



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BAJA CALIFORINA

FACULTA DE CIENCIAS QUIMICAS E INGENIERIA.

Respuesta en la autorregulación de la expresión de monómero y oligómero de  
MAP3773c con la región TAATAG del promotor T7 en *Escherichia coli*.

**TESIS**

PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACOBIOLOGO

**PRESENTA**

DANIA MELISSA DIAZ PADILLA

TIJUANA B.C.

JUNIO 2017

# Universidad Autónoma de Baja California

## FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

"2017 Año del 60 Aniversario de la Universidad Autónoma de Baja California"

FOLIO No. 011

Tijuana, B. C., a 29 de marzo, 2017.

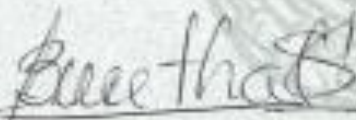
C. Dania Melissa Diaz Padilla  
Pasante de Químico Farmacobiólogo  
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la

Opción     Tesis    

Es propuesto, por la Dra. Bertha Landeros Sánchez y la Dra. Lilia Angélica Hurtado Ayala, quienes serán los responsables de la calidad de trabajo que usted presente, referido al tema "Respuesta en la autorregulación de la expresión de monómero y oligómero MAP3773c con la región TAATAG del promotor T7 en *Escherichia coli*" el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I.- ANTECEDENTES
- II.- INTRODUCCIÓN
- III.- JUSTIFICACIÓN
- IV.- OBJETIVO GENERAL
- V.- OBJETIVOS ESPECÍFICOS
- VI.- MATERIALES Y MÉTODOS
- VII.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN
- VIII.- CONCLUSIONES
- IX.- REFERENCIAS
- X.- ANEXOS



Dra. Bertha Landeros Sánchez  
Directora de Tesis




Dra. Lilia Angélica Hurtado Ayala  
Co-Directora de Tesis

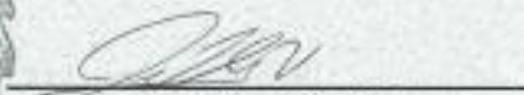
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS  
QUÍMICAS E INGENIERÍA



Dr. Luis Enrique Palafox Maestre  
Director



Dr. José Luis González Vázquez  
Subdirector

## **AGRADECIMIENTOS.**

*... A mis padres por su dedicación y el amor con el que me han alentado a alcanzar cada meta propuesta. A Andrea por ser una motivación para querer ser mejor cada día.*

*... A Erick por el apoyo incondicional.*

*... A mi Directora de Tesis, Dra. Bertha Landeros, por la paciencia y la vocación con la que guío mis pasos en este proyecto y compartir conmigo sus conocimientos.*

*... A mi Universidad por darme las herramientas para desarrollar mis capacidades como investigadora.*

## CONTENIDO

I.	ANTECEDENTES	1
	1.1 <i>Mycobacterium avium</i> : Evolución.	1
	1.2 <i>Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i> (MAP).	2
	1.3 <i>Paratuberculosis</i> (Enfermedad de Johne).	2
	1.4 <i>Enfermedad de Crohn</i> y su relación con MAP.	4
	1.5 <i>Diagnóstico de MAP</i> .	5
	1.6 <i>Control y tratamiento</i> .	7
	1.7 <i>Hierro como micronutriente</i> .	7
II.	INTRODUCCION	10
	2.1 <i>Proteína Fur</i> .	10
	2.2 <i>Caja Fur</i> .	11
	2.3 <i>Mecanismos de represión y activación por Fur</i> .	13
	2.4 <i>Proteína Fur multifuncional</i> .	16
	2.5 <i>Autorregulación de Fur</i> .	18
	2.6 <i>Complejo Zinc-Fur</i> .	19
	2.7 <i>Genoma de Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis</i> .	21
	2.8 <i>Proteína MAP3773c</i> .	24
III.	JUSTIFICACION	25
IV.	OBJETIVO GENERAL	26
V.	OBJETIVOS ESPECIFICOS	26
VI.	MATERIALES Y METODOS	27
	6.1 <i>Proteína MAP3773c</i>	27
	6.2 <i>Alineamiento de la región del promotor T7 con la región de regulación de map3773c</i>	27
	6.3 <i>Diseño de sondas de DNA para la región del promotor T7</i>	27
	6.4 <i>PCR para la amplificación del DNA no relacionado</i>	27

6.5	<i>Purificación de DNA no relacionado</i>	28
6.6	<i>EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)</i>	28
VII.	RESULTADOS Y DISCUSION	36
7.1	<i>Proteína MAP3773c</i>	36
7.2	<i>Alineamiento de la región del promotor T7 con la región de regulación de map3773c</i>	37
7.3	<i>Diseño de sondas de DNA para la región del promotor T7</i>	37
7.4	<i>PCR para la amplificación del DNA no relacionado</i>	37
7.5	<i>EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)</i>	38
VIII.	CONCLUSIONES	52
IX.	REFERENCIAS	53
X.	ANEXOS	55
	ANEXO I: SOLUCIONES Y REACTIVOS	55
	ANEXO 2: MARCADOR DE PESO MOLECULAR	57
	ANEXO 3: ABREVIATURAS	58

## I. ANTECEDENTES

### 1.1 *Mycobacterium avium*: Evolución.

*Mycobacterium avium*, ha sido clasificada en cuatro distintas subespecies y es la especie clínicamente más importante dentro del complejo *Mycobacterium avium* (MAC). Antes de la contribución de la taxonomía basada en genética, las pruebas bioquímicas convencionales se utilizaron por mucho tiempo para diferenciar los miembros de MAC. Thorel y colab. (1990) basados en pruebas fenotípicas mayormente discriminativas, junto con un análisis molecular, propusieron considerar las especies de micobacterias en distintas subespecies de *M. avium*; *M. avium subsp. avium* (MAA) y *M. avium subsp. paratuberculosis* (MAP), más tarde dos subespecies fueron propuestas, *M. avium subsp. hominissuis* (MAH) y *M. avium subsp. silvaticum* (MAS) [1].

Al menos cuatro principales secuencias de inserción han sido descritas en el genoma de *M. avium*, de las cuales solo dos se han encontrado en *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis*; IS1311 y IS900. Basado en polimorfismos de estas secuencias de inserción, los organismos MAP fueron principalmente clasificados en dos grupos que parcialmente reflejan su especificidad por un hospedero: Tipo S (Oveja) designado también como tipo I, el cual es prevalente en ovejas, mientras que el tipo C (Ganado vacuno) también conocido como tipo II que representa el grupo más ampliamente recuperado de varios hospederos usualmente ganado vacuno y cabras. Se detectó recientemente un subtipo del tipo I que ha sido nombrado como tipo III o intermediario y un segundo tipo llamado tipo B (Bisonte) del cual derivan dos cepas catalogadas recientemente como cepa del tipo Bisonte Americano y cepa del tipo Bisonte Indio, el cual tiene una amplia gama de hospederos y es altamente patógeno [1].

El elemento IS1311 es una secuencia de inserción de 1317 pares de bases, presente en todas las subespecies de *M. avium*. Mientras que la secuencia de inserción IS900, originalmente encontrada en aislamientos de pacientes humanos con la enfermedad de Crohn, es un elemento de 1451 pares de bases considerado único para MAP, aunque raramente se ha encontrado en otras micobacterias. Esta secuencia de inserción provee un marcador altamente específico para la identificación precisa de MAP. Otros polimorfismos como los de secuencia larga (LSP) y repeticiones en tándem sobre todo secuencias minisatélite han permitido proponer diferentes modelos de evolución para *M. avium*, la hipótesis sugerida por Bannantine y colab. (2012) propone que MAH es la cepa progenitora, seguido por MAP de origen ovino, que da origen a MAP de linaje vacuno para

subsecuentemente evolucionar a MAP aislada de bisonte en sus dos tipos; Bisonte Americano y bisonte de la India. En ese mismo modelo evolutivo se plantea MAA y MAS como ramas evolutivas directamente de MAH [1].

## 1.2 Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP)

MAP es un patógeno intracelular facultativo, Gram positivo, ácido alcohol resistente, aerobio y cuya temperatura óptima de crecimiento es 37°C. Es una bacteria de crecimiento lento, con un tiempo de generación mayor a 20 h, requiere varias semanas de incubación antes de que las colonias sean detectables en los medios de cultivo. Como característica específica de esta especie destacan su dependencia del sideróforo micobactina para el crecimiento in vitro [2].

*Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* tiene la capacidad de infectar a un gran número de especies animales, también se le ha encontrado infectando protozoos para sobrevivir a las condiciones del medio ambiente [2]. MAP tiene una amplia distribución en el mundo debido a su desprendimiento en heces, la ruta de transmisión más frecuente es la vía oro-fecal, a través del pastizal, la leche y el agua contaminada con heces de animales asintomáticos y clínicamente enfermos, sin embargo, la transmisión vertical a través de la placenta y el semen también se ha sugerido [1]. La supervivencia intracelular de MAP se le atribuye a su capacidad para alterar la maduración del fagosoma dentro del macrófago, evitando su acidificación progresiva y su fusión con los lisosomas [2].

## 1.3 Paratuberculosis: Enfermedad de Johne.

La paratuberculosis bovina o enfermedad de Johne se caracteriza por una lesión intestinal crónica proliferativa que tiene como agente causal la bacteria *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*. Esta patología consiste en una enteritis crónica y linfadenopatía mesentérica, que cursa con signos histológicos en mucosa tales como formación de granulomas dispersos que se localizan generalmente a nivel del íleon o en la zona adyacente del colon [2].

En ganado vacuno la infección por MAP comúnmente ocurre en terneros recién nacidos, por vía oro-fecal. Sin embargo, los síntomas clínicos, incluyendo predominantemente diarrea persistente y pérdida de peso, usualmente aparecen en animales hasta los 3 a 5 años de edad en el animal [3].

En el proceso de infección por MAP se ha propuesto que, el microorganismo cruza del lumen del intestino delgado hacia el sistema linfático a través de las células M epiteliales. La bacteria es captada por macrófagos epiteliales los cuales una vez activados, inducen la activación de las células T y la expansión clonal, dando paso a la respuesta inmune. La infección por *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* parece seguir patrones observados en infecciones por *M. lepreae*, *M. bovis* o *M. tuberculosis*. Estos patrones implican una respuesta inicial TH1 caracterizada por un infiltrado tisular distinguido principalmente por linfocitos con pocos o ningún organismo detectable, respuesta que parece ser predominante durante la etapa subclínica de la infección por MAP. La fase subclínica de la infección puede perdurar por meses o años, ya que los bacilos se encuentran contenidos dentro de macrófagos y granulomas microscópicos. La memoria continua de células T y su respuesta es requerida para mantener esos granulomas, contener la diseminación de la bacteria y minimizar el daño tisular [4].

