarosa donde se confirma la orientación del gen *fur*$_{1398}$ se muestra en la Figura 13.

.

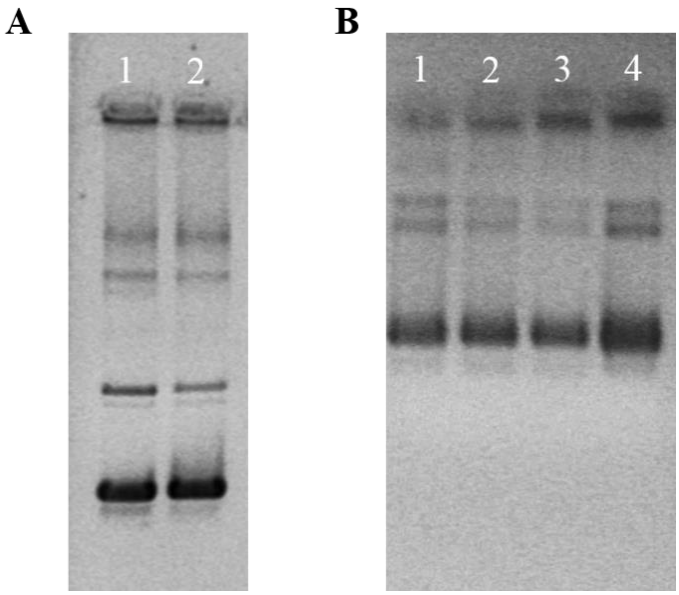


Figura 11. Análisis en gel de agarosa al 1% de los plásmidos pEXP::*fur*$^{1}_{1398}$ y pEXP::*fur*$^{2}_{1398}$. **Panel A**: plásmidos de la construcción pEXP::*fur*$^{1}_{1398}$ carril 1: clona 42; carril 2: clona 49. **Panel B**: plásmidos de la construcción pEXP::*fur*$^{2}_{1398}$. carril 1: clona 4; carril 2: clona 18; carril 3: clona 9; carril 4: clona 25.

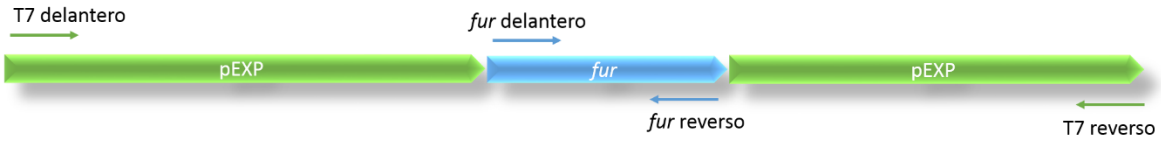


Figura 12. Esquema de la ubicación de los iniciadores del gen *fur*$_{1398}$, y de los iniciadores del fago T7 utilizados para confirmar la dirección 5´-3´del gen *fur*$_{1398}$ en el vector pEXP5-CT.

	pEXP::*fur*^{1}$_{1398}$	**pEXP::*fur*^{2}$_{1398}$**
FurF (1,2)+ T7 delantero	Sin amplificado	Sin amplificado
T7 delantero + FurR(1,2)	607 pb	No realizado
FurF (1,2) + T7 reverso	676pb	676
T7 reverso + FurR(1,2)	Sin amplificado	Sin amplificado

Tabla 5. Combinación de iniciadores utilizados para corroborar la orientación del gen *fur* en el vector de expresión pEXP5-CT.

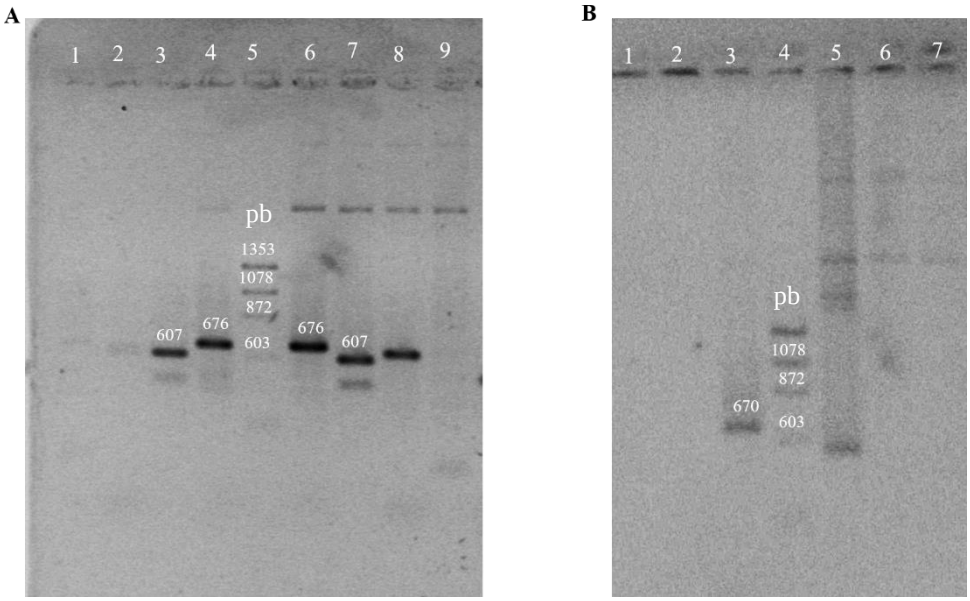
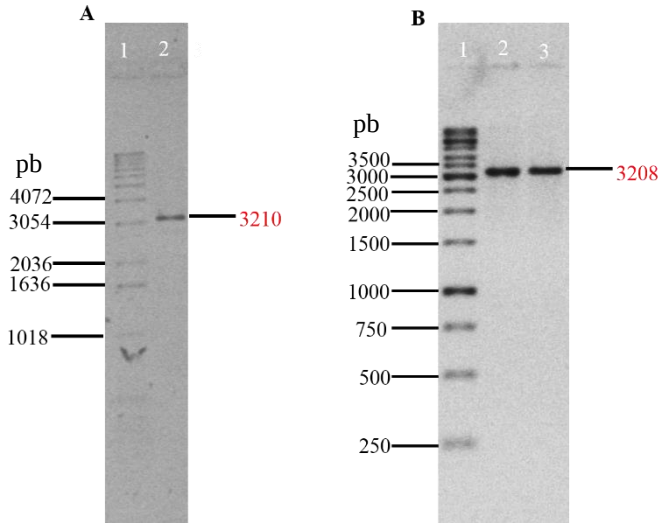


Figura 13.Análisis en gel de agarosa al 1.5% del PCR con los iniciadores del gen *fur* y del vector pEXP5-CT. **Panel A**: construcción pEXP::*fur*^{1}$_{1398,}$ carril 1: FurR1+T7 reverso clona 42; carril 2: FurF1+T7 delantero clona 42; carril 3: T7 delantero+FurR1 clona 42; carril 4: FurF1+T7 reverso clona 42; carril 5: Marcador φX174 Hae III fragmento; carril 6: FurF1+T7 reverso clona 49; carril 7: T7delantero+FurR1 clona 49; carril 8: FurF1+T7 delantero clona 49; carril 9: FurR1+T7 reverso clona 49. **Panel B**: construcción pEXP::*fur*^{2}$_{1398,}$ carril 1: FurR2-T7+T7 reverso clona 18; carril 2: FurF2+T7 delantero clona 18; carril 3: FurF2+ T7 reverso clona 18; carril 4: Marcador φX174 Hae III fragmento; carril 5: FurF2+T7 reverso clona 25; carril 6: T7 delantero+FurF2 clona 25; carril 7: FurR2+T7 reverso.

En base a los resultados observados en la Figura 13, se decidió trabajar con las clonas pEXP5CT::*fur*$_{1398\text{-}18}$ y pEXP5CT::*fur*$_{1398\text{-}42}$. Para corroborar la dirección 5´-3´del inserto se hicieron análisis por patrones de restricción. Se utilizaron las enzimas de restricción *Eco*RI y *Ava*I. La enzima *Eco*R1 produce un solo corte en el inserto provocando que el plásmido se linearice dando lugar a un fragmento de 3,210 pb para pEXP::*fur*$^{1}_{1398}$ Figura 14 A, y de 3208 pb para pEXP::*fur*$^{2}_{1398}$ Figura 14 B. La enzima *Ava*I tiene un sitio único en el vector, y uno en el gen *fur*$_{1398}$, permitiendo la liberación de dos fragmentos. Para la construcción pEXP::*fur*$^{1}_{1398}$ se esperan fragmentos de 2,853 y 357 pb (Figura 14 C), mientras que para la construcción pEXP::*fur*$^{2}_{1398}$ se esperan fragmentos de 2,853 y 355 pb (Figura 14 D y E). Con estos resultados se confirmó la orientación 5´-3´del gen *fur*$_{1398}$ en el vector pEXP5-CT.



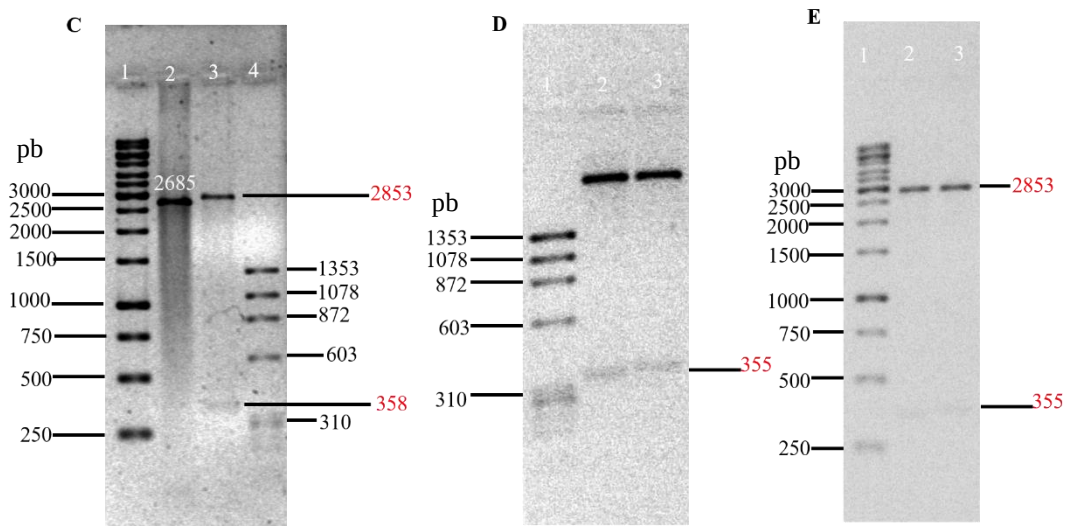


Figura 14. Análisis en gel de agarosa al 1% de las restricciones realizadas a las clonas pEXP5CT::*fur*$_{1388\text{-}42}$ y pEXP5CT::*fur*$_{1388\text{-}18}$. Panel **A:** carril 1: Marcador GIBCO BRL 1kb; carril 2: restricción con la enzima *Eco*RI pEXP5-CT::*fur*$^{1}_{1398\text{-}42}$. **Panel B**: carril 1: Marcador Fermentas 1kb. Carril 2: Restricción con *Eco*RI pEXP5-CT::*fur*$^{2}_{1398\text{-}18}$. **Panel C**. Carril 1: Marcador Fermentas1kb; carril 2: restricción con la enzima *Ava*I del plásmido pEXP5-CT; carril 3: restricción *Ava*I pEXP5-CT::*fur*$^{1}_{1398\text{-}42}$; carril 4: marcador φX174 Hae III fragmento. **Panel D.** Gel de agarosa 1.5%, carril 1: marcador φX174 Hae III fragmento; carril 2: restricción *Ava*I pEXP5-CT::*fur*$^{2}_{1398\text{-}18}$. **Panel E**. Carril 1: marcador Fermentas 1kb; carril 2: restricción *Ava*I pEXP5-CT::*fur*$^{2}_{1398\text{-}18}$.

El plásmido pEXP5-CT::*fur*$^{2}_{1398\text{-}18}$ se mandó a secuenciar utilizando el iniciador T7 delantero para corroborar la identidad con el gen de la cepa silvestre. La secuencia obtenida se analizó mediante un Blast con el programa de NCBI. Obteniéndose un 100% de identidad Figura 15. Una vez que se confirmó que el gen *fur* correspondía con el gen silvestre, los plásmidos pEXP5-CT::*fur*$^{1}_{1398}$ y pEXP5-CT::*fur*$^{2}_{1398}$ se transformaron en células químicamente competentes *E.coli* BL21 pLys. A las colonias transformantes se les realizó PCR en colonia, en el cual se confirmó la presencia del gen *fur*$_{1398}$, tal como se observa en la Figura 16A, en la que se ve el amplificado de 525pb correspondiente a pEXP5-CT::*fur*$^{1}_{1398}$, y un amplificado de 523 pb correspondiente a pEXP5-CT::*fur*$^{2}_{1398}$ Figura 16B.

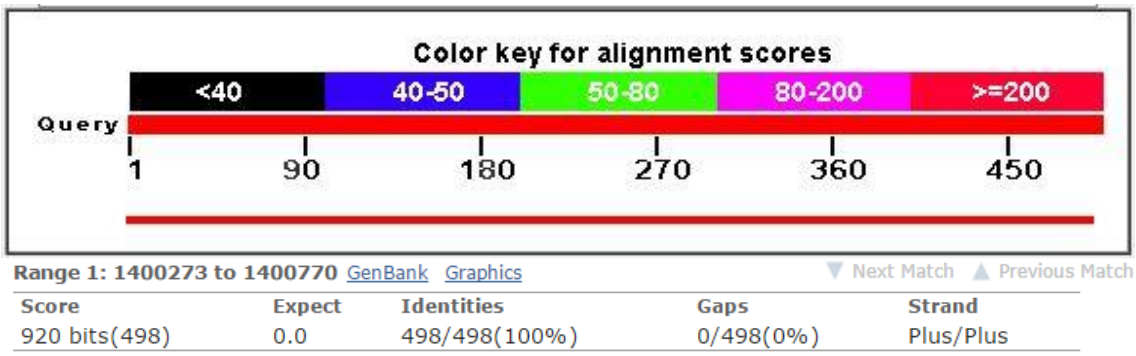


Figura 15. Análisis del resultado de secuenciación del plásmido pEXP::*fur*$^{2}_{1398\text{-}18}$ utilizando el programa BLAST de la base de datos NCBI.

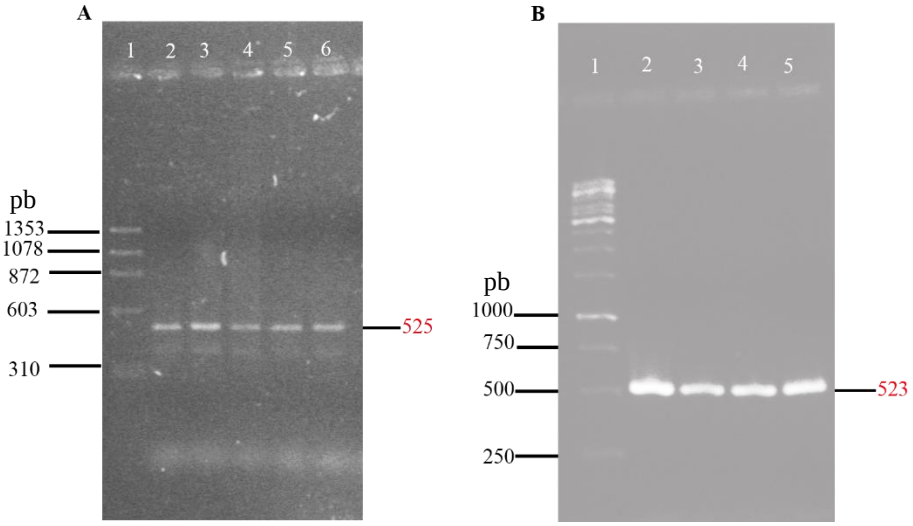


Fig.16. Análisis en gel de agarosa al 1.5 % de los PCR en colonia de las clonas candidatas obtenidas en *E.coli* BL21 pLys. **Panel A**. pEXP5-CT::*fur*$^{1}_{1398}$ carril 1: marcador φX174 *Hae* III fragmento; carril 2: PCR clonas (8, 10); carril 3: PCR clonas (15, 17); carril 4: PCR clonas (33, 36); carril 5: PCR clonas (40, 42); carril 6: PCR clonas (47, 49). **Panel B**. pEXP5-CT::*fur*$^{2}_{1398}$ carril 1: marcador φX174 *Hae* III fragmento; carril 2: PCR clonas (1, 2, 3 y 4); carril 3: PCR clonas (5, 6, 7 y 8); carril 4: PCR clonas (9, 10, 11 y 12); carril 5: PCR clonas (13, 14, 15 y 16).

8.5 Inducción de la proteína Fur_{1398}

La inducción de la proteína Fur_{1398} recombinante se realizó utilizando diferentes concentraciones de IPTG. Para la proteína Fur^{1}_{1398} (pEXP::fur^{1}_{1398}) se utilizaron concentraciones de IPTG de 0.05 mM hasta 1 mM y se indujeron por 4 horas Figura 17A. Mientras que para la proteína Fur^{2}_{1398} (pEXP::fur^{2}_{1398}) las concentraciones de IPTG fueron de 0.075 hasta 0.5mM y se tomó muestra a las 2 y 4 horas Figura 17B.