Los animales típicamente comienzan a exhibir signos clínicos no específicos, tales como pérdida de peso, y diarrea, cuando entran en la etapa TH2 o lepromatosa de la infección, aun no se conoce qué desencadena esta transición. La afluencia de células inflamatorias causa un engrosamiento de la pared intestinal comprometiendo su funcionalidad, conduciendo a una enteropatía por malabsorción y pérdida de proteínas. En esta fase de la infección, MAP puede diseminarse dentro del tracto gastrointestinal y hacia otros órganos, tal como lo muestran las lesiones compuestas por macrófagos infiltrados, cargados con microorganismos, en riñón, hígado, glándula mamaria, etc. Los animales clínicamente afectados en esta fase de la enfermedad de Johne usualmente sucumben a la infección en pocas semanas [4].

La paratuberculosis en animales por si misma tiene un impacto económico para el sector pecuario, debido a sus consecuencias en la disminución de la producción de leche, la disminución del valor comercial del ganado enfermo y la eventual muerte del mismo [2]. Su ocurrencia es mundial con tasas de prevalencia que oscilan entre un 7% y un 55% en Europa; 40% en los Estados Unidos de América, donde la tasa de positividad guarda una estrecha correlación con el tamaño del rebaño. En Australia, las tasas de infección declarada fluctúan entre un 9 y un 22%. Latinoamérica no escapa a la problemática, aunque no dispone de caracterización epidemiológica, cifras oficiales, ni programas de control. Sin embargo, algunas investigaciones basadas en la técnica de inmunoensayo enzimático (ELISA, por sus siglas en inglés) revelan tasas de positividad elevadas. En Argentina, 18,8% en fincas lecheras y 6,8% de hatos de carne; En Guanajuato, México, se encontró un 28,7%

de explotaciones con animales positivos [5]. Esta enfermedad causa importantes pérdidas económicas directas por la disminución de producción de leche o carne. Mediante estudios realizados en otros países, se estimó que la reducción en la producción de leche se aproximaría a un 4% del rendimiento total, sin embargo, investigaciones realizadas en INTA, Argentina, estimaron que esta disminución alcanzaría hasta un 19% [6]. Un estudio reciente estimó que el 21% de los rebaños lecheros de Estados Unidos están infectados, lo que resulta en considerables pérdidas económicas para la industria láctea por un total de más de \$ 200 millones al año [7].

#### 1.4 Enfermedad de Crohn y su relación con MAP

Desde 1913 fue sugerida una posible asociación entre *M. avium subsp. paratuberculosis* y la enfermedad de Crohn (EC) en humanos, cuando se encontraron similitudes patológicas y sintomatológicas entre humanos y animales con enfermedad de Johne [6].

La enfermedad de Crohn (EC) es un desorden sistémico que afecta a los humanos y causa principalmente la inflamación crónica del intestino, con una apariencia macroscópica similar a la que se observa en bovinos con paratuberculosis lo cual hace suponer una asociación causal de MAP para ambas patologías. La patogénesis de esta enfermedad es compleja y parece ser multifactorial. [2,6].

La comparación de las secuencias de genomas de MAP aislada en humanos y animales demostró una relación filogenética basada en polimorfismos de un solo nucleótido que proporcionan evidencia de una transmisión zoonótica de animales domésticos a humanos [1]. Los antecedentes bibliográficos citan que, en casos clínicos de pacientes con EC se ha detectado DNA de *M. avium subsp. paratuberculosis* por medio de PCR en el 90% de los casos estudiados, por hibridación in situ en el 70% de los casos, y por RT-PCR (RNA) en el 100% de los casos. Por otro lado, *M. avium subsp. paratuberculosis* ha sido cultivado en enfermos de Crohn en heces, tejido intestinal y en muestras de sangre periférica [6].

La enfermedad de Crohn es una enfermedad intestinal inflamatoria transmural en la cual se presenta un trastorno de la permeabilidad intestinal provocando mala absorción y desnutrición. Se han observado lesiones granulomatosas presentes en el 30% de las biopsias de pacientes con enfermedad de Crohn con lo cual se ha convertido en un signo característico de utilidad para el diagnóstico diferencial con otras enfermedades intestinales inflamatorias [2].

Se ha desarrollado la hipótesis de que MAP es un posible agente causal de la enfermedad de Crohn debido a su identificación a partir del aislamiento directo del patógeno desde los tejidos afectados en pacientes con esta enfermedad y a las similitudes fisiológicas de las lesiones ocasionadas. La asociación MAP-EC está fundamentada en tres aspectos que establecen un vínculo entre MAP y la enfermedad de Crohn, mismos que se describen a continuación.

1. La incidencia de ambas enfermedades, tanto para la enfermedad de Crohn como para la paratuberculosis bovina, es creciente desde que ambas enfermedades fueron descritas, teniendo zonas geográficas en común.
2. La identificación de pacientes afectados por la enfermedad de Crohn, infectados simultáneamente por MAP.
3. MAP se caracteriza por presentar una respuesta inflamatoria desencadenando una enfermedad crónica.

Aun con las evidencias que podrían vincular ambas enfermedades la aceptación de dicha hipótesis continúa aun en discusión esto debido a que existen estudios en los que no se ha detectado MAP en personas afectadas por la enfermedad de Crohn y a que aún se desconoce el papel específico que tendría la bacteria en el desarrollo de la patología [2].

Independientemente de su asociación como agente causal de la enfermedad de Crohn, MAP se ha encontrado infectando al ser humano, lo cual sugiere una infección zoonótica que puede ser consecuencia de distintas vías de transmisión. La leche y otros derivados lácteos constituyen el principal riesgo para la transmisión de la bacteria, aun cuando la pasteurización disminuye considerablemente el riesgo este no se elimina completamente debido a la característica pared bacteriana de MAP, la contaminación también puede deberse en segundo plano a la ingesta de otros tipos de alimentos como carnes bovinas, además de encontrarse en aguas de superficie y en la tierra [2].

### 1.5 Diagnóstico de MAP

Existen dos métodos básicos para el diagnóstico de la paratuberculosis; Buscar directamente el agente causal de la enfermedad (*M. avium subsp. paratuberculosis*) o buscar indicadores de la respuesta inmunológica a la infección (citosinas, anticuerpos o lesiones intestinales características). Dada la patogénesis de la enfermedad, con el estadio final o producción intermitente de signos inmunológicos detectables de la infección, un resultado positivo proporciona el más útil dato

diagnóstico. Un resultado negativo no significa que el animal es libre de la infección, es probable que la muestra recolectada no contiene el analito en cuestión [4].

Una tinción ácida directa de muestra fecal puede revelar bacilos micobacteriales, pero la sensibilidad de este método es baja. Un frotis de impresión de diapositivas de tejido colectado de necropsia o biopsia del íleon y nodos linfáticos mesentéricos pueden ser útiles si son teñidos con una tinción ácida, tinción de Ziehl-Neelsen, por ejemplo, es una prueba rápida y económica sin embargo la detección de formas paucibacilares es poco probable en esta técnica [4].

La prueba de elección para la identificación de MAP es el cultivo bacteriológico de heces o tejido lesionado, aunque requiere un periodo de tiempo prolongado para su interpretación (12 o 16 semanas) y requiere de medios altamente enriquecidos. La sensibilidad del ensayo puede variar ya que algunas cepas de MAP son más difíciles de aislar que otras. Debido a que otras especies de Micobacterias pueden encontrarse en muestras fecales, todos los aislamientos deben ser confirmados con el test de dependencia de micobactina, el cual se basa en el crecimiento en un medio suplementado únicamente con micobactina [2,4].

Hay dos métodos básicos para el cultivo convencional de MAP en un medio sólido: el método en el que se emplea ácido oxálico y NaOH para la descontaminación y el medio Löwenstein–Jensen (LJ) para el crecimiento, y el método en el que se emplea cloruro de hexadecilpiridinio (HPC) para la descontaminación en combinación con el medio de yema de huevo de Herrold (HEYM) para el crecimiento. Además, existe una técnica de cultivo radiométrico mediante la cual el crecimiento en medio líquido BACTEC™ 12B (Middlebrook 7H12) suplementado con yema de huevo se mide por la liberación de  $^{14}\text{CO}_2$  radioactivo a partir de palmitato como consecuencia del metabolismo bacteriano. Con este método se reduce el tiempo necesario para obtener resultados y se considera más sensible que los métodos de cultivo convencionales [8]

Existen técnicas de detección del material genético, hibridación in situ y PCR en donde la secuencia de inserción IS900 es el principal blanco de amplificación permitiendo resultados de alta sensibilidad, convirtiéndolo en el biomarcador de elección, sin embargo, existe la desventaja de que esta técnica es incapaz de diferenciar células viables de células muertas. Desde luego la selección de la muestra juega un papel fundamental considerando la distribución heterogénea de la bacteria en el tejido [2].

## 1.6 Control y tratamiento.

No existe tratamiento satisfactorio para la paratuberculosis, debido a las lesiones generadas por esta bacteria, el engrosamiento de la pared intestinal no se modifica. Teóricamente, algunas combinaciones de antibióticos podrían ser exitosas, siendo de elección aquellos utilizados en el tratamiento de la tuberculosis humana como isoniazida o rifampicina, sin embargo, se requiere un tratamiento a largo plazo y es probable que no sea económicamente viable. Además, *M. avium subsp. paratuberculosis* es sensible a relativamente pocos fármacos, y la posibilidad de una recuperación completa es baja debido a que las lesiones son irreversibles [9,10].

Una razón para no recomendar el tratamiento de la enfermedad, es que se tendrían que utilizar los antibióticos de uso humano por periodos prolongados, lo provocaría que la leche proveniente de las vacas tratadas vaya a consumo humano, y atente contra la inocuidad alimentaria [9].

La prevención y el control de la paratuberculosis resulta ser la mejor arma contra esta enfermedad. Controlar la enfermedad en un rebaño infectado no es tarea fácil, es de vital importancia realizar la detección temprana de la enfermedad, eliminar el ganado infectado y proteger a los terneros recién nacidos de las heces y leche contaminada. No existe ningún medicamento para el tratamiento, vacuna o protección contra la enfermedad de Johne. Para controlar la enfermedad, se deberán de realizar las siguientes prácticas de control: Realizar una prueba de ELISA a todo el ganado mayor a dos meses, realizar cultivos de heces de todo el ganado adulto con intervalos de 6 meses, eliminar vacas y toros infectados, proporcionar áreas de maternidad limpias, alimentar con calostro de vacas negativas y saludables, y tomar medidas que eviten la contaminación fecal de alimentos y agua [9].

## 1.7 Hierro como micronutriente.

Los metales como micronutrientes son componentes necesarios de las proteínas, siendo más comunes los cofactores inorgánicos;  $Mg^{+2}$ ,  $Zn^{+2}$ ,  $Mn^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$  y  $Fe^{+2}$ . Junto con el Zinc y el magnesio, el hierro es requerido para el crecimiento de casi todos los microorganismos con la excepción de algunos lactobacilos y *Borrelia* [11].