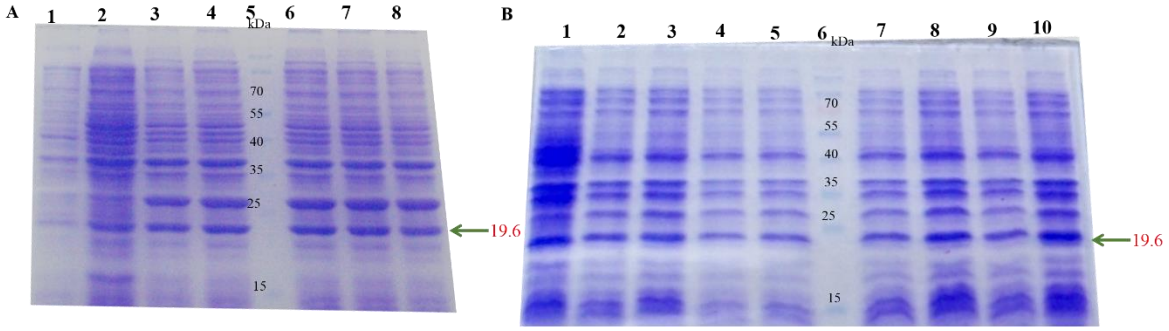


Figura 17. Análisis por PAGE-SDS 12% de la expresión de la proteína Fur con diferentes concentraciones de IPTG. **Panel A**. Fur^{1}_{1398} carril 1: 0 horas; carril 2: 4 horas sin IPTG; carril 3: 4 horas 0.05 mM IPTG; carril 4: 4 Horas 0.1 mM IPTG; carril 5: marcador para proteínas preteñido Fermentas; carril 6: 4 Horas 0.25 mM IPTG; carril 7: 4 Horas 0.5 mM IPTG; carril 8: 4 horas 1 mM IPTG. **Panel B**.$Fur^{2}_{1398.}$ carril 1: 4 horas sin IPTG; carril 2: 2 horas 0.075 mM IPTG; carril 3: 4 horas 0.075 mM IPTG; carril 4: 2 horas 0.1mM IPTG; carril 5: 4 horas 0.1 mM IPTG; carril 6: marcador para proteínas preteñido Fermentas; carril 7: 2 horas 0.25 mM IPTG; carril 8: 4 horas 0.25 mM IPTG; carril 9: 2 horas 0.5 mM IPTG; carril 10: 4 horas 0.5 mM IPTG.

El análisis por electroforesis en PAGE-SDS 12% permitió ver que la proteína Fur_{1398}^{1} se indujo en mayor cantidad a la concentración de 0.5 mM (ensayos realizados por triplicado), y para la proteína Fur_{1398}^{2} se utilizó la concentración de 0.075 y 0.1 mM estas concentraciones fueron utilizadas para realizar el ensayo de western blot. En las figuras 18 y 19 se puede observar el análisis por PAGE-SDS al 12%, la confirmación de la transferencia mediante la tinción de la membrana con rojo de Ponceau, y el western blot. En el análisis por western blot de la proteína Fur_{1398}^{1} Figura 18 se observan bandas inespecíficas de aproximadamente 15 y 35 kDa, bandas que no corresponden al peso de la

proteína Fur_{1398} que es de 19.6 kDa, 18.5 kDa correspondientes al peso de la proteína Fur_{1398} y 1.1 kDa correspondientes al peso de la etiqueta de histidinas. En el western blot de la proteína Fur_{1398}[2] Figura 19 no se logran ver bandas.

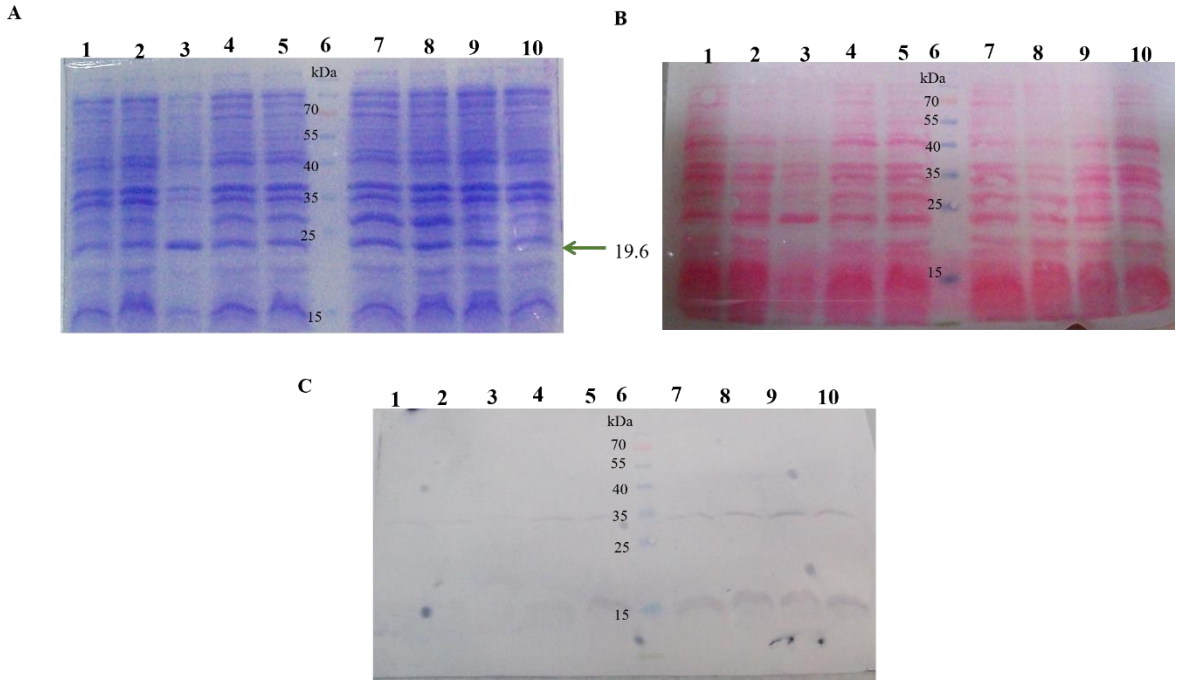


Fig. 18. Ensayo de inducción y western blot de la proteína recombinante Fur^1 (pEXP5-CT::*fur*$^1_{1398}$) en células BL21 pLys. **Panel A:** PAGE-SDS al 12% inducción con 0.5 mM de IPTG carril 1: 4 horas. BL21 pLys (vector vacío); carril 2: 4 horas sin IPTG Fur^1_{1398}; carril 3: BL21 pLys; carril 4: 3 horas BL21 pLys (vector vacío); carril 5: 4 horas BL21 pLys (vector vacío); carril 6: marcador de proteínas preteñidas Fermentas; carril 7: 4 horas Fur^1_{1398}; carril 8: 3 horas Fur^1_{1398}; carril 9: 2 horas Fur^1_{1398}; carril 10: 1 hora Fur^1_{1398}. **Panel B:** tinción de la membrana con rojo de Ponceau. **Panel C:** western blot de la proteína Fur recombinante utilizando anticuerpo monoclonal antihistidina.

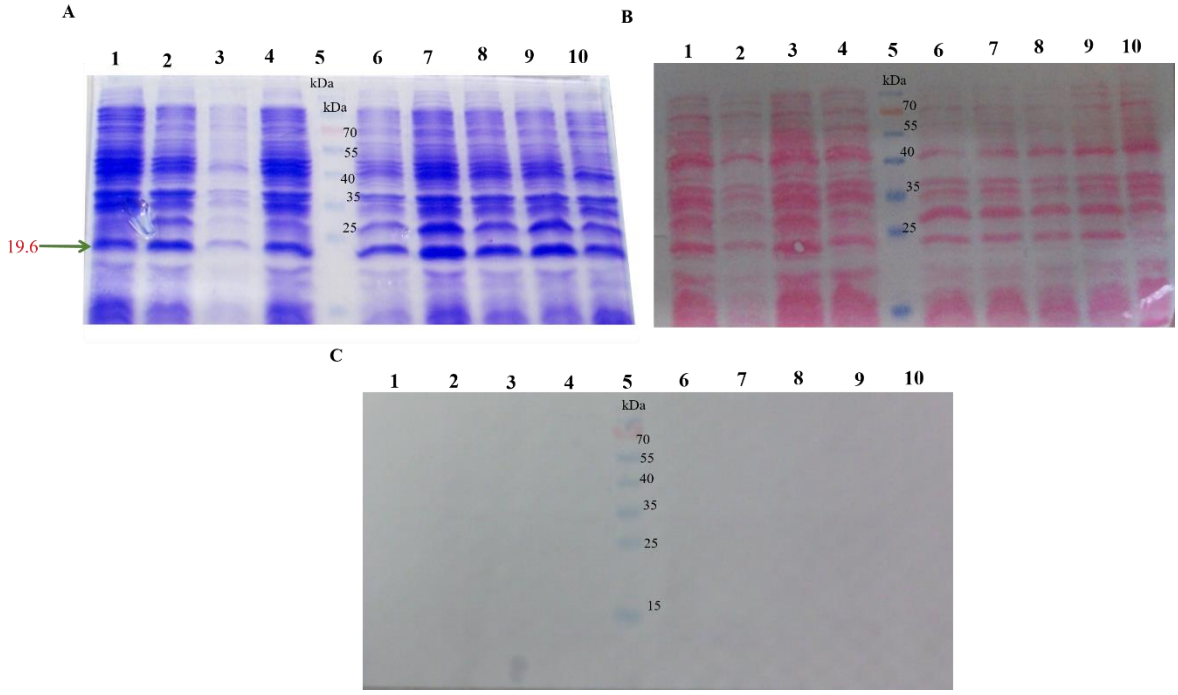


Figura 19. Inducción de la proteína recombinante y western blot de la proteína Fur^2_{1398} (pEXP5-CT::*fur*$^2_{1398}$) en células BL21 pLys. **Panel A** PAGE-SDS al 12% carril 1: 4 horas BL21 pLys; carril 2: 4 horas BL21 pLys (vector vacío); carril 3: Fur^2_{1398} tiempo 0; carril 4: 4 horas Fur^2_{1398} sin IPTG; carril 5: marcador de proteínas preteñidas Fermentas; carril 6: 2 horas 0.075 mM Fur^2_{1398}; carril 7: 4 horas 0.075 mM Fur^2_{1398}; carril 8: 2 horas 0.1 mM Fur^2_{1398}; carril 9-10: 4 horas 0.1 mM Fur^2_{1398}. **Panel B**: tinción de la membrana con rojo de Ponceau. **Panel C**: western blot de la proteína Fur recombinante utilizando anticuerpo monoclonal antihistidina.

Debido a que no se lograba la expresión de la proteína Fur_{1398} se modificaron las condiciones de inducción a 30°C, se agregó glucosa al medio, esto para favorecer la inducción de la proteína Fur_{1398}; obteniendo resultados negativos. (Datos no mostrados). Se decidió analizar *in silico* las construcciones pEXP5::*fur*$^1_{1398}$ y pEXP5::*fur*$^2_{1398}$. Éste análisis reveló que el marco de lectura estaba alterado razón por la cual no se podía observar la inducción de la proteína Fur_{1398} en el western blot.

Se mandó a sintetizar un iniciador delantero que iniciara desde el ATG del gen *fur*$_{1398}$ y se utilizó el iniciador FurR2, de esta manera el amplificado sólo abarcaría la región codificante del gen *fur*$_{1398}$.

8.6 Resultados utilizando los iniciadores FurF3-R2

8.6.1 Amplificación y clonación del gen *fur*$_{1398}$

El DNA genómico purificado, fue analizado por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 1% se muestra en la Figura 20A, así como el fragmento obtenido con los iniciadores *fur*F3 y *fur*R2 dando el tamaño esperado de 495 pb figura 20B, este fragmento fue clonado en el vector de expresión pEXP5-CT dando lugar al plásmido pEXP5-CT::*fur* de un tamaño aproximado de 3,180 pb como se observa en la Figura 20C.

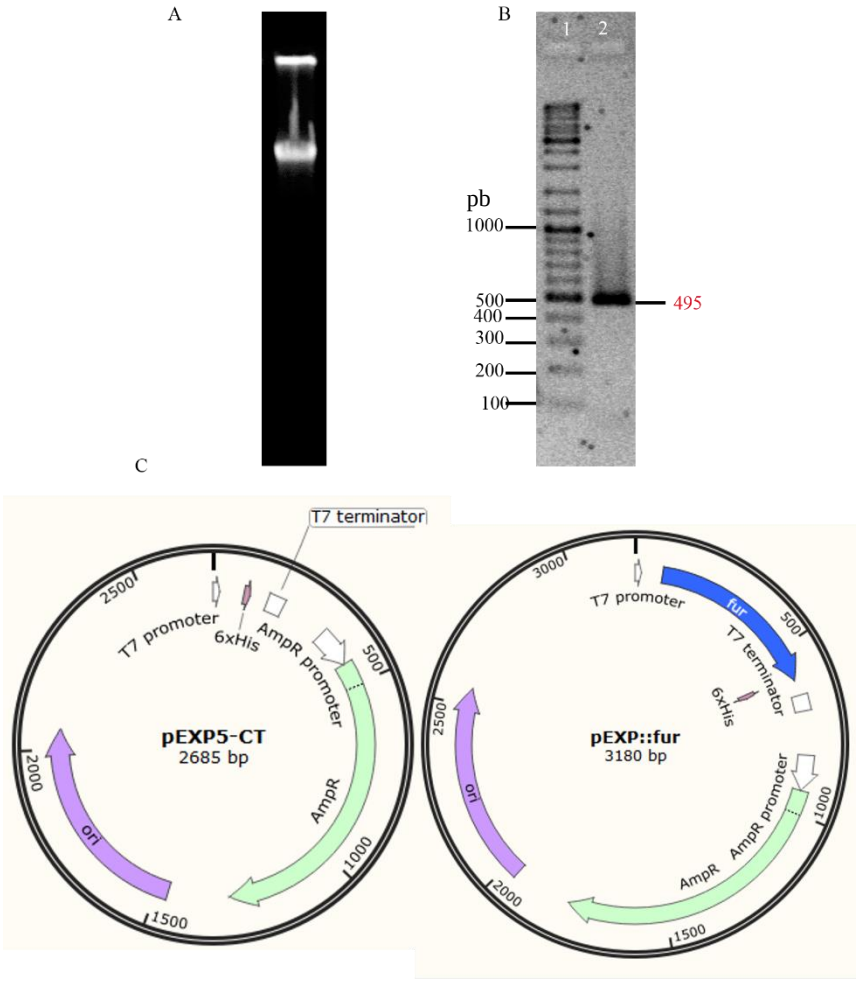


Figura 20. **Panel A**: análisis electroforético al 1% del DNA genómico de *G. diazotrophicus* Pal5. **Panel B**: PCR del gen *fur*$_{1398}$ con los iniciadores Fur-F3 y Fur-R2 , carril 1: marcador Fermentas DNA mix 1 Kb; carril 2: amplificado del gen *fur*$_{1398.}$ **Panel C**: mapa del vector solo y de la construcción pEXP5-CT::*fur*$_{1398}$.

El producto obtenido de la clonación fue transformado en células competentes *E. coli* One Shot Top 10. A las transformantes candidatas se les realizó PCR en colonia con los iniciadores del gen fur_{1398} FurF3y FurR2, para comprobar la presencia del gen fur_{1398} Figura21A. Una vez comprobada la presencia del gen fur_{1398} se extrajo plásmido de las clonas 16, 25, 26 y 28. Figura 21B

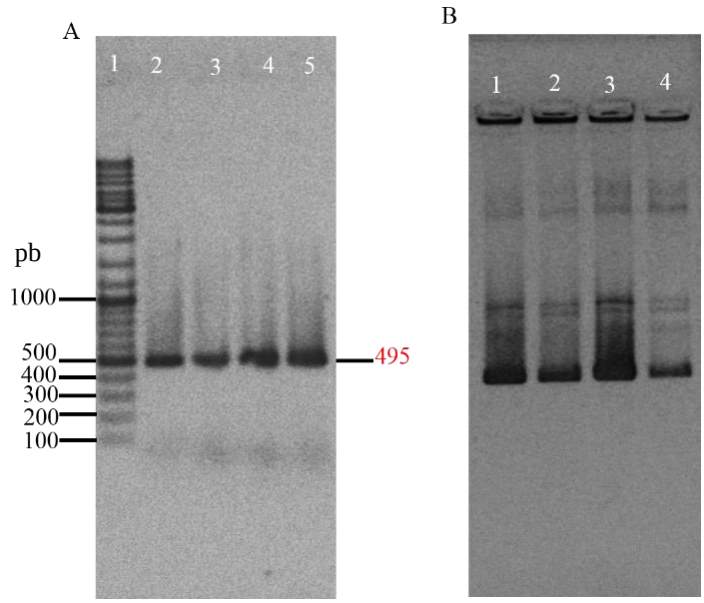


Figura 21. Análisis electroforético de los productos de PCR en colonia y perfil plasmídico en gel de agarosa al 1.5%. **Panel A**: transformantes obtenidas en *E.coli* One Shot Top 10, carril 1 marcador 1Kb Fermentas; carril 2: clonas 15, 16 y 17; carril 3: clonas 21, 22 y 23; carril 4: clonas 24, 25 y 26; carril 5: clonas 27, 28 y 29. **Panel B**: plásmido obtenido de las transformantes, carril 1: clona 16; carril 2: clona 25; carril 3: clona 26; carril 4: clona 28.