Es generalmente aceptado que el hierro es el más importante micronutriente utilizado por las bacterias [12]. El hierro es un elemento que participa en la modulación de la respuesta inmune del hospedero contra patógenos mediante la regulación de sus concentraciones en las células del

sistema inmune y el medio externo. Durante el proceso infeccioso los microorganismos utilizan varias estrategias para adquirir competitivamente el hierro del ambiente interno del hospedero [13].

En el cuerpo, el hierro es almacenado principalmente en ferritina y hemosiderina mientras la mayoría del hierro funcional está unido a la hemoglobina. Hay muchas otras moléculas para almacenamiento de hierro, como lactoferrina y transferrina, las cuales secuestran el hierro de las superficies mucosas y dentro del sistema circulatorio, y han demostrado ser fuentes de hierro para algunos patógenos [14].

En un esfuerzo por limitar la disponibilidad del hierro para los patógenos durante una infección, el huésped disminuye la absorción de hierro en el intestino, a través de moléculas como la hepcidina, incrementa la producción de moléculas de almacenamiento de hierro, y cambia el hierro del plasma hacia las moléculas de almacenamiento. Incluso las moléculas almacenadoras de hierro son posicionadas en áreas que, probablemente, son sitios de infección [14]. Por ejemplo, la fagocitosis del patógeno intracelular *S. typhimurium* por macrófagos mejora la expresión de la proteína exportadora de  $\text{Fe}^{+2}$ , Ferroportina, la cual limita el  $\text{Fe}^{+2}$  disponible durante la residencia intracelular de *S. typhimurium* [15].

La activación de células innatas por PAMPs inicia la síntesis de grandes cantidades de proteínas secuestrantes del  $\text{Fe}^{+2}$  para limitar la disponibilidad del hierro para el patógeno, de este modo el huésped es capaz de remover inmediatamente el hierro de aquellos sitios donde el patógeno es detectado, en un proceso denominado “inmunidad nutricional” [14,15].

Con la finalidad de adquirir hierro en ambientes donde este metal es limitado, las bacterias sintetizan y secretan compuestos de bajo peso molecular llamados sideróforos, los cuales tienen una elevada afinidad para la unión a  $\text{Fe}^{+3}$ , actuando como un quelante específico. La mayoría de los sideróforos son producidos por la vía de síntesis de péptidos no ribosomales (NRPS, por sus siglas en inglés), un ejemplo es el sideróforo enteroquelina (enterobactina). La aerobactina es un ejemplo de sideróforo no producido por la ruta NRPS. La síntesis de estos sideróforos incrementa en ambientes donde las concentraciones de hierro son escasas; en esta condición se sintetizan proteínas de membrana externa (OMPs) reguladas por hierro (IROMPs) que funcionan como receptores para complejos sideróforo-hierro, o captan hierro mediante receptores de transferrina, lactoferrina, ovotransferrina, hemina y hemoglobina. El Hierro unido al sideróforo es subsecuentemente transportado al interior de la célula para satisfacer los requerimientos de  $\text{Fe}^{+2}$

[13, 15]. Algunos de estos sistemas de alta afinidad de captación del hierro son importantes factores de virulencia en la bacteria que infecta el fluido o tejido animal ya que les permite quelar el metal unido a las proteínas del huésped [12].

Por otro lado, un exceso de hierro es tóxico ya que cataliza la reacción de Fenton y la formación de especies activas de oxígeno. La captación de hierro por lo tanto debe ser delicadamente regulada. Considerando que no se conocen mecanismos de excreción para el hierro en bacterias, estos microorganismos parecen controlar la homeostasis del hierro, regulando su transporte a través de la membrana [12]. Estos microorganismos regulan el hierro intracelular mediante proteínas de membrana, evitando así la toxicidad de las elevadas concentraciones de hierro en su citoplasma celular, no se han descrito hasta la fecha bombas de excreción para el hierro [13].

La proteína Fur o proteína reguladora de la captación del hierro es un polipéptido de aproximadamente 17 kDa que actúa como represor transcripcional de promotores regulados por hierro, en donde el Fe(II) actúa como co-represor. Bajo condiciones ricas en hierro, Fur se une al ión divalente y forma el complejo Fe(II)-Fur, adquiriendo una configuración capaz de unirse a secuencias blanco de DNA, conocidas como cajas Fur o cajas de hierro, inhibiendo la transcripción de genes regulados por Fur. Por el contrario, cuando el hierro es escaso, disminuye el complejo Fe(II)-Fur y se liberan regiones operadoras reguladas por hierro permitiendo que la RNA polimerasa acceda a promotores de genes para la biosíntesis de sideróforos y otras funciones reguladas por hierro, permitiendo su expresión [13].

La regulación de la expresión del gen *fur* es muy compleja, ya que es auto-regulable y está sujeta a represión catabólica, con lo que se liga su expresión al metabolismo de la célula, y además es regulada también por la respuesta al estrés oxidativo [13].

## II. INTRODUCCION

### 2.1 Proteína Fur.

La proteína reguladora de la absorción férrica conocida como Fur (Ferric Uptake Regulatory) se encarga de la regulación, en respuesta a los niveles intracelulares de hierro, de una variedad de genes, como se ha observado en *Escherichia coli* como modelo, incluyendo aquellos encargados de la captación del hierro. Se ha mostrado también que Fur regula otros genes que no están directamente relacionados con el hierro, tal como los que codifican para hemolisina, toxinas y superóxido dismutasas entre otros [16].

Análisis bioquímicos y de secuencia se realizaron para mostrar que Fur es conservada a través de un amplio rango de especies bacterianas. Fur es una pequeña proteína reguladora con una masa molecular de 15 a 17 kDa y aproximadamente 150 aminoácidos que funciona como un dímero, utiliza Fe (II) como co-factor y contiene 12 residuos de Histidina y 4 residuos de Cisteína. Estos residuos han sido identificados como probables candidatos para la coordinación de la proteína con el metal, sin embargo, el sitio de unión del metal en Fur es aun controversial [14, 16]. Estudios de resonancia magnética nuclear paramagnética sugieren una coordinación de histidinas y carboxilato al ion Mn (II) el cual se ha asumido se une al sitio putativo de Fe (II) en Fur [16]

Los promotores de genes para la captación de hierro son negativamente regulados por Fur, una baja concentración de hierro en el medio resulta en una des-represión, mientras que altas concentraciones de hierro resultan en una represión dependiente de Fur. Basado en evidencias de ensayos acoplados de transcripción y traducción in vitro se ha propuesto que la proteína metaloreguladora, Fur, actúa como un clásico regulador en el cual Fe(II) es requerido como cofactor para la unión al DNA. Se ha propuesto también que Fur no se une al DNA en ausencia de iones metálicos divalentes [16]. El modelo aceptado de la represión mediada por Fur de los genes metaloregulados establece que, bajo condiciones ricas en hierro, Fur une el ion divalente y adquiere una configuración capaz de unirse a la secuencia de DNA blanco e inhibir la transcripción de prácticamente todos los genes y operones reprimidos por el metal. La proteína Fur parece ser un dímero en solución independientemente de la presencia o ausencia de Fe<sup>+2</sup> [12].

Fur le da nombre a una superfamilia de sensores metálicos que regulan la transcripción de genes conectados a la homeostasis de metales y a la respuesta contra el estrés oxidativo. Además de Fur,

la familia FUR de metaloreguladores incluye Zur (captación de zinc), Mur (captación de manganeso), Nur (Captación de níquel), PerR (Respuesta al estrés por peróxido) y el regulador sensible al hierro dependiente de hemo (Irr). La familia de proteínas FUR está presente en procariontes [11].

Un modelo simplificado del mecanismo más común encontrado en proteínas Fur consiste en su unión específica como dímero a una secuencia palindrómica rica en A/T encontrada en los promotores de su DNA blanco utilizando un cofactor metálico como co-represor. La coordinación con este co-represor causa un cambio conformacional del regulador, que promueve y estabiliza su interacción con el DNA. Aunque existen importantes diferencias mecánicas entre ellas, las proteínas FUR comparten un plegamiento en común de 120 aminoácidos de largo en promedio y están compuestas por un dominio de unión a DNA en el extremo N-terminal y un sitio regulatorio de unión al metal, que se localiza en extremo C-terminal de la proteína que también permite la dimerización. Usualmente, los miembros de esta superfamilia de proteínas son reconocidos por su motivo rico en histidinas HHHXHX<sub>2</sub>CX<sub>2</sub>C localizado en el inicio del dominio de dimerización, luego de la región de bisagra presente entre el dominio de unión al DNA y el C-terminal [11].

El tipo de regulación descrito para Fur podría también ser aplicable a otros represores dependientes de metal. Al igual que el hierro, el zinc es un elemento que, dependiendo de sus concentraciones, puede ser un micronutriente esencial o un potente tóxico. La captación de este metal es regulada por la proteína Zur en combinación con zinc, parecido al fenómeno discutido para Fur. Poco es conocido acerca de mecanismos de represión de Zur, pero algunas secuencias de unión a estas proteínas se han descrito en promotores de genes relacionados a la captación de Zn y se ha observado, son similares a las cajas Fur. Algunas proteínas inicialmente clasificadas como Fur homólogas son ciertamente más similares a Zur que a Fur y quizás podrían ser reclasificadas como reguladores de la captación del zinc. Además, el hecho de que Fur ha sido recientemente definido como una zinc-metaloproteína que contiene un ion estructural de Zn<sup>+2</sup> por polipéptido, establece una relación entre estas dos proteínas aún más compleja [12].

## 2.2 Caja Fur

Ensayos utilizando el promotor de aerobactina de *E. coli* definieron la secuencia consenso de 19 pares de bases, 5'GATAATGATAATCATTATC3', como la caja de hierro o caja Fur utilizada por la proteína Fur cargada con hierro para reprimir este operón. En un punto posterior, el alineamiento

de secuencias de una colección de más de 30 promotores controlados por hierro, de varios orígenes, confirmó que esta secuencia era el blanco funcional de la proteína Fur [11,12].

La secuencia blanco de la caja de hierro podría ser interpretada como un palíndromo formado por dos repeticiones invertidas de nueve pares de bases 5'GATAATGAT3' separados por uno impar. Pero interesantemente la misma secuencia de 19 pares de bases puede ser vista como una combinación de tres repeticiones adyacentes, 5'NATA/TAT3'. Es plausible que la secuencia consenso pudiera ser reconocida por Fur como tres repeticiones de 6 pares de bases, en lugar de un palíndromo de 19 pares de bases, como se observa en modelos clásicos de interacción Fur-DNA. Se ha observado en diversos estudios que mientras se requiere un mínimo de tres repeticiones para producir un sitio de unión a Fur, su orientación relativa y su número puede no tener importancia. El hexámero NATA/TAT parecer ser la unidad de la interacción con Fur en el sitio de unión, aunque solo la suma de al menos tres unidades puede dotar al complejo suficiente fuerza y especificidad para ser completamente funcional. La interacción Fur-DNA podría, por lo tanto, ser completamente diferente del clásico modelo de Lac I, o proteínas activadoras de genes catabólicos, en los que una proteína dimérica (o tetraédrica) se une a una secuencia palindrómica. Por otro lado, muchos promotores regulados por hierro parecen no tener solo una caja Fur si no múltiples, algunas veces traslapadas lo cual es altamente compatible con el modelo dímero-palíndromo. Adicional a esto, parece ser que Fur se envuelve helicoidalmente alrededor del DNA [12].