8.6.2 Análisis de la orientación del gen fur_{1398}

La construcción pEXP5-CT::fur_{1398} fue analizada mediante PCR y con las enzimas de restricción *Eco*RI y *Ava*I para comprobar la dirección 5'-3' del inserto como se muestra en la Figura 22. Se realizó una restricción con la enzima *Ava*I que tiene un sitio de corte en el vector y en el gen fur_{1398}, liberando dos fragmentos que dependiendo de su tamaño nos indican si el fragmento se encuentra en la dirección 5´-3´o en la dirección 3´-5´. Para la dirección 5´-3´del inserto los tamaños de las bandas son de 327 y 2,853 pb, y para la dirección 3´-5´del inserto son de 372 y 2,808 pb. En la figura 22A se observa que sólo en

las clonas pEXP5-CT::*fur*$_{1398\text{-}16}$ y pEXP5-CT::*fur*$_{1398\text{-}26}$ se encuentra el fragmento correspondiente a la dirección 5´-3´del inserto. La restricción con la enzima *Eco*RI muestra una banda de 3,810 pb correspondiente al plásmido linearizado de la clona pEXP5-CT::*fur*$_{1398\text{-}26}$ (Figura 22C).

El análisis mediante PCR con los iniciadores del vector pEXP5-CT y del inserto se realizó con la clona pEXP5-CT::*fur*$_{1398\text{-}26}$. Los tamaños esperados son: 642 pb al amplificar con delantero del inserto (FurF3) y reverso del vector (T7 reverso) (ver carril 3), 576 pb al amplificar con el delantero del vector (T7 delantero) y el reverso del inserto (FurR2) (ver carril 2), y al utilizar reverso del inserto (FurR2) y del vector (T7 reverso) no obtener amplificado carril 1 (Figura 22B).

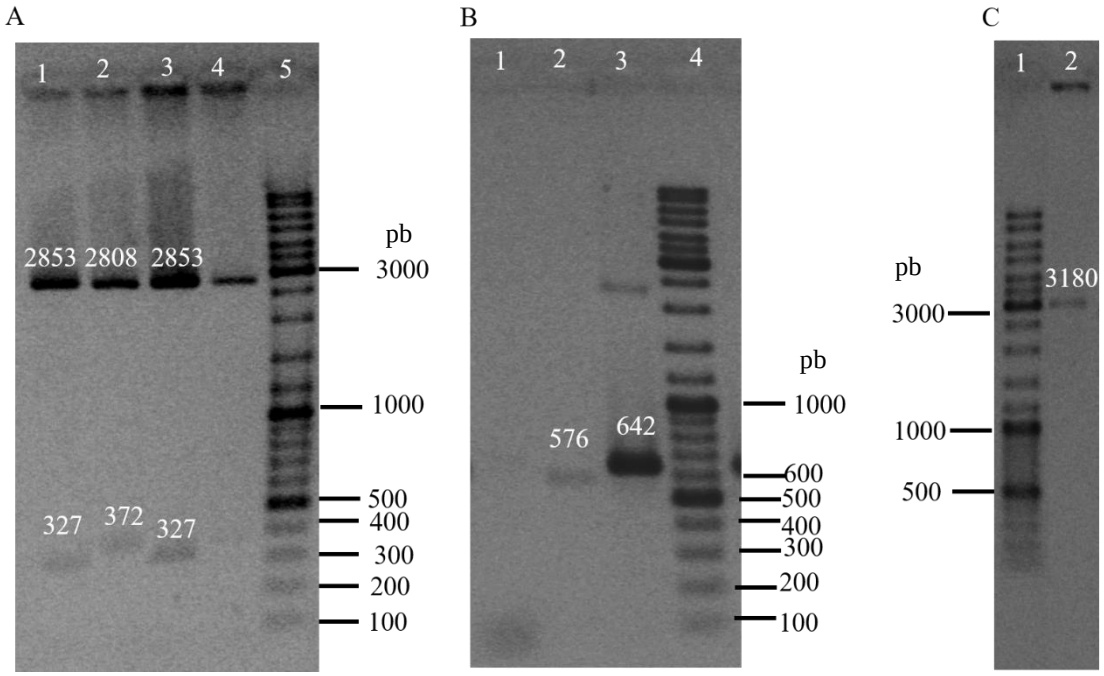


Figura 22. Análisis de la orientación 5'-3' del fragmento del gen *fur*$_{1398}$. **Panel A**: restricción con *Ava*I; carril 1: pEXP5-CT::*fur*$_{1398\text{-}16}$; carril 2 pEXP5-CT::*fur*$_{1398\text{-}25}$; carril 3: pEXP5-CT::*fur*$_{1398\text{-}26}$; carril 4 pEXP5-CT::*fur*$_{1398\text{-}28}$; carril 5 marcador Fermentas DNA mix**.** **Panel B**. PCR con los iniciadores del vector y del inserto de la construcción pEXP5-CT::*fur*$_{1398\text{-}26}$; carril 1: FurR2+T7 reverso; carril 2: T7 delantero+FurR2; carril 3: FurF3+T7 reverso; carril 4: Marcador Fermentas DNA mix. Panel **C**. Restricción con *EcoRI* carril 1 marcador Fermentas DNA mix 1Kb, carril2 pEXP5-CT::*fur*$_{1398\text{-}26}$

Una vez verificada la dirección del inserto se transformó en células químicamente competentes *E. coli* (BL21) pLys, y las colonias transformantes candidatas se analizaron

por PCR en colonia con los iniciadores del gen *fur*$_{1398}$ (FurF3-R2).

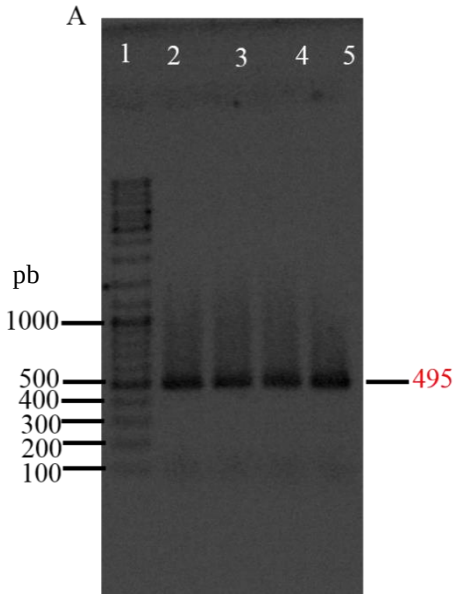


Figura 23. Análisis en gel de agarosa al 1.5% del PCR de las transformantes candidatas de *E.coli* BL21 pLys, carril 1: marcador Fermentas DNA mix 1 kb; carril 2: clona 20; carril 3: clona 26; carril 4: clona 30; carril 5: clona 40.

8.6.3 Inducción de la proteína Fur$_{1398}$

Los ensayos de inducción se realizaron utilizando las concentraciones de 0.1, 0.25, 0.5 y 1mM de IPTG, se tomaron muestras a diferentes tiempos de inducción (Figura 24A y B). En base al análisis de datos obtenidos en la Figura 24 se decidió utilizar la concentración de 0.1mM de IPTG para ensayos posteriores. Para determinar el tiempo óptimo de inducción se realizó el ensayo durante 6 horas y se tomó muestra cada hora, el análisis de la Figura 25A y B; nos sirvió para determinar que el tiempo para obtener una cantidad suficiente de proteína fue 3 horas. Finalmente se realizó la inducción a 30 y 37°C para determinar si la temperatura afectaba la expresión de la proteína, los datos mostrados en la Figura 25 C y D se observa que a 37°C hay una mayor cantidad de proteína, una vez estandarizadas las

condiciones de ensayo éstas se utilizaron en ensayos posteriores, las condiciones fueron a 37°C durante 3 horas con 0.1mM de IPTG.

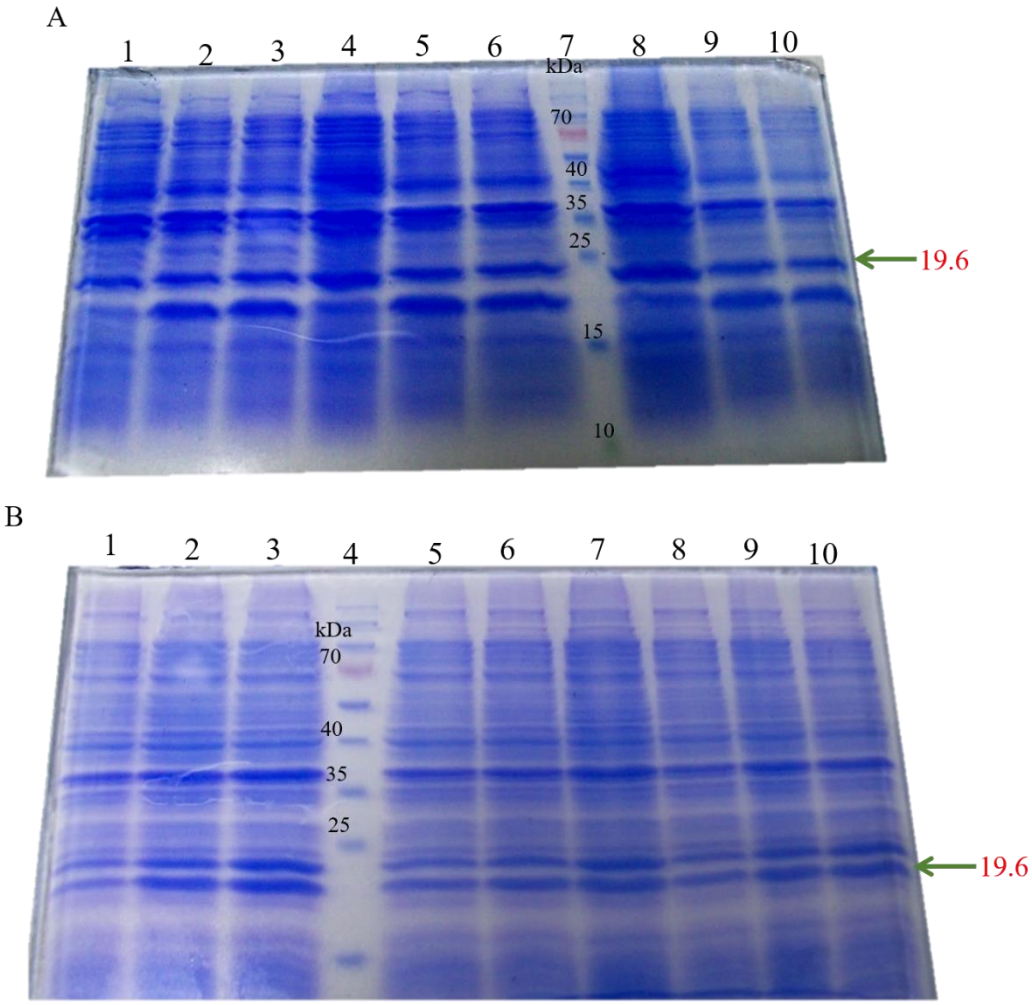


Figura 24. Análisis por PAGE-SDS al 12% de la proteína Fur_{1398} en diferentes tiempos de inducción con 0.1mM y 0.5 mM de IPTG **Panel A:** carriles 1-3:1 hora; carril 1: sin IPTG; carril 2: 0.5mM IPTG; carril 3: 1mM IPTG; carriles 4-6: 2 horas; carril 4: sin IPTG; carril 5: 0.5mM IPTG; carril 6 :1mM IPTG; carril 7: marcador de proteínas preteñido Fermentas, carriles 8-10: 3 horas; carril 8: sin IPTG; carril 9: 0.5mM IPTG; carril 10: 1mM IPTG. **Panel B:** carriles 1-3: 0.1mM. carril 1: 30 minutos; carril 2: 1 hora; carril 3: 2 horas; carril 4: marcador de proteínas preteñido Fermentas; carril 5-7: 0.25mM; carril 5: 30 minutos; carril 6: 1 hora; carril 7: 2 horas; carril 8-10: 0.5mM; carril 8: 30 minutos; carril 9: 1 hora; carril 10: 2 horas.

Los datos observados en de la Figura 24 permitieron elegir la concentración de 0.1mM, para la inducción de la proteína y posteriormente se visualizó por western blot. Figura 25 A y B.

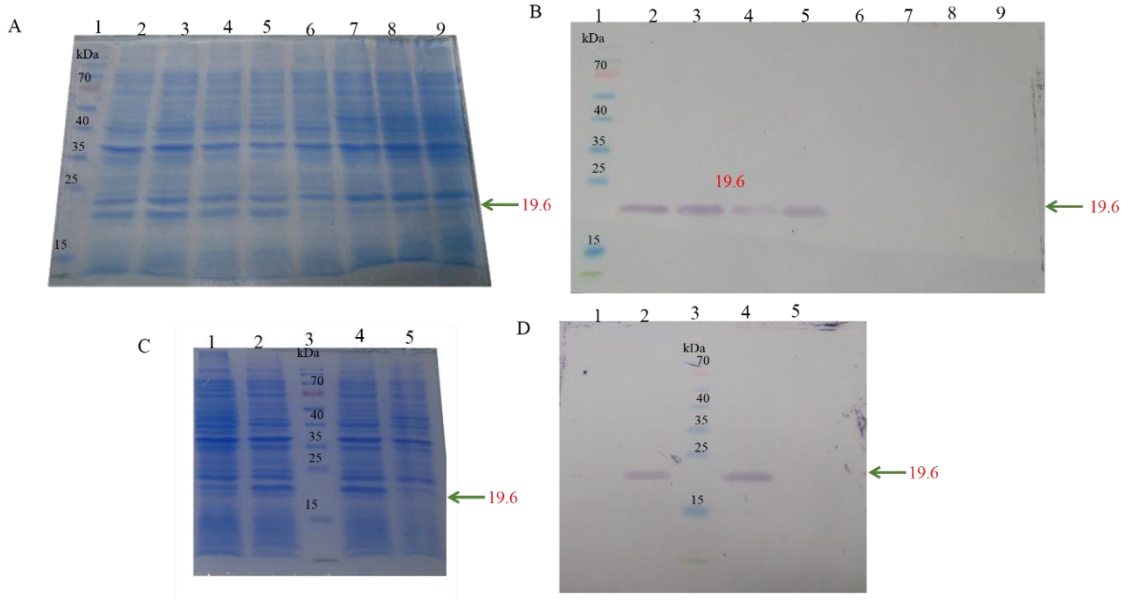


Figura 25. Análisis por PAGE-SDS al 12% de la inducción con 0.1 mM de IPTG a diferentes tiempos y temperaturas. **Panel A y C** y **panel B y D** Western blot. **A** y **B**: carril 1: marcador de proteínas preteñidas Fermentas; carril 2-5: 0.1 mM IPTG; carril 2: 1 hora; carril 3: 2 horas; carril 4: 4 horas; carril 5: 6 horas; carriles 6-9: sin IPTG; carril 6: 1 hora; carril 7: 2 horas; carril 8: 4 horas; carril 9: 6 horas. **Panel C** y **D**: carriles 1, 2: 30°C; carril 1: sin IPTG; carril 2: 0.1 mM IPTG; carril 3: marcador de proteínas preteñidas Fermentas; carril 4,5: 37°C; carril 4: 0.1 mM IPTG; carril 5: sin IPTG.

8.6.3.4 Purificación de la proteína Fur_{1398}

La proteína Fur_{1398} de *G. diazotrophicus* en *E.coli* se purificó en condiciones nativas utilizando diferentes concentraciones de imidazol. Figura 26A.

Para comprobar la purificación en condiciones nativas, se realizó un PAGE-SDS y se utilizó la tinción con plata Figura 26B.

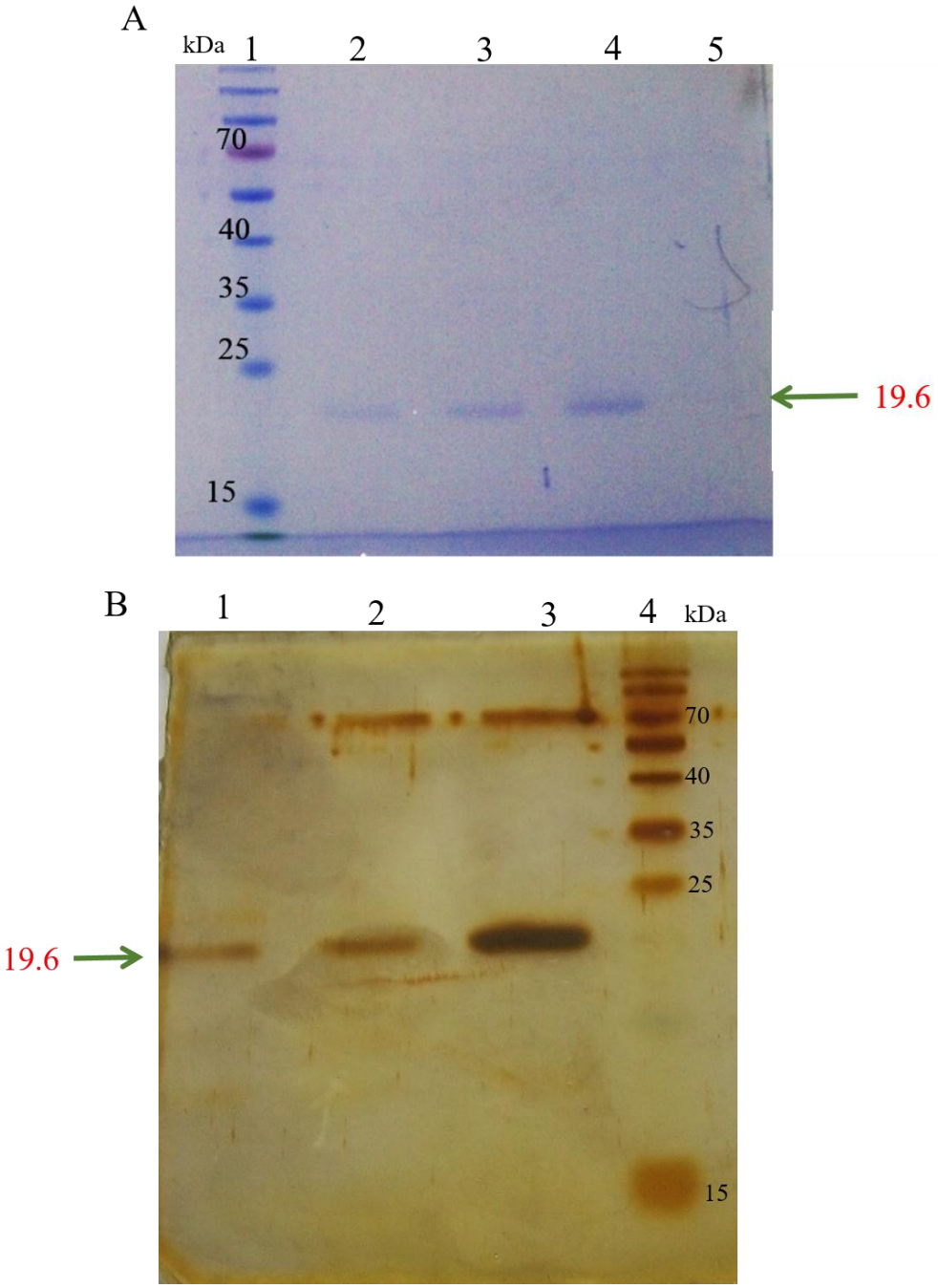


Figura 26: PAGE-SDS 12%. **Panel A**: purificación de la proteína Fur_{1398} en condiciones nativas en columna de afinidad Ni-NTA, carril 1: marcador de proteínas preteñidas Fermentas; carril 2: elución con 75 mM imidazol; carril 3: 100 mM imidazol; carril 4: 250 mM imidazol; carril 5: 300 mM imidazol. **Panel B**: tinción plata, carril 1: elución con 75 mM imidazol; carril 2: 100 mM imidazol; carril 3: elución 250 mM imidazol; carril 4: marcador de proteínas preteñidas Fermentas.