Se observó en diversos estudios que la gama de afinidades por el sitio de unión al DNA funcional podría estar formado por la adición de discretas extensiones GATAAT a secuencias de reconocimiento mínimo, permitiendo así la unión y polimerización del regulador sobre su DNA blanco. En todos los casos las cajas de hierro tienen un alto contenido de regiones ricas en A/T [11].

En algunos casos, adicional a la secuencia de la caja Fur, el regulador requiere otro motivo estructural en el sitio de unión al DNA para una óptima interacción. Es interesante que solo pequeñas diferencias entre sitios de unión de diferentes proteínas FUR en la misma bacteria han sido observados. A pesar de las diferencias encontradas, hay suficiente información para distinguir entre cajas Fur, PerR y Zur [11].

### 2.3 Mecanismos de represión y activación por Fur.

#### *Represión clásica de hierro unido a Fur.*

Tal como el hierro comienza a incrementar su disponibilidad en la célula bacteriana, el co-factor Fe(II) se une a monómeros apo-Fur, y este monómero unido a hierro dimeriza. El dímero Fur unido a hierro reprime la transcripción uniéndose a la caja Fur en su promotor blanco y bloqueando la unión de la RNA polimerasa evitando la transcripción de los genes relacionados.

Aunque la caja Fur de *E. coli* es usada como estándar para comparar otras secuencias de unión a Fur, esta secuencia no es claramente conservada en todos los organismos que exhiben una regulación por Fur, un ejemplo es *B. subtilis* cuya caja Fur es una repetición invertida de 15 pares de bases en una configuración 7-1-7. [14]

#### *Apo-represión*

Actualmente, *H. pylori* es único en la utilización de Fur como un represor aun cuando hay ausencia de Fe(II) como co-factor, este fenómeno se conoce como regulación por apo-Fur. Bajo condiciones de agotamiento de hierro, Fur se encuentra en su forma apo-Fur, en esta forma Fur se une a la caja de hierro de su promotor blanco. Esa unión bloquea la unión de la RNA polimerasa, por lo tanto, la transcripción es reprimida [14].

La expresión de la molécula de almacenamiento de hierro Pfr es regulada por apo-Fur. Otro blanco de apo-Fur confirmado es *sodB*. Se ha demostrado, la unión de Fur a *sodB* en ausencia de hierro. *sodB* tiene solo un sitio de unión a Fur, a diferencia de *pfr* que tiene 3 sitios. El debate se centra alrededor de si Fur podría o no encontrarse no unido al hierro in vitro [14].

Se ha asumido que Fur principalmente trabaja como un represor transcripcional uniéndose directamente como Fe<sup>+2</sup>-Fur a elementos regulatorios de sus genes blanco. Sin embargo, existe evidencia que indica que Fur modula la transcripción de genes permitiendo tanto la represión como la activación por diferentes mecanismos. Estudios proveen evidencia de que la activación por Fur es un mecanismo extenso en procariontes con diferentes requerimientos fisiológicos y metabólicos [11].

La activación por la proteína Fur unida a hierro puede tener lugar por diferentes mecanismos, mismos que en algunos casos no están bien definidos. La activación podría ser resultado de una competencia entre Fur y otro represor por la unión al DNA. Sin embargo, la iniciación directa de la transcripción por Fur ha sido sugerida en la mayoría de los casos. Ensayos transcripcionales y

comparativos utilizando proteína Fur mutante con una delección en *N. meningitidis* llevo a la identificación de 38 genes activados por Fur [11].

#### *Mecanismo de activación por Fur dependiente de ryhB.*

Fur es requerido para la expresión de muchas proteínas dentro del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA, por sus siglas en inglés) y la superóxido dismutasa dependiente de  $Fe^{+2}$  (SodB). La ruptura del ciclo del ácido tricarboxílico en mutantes fur podría tener un rol relevante en la regulación de la virulencia, ya que mutaciones en el ciclo TCA alteran la expresión de la virulencia en *Staphylococcus epidermidis* y *Vibrio cholera*. El mecanismo molecular para la activación positiva de Fur en el ciclo TCA y SodB fue inexplicable hasta que se determinó la importancia de un pequeño RNA no traducido (sRNA) llamado *ryhB* en la activación por Fur. *ryhB* se une por medio de un RNA chaperón al mRNA blanco *sodB* (FeSOD), este sRNA reduce la vida media del mRNA de *sodB* y reduce la proteína SodB dentro de la célula. Fur activado en presencia de cantidades adecuadas de  $Fe^{+2}$  reprime la transcripción de *ryhB*, con lo cual incrementa la vida media de mRNA de *sodB*, mejorando la producción de la proteína y la actividad de FeSOD, de modo que Fur es indirectamente requerido para la expresión de FeSOD. La delección de *ryhB* en un incremento de fur resulta en la restauración de la expresión de proteínas TCA y SodB [15].

La regulación positiva indirecta por Fur a través de regulación negativa del regulador negativo, *ryhB*, es el mecanismo molecular más estudiado para la activación dependiente de  $Fe^{+2}$  de la expresión de genes. [18]. La identificación de 38 RNA's reguladores indica que su participación es un mecanismo comúnmente utilizado [11].

#### *Mecanismo de activación por Fur a través de reclutamiento RNA polimerasa.*

Los genes activados por Fur contienen cajas Fur localizadas aproximadamente 100 pares de bases antes del sitio de inicio de la transcripción, mientras que los genes reprimidos por Fur contienen cajas Fur que se superponen con los sitios de unión a la RNA polimerasa (RNAP). En *Helicobacter pylori*, Fur activa la expresión de *oorB*, el cual codifica dos oxidoreductasas aceptoras 2-oxoglutarato, por medio de la unión directa a elementos cis-regulatorios localizados 130 pares de bases antes del sitio de inicio de transcripción. En *V. cholera*, Fur activa la expresión de la porina de membrana externa, *ompT*, por medio de la unión a una caja Fur localizada 90 pares de bases antes del inicio del sitio de transcripción [15].

Importantemente, la secuencia del sitio de la caja Fur para genes activados es virtualmente idéntica a la caja de Fur para genes reprimidos. Colectivamente, evidencia molecular sugiere que la ubicación de la caja Fur en proximidad al sitio de unión a RNAP determina la habilidad de Fur para activar los genes de expresión. Experimentos de transcripción in vitro demuestran que Fur puede activar la transcripción de un gen blanco aun cuando la caja Fur está ubicada 100 – 200 pares de bases antes del sitio de inicio de la transcripción. Este ejemplo de activación por Fur es raro, pero podría involucrar un reclutamiento mejorado de RNAP al promotor de genes blanco [15].

Los activadores transcripcionales que se unen antes del sitio de unión al RNAP han demostrado interactuar con el dominio C-terminal de la subunidad alfa (alfa-CTD) de RNAP, lo cual promueve la transcripción del gen blanco. El contacto entre activadores y la alfa-CTD es inhibido cuando el sitio de unión del activador se encuentra a más de 100 pares de bases antes del sitio de inicio de la transcripción. De modo que, el factor de transcripción que se una a un sitio localizado más allá de 100 pares de bases es poco probable que logre interactuar físicamente con la alfa-CTD de RNAP. Sin embargo, se sabe que puede ocurrir la oligomerización de la proteína Fur en el sitio de la caja Fur, lo cual sugiere que las proteínas Fur pueden extenderse para interactuar con otras proteínas cercanas [15].

#### *Mecanismo de activación por Fur a través de anti-represor*

Se ha observado que Fur se une a un sitio regulador distal antes del sitio de unión a RNAP en el promotor de *ftnA* para remover físicamente la proteína similar a la histona, H-NS, la cual modula la represión de *ftnA*. H-NS reprime la transcripción de *ftnA* y Fur es únicamente requerido para liberar esta represión. El rol de Fur como un anti-represor en la activación de *ftnA* es respaldado por dos evidencias in vivo: 1) Fur no es requerido para la expresión de *ftnA* en ausencia de *hns*; y 2) la expresión de *ftnA* no es reducida por quelación de  $Fe^{+2}$  en un incremento de *hns* [15].

La activación de expresión de genes por Fur a través de este modelo representa un tercer tipo de activación, el mecanismo de activación por anti-represión. Evidencia in vivo sostiene el modelo de anti-represión con el principal mecanismo de activación dependiente de Fur para la expresión de genes [15]

Fur puede actuar como un represor o activador y funcionar con o sin hierro como co-factor. Dímeros de Fur unidos a hierro son formados bajo condiciones de abundancia de hierro, y estos dímeros se unen a la caja de hierro en sus respectivos promotores blanco y activan la transcripción

del gen. Por otro lado, bajo condiciones escasas de hierro se forma un dímero apo-Fur, este dímero apo-fur se une a la caja hierro en su promotor blanco y activa la transcripción de genes. Mientras el mecanismo de la regulación de Fur unido a hierro es bien comprendido, comparativamente poco se conoce sobre la regulación por apo-Fur. Por ejemplo, no se conoce aún si apo-Fur funciona como monómero o dímero. Aunque apo-Fur ha demostrado unirse directamente a promotores blanco in vitro, y datos transcripcionales in vivo indican represión solo en ausencia de hierro, hasta ahora, la represión por apo-Fur mantiene un mecanismo de acción altamente debatido [14].

En *H. pylori*, *sodB* es directamente reprimida por Fur en ausencia de hierro, es decir en su forma apo-Fur. En la actualidad únicamente se ha descubierto un organismo que utiliza Fur en todas sus diferentes formas, *H. pylori* [14].

Un gran número de genes para la captación de hierro han mostrado ser reguladas por Fur tanto en bacterias Gram negativas como en Gram positivos, como es el caso de *Bacillus subtilis* en donde el sistema mejor caracterizado incluye el sideróforo catecolato, *dhb*, y un gen involucrado en el transporte de ferrihidroximato, *fhuD*. En *P. aeruginosa*, Fur regula la producción de los sideróforos pioverdina y pioquelina. Un sistema de transporte de sideróforo (*sir*) y el operón de captación de ferricromo (*fhu*) son también regulados por Fur en *Staphylococcus aureus*. Fur regula también, genes involucrados en la adquisición de hierro de las únicas fuentes del huésped, como hemo y transferrina. En *V. vulnificus* Fur regula *hupA*, un gen para la utilización de hemo, mientras que el agente causal del chancro humano, *Haemophilus ducreyi*, utiliza Fur para controlar la expresión de *hgbA*, el cual codifica una proteína involucrada en la unión a hemoglobina [14].