Debido a que la cantidad que se obtuvo de proteína (0.5 mg/ml) no era suficiente para realizar los ensayos de oligomerización, se decidió purificar mediante condiciones híbridas. En la Figura 27 se muestran las eluciones con diferentes concentraciones de imidazol obtenidas en la purificación en condiciones híbridas.

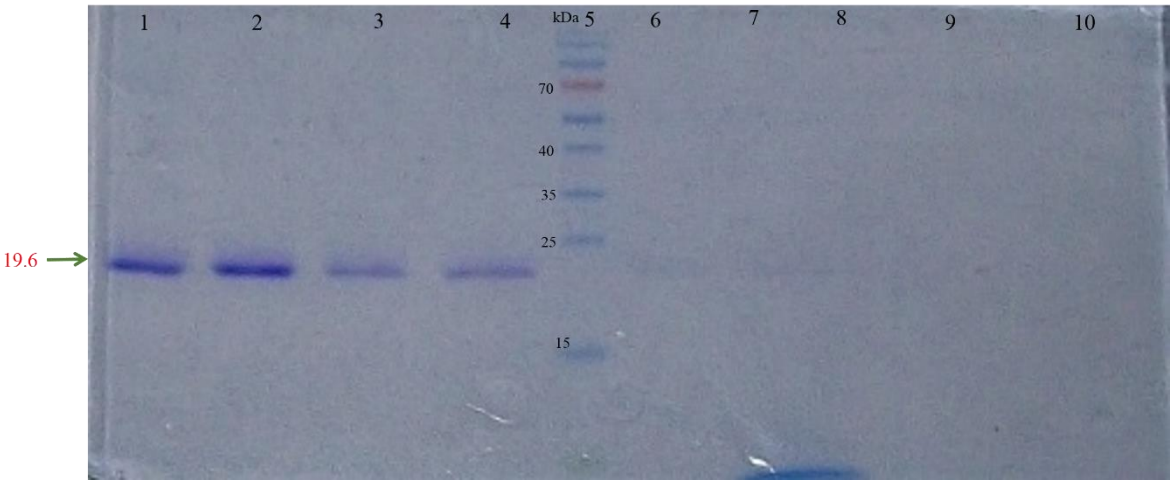


Figura 27: Corrimiento en PAGE-SDS al 12% de la purificación en condiciones híbridas de la proteína Fur_{1398} con 250 y 300 mM de imidazol. Carriles 1-4 eluciones 250 mM carril 5: marcador de proteínas preteñidas Fermentas; carriles 6-10: eluciones 300 mM.

Se utilizó la proteína obtenida de la elución de 250 mM de imidazol para realizar los ensayos de oligomerización, sin embargo no se logró observar la formación de dímeros (datos no mostrados), ya que la cantidad de proteínas seguía siendo insuficiente (2mg/ml). El protocolo de purificación en condiciones híbridas se modificó, se cambió el buffer de lisis y se utilizó un gradiente de eluciones empezando desde 5 mM hasta 300 mM de imidazol (Ver anexo). De esta manera se logró obtener una cantidad suficiente de proteína (40mg/ml) para realizar los ensayos de oligomerización Figura 28.

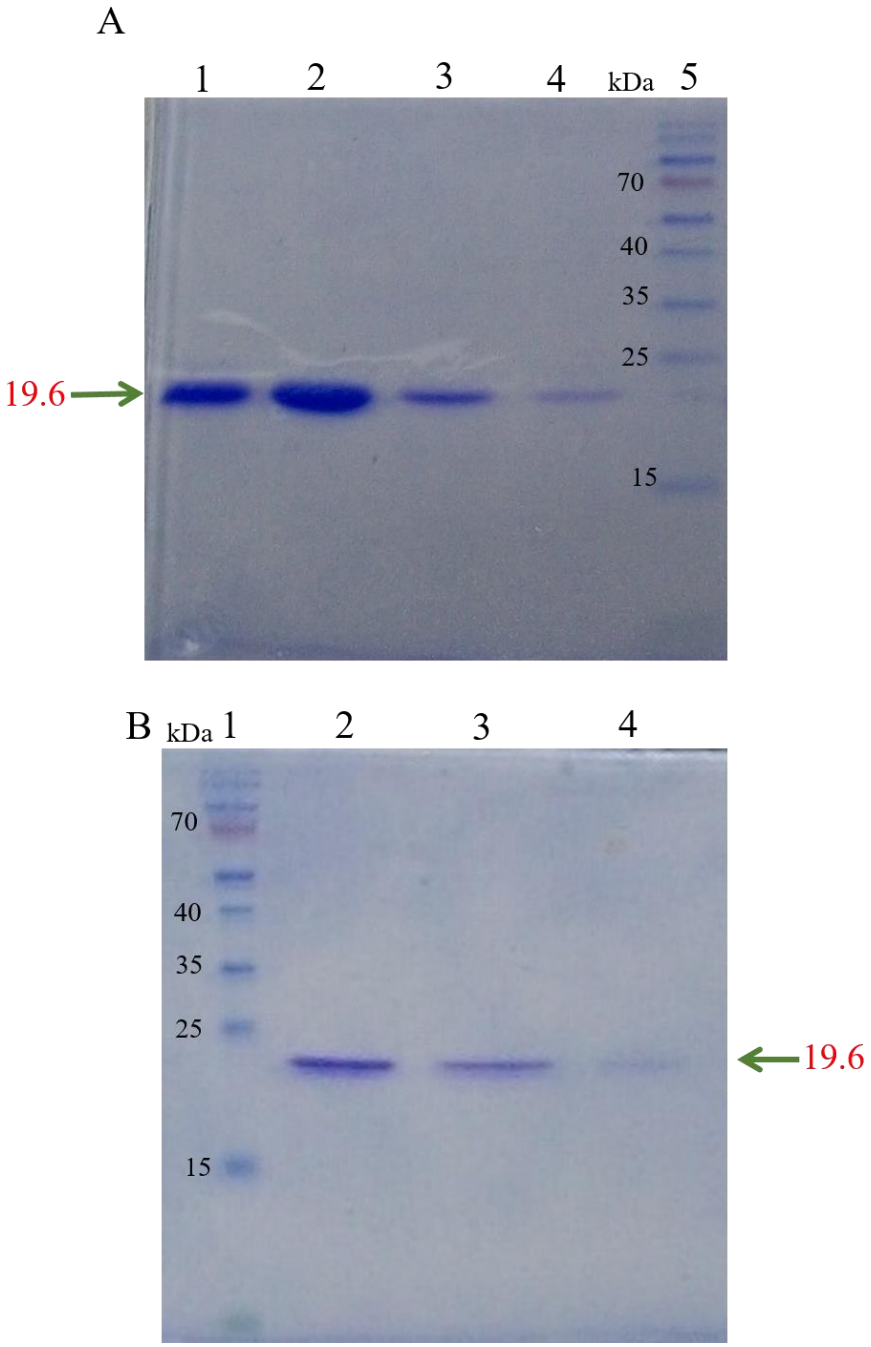


Figura 28: Purificación por columna de afinidad Ni-NTA de la proteína Fur_{1398} en condiciones híbridas modificadas con 250 y 300 mM de Imidazol y análizadas por PAGE-SDS al 15%. **Panel A**: carriles 1-4: eluciones de 250 mM; carril 5: marcador de proteínas preteñidas Fermentas. **Panel B**: carril 1: marcador de proteínas preteñidas Fermentas; carriles 2-4: eluciones de 300 mM.

8.6.3.5 Ensayos de oligomerización

La proteína Fur_{1398} se dializó contra un buffer acético acetato pH4.0 durante toda la noche, y la proteína dializada fue utilizada para todos los ensayos de oligomerización. Primero se realizó el ensayo de oligomerización a diferentes tiempos de incubación y con diferentes concentraciones de glutaraldehído. La proteína Fur_{1398} purificada se puso a interactuar con glutaraldehído y se incubó durante 10, 20 y 30 minutos, las muestras se analizaron en PAGE-SDS 12% Figura 29A. En la Figura 29B, se observa el ensayo de oligomerización con diferentes concentraciones de glutaraldehído (0.5-2.5%). Estos ensayos nos permitieron observar que la proteína Fur_{1398} forma oligómeros dentro de los que se encuentran dímeros, trímeros y tetrámeros.

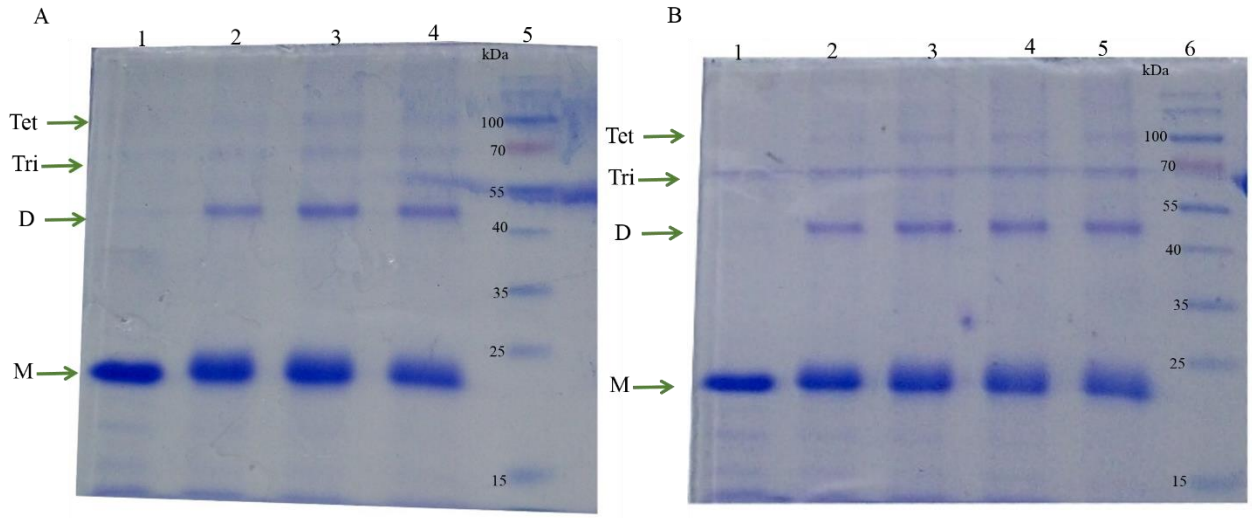


Figura 29: Ensayo de entrecruzamiento de la proteína Fur_{1398} purificada con glutaraldehido y analizado en PAGE-SDS 12%. **Panel A**: ensayos de oligomerización de la proteína Fur_{1398} con 2.5% de glutaraldehido a diferentes tiempos de incubación, carril 1: proteína Fur_{1398} sin tratamiento; carril 2: 10 minutos; carril 3: 20 minutos; carril 4: 30 minutos; carril 5: marcador de proteínas preteñidas Fermentas. **Panel B**: ensayos de oligomerización de la proteína Fur_{1398} durante con diferentes concentraciones de glutaraldehído y tiempo de incubación de 20 minutos; carril 1: Fur_{1398} sin tratamiento; carril 2: 0.5%; carril 3: 1.5%; carril 4: 2.0%; carril 5: 2.5%; carril 6: Marcador de proteínas preteñidas Fermentas. M: monómero, D: dímero, T: trímero, Tet: tetrámero.

Para conocer si estos patrones de oligomerización se veían afectados, se realizaron ensayos de oligomerización utilizando agentes reductores (DTT y β mercaptoetanol), oxidantes (H_2O_2) y fuerza iónica (NaCl). A la proteína Fur_{1398} se le agregó glutaraldehido 2.5% a ésta reacción se le agregaron los agentes reductores y oxidantes. En el análisis de la Figura 30 se observan los diferentes patrones de oligomerización al interactuar la proteína Fur_{1398} con β.mercapto-etanol, DTT y H_2O_2.

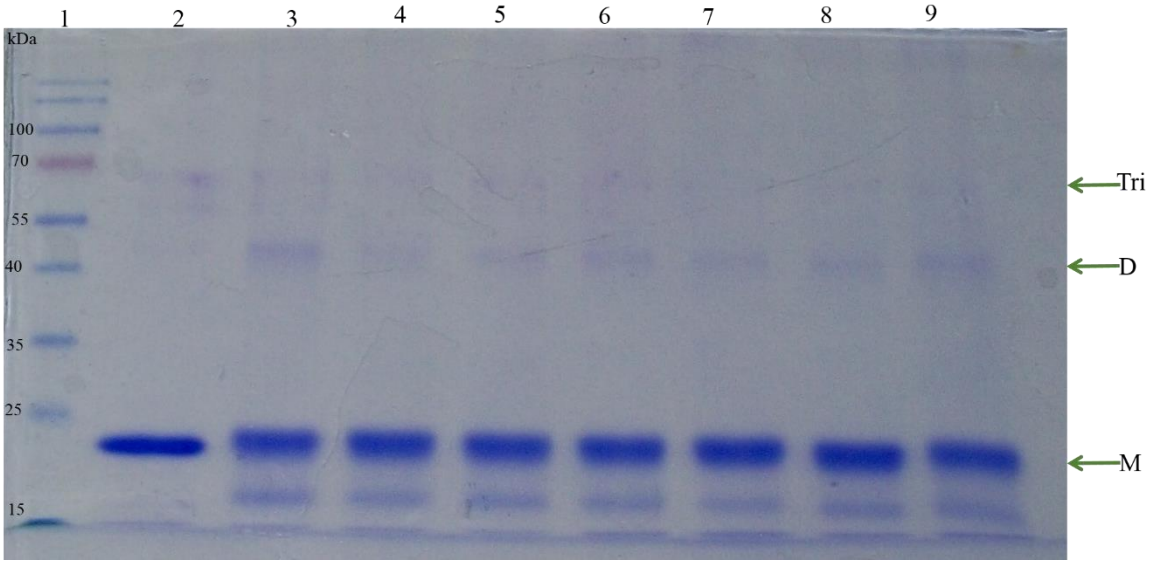


Figura 30. Ensayo de oligomerización con agentes reductores y oxidantes en presencia de glutaraldehido al 2.5% en PAGE-SDS, carril 1: marcador de proteínas preteñidas Fermentas; carril 2: Fur_{1398}; carril 3: Fur_{1398} + glutaraldehído; carril 4: 5mM DTT+ 15 mM $MnCl_2$; carril 5: 15 mM $MnCl_2$; carril 6: 5 mM DTT; carril 7: 50 mM DTT; carril 8: 10 mM β-mercapto etanol; carril 9: 15 mM H_2O_2. M: monómero, D: dímero, T: trímero, Tet: tetrámero.

Otro factor que afecta la oligomerización de la proteína Fur_{1398} es el estrés salino, para éste ensayo interactúo la proteína con diferentes concentraciones de NaCl, y los resultados se muestran en la Figura 31. En esta figura se puede observar que a medida que la concentración de NaCl aumenta el dímero disminuye, y el trímero se observa muy disminuido en la concentración más alta de NaCl en experimentos realizados en *Anabaena* el comportamiento es diferente ya que a medida que aumenta la concentración de NaCl hay mayor formación de dímeros (Hernández y cols, 2002).