#### 2.4 Proteína Fur multifuncional.

Se ha sugerido que Fur puede tener diferentes roles en distintas especies debido a la observación de que el gen es esencial en *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Vibrio anguillarum*, pero no en *E. coli*, *Bacillus*, *Yersinia* o *Vibrio cholerae*. Una gran variedad de genes controlados por este regulador, han sido revelados a través del uso de ingeniosas técnicas genéticas y bioquímicas, el análisis de estos genes regulados por Fur ha revelado que esta proteína participa en funciones no relacionadas directamente con el metabolismo del hierro [12].

### *Estrés oxidativo*

Existe evidencia sustancial in vivo que correlaciona el estrés oxidativo con alteraciones en las concentraciones de hierro libre intracelular, tal como estudios genéticos que muestran como la desregulación de la homeostasis del hierro dirige al estrés oxidativo. El control del metabolismo del hierro y su acoplamiento con la regulación de defensas contra el estrés oxidativo es llevado a cabo por Fur en la mayoría de los organismos procariotas [11].

La defensa enzimática contra ROS (especies reactivas de oxígeno) ocurre por la rápida dismutación del superóxido ( $O_2^-$ ) por las superóxido dismutasas (SODs), que convierten radicales superóxido en oxígeno y peróxido, y la detoxificación de  $H_2O_2$  por la hidroperoxidasas y catalasas, que convierten el peróxido en agua y oxígeno. Fur directamente reprime la transcripción de genes que codifican la MnSOD (*sodA*) e indirectamente activa la expresión de genes que codifican la FeSOD (*SodB*). Ya que la MnSOD es clave en la defensa contra oxígeno tóxico, el significado fisiológico de esta regulación negativa no está claro. En varios organismos, el gen de *kat* que codifica para la enzima catalasa, es regulado por Fur. Fur reprime *katG*, una catalasa-peroxidasa combinada, en *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium smegmatis* y esta regulación se piensa, es universal en todas las especies de *Mycobacterium* [12,14,15]. *Actividad Disulfuro reductasa de FurA en cianobacterias*

El daño oxidativo es particularmente perjudicial para los organismos fotosintéticos. A diferencia de las proteínas Fur caracterizadas hasta la fecha, FurA de *Anabaena sp.* PCC7120 carece de zinc estructural, provocando que su arreglo CXXC se comporte como regulador redox. Esta actividad enzimática, la cual parece ser específica de FurA en cianobacterias, revela la multifuncionalidad de este regulador y su conexión con las rutas de señalización redox [11].

### *Interacción Fur-Hemo.*

Una relación adicional entre Fur y la respuesta al estrés oxidativo es establecido por su interacción funcional con el grupo hemo. El grupo hemo es muy tóxico en su forma libre debido a que cataliza la formación de especies reactivas de oxígeno y es por sí mismo una señal de estrés oxidativo. Fur controla muchos genes involucrados en la captación de hemo y su degradación en la mayoría de las bacterias. En *Anabaena sp.* PCC7120, FurA ha demostrado que la unión de hemo a la proteína en una proporción equimolar provoca la pérdida de su afinidad por el DNA [11].

Más allá del control de la homeostasis del hierro y la respuesta cercanamente relacionada al estrés oxidativo, Fur está involucrada en la regulación de procesos que aparentemente son independientes

del estado del hierro. Existen suficientes datos que evidencian el rol central de Fur en el metabolismo de organismos procariotas a través de la modulación de un gran número de genes involucrados en diferentes funciones en respuesta a diferentes estímulos [11].

#### *Patogénesis/Factores de virulencia*

Fur también juega un rol crucial en la patogénesis, controlando la expresión de factores de virulencia en la interacción huésped-microorganismo [11]. Fur regula numerosos genes que son importantes para la patogénesis de la bacteria. Por ejemplo, en *P. aeruginosa*, Fur ha mostrado estar involucrada en la producción de toxinas, formación de biofilm, y quorum sensing. Aunque el rol que Fur juega en la formación de biofilm en *P. aeruginosa* no es aun caracterizado, se ha mostrado que fur mutante forma biofilms más maduros que el tipo silvestre bajo condiciones limitadas de hierro. Fur está indirectamente involucrada en la regulación de quorum sensing en *P. aeruginosa* a través de la regulación de dos pequeños RNAs no codificantes (sRNAs), *prfF1* y *prfF2*. En cepas uropatógenas y enterohemorrágicas de *E. coli* Fur regula negativamente la adhesina homóloga IrgA (*iha*), mientras que en *E. coli* enterotoxigénica, Fur reprime la expresión de adhesinas fimbriales CFA/I [14].

Esto significa que la contribución de Fur a la virulencia podría no deberse a su rol clásico como represor transcripcional de proteínas para la captación de hierro, si no a su complejo rol como un activador transcripcional de la virulencia, luego de observarse la incapacidad de mutantes *fur* de causar enfermedades dentro del hospedero [15].

#### 2.5 Autorregulación de Fur.

La regulación de Fur es un proceso multifactorial que involucra diferentes señales ambientales, así como la participación de diversos reguladores. Las proteínas FUR son usualmente autorreguladas a través de la presencia de su secuencia blanco correspondiente en sus propios promotores. Sin embargo, muchos otros efectores han sido reportados por influir en el nivel final del regulador activo en la célula.

Usualmente, el estado del hierro influye en la expresión de Fur, aunque hay algunas excepciones, incluyendo las proteínas Fur de *P. aeruginosa*, cuya región reguladora no contiene una secuencia similar a la caja de hierro consenso y los promotores que controlan su transcripción no son inducidos

por hierro. Adicional al control del hierro, cambios oxidativos, bajo pH y la disponibilidad de carbón o nitrógeno son condiciones ambientales que afectan la expresión de Fur [11].

Debido a la cercana conexión entre el hierro y el estrés oxidativo, Fur también es modulado en muchos organismos por reguladores involucrados en el control de genes inducibles por peróxido de hidrogeno, PerR y OxiR. Los regulones PerR y Fur están inter-regulados en *B. subtilis*, donde PerR regula su propia represión y la de Fur. La modificación pos-traducciona de Fur ha sido reportada en cianobacterias y *E. coli*. En el caso de *Anabaena* sp. PCC7120, la unión de hemo a FurA y FurB afecta su interacción con el DNA [11].

Mientras algunos organismos tienen proteínas reguladoras adicionales para regular la expresión de Fur, como la proteína activadora de catabolito en *E. coli*, RpoS en *V. vulnificus*, y NikR en *H. pylori*, la autorregulación de Fur es el mecanismo más conservado [14].

Fur reprime su propia expresión bajo condiciones de abundante hierro. *H. pylori* muestra la más compleja autorregulación de Fur ya que combina tanto la represión clásica por Fur unida a Hierro y la activación por apo-Fur. Existen tres regiones de unión a Fur en el promotor de fur en *H. pylori*. El operador I y II de mayor afinidad están probablemente involucrados en la represión del promotor fur y el tercer operador ha mostrado actuar como un sitio de activación apo-Fur. Este modelo para *H. pylori* de autorregulación de Fur sugiere que, si las concentraciones de Fur descienden a un cierto nivel, la unión de Fur con el operador I y II se pierde, permitiendo que este sitio actúe como un elemento de unión para la RNA polimerasa [14].

Usualmente, más de una proteína FUR con diferentes especializaciones son encontradas en el mismo organismo, siendo bastante común observar una regulación cruzada o solapamiento de los respectivos regulones [11].

## 2.6 Complejo Zinc-Fur

Adicional al sitio de unión al hierro, la purificación de Fur a partir de *Escherichia coli* y *Vibrio anguillarum* mostró la presencia de un átomo de zinc estructural por monómero de Fur, el cual es requerido para estabilizar la forma dimérica de la proteína [11].

Se han caracterizado tres formas de la proteína en base a su unión al zinc; Zn<sub>2</sub>Fur, Zn<sub>1</sub>Fur y apo-Fur y se observó que la unión de Zinc a Fur se correlaciona con un incremento en la afinidad de unión al DNA. Existe suficiente evidencia que permite proponer que la forma nativa de la proteína

Fur encontrada en células, en crecimiento con niveles normales de hierro en el medio, es una zinc-metaloproteína, decir,  $Zn_2Fur$  o  $Zn_1Fur$  [16].

En un estudio realizado por Ellen Wang Althaus y colab. en la Northwestern University en Illinois (1999) se definió la estequiometría de la unión Zn-Fur. Encontraron que la proteína se une a  $2.1 \pm 0.5$  átomos de zinc por monómero, esta estequiometría fue asignada a la forma  $Zn_2Fur$ . Luego de un proceso para la completa remoción de todos los átomos de zinc del complejo Zn-Fur obtuvieron  $0.9 \pm 0.1$  mol de Zinc/mol de Fur en el remanente protéico, definiendo la estequiometria de  $Zn_1Fur$ . En un segundo proceso para la eliminación de zinc empleando urea se obtuvo como resultado  $0.1 \pm 0.1$  mol de Zinc/mol de Fur, reconocida como apo-Fur. Para cada una de estas formas se determinó el peso molecular observándose para  $Zn_2Fur$ ,  $Zn_1Fur$  y apo-Fur un peso molecular aparente ( $M_r$ ) de 48000, 45000 y 32000 respectivamente [16].

Ambas formas,  $Zn_2Fur$  y  $Zn_1Fur$  han demostrado experimentalmente afinidades similares por el DNA con una constante de disociación de  $K_d = 18 \pm 7$  nM y  $K_d = 19 \pm 5$  nM respectivamente. La constante de disociación para la forma apo-Fur,  $K_d = 48 \pm 10$  nM, es notablemente mayor a las otras dos formas de Fur [16].

La unión del zinc a la proteína Fur aparentemente se relaciona con la estabilización de la arquitectura de la proteína. Una vez que el zinc es totalmente removido de la proteína, la conformación y la afinidad de Fur por el DNA parece cambiar tal como lo demuestra la disminución en el peso molecular aparente y la disminución en la afinidad de unión Fur-DNA. La afinidad de apo-Fur por el DNA se ve disminuida a cero mientras que la reconstitución de esta forma con un mol de Zn(II) reestablece la afinidad de la proteína por el DNA. Experimentos que muestran la mejora en la susceptibilidad a contaminación con trazas de proteasa, respalda la idea de que Fur es más inestable sin Zinc. La inestabilidad de apo-Fur puede deberse a varios factores, una hipótesis plantea que la carencia de zinc para estabilizar la conformación activa de Fur le hacen más vulnerable a la contaminación por proteasas, por otro lado, los residuos de cisteína, los cuales están coordinados y protegidos en el interior de la proteína mientras el zinc se encuentra unido, podrían ser mayormente susceptibles a la oxidación en la apo-proteína. [16]

Las observaciones de que la proteína Fur une dos átomos de Zinc por monómero sugiere la existencia de dos sitios separados. Hay al menos dos diferentes sitios de unión de metal en Fur, pero solo uno de los dos sitios es centro de metal fácilmente intercambiable. Diversos experimentos demostraron que el hierro no desplaza el zinc en  $Zn_1Fur$ , sin embargo, la unión de un segundo Zinc

podría tener lugar en el sitio de unión de Fe(II), ya que éste desplaza un Zn(II) en Zn<sub>2</sub>Fur, indicando que el zinc compite en algún grado con el co-represor putativo de Fur, Fe (II) [16].

Otra hipótesis sugiere que, en todos los casos, el sitio de unión en la región de bisagra entre el dominio de unión al DNA y el dominio de dimerización corresponde a un sitio de detección de metal de alta afinidad, llamado sitio 2, que en la proteína Fur al igual que en la proteína PerP, esta unión es penta-coordinada por tres residuos de histidinas y dos ácidos. El zinc estructural, ubicado en el sitio 1, está cerca del C-terminal y usualmente es coordinado por cuatro cisteínas organizados en dos motivos CXXC, mientras que el zinc localizado en el sitio 3 parece jugar un rol en la estabilización de la forma dimérica del regulador y está localizado en el núcleo del dominio de dimerización. Sin embargo, existen importantes diferencias no solo entre Fur parálogos, sino en las estructuras de las mismas proteínas Fur también [11].

No se ha demostrado a la fecha que el zinc tenga un efecto sobre la regulación de la expresión de genes, sin embargo, es cuestionable aun, por qué la unión in vitro del DNA a Fur puede aparentemente ser inducida por una variedad de metales además de Fe(II) cuando la función de ese receptor de Fe(II) es regular los niveles de hierro dentro de la célula. El problema sin resolver en el caso de Fur es como la señal correcta por un cambio intracelular de hierro es distinguible de un cambio en la concentración de zinc intracelular [16].

## 2.7 Genoma de *M. avium* subsp. Paratuberculosis.

El análisis genómico realizado por Lingling Li y colab. mostró que map K-10 tiene una única secuencia circular de 4,829,781 pares de bases, con un contenido de GC del 69.3%. El codón de inicio para el gen *dnaA* fue elegido como punto de inicio para la numeración del genoma. El contenido de G+C es relativamente constante a través del genoma. El análisis reveló solo pocas regiones del genoma con contenido bajo de G+C correspondientes a profagos o secuencias codificantes de RNA [7].

El análisis también identificó 17 copias de la secuencia de inserción IS900, siete copias de IS1311, y tres copias de ISMav2 en el genoma de K-10. Al igual que reveló la presencia de varias secuencias de inserción de las cuales no se han identificado homólogos en otras micobacterias, por ejemplo, ISMAP02, presente en 6 copias en el genoma K-10, y ISMAP04 con 4 copias. Estas nuevas secuencias de inserción descubiertas son de particular interés para su uso como potenciales blancos de diagnóstico [7].

El genoma K-10 contiene 4.350 ORFs con longitudes que van desde 114 hasta 19.155 pares de bases que, en suma, representan el 91,5% del genoma completo. El análisis mostró que un total de 60% de las proteínas putativas en el mapa tenía homólogos a otras proteínas microbianas con funciones conocidas y el 25% eran homólogos de proteínas hipotéticas. Un total de 39 proteínas predichas son exclusivas de MAP, sin homólogos identificables en las bases de datos actuales [7].

Una de las principales diferencias fenotípicas entre MAP y otras micobacterias es su incapacidad para producir micobactina en cultivos de laboratorio. Micobactina es un sideróforo que es responsable de la unión y transporte del hierro al interior de las células. Un grupo de 10 genes en *Mycobacterium avium subsp. tuberculosis (mbtA-J)* ha mostrado ser responsable de la producción de micobactina y el transporte de hierro. Homólogos del grupo *mbtA-J* fueron identificados en el genoma MAP. Sin embargo, una comparación directa del grupo *MbtA-J* en MAP con los de MAV, y MTB mostró diferencias significantes en la estructura primaria de esta región. La principal diferencia entre MAP, MAV y MTB en el grupo *mbtA-J* fue en el gen *mbtA*. El gen *mbtA* es más corto en MAP, codificando una proteína de 400 aa, en comparación con los 565 y 551 aa de proteína en MTB y MAV, respectivamente [7].

Una investigación de la secuencia completa de un locus de 38 kb en la posición de 1 a 38760, que incluye varios grupos de genes relacionados con la captación del hierro, confirmó la única especificidad de esta región, la cual incluye la sonda específica para *M. avium subsp. Paratuberculosis*, Mptb61.32, localizada en la posición de 36208 a 36803. La ausencia de homología de la región entera de 38 kb a *M. avium subsp. Avium*, la presencia de la secuencia corta, Mptb61.32, el análisis de PCR positivo con 14 cepas clínicas de *M. avium subsp. Paratuberculosis* y el análisis de PCR negativo con cepas referencia de otras 6 especies de micobacterias, fuertemente sugieren que este locus es específico de *M. avium subsp. Paratuberculosis* [3].

Se identificaron tres nuevos operones en *M. avium subsp. paratuberculosis (mpt, fep y sid)* presentes en el locus de 38 kb. Se encontró la presencia de motivos de control transcripcional regulados por  $Fe^{+3}$  (cajas Fur) en los promotores asociados a los operones *sid* y *mpt*, los cuales son responsables del transporte del  $Fe^{+3}$  hacia el citosol bacteriano, unido a un sideróforo. El rol del operón *mpt* de 7 Kb en la captación del hierro es apoyado debido a la presencia de dos cajas Fur localizadas inmediatamente antes del operón de dentro de su región promotora [3].

Homólogos de proteínas codificadas por el operón *sid* están involucradas en la síntesis no ribosomal y transporte membranal de sideróforos heterocíclicos asociados a  $Fe^{+3}$  de *Y. pestis*, *Y.*

*enterocolitica*, *S. coelicolor*. En estos organismos, los operones son transcripcionalmente controlados por proteínas de unión, tal como el producto del gen *furB*, sobre motivos de caja Fur posicionados dentro de los promotores asociados. A la fecha, nada se sabe de la función de *furB*, la cual igualmente está presente en varias especies de micobacterias. Homólogos de proteínas codificadas por el operón *fep* (*fepC-D*) en *Y. pestis* y *S. coelicolor* son transportadores ABC asociados con la capacidad del sideróforo catecolato acoplado a  $Fe^{+3}$  para atravesar la membrana celular hacia el citosol [3].

Se ha investigado la expresión y ubicación de dos proteínas del operón *mpt*. Se ha propuesto que el codón de inicio de *MptA/MptB* está en la posición 14040. Este codón de inicio es apoyado por una secuencia consenso Shine-Delgado (GAAGGA) y dos motivos de control transcripcional (cajas Fur) localizados en las posiciones 14079-14105 y 14504-1453 en el locus de 38 kb. Ambas secuencias consenso de cajas Fur tienen una homología significativa a las cajas Fur consenso 1 y 2 de *E. coli*, también tienen una perfecta estructura palindrómica. La expresión de la proteína *MptC* en la envoltura celular de *M. avium subsp. Paratuberculosis* demuestra su función aparente como transportador ABC [3].

Adicionalmente un fago específico a *M. avium subsp. paratuberculosis* (*fMptD*) fue aislado y utilizado para demostrar la expresión de la proteína *MptD* en *M. smegmatis* y en la superficie de *M. avium subsp. paratuberculosis*. Este descubrimiento apoya la hipótesis de que esta proteína podría formar un poro selectivo asociado con la capa externa de la envoltura celular de las micobacterias. Empleando un péptido derivado de *fMptD* con capacidad de unión selectiva para *MptD* se capturó e identificó *M. avium subsp. paratuberculosis* en leche de vacas infectadas. Esto demostró que la proteína *MptD* está expuesta en la superficie de MAP durante la infección y es por lo tanto un blanco potencial para la inmunización o tratamiento de *M. avium subsp. paratuberculosis* [3].

Los genes *mpt* están ubicados entre los grupos *sid* y *fep*. El grupo *sid* es el más largo de los operones e incluye los genes *sidA* a *sidG*, estos genes son contiguos, pero están orientados en grupos transcritos en direcciones opuestas codificando una caja Fur localizada en la posición de 18571 a 18597 entre *sidG* y *sidA*. El grupo *fep* es un grupo de 6 marcos de lectura abiertos con cuatro de ellos sobreponiéndose. El primer marco de lectura abierto codifica un homólogo (46% de identidad) del gen *ppe* en *M. tuberculosis* y es una probable proteína de membrana involucrada en señalización. Adyacente a esto hay tres marcos de lectura sobrepuestos, *fepB* a *febD*, con identidad significativa (25 a 36%) y organización similar a los genes en *Y. pestis* y *S. coelicolor* que están involucrados en el

transporte de sideróforo asociados a  $Fe^{+3}$ , catecolato, al interior del citosol bacteriano. Homólogos de *fepC* y *fepD* son transportadores ABC asociados con la capacidad de los sideróforos catecolato para atravesar la membrana celular [3].

Estos resultados junto con las funciones predichas de otros genes en la región de 38 kb fuertemente sugieren su asociación con la virulencia de *M. avium subsp. paratuberculosis* y que el locus de 38 kb debería ser considerado el primer islote de patogenicidad identificado en MAP. La inducción de inmunidad protectora contra infección sistémica por *S. pneumoniae* en ratones cuando fueron vacunados con componentes de transportadores ABC de captación de hierro, sugiere que la proteína MptD podría ser un componente idóneo en vacunas diseñadas para MAP [3].

## 2.8 Proteína MAP3773c.

Dentro del genoma de la cepa *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis* K-10, se identificó el gen *map3773c* de 420 pares de bases, situado en 4,216,834 - 4,217,253 con un contenido de GC de 62.9%. Dicho gen codifica una proteína de 139 aa con una masa de 16,229 kDa, que ha demostrado capacidad de unirse a secuencias específicas de DNA y actuar como factor de transcripción. Se ha propuesto una función hipotética de la proteína MAP3773c como proteína Fur [17,18].

Por medio del ensayo de cambio en corrida electroforética, EMSA (por sus siglas en inglés) este proyecto investigativo busca comprobar la unión de la proteína MAP3773c a una caja Fur encontrada en la región promotora del gen *map3773c* demostrando así su autorregulación [19].

La técnica de EMSA se emplea con la finalidad de detectar interacciones entre proteínas y ácidos nucleicos. Se basa en la observación de que los complejos ácido nucleico-proteína migran más lentamente que el correspondiente ácido nucleico libre. Este ensayo se utiliza con fines cualitativos, aunque también puede proporcionar datos de estequiometrias, afinidades y cinéticas de unión [20].