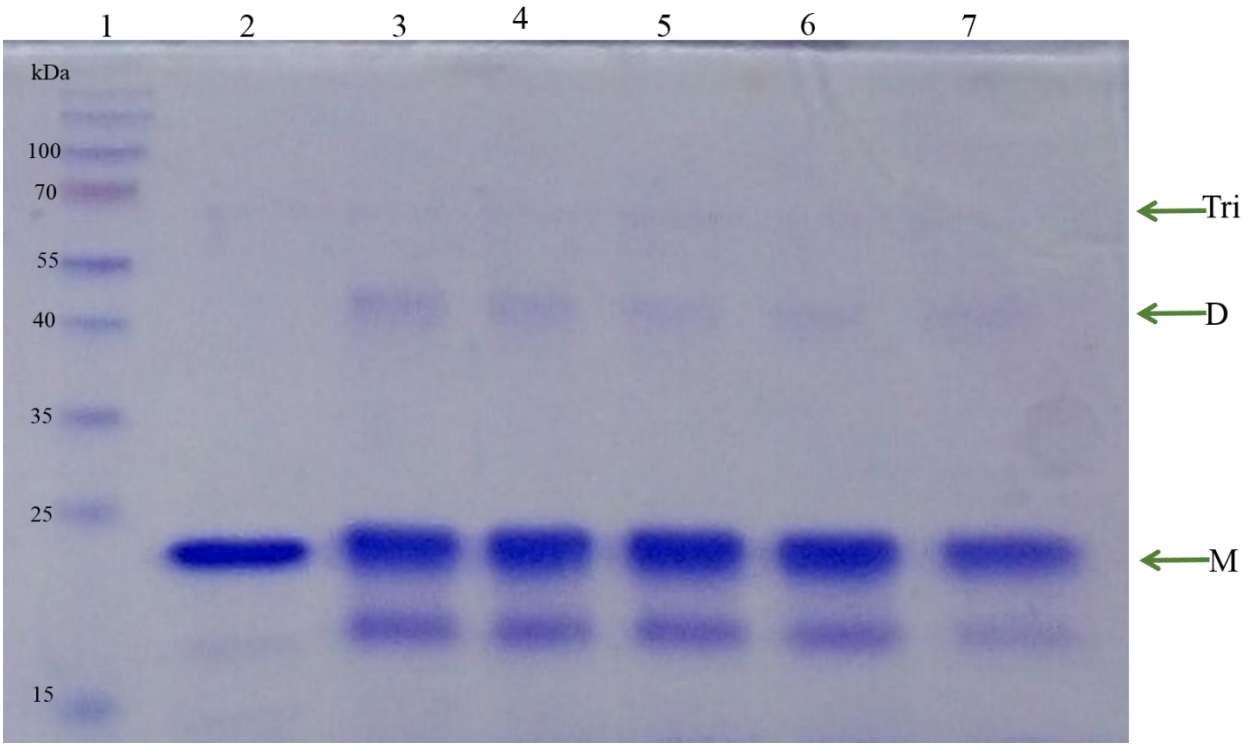


Figura 31. Efecto de la concentración de NaCl en la oligomerización de la proteína Fur_{1398}, carril 1: marcador de proteínas preteñidas Fermentas; carril 2: Fur_{1398} sin tratar ; carril: 3: Fur+ glutaraldehído 2.5%; carril 4: 20 mM NaCl; carril 5: 100 mM NaCl; carril 6: 250 mM NaCl; carril 7:500 mM NaCl. M: monómero, D: dímero, T: trímero, Tet: tetrámero.

Debido a que la proteína Fur tiene sitios de unión a metal y un sitio estructural de Zn^{2+}se realizó un ensayo incubando la proteína Fur_{1398} con glutaraldehído 2.5% y a esta mezcla se le adicionó diferentes tipos de metales, en la Figura 32 se muestran los resultados obtenidos en este ensayo. El PAGE-SDS muestra la presencia del dímero en todos los pozos, y el trímero sólo se observó en el pozo que contenía la reacción de la proteína Fur_{1398} + $FeCl_3$ y en menor proporción en el pozo de la reacción Fur_{1398} + $ZnCl_2$.

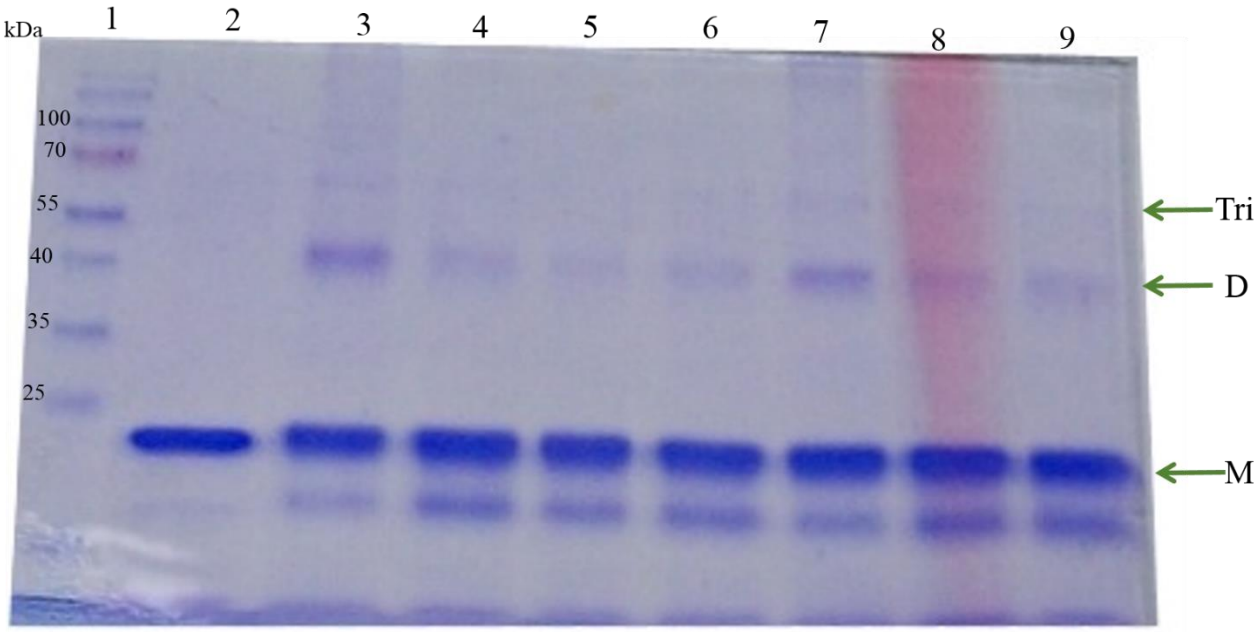


Figura 32. Corrimiento del ensayo de oligomerización de la proteína Fur_{1398} con diferentes metales divalentes en PAGE-SDS al 12%, carril 1: marcador de proteínas preteñidas Fermentas; carril 2: $Fur_{1398;}$ carril 3: Fur+glutaraldehído 2.5%; carril 4: Fur+ glutaraldehído 2.5%+1 mM Zn^{2+}; carril 5: Fur+glutaraldehído 2.5%+1 mM Zn^{2+}+1 mM DTT; carril 6: Fur+glutaraldehído 2.5%+1 mM Ca^{2+}; carril 7: Fur+ glutaraldehído 2.5%+1 mM Fe^{2+}.; carril 8: Fur+glutaraldehído 2.5%+1 mM Co^{2+}; carril 9: Fur+glutaraldehído 2.5%+1 mM Mn^{2+}. M: monómero, D: dímero, T: trímero, Tet: tetrámero.

8.6.3.6 Ensayos de estrés oxidativo en *E. coli* BL21(pLys)$_{fur1398}$

El análisis de estrés oxidativo *in vivo* se realizó en *E. coli* fur_{1398} que sobreexpresa la proteína Fur_{1398} de *G. diazotrophicus* Pal5. Como controles negativos se utilizaron: *E. coli* BL21, y *E. coli* BL21 con el vector vacío, las condiciones de ensayo se muestran en la metodología anteriormente descrita. Los resultados de viabilidad mostrados en las Figuras 33 y 34 muestran que la sobreexpresión de la proteína Fur_{1398} en células *E. coli* BL21(pLys) inducidas, aumenta la sobrevivencia de éstas cuando se encuentran en condiciones de deficiencia de hierro (medio adicionado con DPD). Sin embargo cuando las células fueron expuestas a condiciones de abundancia de hierro (medio adicionado con $FeCl_3$) o bien no se agregan quelantes de hierro la proteína Fur_{1398} parece no proteger a las células del estrés oxidativo causado por la presencia de H_2O_2.

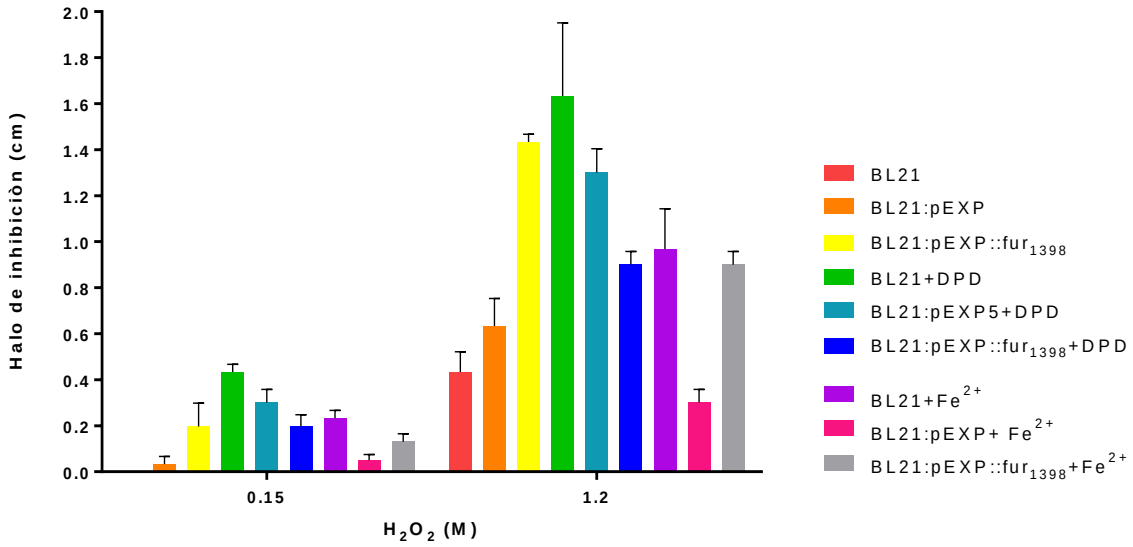


Figura 33. Análisis de estrés oxidativo en *E. coli* BL21(pLys), pEXP5CT y pEXP5CTfur_{1398} en placas de medio LB sin hierro e IPTG. Se muestra el halo de inhibición en cm de cada tratamiento a 0.15 y 1.2 M de H_2O_2. SEM. ρ=0.005, este fue realizado en tres ensayos independientes.

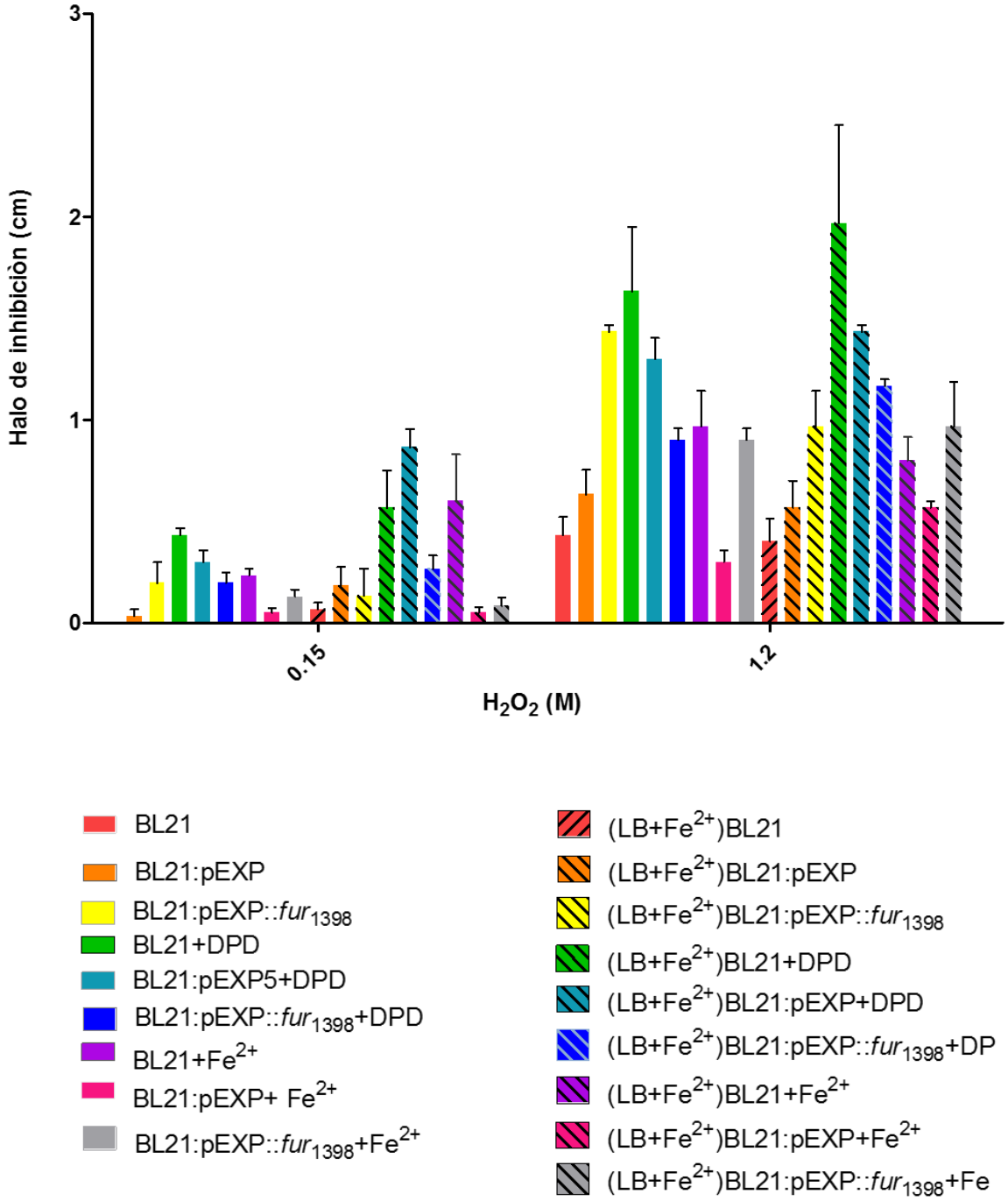


Figura 34. Análisis de estrés oxidativo en *E. coli* BL21(pLys), pEXP5CT y pEXP5CT*fur*$_{1398}$ en placas de medio LB con y sin hierro e IPTG. Se muestra el halo de inhibición en cm de cada tratamiento a 0.15 y 1.2 M de H_2O_2. SEM. ρ=0.005, este fue realizado en tres ensayos independientes.

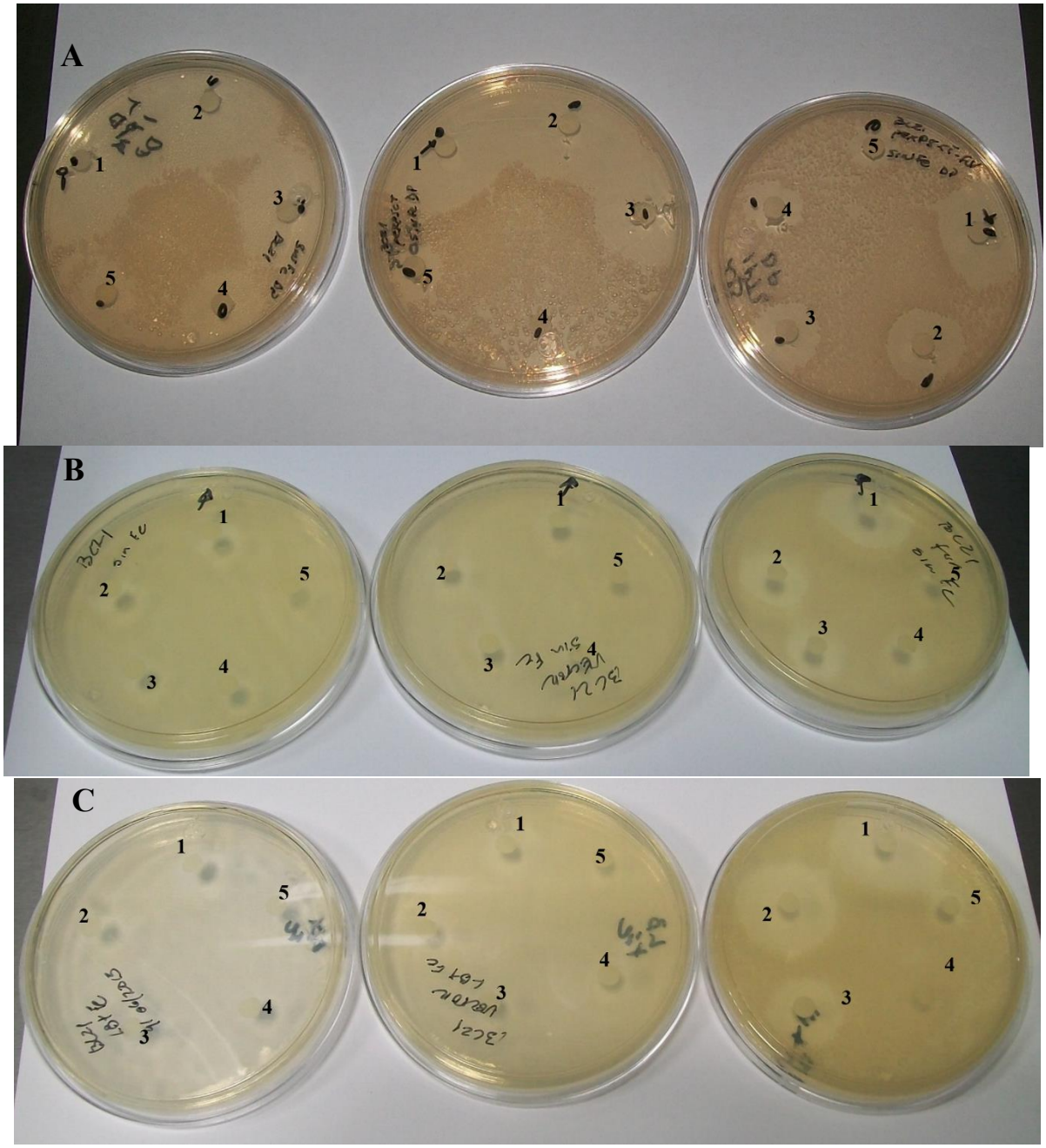


Figura 35. Ensayos de estrés oxidativo en placa, efecto del H_2O_2 en el sobrevimiento de las células. De izquierda a derecha *E. coli* BL21 pLys, *E. coli* BL21 pLys (vector vacío), *E. coli* BL21 pLys pEXP::fur_{1398} . Concentraciones de H_2O_2: 1(2.4 M), 2(1.2 M), 3(0.6 M), 4(0.3 M), 5 (0.15 M). **A**. Células tratadas con DPD. **B**. Células tratadas con $FeCl_3$. **C**. Células sin $FeCl_3$ y sin DPD.

9. Discusión.

El hierro es un nutriente esencial para la mayoría de las bacterias debido a que es cofactor de diversas enzimas y también es componente de proteínas transportadoras de electrones. Además de su importancia metabólica, las bacterias patógenas utilizan la disponibilidad del hierro como señal para la regulación de genes de virulencia. A pesar de la dependencia metabólica del hierro, las concentraciones celulares deben estar intrincadamente reguladas en ambientes aeróbicos para prevenir la formación de especies reactivas de oxigeno mediadas por Fe^{2+}. En la mayoría de las bacterias, esta compleja regulación es llevada a cabo por la proteína reguladora de la captación de hierro conocida como Fur (Bender y cols., 2007).

Los avances recientes en genómica, proteómica y bioinformática han facilitado el uso de la tecnología del DNA recombinante con el fin de evaluar cualquier proteína de interés. En este trabajo se utilizó el vector de expresión pEXP5-CT el cual cuenta con el origen de replicación pUC que permite un alto número de copias. Además cuenta con el promotor T7, el cual es muy utilizado para la expresión de proteínas. La cepa que se escogió para realizar la expresión de la proteína Fur_{1398} fue *E. coli* BL21(DE3)pLysS porque que contiene el lisógeno λDE3 y el plásmido pLysS (Invitrogen).

Los resultados obtenidos de la secuenciación en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología, UNAM de las construcciones pEXP::fur_{1398}^{1}, y pEXP::fur_{1398}^{2} resaltaron la importancia del mantenimiento del marco de lectura correcto en el vector de expresión al momento de realizar la clonación, ya que como se pudo observar a pesar de que la orientación 5´-3´ fue correcta, no hubo expresión de la proteína Fur_{1398} Figuras 18 y 19. El diseño de un nuevo iniciador *fur*F3 a partir del sitio de inicio del gen fur_{1398} y utilizando el iniciador reverso *fur*R2, obtuvimos por PCR un fragmento de aproximadamente 495 pb, este fragmento se clonó en el vector pEXP5-CT, dando como resultado la construcción pEXP::fur_{1398}, la cual fue verificada por análisis de restricción. Los ensayos de inducción con IPTG a diferentes concentraciones, nos permitieron conocer la concentración óptima para llevar a cabo la expresión de la proteína Fur_{1398}. La purificación se realizó por cromatografía de afinidad a Níquel. Este sistema está diseñado

para la purificación de proteínas con etiquetas de histidina (6xHis), en condiciones nativas o desnaturalizantes, la elección del método de purificación depende de la solubilidad de la proteína y la necesidad de mantener la actividad biológica de esta para estudios posteriores. Sin embargo, si la proteína es insoluble pero se quiere preservar la actividad se utiliza la purificación en condiciones híbridas en la cual, la lisis y la unión a la resina se realiza en condiciones desnaturalizantes y las eluciones se realizan bajo condiciones nativas (Invitrogen). Debido a que la proteína Fur_{1398} se encontraba en el sobrenadante después de la lisis se decidió utilizar la purificación en condiciones nativas, en esta condición se obtuvo la proteína Fur_{1398} libre de proteínas contaminantes como se observa en la Figura 26, sin embargo el problema que presentó esta purificación fue que la proteína se purificó en muy baja concentración. Puede suponerse que esta baja concentración de proteína se debió a que la mayor parte de la proteína se encontraba en cuerpos de inclusión, por lo que se utilizó la purificación en condiciones híbridas, con esta purificación se logró obtener un poco más de proteína sin embargo seguía siendo insuficiente (2mg/ml) para realizar los ensayos de oligomerización que requieren de aproximadamente 50mg/ml. Se analizaron las posibles causas de la obtención de una baja concentración de proteína Fur_{1398} purificada, una causa puede ser, que la proteína podría estarse degradando durante el proceso de purificación, ya que el buffer de lisis utilizado en la purificación en condiciones hibridas no contenía ningún agente estabilizador. Se ha reportado que el glicerol mejora la estabilidad estructural de las proteínas a través de una alteración en el equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) (Pagliaro y cols., 2008) por lo que se agregó al buffer de lisis glicerol a una concentración de 0.5%, también se agregó el detergente NP-40 0.1%, éste es utilizado en los buffers de lisis para extraer y solubilizar proteínas y además se conoce que su presencia aumenta la actividad de las proteínas en comparación con las no tratadas (Weitz y cols., 1986). Al utilizar este protocolo en condiciones hibridas modificado, se logró obtener 40 mg/ml de la proteína Fur_{1398}, con los datos obtenidos anteriormente podemos sugerir que la proteína Fur_{1398} es inestable bajo las condiciones de purificación antes utilizadas.

Los genes bacterianos están organizados en operones o “clusters” de genes corregulados, este tipo de estructuración permite que todos los genes de un operón se activen o desactiven al mismo tiempo, además permite la expresión simultánea de todos los genes que se encuentran en *cis* en el operón. La agrupación de genes relacionados bajo un mecanismo de

control común permite que las bacterias se adapten rápidamente a los cambios en el medio ambiente. (Ralston A., 2008). El gen *fur*$_{1398}$ de *G. diazotrophicus* se encuentra formando parte de un operón constituido por: 1) El regulador transcripcional Ros/MucR que es uno de los genes conservados en las α proteobacterias y que además es importante en interacciones bacteria-hospedero. Estudios recientes vinculan genéticamente las mutaciones de *ros* y *muc*R con defectos en el crecimiento y diferencias en la mucosidad de la colonia, también ha sido determinado que las proteínas transcripcionales Ros/MucR regulan diversos genes, incluidos aquellos involucrados en la síntesis de polisacárido, movilidad y quorum sensing (Caswell y cols., 2013). 2). Un gen que codifica para la lisofosfolípido aciltransferasa (LPLAT) que contribuye a la asimetría y diversidad de la membrana (Shindou., 2009). 3) un gen que codifica para una apolipoproteína N-acetil transferasa. En estudios *in vitro* el último paso en la maduración de lipoproteínas es la N-acetilación de las apolipoproteínas por la apolipoproteína de membrana plásmática la N-acetil transferasa (Lnt), que es necesaria para el reconocimiento de las lipoproteínas de la membrana externa por el sistema Lol, que las transporta desde el plasma a la membrana externa. En mutantes del gen *lnt* obtenidas en *Salmonella entérica* se muestra la actividad de Lnt termosensible (Robichon y cols., 2005). Las funciones de los genes que están en este operón se relacionan con funciones relacionadas a la morfología de la colonia, secreción de exopolisacáridos y viabilidad celular. Debido a la importancia de regular la cantidad de ROS que se generan en la célula; *G.diazotrophicus* tiene la habilidad de proteger su nitrogenasa contra la inhibición producida por el oxígeno. Estudios previos han sugerido que la actividad de la nitrogenasa está controlada por un mecanismo de "switch" encendido/apagado para el O_2 o bien que sintetiza levanas que forman un mucílago que la protege para lograr un flujo óptimo de O_2 que permita la respiración aeróbica sin inhibir su actividad (Eskin y cols., 2014). En base a lo anterior podría asumirse que el operón del que forma parte *fur*$_{1398}$ regula los genes encargados de la producción de mucílago que evita que concentraciones altas de O_2 ingresen a la célula, inhibiendo así la formación de ROS que además de causar daño celular, inhiben la actividad de la nitrogenasa, que a su vez disminuye la cantidad de nitrógeno fijado por la bacteria. Sin embargo, estas no son las únicas funciones en las que este operón podría estar involucrado, debido a que dentro de éste hay dos reguladores transcripcionales (ROS/MUCR y Fur) los genes blanco que se

estén regulando positiva o negativamente pueden incluir funciones relacionadas con síntesis de polisacárido, genes relacionados con la producción de sideróforos, mantenimiento de la integridad celular, entre otros (Caswell y cols., 2013).

La proteína Fur ha sido estudiada y gracias a los análisis de mutaciones se ha provisto de información funcional. Por ejemplo mutaciones de His_{12} y Cys_{4} en Fur de *E. coli* identificaron 4 residuos críticos H_{32}, H_{117}, C_{92} y C_{95} éstos dos últimos reconocidos como ligandos de unión a metal. En estudios de resonancia magnética (NMR) de la proteína Fur de *E. coli* se identificaron a His_{33} y a His_{132} como ligandos de unión a metal. Mutagénesis de la proteína Fur de *Vibrio cholerae* mostró que los residuos H_{90} y D_{113} son importantes para la funcionalidad de la proteína Fur. El residuo H_{90} se encuentra en el motivo altamente conservado (HHDH) que está involucrado en la unión de hierro en *E.coli*. En *P. aeuroginosa* los residuos de los aminoácidos A_{10} y H_{86} son críticos para la regulación de la proteína Fur. La región altamente conservada HHDH en *P. aeuroginosa* abarca los residuos 86-89; mutaciones en estos residuos mostraron que mientras H_{86} y D_{88} son parcialmente dispensables, H_{87} y H_{89} son esenciales para la funcionalidad. Sin embargo a diferencia de la proteína Fur de *E.coli* que contiene residuos de Cys requeridos para la unión de metal, la proteína Fur de *P. aeuroginosa* carece de estos residuos esenciales (Carpenter y cols., 2010).

En *G. diazotrophicus* aún no se han hecho estudios de mutagénesis en residuos de la proteína Fur_{1398}, sin embargo se puede sugerir la función de ciertos residuos basados en la información de los análisis de alineamientos realizados *in silico*. La proteína Fur_{1398} tiene un dominio de unión a DNA el cual está constituido por 14 aminoácidos de los cuales 5 aminoácidos coinciden con los aminoácidos en la proteína Fur de *E.coli*, estos aminoácidos son: A_{60}, T_{61}, V_{62}, Y_{63}, y R_{64}; la proteína Fur_{1398} también cuenta con sitios de unión a metal con un total de 9 aminoácidos de los cuales H_{40}, E_{88}, H_{95}, H_{97}, E_{108}, H_{132} coinciden con la proteína Fur de *E. coli*, y en el sitio de dimerización los residuos conservados son I_{98}, H_{124} y L_{129}, H_{132} y L_{136}, son 4 de los 16 aminoácidos que forman parte del sitio de dimerización. Respecto al sitio altamente conservado HHDH se encuentra entre los aminoácidos 94 al 97 de los cuales sólo H_{95} y H_{97} se encuentran conservadas, lo cual puede sugerir que de la

misma forma que en *P. aeuroginosa*, los dos aminoácidos que no se encuentran conservados en *G. diazotrophicus* no son esenciales para la funcionalidad.

Una de las características de la proteína Fur es su capacidad de formar dímeros, en la proteína Fur de *Anabaena* se han realizado ensayos que demuestran que Fur puede encontrarse en diferentes formas oligoméricas dentro de las que destacan dímeros, trímeros y tetrámeros, todas ellas afectadas por la presencia de agentes reductores, fuerza iónica y la presencia de diversos metales (Hernandez y cols., 2002). En este trabajo se determinó si la proteína Fur_{1398} de *G. diazotrophicus* también posee propiedades oligoméricas. En los ensayos de oligomerización con la proteína Fur_{1398} se lograron observar dímeros, trímeros y tetrámeros al tratar la proteína con glutaraldehído 2.5%. Al realizar los ensayos con agentes reductores se pudo observar que la proteína Fur_{1398} formó monómeros, dímeros y trímeros, a excepción del tratamiento con 50 mM de DTT y β-mercaptoetanol, donde el trímero no se pudo observar. Esto puede ser debido a que la presencia de trímeros está estrechamente ligada a la presencia de enlaces disulfuro entre un dímero y un monómero o bien entre varios monómeros. Por ello la ausencia de trímeros en las muestras con altas concentraciones de DTT indica que la presencia de puentes disulfuro es necesaria para la formación de los trímeros. Bajo condiciones oxidantes como las causadas por la presencia de un agente altamente oxidante como el H_2O_2 se forman dímeros y solo una pequeña fracción forma trímeros. Estos resultados muestran que en condiciones oxidantes una pequeña fracción los dímeros de Fur promueven la formación de trímeros, sin embargo un exceso de condiciones oxidantes sólo se observa la presencia de dímeros como lo observado en los estudios realizados en *Anabaena* (Hernández y cols., 2002).

El análisis de los resultados realizados con fuerza iónica indica que al interaccionar la proteína Fur_{1398} con diferentes concentraciones de NaCl la oligomerización de la proteína Fur1398 se ve afectada. El incremento en la concentración de NaCl provocó una disminución de dímeros, trímeros y tetrámeros de la proteína Fur_{1398} y por lo tanto un incremento de la fuerza iónica, sugiere que la disminución de interacciones hidrofóbicas podrían ser insuficientes debido a que hay una mayor proporción de aminoácidos cargados con respecto a los aminoácidos hidrofóbicos. Por el contrario se observó una mayor cantidad de dímeros en concentraciones bajas de NaCl. Nuestros resultados coinciden con

aquellos para la proteína Fur de *E.coli*,donde la oligomerización depende de puentes salinos intersubunitarios y aumenta en concentraciones bajas de NaCl (Lostao y cols., 2010).

El análisis *in silico* de la proteína Fur_{1398} arrojó que cuenta con dos sitios de unión a metal y un sitio estructural de unión a Zn^{2+} que usualmente en otras proteínas Fur participa en el plegado de la proteína a un estado conformacional activo. Los resultados experimentales obtenidos, mostraron que la proteína Fur_{1398} no sólo puede estar interaccionando con Fe^{2+} y Zn^{2+}, sino que también con el Co^{2+} y el Mn^{2+} estos promueven la formación de dímeros. Solo al utilizar los iones metálicos Zn^{2+} y Fe^{2+} se lograron observar dímeros y trímeros, estos últimos fueron más evidentes al utilizar Fe^{2+}. Estos resultados demuestran que la presencia de hierro es indispensable para la formación de los estados oligoméricos de alto orden en la proteína Fur_{1398}. En *E. coli* la proteína Fur tiene dos puentes disulfuro cuya reducción en presencia de Zn^{2+} es requerida para la reconstitución del dímero. Lo cual puede ser consistente con los resultados obtenidos con la proteína Fur_{1398} ya que se logró observar una pequeña formación de dímeros al ser tratada con 1mM de Zn^{2+} y DTT.

En muchos microorganismos la proteína Fur regula la expresión de genes involucrados en la defensa contra el estrés oxidativo, como aquellos que codifican para la superóxido dimutasa o la catalasa. En un estudio realizado en *Anabaena* mostró que la sobreexpresión de FurA y FurB en *E.coli* incrementa la sobrevivencia de las células cuando son expuestas a diferentes concentraciones de H_20_2. Aunque la sobreexpresión de FurC no parece influenciar la sobrevida de las células se hipotetiza que FurC pueda jugar un rol en la regulación de procesos metabólicos como aquellos relacionados con la fotosíntesis (Lostao y cols., 2010).

La exposición a ROS provoca la oxidación reversible de los grupos tiol de residuos de cisteínas clave en diversas proteínas, incluyendo reguladores transcripcionales, cinasas, fosfatasas, proteínas estructurales y enzimas metabólicas. Por ejemplo en bacterias el mecanismo de censado y transducción de señales por el peróxido de hidrógeno subyace en cambios en la expresión de genes contenidos en reguladores transcripcionales que son directamente oxidados en respuesta en presencia de peróxido de hidrógeno (Veal E y cols., 2007). En la proteína Fur_{1398} proponemos que el residuo de Cys_{16}, pudiera estar involucrado

en la formación de oligómeros de alto orden, también podría estar implicado en censar el estrés oxidativo (Lostao y cols., 2010).