En el presente trabajo de investigación se emplea la técnica de EMSA con la finalidad de obtener información que explique, cualitativa y cuantitativamente, la relación entre la unión Fur-DNA y la presencia o ausencia del zinc en dicha interacción, con un enfoque basado en los descubrimientos citados.

### III. JUSTIFICACION

El impacto que *Mycobacterium avium subsp paratuberculosis* representa, como agente causal de la enfermedad de Johne o paratuberculosis bovina, en el sector ganadero es de interés tanto económico como alimentario. Los rebaños que son infectados por MAP y desarrollan la enfermedad representan una disminución en la producción de lácteos y carnes, y por lo tanto, una pérdida en el valor comercial de los animales, en otros casos MAP es responsable de la muerte del ganado bovino, derivando en pérdidas económicas para el sector pecuario. Adicional a esto, MAP se ha encontrado infectando al ser humano y ha sido relacionada con la enfermedad de Crohn lo cual conlleva también un impacto para el sector salud.

El estudio del comportamiento de proteínas Fur de MAP y Zur, como la proteína MAP3773c que se utilizó para el presente trabajo de investigación, es necesario para entender los mecanismos de regulación en la expresión de la proteína en cuestión, tanto a nivel transcripcional y traduccional, en la disposición de hierro por parte de MAP, para su sobrevivencia y efectos en la patogenicidad en el huésped. Por lo cual, es necesario conocer cómo está involucrada esta proteína en el transporte, almacenamiento y metabolismo del hierro dentro de la bacteria y posiblemente en la célula huésped, generando las pautas necesarias para idear blancos farmacológicos contra MAP aportando avances significativos para tratamientos, y métodos de prevención y control de las enfermedades que pudieran estar asociadas con *Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis*.

#### **IV. OBJETIVO GENERAL**

Determinar la regulación transcripcional de MAP3773c en la región TAATAG del promotor T7 en *E. coli*.

#### **V. OBJETIVOS ESPECIFICOS**

Realizar alineamientos de la región TAATAG del promotor T7 con la región de regulación del gen *map3773c*.

Diseñar las sondas para los experimentos de interacción de oligómero y monómero de MAP3773c, con la región del promotor T7.

Realizar un PCR para amplificar la región del fragmento de DNA no relacionado.

Realizar los experimentos de interacción de monómero de MAP3773c, con la región TAATAG, por la técnica de EMSA.

Realizar los experimentos de interacción de oligómero de MAP3773c, con la región TAATAG, por la técnica de EMSA.

Realizar los experimentos de interacción de monómero de MAP3773c, con la región TAATAG, por la técnica de EMSA, en condiciones de saturación con Zinc.

Realizar los experimentos de interacción de oligómero de MAP3773c, con la región TAATAG, por la técnica de EMSA, en condiciones de saturación con Zinc.

## VI. MATERIALES Y METODOS

### 6.1 Proteína MAP3773c

La proteína MAP3773c utilizada en este trabajo, se usó en forma de monómero, dímero y trímero, existente en el laboratorio de Biología Molecular.

### 6.2 Alineamiento de la región del promotor T7, con la región de regulación *de map3773c*.

Los alineamientos se realizaron utilizando el programa Geneious 7.1.3.

### 6.3 Diseño de sondas de DNA para la región del promotor T7.

Para el diseño de las sondas utilizamos el programa Geneious 7.1.3.

### 6.4 PCR para la amplificación del DNA no relacionado

La región que se utilizó como región no relacionada fue un segmento de 300pb de la región traducible del gen *map3773c*, que fue amplificada empleando 50 reacciones de PCR, las condiciones de amplificación se dan a conocer enseguida.

Mezcla de PCR para 50 reacciones.	µL	dNTP's
dNTP's	75	<ul style="list-style-type: none"><li>• 2' Deoxyadenosine 5'</li><li>• DT- 103F</li><li>• 2' Deoxycytidine 5'</li><li>• 2' Deoxyguanosine 5'</li></ul>
Buffer 10x	125	
Mezcla de oligonucleótidos R y F	250	
Dimetil Sulfoxido	62.5	
H <sub>2</sub> O libre de nucleasas	625	
Taq Polimerasa	12.5	

**Tabla 1**

**Tabla 2**

La mezcla obtenida para la reacción de PCR fue separada en 50 tubos eppendorf de los cuales uno se separó funcionando como control negativo, a los 49 restantes se les agregó, a cada uno, 2 µL de DNA no relacionado. La reacción de PCR se llevó a cabo en el termociclador Mastercycler® personal utilizando las siguientes condiciones:

1. **Templar:** 94° C durante 10 min
  2. **Desnaturalizar:** 94° durante 30 seg
  3. **Hibridación del cebador:** 67° C durante 1 min
  4. **Elongación:** 72° C durante 2 min
  5. Continuar desde el paso 2 (30 veces)
  6. **Ultima elongación:** a 72° C durante 10 min
  7. **Conservación** a 4° C, durante 10 min
- STOP

Utilizando los siguientes oligonucleótidos.

- Hsp70 REcoRV: GATATCTTACTTGGACTCCCGGTCATCGTCG
- Hsp70 FBsrgI: TGTACAATGGCTCGTGCGGTCGGTATCGAC

Para revelar el resultado obtenido de la reacción de PCR se empleó la técnica de electroforesis en gel de Agarosa (1 %)

- Preparación de Gel de Agarosa 1%
  1. Disolver 0.30 gramos de agarosa en 30 ml de TAE 1x
  2. Calentar 30 – 40 seg. hasta lograr un color transparente
  3. Verter el gel (tibio) en la cámara de electroforesis, colocar los peines y dejar polimerizar.

Se cargaron 3 pocillos en el gel, siendo uno para el marcador de peso molecular Quick-Load<sup>®</sup> 2-Log DNA Ladder (0.1 – 10.0 Kb), uno más para el DNA amplificado y el ultimo para el control negativo de la reacción. Se dejó correr la electroforesis a 100 V durante 30 minutos. Se utilizó como buffer de corrida para electroforesis TAE 50x. La reacción de PCR para la obtención de DNA no relacionado se realizó en 3 ocasiones durante el proyecto.

#### *6.5 Purificación de DNA no relacionado*

Para la purificación del DNA no relacionado, se utilizó el fragmento de la región codificante de la proteína MAP3773c, que se amplificó por PCR y posteriormente se purificó de la siguiente forma:

A la reacción de PCR se le añadió un volumen igual de una solución de Fenol/Cloroformo/alcohol isoamílico (50:49:1) y se agito en vórtex durante 2 minutos. Posteriormente se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 minutos, se tomó la fase superior acuosa en un tubo nuevo, y se añadió 30 µL (1/10 Vol) de acetato de potasio 5 M, y 600 µL (2 Vol) de Etanol al 100%. La solución se incubó a -20°C (Si apareciera turbia se incubaba de 5-10 minutos, si apareciera clara se incubaba durante 1 hora). Se centrifugó a 12 000 rpm durante 5 minutos. Posteriormente se eliminó el sobrenadante, se lavó el pellet con 500 µL de Etanol al 70% y se dejó secar durante 10 minutos a 37°C. Una vez seco, el pellet se disolvió en 100 µL con H<sub>2</sub>O (libre de nucleasas). Finalmente se revisó la concentración en un espectrofotómetro y se almacenó a -20°C, hasta su uso.

#### *6.6 EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)*

Para observar el grado de afinidad de la proteína MAP3773c al DNA relacionado se empleó la técnica de EMSA (Electrophoretic mobility shift assay). Para esta técnica se utilizó una solución denominada solución madre que funcionó como base para las reacciones. La cantidad de reacciones y la composición de la solución madre varió dependiendo las necesidades de cada experimento.

- *Solución madre.*

Para preparar la solución madre se mezclaron todos los componentes en el orden que lo muestra la tabla en un tubo eppendorff (1.5mL), de forma separada se mezcló 1 µL de cada uno de los DNA's relacionados (TAATAG 1 y ATTATC 2) los cuales se sometieron a un periodo de incubación en agua en ebullición durante 15 minutos periodo en el cual se llevó a cabo la hibridación de las sondas, para después ser integradas a la mezcla de la solución madre.

La reacción se complementó añadiendo a la solución madre la proteína MAP3773c en diferentes concentraciones y H<sub>2</sub>O grado BM, y ZnSO<sub>4</sub> en algunos experimentos que se describen en las tablas siguientes, llegando a un total 20 µL para cada una de las reacciones.

SOLUCION MADRE		µL (por reacción)
Binding Buffer 5x		4
MnCl <sub>2</sub> (86.91 mM)		0.5
ABS (4mg/ml)		0.5
Ficoll 40%		2.5
DTT		2
DNA no relacionado		1
DNA relacionado	TAATAG 1	1
	ATTATC 2	1
Total		12.5

**Tabla 3**

- *Experimento 1*

Se empleó una solución madre suficiente para las 7 reacciones de este experimento tal como se describe en la tabla 3.

REACCION EMSA (µL)	C1	1	2	3	4	5	6
Solución Madre	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
MAP3773c (monómero, dímero, trímero)	0	1 (500 NM)	2 (1000 NM)	3 (1500 NM)	4 (2000 NM)	5 (2500 NM)	6 (3000 NM)
H <sub>2</sub> O	7.5	6.5	5.5	4.5	3.5	2.5	1.5
Total	20	20	20	20	20	20	20

**Tabla 4**

Este experimento se realizó utilizando la proteína MAP3773c (0.2 mg/ml) en forma de monómero, dímero y trímero en una concentración creciente para 6 reacciones. En el caso del control C1 únicamente se utilizó la solución madre sin proteína. Todas las reacciones se llevaron a 20 µL con H<sub>2</sub>O grado BM Este experimento se realizó por duplicado (**Ver fig. 6a y 6b**).

- *Experimento 2*

En este experimento la solución madre descrita en la tabla 3 se modificó omitiendo el  $MnCl_2$ .

REACCION EMSA ( $\mu L$ )	C1	C2	1	2	3	4	5
Solución Madre	12	12	12	12	12	12	12
ZnSO <sub>4</sub> (4000 $\mu M$ )	0	0	0.125 (25 $\mu M$ )	0.25 (50 $\mu M$ )	0.50 (100 $\mu M$ )	1.25 (250 $\mu M$ )	2.50 (500 $\mu M$ )
MAP3773c (monómero, dímero, trímero)	0	5	5	5	5	5	5
H <sub>2</sub> O	8	3	2.875	2.75	2.5	1.75	0.50
<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>

**Tabla 5**

Se utilizaron concentraciones crecientes de ZnSO<sub>4</sub> en cinco reacciones para las cuales se utilizó una concentración constante de MAP3773c (2500 NM) en su forma de monómero, dímero y trímero. Se realizaron dos controles, para el primero (C1) no se agregó proteína, para el segundo control (C2) se agregó únicamente MAP3773c (monómero, dímero y trímero). En ninguno de los controles se agregó ZnSO<sub>4</sub> (*Ver fig. 7*).