Los resultados mostrados en la Figura 34 de estrés oxidativo *in vivo* en *E. coli* BL21(pLys) en condiciones de deficiencia de hierro sugiere una posible participación de la proteína Fur_{1398} recombinante sobrexpresada en un 56% menor en presencia de hierro, sin embargo los datos obtenidos en los cultivos adicionados con $FeCl_3$ no muestran protección en presencia de la proteína Fur_{1398} al estrés ocasionado por el peróxido, ya que la presencia del $FeCl_3$ en abundancia por encontrarse en alto porcentaje como Fe^{2+} en el cultivo proveniente y además en la presencia de éste en las placas de LB, pudo haberse dado un proceso de pérdida de la actividad de Fur probablemente debida a la agregación heterogénea de la proteína a través de la interrupción de los puentes disulfuro disminuyendo la correcta dimerización y la unión a la cadena de DNA (Bes y cols., 2001). Las cisteínas son sensibles a la oxidación por H_2O_2 por lo que actúan como sensores de estrés oxidativo; si revisamos la composición de aminoácidos de la proteína Fur_{1398} se observa que sólo cuenta con una cisteína (C_{16}) razón por la cual la proteína Fur_{1398} podría no estar protegiendo de manera eficaz a las células contra el estrés oxidativo (Veal y cols., 2007).

Se ha observado que las células de *E. coli* bajo estrés oxidativo incrementan los niveles de expresión de genes relacionados con el importe de hierro, esta sobreregulación del regulón Fur sugiere que el crecimiento de *E. coli* bajo condiciones de estrés de superóxido está limitado por hierro, de hecho estudios preliminares muestran que la adición de DPD un quelante de hierro a cultivos de *E. coli* creciendo bajo condiciones de estrés oxidativo reduce el crecimiento de las células drásticamente (Blanchard y cols., 2007). Con base en lo anterior se puede sugerir que la sobreexpresión de la proteína Fur_{1398} en las células BL21 podría estar regulando positivamente a genes relacionados con sideróforos con el fin de captar el hierro libre del medio. En este estudio se observó en los ensayos con DPD una protección contra el estrés oxidativo en la cepa BL21 que sobreexpresa Fur_{1398}. Sin embargo es necesario estudiar con más detalle la función de la cisteína en la proteína Fur_{1398} de *G. diazotrophicus* Pal5 así como el papel del hierro en la regulación de la proteína $Fur_{1398.}$ Así como analizar estas mismas condiciones en una cepa de *E.coli* deficiente en el gen *fur*.

10. Conclusiones.

- Se clonó el gen *fur*$_{1398}$ en el vector de expresión pEXP5-CT TOPO
- La inducción de la proteína Fur$_{1398}$ recombinante se logró con 0.1mM de IPTG
- Las condiciones hibridas permitieron estabilizar a la proteína Fur$_{1398}$ recombinante y obtener mayor concentración.
- La proteína Fur$_{1398}$ tiene la capacidad de formar dímeros, trímeros y tetrámeros.
- En presencia de agentes reductores sólo es posible la visualización del dímero. Y en condiciones de alta fuerza iónica no es posible observar las formas triméricas de la proteína.
- La proteína Fur$_{1398}$ mostró tener actividad de protección contra el estrés oxidativo en condiciones de ausencia de $FeCl_3$ y menor protección en presencia de $FeCl_3$.

11.- Perspectivas

- Realizar ensayos de unión de la proteína Fur_{1398} al grupo hemo.
- Generar mutantes del gen *fur*$_{1398}$ en *G. diazotrophicus* Pal5 y realizar su análisis fenotípico.
- Realizar mutagénesis en los aminoácidos conservados de la proteína Fur_{1398}, para determinar aquellos involucrados en la unión de DNA y en la oligomerización.

12. Anexos

ANEXO 1: MÉTODOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

Extracción de ADN genómico (CTAB comunicación personal Pedraza y cols., 2007)

1.- A partir de 1.5 ml de un cultivo bacteriano de 16 horas de incubación, centrifugar durante 2 minutos a 10000 rpm.

2.- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 567 µl de buffer TE al que se le agrega 30 µl de SDS 20% y 3 µl de pronasa E(100 mg/ml).

3.- Incubar 1 hora a 37°C

4.- Agregar 100 µl de NaCl 5 M y 80 µl de una solución alcalina de CTAB al 10%.

5.- Incubar 10 min a 65°C.

6.- Agregar 500 µl de una mezcla de cloroformo alcohol isoamílico (24:1).

7.- Centrifugar 5 min a 12000 rpm.

8.- Transferir la fase superior a otro tubo y agregar 2 volúmenes de etanol al 100%.

9.- Incubar -20°C durante 2 horas

10.- Centrifugar 5 min a 12000 rpm

11.- Descartar el sobrenadante y lavar el pellet con 600µl de etanol al 70%.

12.- Centrifugar a 10000 rpm durante 5 min.

13.-Secar el pellet completamente en flujo laminar y resuspender en 50 µl de agua con RNAsa. Incubar 30 min a 37°C

14.- Almacenar a 4°C.

PCR

REACTIVO	**VOLUMEN (µl)**
Buffer de PCR HF 5x	8
dNTP´s	4
*fur*F	0.8
*fur*R	0.8
DNA	0.5
Taq Phusion	0.2
DMSO	4
H_2O	21.7
Volumen final	40

Condiciones utilizadas en termociclador eppendorf utilizando la Taq DNA Polimerasa recombinante (Invitrogen).

PASO	**TEMPERATURA**	**TIEMPO**	**No. DE CICLOS**
Desnaturalización inicial	95°C	5 minutos	1
Desnaturalización	94°C	30 segundos	30
Alineamiento	66°C	50 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto	
Extensión final	72°C	20 minutos	1
Conservación	4°C	∞	

Condiciones utilizadas en termociclador eppendorf utilizando la Taq DNA Polimerasa Phushion de alta fidelidad (Fermentas).

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO	No. DE CICLOS
Desnaturalización inicial	98°C	3 minutos	1
Desnaturalización	94°C	10 segundos	30
Alineamiento	66°C	15 segundos	
Extensión	72°C	20 segundos	
Extensión final	72°C	20 minutos	1
Conservación	4°C	∞	

Clonación del producto de PCR en el vector pEXP5-CT

REACTIVO	Cantidad (µl)
Producto de PCR	1
Solución salina	0.5
Agua	1
Vector TOPO	0.5
Volumen final	3

1.- Mezclar con cuidado e incubar a temperatura ambiente durante toda la noche

2.- Colocar esta reacción en hielo y proceder a transformar en células *E. coli* químicamente competentes.

Extracción de plásmido (Sambrook y cols.)

1.- A partir de un cultivo bacteriano de 12 horas de incubación, centrifugar a 12000 rpm durante 1 minuto.

2.-Lavar la pastilla dos veces con 300 µl de buffer TE (10 mM Tris, 1 mM EDTA. pH 8).

3.- Colocar 300 µl de solución P1(50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH8) y resuspender, posteriormente agregar 15 µl de lisozima 4 mg/ml e incubar 5 minutos.

4.- Agregar 400 µl de solución P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) y mezclar por inversión. Dejar incubar 5 minutos.

5.- Agregar 350 µl de solución P3 (3 M acetato de potasio pH5.5 ajustar con ácido acético) y mezclar por inversión muy suavemente. Incubar 10 minutos a 4°C.

6.- Centrifugar 15 minutos a 10000 rpm a 4°C.

7.- Tomar el sobrenadante y pasarlo a un tubo nuevo. Hacer un lavado con 400 µl de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, mezclar durante 5 minutos y centrifugar 8 minutos a 10000 rpm.

8.- Recuperar la fase acuosa y hacer 2 lavados de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1 y centrifugar 8 minutos a 10000 rpm.

9.-Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo y agregar 0.7 volúmenes de isopropanol mezclar suavemente y dejar incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos. Centrifugar a 13000 rpm durante 20 minutos.

10.- Eliminar el sobrenadante. Lavar con 1 ml de etanol al 70%. Repetir los lavados 2 veces.

11.- Eliminar cuidadosamente el etanol y dejar secar la pastilla. Resuspender la pastilla en 50µl de agua con RNAsa e incubar durante 20 minutos a 37°C.

Digestiones con enzimas de restricción

	ENZIMA	
	*Ava*I	*Eco*RI
H_2O	3.5 µl	3.5 µl
Buffer	1 µl	1 µl
DNA	5 µl	5 µl
Enzima	0.5 µl	0.5 µl
Volumen final	10 µl	10 µl
	Incubar 1 hora a 37°C. Inactivar incubando 20 minutos a 80°C.	Incubar 1 hora a 37°C. Inactivar incubando 10 minutos a 65°C.

Anexo 2: Métodos de expresión, lisis y purificación de la proteína Fur.

Inducción con IPTG

1. Tomar con un asa 2-3 colonias e inocular en un matraz con 15ml de caldo LB con Ap (100 µg/ml), Cm (34 µg/ml) e incubar en agitación a 37°C durante toda la noche.
2. Agregar una alícuota de 150ul a un matraz con 150 ml de caldo LB con Ap (100 µg/ml), Cm (34 µg/ml) y crecer hasta alcanzar una $D.O_{600}$ 0.3.
3. Adicionar 0.1 mM de IPTG.
4. Crecer por 2 horas.
5. Centrifugar 10000 rpm a 4°C.
6. Lavar los paquetes celulares con buffer de fosfatos de potasio 20 mM pH7.6.
7. Centrifugar 10000 rpm a 4°C desechar el sobrenadante y almacenar la pastilla a -20°C.
8. Analizar mediante PAGE-SDS.

Electroforesis en gel de poliacrilamida

Gel separador

H_2O

Acrilamida al 30%

Tris 1.5 M pH 8.8

Persulfato de amonio al 10% (PSA)

Dodecil Sulfato de Sodio al 10% (SDS)

N,N,N,N-tetrametil etilendiamina (TEMED)

Gel concentrador

H_20

Acrilamida al 30%

Tris 1.0M pH 6.8

Persulfato de amonio al 10% (PSA)

Dodecil Sulfato de Sodio al 10% (SDS)

N,N,N,N-tetrametil etilendiamina (TEMED)

Buffer de cámara

Tris 250 mM

Glicina 192 mM

Tinción con azul de Coomassie

Material

Solución de tinción azul brillante de Coomassie R-250 (0.125% de azul de Coomassie; 50% de metanol; 10% ácido acético.

Método:

1.-Sumergir el gel de poliacrilamida en una solución de tinción de azul de Coomassie por 30 minutos en agitación.

2.- Desteñir con 20% de ácido acético hasta que las bandas sean notorias.

Transferencia de proteínas a membrana de nitrocelulosa

Solución de transferencia

Tris 50 mM, glicina 80 mM, SDS 0.1%, metanol 20%

1.- Separar las proteínas presentes en las muestras por electroforesis en gel de poliacrilamida.

2.- Transferir a una membrana de nitrocelulosa en semiseco (Transfer blot Semi Dry, Biorad) utilizando la solución de transferencia.

3.- Aplicar 15 mV por 1 hora.

4.- Dejar secar la membrana y almacenarla a -20°C

Western blot

1. Bloquear la membrana en PBS con 3% de BSA durante 2 horas en agitación (55 rpm).
2. Lavar la membrana en PBS (0.05% tween 20) con agitación por 5 minutos (repetir dos veces).
3. Incubar 2 horas con el anticuerpo anti-polihistidina conjugado a fosfatasa alcalina (Sigma-Aldrich) en PBS.
4. Lavar la membrana en PBS (0.05% tween 20) con agitación por 5 minutos (repetir dos veces).
5. Revelar con buffer alcalino conteniendo los sustratos BCIP (bromo-cloro-indolil fosfato) / NBT (nitroblue tetrazolium) (Promega) hasta que sean notorias las bandas azul-púrpura.

Purificación en condiciones nativas

Material

Buffer de lisis

50 mM NaH_2PO_4

300 mM NaCl

10 mM Imidazol

pH 8

Buffer de lavado

50 mM NaH_2PO_4

300 mM NaCl

20 mM Imidazol

pH 8

Buffer de elución

50 mM NaH_2PO_4

300 mM NaCl

75, 100, 250 y 300 mM Imidazol

pH 8

Método

1.-Resuspender la pastilla en buffer de lisis 2-5 ml/gr de pastilla.

2.- Añadir 1mg/ml de lisozima, incubar en hielo 30 minutos.

3.- Sonicar 6 pulsos de 10 segundos a máxima amplitud.

4.- Centrifugar a 12000 rpm a 4°C durante 15 minutos. Guardar el sobrenadante.

5.- Equilibrar la resina.

En un tubo estéril nuevo agregar 250 µl de resina y 500 µl de buffer de lisis. Agitar el tubo 5 minutos a 4°C y centrifugar 2 minutos a 4°C. Repetir dos veces el mismo paso y guardar a 4°C.

5.-Interacción con la resina.

A un tubo que contenga el sobrenadante lisado agregar 250 µl de la resina Ni-NTA equilibrada y un coctel de inhibidores de proteasas.

6.- Agitar durante toda la noche a 4°C.

7.- Centrifugar 10 minutos a 4°C 6000 rpm. Colocar el sobrenadante en un tubo nuevo.

8.- Pasar la resina a un tubo y lavar en agitación a 4°C con 500 µl de buffer de lavado durante 5 minutos y centrifugar 2 minutos a 5000 rpm 4°C. Repetir los lavados 5 veces.

9.- Elución

Al tubo con Ni-NTA-proteína agregar 500 µl de buffer de elución y agitar 5 minutos a 4°C, centrifugar 5000 rpm 4°C y recuperar el sobrenadante. Repetir hasta realizar tres eluciones (75, 100 y 250 mM de imidazol).

Purificación en condiciones híbridas

Material

1. Solución A (10x) pH si ajustar
- 200 mM Fosfato de sodio monobásico
- 5 M NaCl
2. Solución B (10x) pH sin ajustar
- 200 mM Fosfato de sodio dibásico
- 5 M NaCl
3. Buffer de purificación nativo (1x) pH 8.0
- 50 mM Fosfato de sodio monobásico
- 0.5 M NaCl
4. Solución de Imidazol 3 M pH 6.0 (20 mM buffer de fosfatos de sodio, 0.5 M NaCl)
- Solución A (10x) 8.77% (w/v)
- Solución B (10x) 1.23% (w/v)
5. Buffer de lisis desnaturalizante pH 7.8 (20 mM buffer de fosfatos de sodio, 0.5 M NaCl)
- Solución A (10x) 0.58% (w/v)
- Solución B (10x) 9.42% (w/v)
- Urea 6 M
6. Buffer de unión desnaturalizante pH 7.8 (20 mM buffer de fosfatos de sodio, 0.5 M NaCl)
- Solución A (10x) 0.58% (w/v)
- Solución B (10x) 9.42% (w/v)
- Urea 8 M
7. Buffer de lavado desnaturalizante pH 6.0 (20 mM buffer de fosfatos de sodio, 0.5 M NaCl)
- Solución A (10x) 7.38% (w/v)
- Solución B (10x) 2.62% (w/v)
- Urea 8 M

8. Buffer de lavado nativo pH 8.0

➲ 20 mM de Imidazol en buffer de purificación nativo 1x.

9. Buffer de elución nativo

➲ 250 mM de Imidazol en buffer de purificación nativo 1x.

Método

1. Resuspender el paquete celular en 8ml de buffer de lisis.
2. Agitar suavemente por 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Sonicar: máxima amplitud, 5 pulsos, 1 minuto (3 veces).
4. Centrifugar 13000rpm por 15 minutos a 4°C y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
5. Lavar la resina de agarosa Ni-NTA con agua y equilibrar con 4 ml de buffer de unión desnaturalizante, repetir paso 1 vez.
6. Eliminar la solución, agregar la muestra y dejar en contacto por una hora con agitación suave a 4°C.
7. Colocar vertical la columna y permitir la salida de las proteínas que no se unieron a la resina.
8. Lavar con 4 ml de buffer de unión desnaturalizante, repetir el paso 1 vez
9. Lavar con 4 ml de buffer de lavado desnaturalizante, repetir paso 1 vez.
10. Lavar con 8 ml de buffer de lavado nativo, repetir paso 3 veces más.
11. Eluir con 6-12 ml de buffer de elución nativo y recolectar fracciones de 1 ml.

Nota: Todos los buffers contendrán 1mM PMSF y 10mM de 2-mercaptoetanol, ajustar pH con NaOH/ HCl y almacenar a temperatura ambiente. Los buffers con urea deberán mezclarse a una temperatura de 50-60°C hasta disolver completamente y dejar enfriar a temperatura ambiente, finalmente esterilizar por filtración (0.45 µm filtro). Los buffers con urea, lavado nativo y elución nativo se preparan al momento.

Purificación en condiciones híbridas Modificado

Material

1. Solución A (10x) pH si ajustar
- 200 mM Fosfato de sodio monobásico
- 5 M NaCl
2. Solución B (10x) pH sin ajustar
- 200 mM Fosfato de sodio dibásico
- 5 M NaCl
3. Buffer de purificación nativo (1x) pH 8.0
- 50 mM Fosfato de sodio monobásico
- 0.5 M NaCl
4. Solución de Imidazol 3 M pH 6.0 (20 mM buffer de fosfatos de sodio, 0.5 M NaCl)
- Solución A (10x) 8.77% (w/v)
- Solución B (10x) 1.23% (w/v)
5. Buffer de lisis desnaturalizante pH 7.8 (20 mM buffer de fosfatos de sodio, 0.5 M NaCl)
- Solución A (10x) 0.58% (w/v)
- Solución B (10x) 9.42% (w/v)
- Urea 6 M
- Imidazol 10 mM
- Glicerol 0.5%
- PMSF 1 mM
- NP40 0.1%
- Coctel inhibidor de proteasas dilución 1:2000
- Lisozima 0.2 mg/ml
- 2- mercaptoetanol 10 mM
6. Buffer de unión desnaturalizante pH 7.8 (20 mM buffer de fosfatos de sodio, 0.5 M NaCl)
- Solución A (10x) 0.58% (w/v)

- Solución B (10x) 9.42% (w/v)
- Urea 8 M

7. Buffer de lavado desnaturalizante pH 6.0 (20 mM buffer de fosfatos de sodio, 0.5 M NaCl)

- Solución A (10x) 7.38% (w/v)
- Solución B (10x) 2.62% (w/v)
- Urea 8 M

8. Buffer A lavado nativo pH 8.0

- 5 mM de Imidazol en buffer de purificación nativo 1x.

9. Buffer B lavado nativo pH 8.0

- 20 mM de Imidazol en buffer de purificación nativo

10. Buffer C lavado nativo pH 8.0

- 50 mM de Imidazol en buffer de purificación nativo

11. Buffer D elución nativo

- 100 mM de Imidazol en buffer de purificación nativo 1x.

12. Buffer E elución nativo

- 250 mM de Imidazol en buffer de purificación nativo 1x.

13. Buffer F elución nativo

- 300 mM de Imidazol en buffer de purificación nativo 1x.

Método

1. Resuspender el paquete celular en 8ml de buffer de lisis.
2. Agitar suavemente por 15 minutos a temperatura ambiente.
3. Sonicar: máxima amplitud, 5 pulsos, 1 minuto (3 veces).
4. Centrifugar 13000 rpm por 15 minutos a 4°C y transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
5. Lavar la resina de agarosa Ni-NTA con agua y equilibrar con 4 ml de buffer de unión desnaturalizante, repetir paso 1 vez.
6. Eliminar la solución, agregar la muestra y dejar en contacto por una hora con agitación suave a 4°C.

7. Colocar vertical la columna y permitir la salida de las proteínas que no se unieron a la resina.
8. Lavar con 4 ml de buffer de unión desnaturalizante, repetir el paso 1 vez
9. Lavar con 4 ml de buffer de lavado desnaturalizante, repetir paso 1 vez.
10. Lavar con 25 ml de buffer A lavado nativo
11. Lavar con 30 ml de buffer B lavado nativo.
12. Lavar con 15 ml de buffer C lavado nativo.
13. Eluir con 6 ml de buffer D elución nativo y recolectar fracciones de 1 ml.
14. Eluir con 5 ml de buffer E elución nativo y recolectar fracciones de 1 ml
15. Eluir con 5 ml de buffer F elución nativo y recolectar fracciones de 1 ml.

Nota: Ajustar pH con NaOH/ HCl y almacenar a temperatura ambiente. Los buffers con urea deberán mezclarse a una temperatura de 50-60°C hasta disolver completamente y dejar enfriar a temperatura ambiente, finalmente esterilizar por filtración (0.45 µm filtro). Los buffers con urea, lavado nativo y elución nativo se preparan al momento.

Anexo 3: Análisis bioquímico de la proteína Fur_{1398}

Ensayo de oligomerización (Hernandez J., 2002)

1.- Mezclar la proteína purificada con buffer acético acetato pH 4 y agregar 4.5 µl de glutaraldehido 2.5%.

2.- Incubar 20 minutos a temperatura ambiente.

3.- Analizar mediante PAGE-SDS 12%.

Ensayos de estrés oxidativo (Gomollón S., 2009)

1. Tomar con un asa 2-3 colonias e inocular en un matraz con 15ml de caldo LB con Ampicilina (Ap 100 µg/ml), Cloranfenicol (Cm 34 µg/ml) e incubar en agitación a 37°C durante toda la noche.

2. Agregar una alícuota de 300 µl a un matraz con 30 ml de caldo LB con Ap (100µg/ml), Cm (34µg/ml) y crecer hasta alcanzar una $D.O_{600}$ 0.6.

3. Adicionar 0.1 mM de IPTG.
4. Crecer por 2 horas.
5. Espatular 200 µl del cultivo inducido en placas de LB con Ap (100 µg/ml), Cm (34µg/ml), IPTG 0.1mM.
6. Colocar discos de papel sartorius 291 de un diámetro de 0.5 cm a las concentraciones de 0.15, 0.303, 0.606, 1.212, 2.425 M de H_2O_2.
7. Incubar toda la noche a 37°C y medir los halos de inhibición del crecimiento.

Nota: Utilizar las células *E.coli* BL21pLys y *E.coli* BL21(pLys) que contienen el vector pEXP-5CT como control negativo.

13. Bibliografía.

Abdul-Tehrani. Hudson A., Yung-Sheng C., Timms A., Hawkins C., Williams J., Harrison P., Guest J., Andrews S. 1999. Ferritin Mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and *fur* mutants are iron deficient. J. Bacteriol. 181(5):1415-1428.

Andrews C., Robinson A., Rodríguez F. 2003. Bacterial iron homeostasis. FEMS Microbiol Rev 27 , 215-237.

Barton L. 2005. Structural and functional relationships in prokaryotes. Springer New York. 382-385.

Bender K., Yen B., Hemme C., Yang Z., He Z., He Q., Zhou J., Huang H., Alm J.,Hazen T., Arkin A., Wall J. 2007. Analysis of a ferric uptake regulator (Fur) mutant of *Desulfovibrio vulgaris Hildenborough*. J Appl Environ Microbiol. 5389-5400.

Bertalan M., Albano R., De Pádua V., Rouws L., Rojas C., Hemerly A., Teixeira K., Schwab S., Araujo J., Oliveira A., França L., Magalhães V., Alquéres S., Cardoso A., Almeida W., Loureiro M., Nogueira E., Cidade D., Oliveira D., Simão T., Macedo J., Valadão A., Dreschsel M., Freitas F., Vidal M., Guedes H., Rodriguez E., Meneses C., Brioso P., Pozzer L., Figueiredo D., Montano H., Junior J., De Souza G., Quintana V., Ferreira B., Branco A., Gonzalez P., Guillobe H., Lemos M., Seibel L., Macedo J., Alves M., Sachetto G., Coelho A., Santos E., Amaral G., Neves A., Pacheco A., Carvalho D., Lery L., Bisch P., Rössle S., Ürményi T., Rael A., Silva R., Rondinelli E., Von Krüger W., Martins O., Baldani J., Ferreira P. 2009. Complete genome sequence of the sugarcane nitrogen-fixing endophyte *Gluconacetobacter diazotrophicus* Pal5. BMC Genomics. 10: 450.

Benson H., Le Vier C., Lou M. 2004. A dominant-negative fur mutation in *Bradyrhizobium japonicum*. J. Bactriol. 186(5):1409-1414.

Bes M., Hernandez J., Peleato M., Fillat M. 2001. Cloning, overexpression and interaction of Recombinant Fur from the cyanobacterium *Anabaena* PCC7119 with *isi*B and its own promoter. FEMS Microbiol Lett. 194:567-574.

Blanchard J., Wholey W., Conlon E., Pomposiello P. 2007. Rapid changes in gene expression dynamics in response to superoxide reveal SoxRS-dependent and independent transcriptional networks. PLoS One. 11(86):1-13

Braun V., Hantke Klaus. 2006. Acquisition of iron by bacteria. D.H. Nies, S. Silver: Molecular Microbiology of Heavy Metals. 190-200.

Carpenter B., Ganez H., Benoit S., Evans S., Olsen C., Michel S., Maier R., Merrell D. 2010. Mutagenesis of conserved Amino acids of *Helicobacter pylori* Fur reveals residues important for Function. J Bacteriol. 92(19): 5037-5052.

Caswell C., Elhassanny A., Planchin E. Roux C. Gorospe J., Ficht T., Dunman P., Roop II R. 2013. Diverse genetic regulon of the virulence-associated transcriptional regulator MucR in *Brucella abortus* 2308. Infect Immun 81(4):1040-1051.

Cavalcante V.,Döbereiner J. 1998. A new acid-tolerant nitrogen-fixing bacterium associated with sugarcane. Plant Soil *108*: 23-31 .

Choi S., Chivers P., Berg D. 2011. Mutations in *Helicobacter pylori´*s fur regulatory gen that alter resistance to metronidazole, a prodrug activated by chemical reduction. PLoS ONE 6(3):e1 8236.

Cornelis P. 2014. Iron uptake and homeostasis in prokaryotic microorganisms. Org Chem Front. 303-332.

Cunha e Silva RM, Almeida SE, Valencia EPE, Nascimento Filbo VF (2004) Determination of Fe, Cu, and Zn in sugar cane spirits commercialized in Southeastern Brazil by TXRF. J Radioanal Nucl Chem 260:3–7.

Dam P., Olman V., Harris K., Su Z., Xu Y. 2007. Operon prediction using both genome-specific and general genome information. Nucleic Acids Res. 35:288 - 298.

Dong Z., Canny M., McCully M., Roboredo M., Fernandez C., Ortega E., Rodés R. 1994. A nitrogen-fixing endophyte of sugarcane stems. Plant Physiol. 105: 1139-1147.

Escolar L., Pérez J., Lorenzo V. 1999. Opening the iron box: Transcriptional metalloregulation by the Fur Protein. J. Bacteriol. 181(20):6223-6229.

Eskin N., Vessey K., Tian L. 2014. Research progress and perspectives of nitrogen fixing bacterium, *Gluconacetobacter diazotrophicus*, in Monocot Plants. International Journal of Agronomy. 1-13.

Faredau S., Mullie C., Dassonville A., Audic N., Sasaki A., Sonnet P. 2011. Bacterial iron uptake: a promising solution against multidrug resistant Bacteria. Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. 695-705.

Gesine R., Hauke H., Hans M. 2006. Beyond the Fur paradigm: iron-controlled gene expression in rhizobia. FEMS Microbiol. 30: 631-648.

Gomollón S., Sevilla E., Bes T., Peleato M., Fillat M. 2009.New insights into the role of Fur proteins: FurB (All2473) from *Anabaena* protects DNA and increases cell survival under oxidative stress. Biochem J. 418:201-207

Grifantini R., Friqimelica E., Delany I., Bartolini E., Giovinazzi S., Balloni S., Agarwall S., Galli G., Genco C., Grandi G. 2004. Characterization of a novel *Neisseria meningitidis* Fur and iron-regulated operon required for protection from oxidative stress: utility of DNA microarray in the assignment of the biological role of hypothetical genes. Mol Microbiol. 54(4):962-979.

Hantke K. 1981. Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. Mol. Gen Genet. 182:288-292.

Hantke K. 2001. Iron and metal regulation in bacteria. Current Opinion in Microbiology**. 4**:172–177.

Hernandez J., Bes T., Fillat M., Neira J., Peleato L. 2002. Biochemical analysis of the Recombinant Fur (ferric uptake regulator) protein from *Anabaena* PCC 7119: factors affecting its oligomerization state. Biochem J. 366: 315-322.

James E., Reis V., Olivares F., Baldani J., Döbereiner J. 1994**.** Infection of sugar cane by the nitrogen-fixing bacterium *Acetobacter diazotrophicus*. J. Exp. Bot., 757-766.

Kashmiri Z., Mankar S. 2014. Free radicals and oxidative stress in bacteria. Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci. 3:9 34-40.

Kenneth R., Dertz E. 2004. Biochemical and physical properties of siderophores. Iron transport in bacteria. Washington, DC: ASM Press. 1-17.

Krewulak K., Vogel H. 2008. Structural biology of bacterial iron uptake. BBA. 1778:1781-1804.

Lavrrar J., McIntosh M. 2003. Architecture of a Fur binding site: A comparative analysis. J. Bacteriol. 185(7):2194-2202.

Lemire J., Harrison J., Turner R. 2013. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. Nat Rev Microbiol. 11: 371-384.

Lostao A., Peleato M., Gómez C., Fillat M. 2010. Oligomerization properties of FurA from the cyanobacterium *Anabaena* sp PCC 7120: Direct visualization by *in situ* atomic force microscopy under different redox conditions. BBA. 1804:1723-1729.

Luna M., Apres J., Crespo J., Boiardi J. 2012. Colonization and yield promotion of tomato by *Gluconacetobacter diazotrophicus*. Appl Soil Ecol. 61:225– 229.

Magdeldin S., Moser A. 2012. Affinity chromatography: principles and applications. Biochemestry, genetics and molecular biology. Chapter 1:3-28.

Magnani G., Didonet L., Cruz L., Pichet C., Pedrosa F., Souza E. 2010. Diversity of endophytic bacteria in brazilian sugarcane. Genet. Mol. Res. 9:1 250-258.

Mao F., Dam P, Chou J, Olman V, Xu Y.2009. DOOR: a Database of prokaryotic Operons. NAR**.** 37: D459-D463, 2009.

Massé E., Arguin M. 2005. Ironing out the problem: new mechanisms of iron homeostasis. Trends Biochem Sci30:8 462-468.

Matthews J. Sundae M. 2012. Dimers, oligomers, everywhere. Protein dimerization and oligomerization in biology. Chapter 1:1-18.

Mayssam A., Imperiali B. 2005. Protein oligomerization: How and why. Bioorganic & Medicinal Chemistry. 13: 5013.5020.

Moriah S., Alison B. 2009. Microbial Iron Acquisition: Marine and Terrestrial Siderophores. Chemical Rev, 4580–4595.

Muthukumarasamy, R., Revathi, G., Seshadri, S., & Lakshminarasimhan, C. 2002. *Gluconacetobacter diazotrophicus* (syn. *Acetobacter diazotrophicus*), a promising diazotrophic endophyte in tropics. Current Science. 137-145.

Ni-NTA Purification System. 2006. Invitrogen

Noinaj N., Guillier M., Bernard T., Buchanan S. 2010. TonB-dependent transporters: regulation, structure and function. Annu. Rev. Microbiol. 64: 43-60.

Pagliaro M., Rossi M. 2008. Glycerol: properties and production. The future of glycerol: new uses of a versatile raw material. Chapter 1:2-18.

pEXP5-CT TOPO® TA Expression Kit 2005 INVITROGEN.

Ralston A. 2008. Operons and prokaryotic gene regulation. Nature Education 1(1):216.

Ramírez M. 2008. Cultivos para la producción sostenible de biocombustible: Una alternativa para la generación de empleos e ingresos. Servicio Holandés de Cooperación al desarrollo SNV. 1-16.

Robichon C., Ingigliardi D., Pugsley A. 2005. Depletion of apolopoprotein N-acyltransferase causes mislocalization of outer membrane lipoproteins in *Escherichia coli*. JBC. 280(2):974-983.

Rosano G., Ceccarelli E. 2014. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. Front Microbiol. 5(172):1-17.

Rosenblueth M., Martínez E. 2006. Bacterial endophytes and their interactions with hosts. APS. 19:8 827-837.

Sambrook J., Fritsch E., Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd Edition Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Saravanan, V. S., Madhaiyan, M., Osborne, J., Thangaraju, M., & Sa, T. M. 2008. Ecological occurrence of *Gluconacetobacter diazotrophicus* and nitrogen-fixing *Acetobacteraceae* Members: Their Possible Role in Plant Growth Promotion. Microb Ecol. 130-140.

Schalk I., Hannaver M., Braud A. 2011. New roles for bacterial siderophores in metal transport and tolerance. Environ Microbiol. 13:11: 2844-2854.

Schalk I. 2013. Innovation and originality in the strategies developed by bacteria to get access to iron. ChemBioChem. 14: 293-294.

Shindou H., Hishikawa D., Takeshi H., Yuki K., Shimizu T. 2009**.** Recent progress on acyl CoA: lysophospholipid acyltransferase research. Journal of Lipid Research. S46-S51.

Storz P. 2013. Oxidative Stress and Redox Regulation. Springer Science & Business Media. 427-430.

Tettelin H., Saunders N., Heidelberg J., Jeffries A., Nelson K., Eisen J., Ketchum K., Hood D., Peden J., Dodson R., Nelson W., Gwinn M., DeBoy R., Peterson J., Hickey E., Haft D., Salzberg S., White O., Fleischann R., Dougherty B., Mason T., Cieckp A., Parksey D., Blair E., Cittone E., Cotton M., Utterback T., Khouri H., Qin H., Vamathevan J., Gill J., Scarlato V., Masignani V., Pizza M., Grandi G., Sun L., Smith H., Fraser C., Moxon E., Rappuoli R., Venter J. 2000. Complete genome sequence of *Neisseria meningitidis* serogroup B Starin MC58. Science. 287: 1809-1815.

Troxel M., Hassan H. 2013. Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. Front Cell Infect Microbiol. 3:59 1-13

Veal E., Day A, Morgan B. 2007. Hydrogen Peroxide Sensing and Signaling. Molecular Cell. 26(1):1-14.

Weitz G., Quintern L., Schram A., Barranger J., Sandhoff K. 1986. Purification and properties of acid sphingomyelinase from human urine. Enzymes of lipid metabolism II. 261-266.

Wittenwiler M. 2007. Mechanisms of iron metabolization by siderophores. Master Studies in Enviromental Sciences Master, ETH Zürich.

Won L., Helmann J. 2007. Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. BioMetals. 20:485-499.

Mao X., Ma Q., Zhou C., Chen X., Zhang H., Yang J, Mao F, Lai W., Xu Y.2013. DOOR 2.0: DOOR 2.0: presenting operons and their functions through dynamic and integrated views. Being reviewed by NAR Special Database Issue.

Yamada, Y., Hoshino, K Ishikawa, T. 1997. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S ribosomal RNA: the elevation of the Subgenus *Gluconacetobacter* to the generic level. Biosci. Biotech. Biochem, 1244-1251.

Yoshikawa T., Naito Y. 2002. What is oxidative stress? JMAJ. 45:7 271-276

Young C., Britton Z., Robinson A. 2011. Recombinant protein expression and purification: A comprehensive review of affinity tags and microbial applications. Biotechnol.J. 7:620-634.