- *Experimento 3*

Se utilizó la solución madre descrita en la tabla 3 para este experimento, se omitió únicamente el  $MnCl_2$ .

REACCION EMSA ( $\mu L$ )	C1	C2	1	2	3	4	5
Solución Madre	12	12	12	12	12	12	12
ZnSO <sub>4</sub> (10,000 $\mu M$ )	0	0	1 (500 $\mu M$ )	1.5 (750 $\mu M$ )	2 (1000 $\mu M$ )	3 (1500 $\mu M$ )	0
ZnSO <sub>4</sub> (20,000 $\mu M$ )	0	0	0	0	0	0	2 (2000 $\mu M$ )
MAP3773c (monómero, dímero, trímero)	0	5	5	5	5	5	5
H <sub>2</sub> O	8	3	2	1.5	1	0	1
<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>

**Tabla 6**

Para este experimento se utilizó la proteína MAP3773c en su forma de monómero, dímero y trímero en una concentración constante para las reacciones, en cinco reacciones se utilizó ZnSO<sub>4</sub> en concentraciones crecientes para ello se emplearon soluciones de ZnSO<sub>4</sub> 10 000  $\mu M$  y 20 000  $\mu M$ .

Dos reacciones se emplearon como controles, C1 sin proteína y sin ZnSO<sub>4</sub>, y C2 con proteína y sin ZnSO<sub>4</sub> (**Ver fig. 8**).

- *Experimento 4*

Se realizó una solución madre suficiente para 8 reacciones, de las cuales dos se emplearon como controles, tal como se muestra a continuación.

REACCION EMSA (μL)	C1	C2	1	2	3	4	5	6
<b>Solución Madre</b>	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5
<b>DNA relacionado</b>	0	2	2	2	2	2	2	2
<b>MAP3773c (monómero)</b>	0	0	0.5 (63 mM)	1 (125 mM)	1.5 (188 mM)	2 (250 mM)	3 (375 mM)	3.33 (416 mM)
<b>H<sub>2</sub>O</b>	9.5	7.5	7	6.5	6	5.5	4.5	4.17
<b>Total</b>	20	20	20	20	20	20	20	20

**Tabla 7**

En esta reacción para uno de los controles se utilizó una solución madre sin DNA relacionado (C1) modificando la solución madre descrita en la tabla 3, para el segundo control (C2) se utilizó la solución madre tal como se describe en la misma tabla, ambos controles sin proteína. Se utilizó la proteína MAP3773c en su forma monomérica (2500 mM) en concentraciones crecientes para el resto de las reacciones, llevando todas las reacciones a 20 μL con H<sub>2</sub>O grado BM (**Ver fig. 9**).

- *Experimento 5*

La solución madre para este experimento se elaboró como se describe en la tabla 3, omitiendo únicamente el MnCl<sub>2</sub>.

REACCION EMSA (μL)	C1	C2	C3	1	2	3	4	5
<b>Solución Madre</b>	12	12	12	12	12	12	12	12
<b>ZnSO<sub>4</sub> (4000 mM)</b>	0	0	0	0.125 (25 μM)	0.25 (50 μM)	0.50 (100 μM)	1.25 (250 μM)	2.50 (500 μM)
<b>MAP3773c (monómero)</b>	0	0	3	3	3	3	3	3
<b>MAP3773c (monómero, dímero, trímero)</b>	3	0	0	0	0	0	0	0
<b>H<sub>2</sub>O</b>	5	8	5	4.875	4.75	4.50	3.75	2.5
<b>Total</b>	20	20	20	20	20	20	20	20

**Tabla 8**

En este experimento se realizaron 8 reacciones, de las cuales 5 contenían una concentración constante de proteína MAP3773c (375mM) en su forma monomérica y concentraciones crecientes de ZnSO<sub>4</sub>. Las tres reacciones restantes corresponden a los controles de los cuales, C1 contiene 3 µL de una mezcla de la proteína MAP3773c (1500 NM) en sus tres conformaciones; monómero, dímero y trímero. El segundo control C2, no contiene proteína, mientras que el tercer control C3 contiene únicamente 3 µL de proteína MAP3773c en su forma monomérica. Ninguno de los tres controles contiene ZnSO<sub>4</sub> (*Ver fig. 10*).

- *Experimento 6*

La solución madre fue modificada para este experimento, se omitió el uso de MnCl<sub>2</sub>.

REACCION EMSA (µl)	1	2	3	4	5	C1	C2
<b>Solución Madre</b>	12	12	12	12	12	12	12
<b>ZnSO<sub>4</sub> (4000 µM)</b>	0.125 (25 µM)	0.25 (50 µM)	0.50 (100 µM)	1.25 (250 µM)	2.50 (500 µM)	0	0
<b>MAP3773c (monómero)</b>	3	3	3	3	3	0	3
<b>H<sub>2</sub>O</b>	4.875	4.75	4.50	3.75	2.50	8	5
<b>Total</b>	20	20	20	20	20	20	20

**Tabla 9**

Para este experimento se realizó la reacción en presencia de diversas concentraciones de ZnSO<sub>4</sub>, partiendo de una concentración 4000 µM. Se utilizaron 3 µL de MAP3773c para las 5 reacciones, y se implementaron dos controles; C1 sin proteína y sin ZnSO<sub>4</sub>, C2 con proteína y sin ZnSO<sub>4</sub>. El experimento se realizó por triplicado (*Ver Fig. 11a, 11b y 11c*)

- *Experimento 7*

Para este experimento se omitió el MnCl<sub>2</sub> en la solución madre y se utilizaron 3 µL de DNA no relacionado. Para el control C1 se utilizó solución madre sin DNA relacionado.

REACCION EMSA (µL)	C1	C2	1	2	3	4	5
<b>Solución Madre</b>	14	14	14	14	14	14	14
<b>ZnSO<sub>4</sub> (4000 µM)</b>	0	0	0.125 (25 µM)	0.25 (50 µM)	0.5 (100 µM)	1.25 (250 µM)	2.50 (500 µM)
<b>MAP3773c (monómero)</b>	0	3	3	3	3	3	3
<b>H<sub>2</sub>O</b>	6	3	2.875	2.75	2.50	1.75	0.50
<b>Total</b>	20	20	20	20	20	20	20

**Tabla 10**

Se utilizaron las mismas concentraciones de ZnSO<sub>4</sub> y proteína MAP3773c que en el experimento anterior (**Ver fig. 12**).

- *Experimento 8*

En este experimento se omitió nuevamente el MnCl<sub>2</sub> en la solución madre, y se utilizó 1 µL de DNA no relacionado para cada reacción.

REACCION EMSA (µL)	C1	C2	1	2	3	4	5
<b>Solución Madre</b>	12	12	12	12	12	12	12
<b>ZnSO<sub>4</sub> (4000mM)</b>	0	0	0.125 (25 µM)	0.25 (50 µM)	0.50 (100 µM)	1.25 (250 µM)	2.50 (500 µM)
<b>MAP3773c (monómero)</b>	0	3	3	3	3	3	3
<b>H<sub>2</sub>O</b>	6	3	2.875	2.75	2.5	1.75	0.5
<b>Total</b>	18	18	18	18	18	18	18

**Tabla 11**

Se utilizaron dos controles para este experimento, C1 sin proteína y sin ZnSO<sub>4</sub> y C2 con proteína y sin ZnSO<sub>4</sub>. El resto de las reacciones se llevaron a cabo con una concentración constante de proteína y una concentración creciente de ZnSO<sub>4</sub>. (**Ver fig. 13**). En este experimento se elaboró una mezcla de reacción de 18 µL a diferencia del resto de los experimentos, debido a que por error se agregaron 2 µL menos de agua en cada reacción.

- *Experimento 9*

Para este experimento se preparó la solución madre descrita en la tabla 3 omitiendo el MnCl<sub>2</sub>.

REACCION EMSA (µL)	C1	1	2	3
<b>Solución Madre</b>	12	12	12	12
<b>ZnSO<sub>4</sub> (1000 mM)</b>	0	2 (100 mM)	3 (150 mM)	4 (200 mM)
<b>MAP3773c (monómero)</b>	3	3	3	3
<b>H<sub>2</sub>O</b>	5	3	2	1
<b>Total</b>	20	20	20	20

**Tabla 12**

Se utilizó la proteína MAP3773c en su forma monomérica y ZnSO<sub>4</sub> en concentraciones crecientes para 3 reacciones partiendo de una concentración 1000 mM, se utilizó un control C1 en el cual se utilizó la proteína sin ZnSO<sub>4</sub>. (**Ver fig. 14**).

- *Experimento 10*

La solución madre empleada para este experimento corresponde a la descrita en la tabla 3 omitiendo el MnCl<sub>2</sub> y añadiendo 1.5 µL de DNA no relacionado.

REACCION EMSA (µL)	C1	C2	1	2	3
Solución Madre	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
ZnSO <sub>4</sub> (1000 mM)	0	0	2 µL (100 mM)	3 µL (150 mM)	4 µL (200 mM)
MAP3773c (monómero)	0	3	3	3	3
H <sub>2</sub> O	4.5	7.5	2.5	1.5	0.5
<b>Total</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>	<b>20</b>

**Tabla 13**

Se utilizó para este experimento la proteína MAP3773c en su forma monomérica y concentraciones crecientes de ZnSO<sub>4</sub> para 3 reacciones, partiendo de una solución preparada 1000 mM. Se emplearon dos controles, C1 sin proteína y sin ZnSO<sub>4</sub> y C2 con proteína y sin ZnSO<sub>4</sub>. Este experimento se realizó por duplicado (*Ver fig. 15a y 15b*)

Una vez añadidos todos los reactivos para la reacción en los tubos eppendorf se mezclaron en vórtex (3 seg) y se centrifugaron utilizando por 3 segundos la función spin down. Las reacciones se dejaron por un periodo aproximado de 40 minutos resguardos de la luz en cámara oscura.

- *Gel de Acrilamida/Bisacrilamida*

Preparación del Gel de acrilamida/ bisacrilamida (al 8%) para cámara chica, no desnaturante.		En un tubo de ensaye se mezclan todos los componentes. Una vez añadido el TEMED el gel se polimeriza inmediatamente por lo cual se debe mezclar a la brevedad y vaciar sobre la cámara de electroforesis colocando el peine de los pocillos en su posición. El gel polimerizará alrededor de los próximos 10 minutos. *El gel deberá precorrerse a 100 V durante una hora antes de ser utilizado.
<b>Acrilamida (30%)/ Bisacrilamida</b>	1.33 ml	
<b>Agua bidestilada</b>	2.0 ml	
<b>Glicerol 50%</b>	0.635 ml	
<b>TBE 5x</b>	1 ml	
<b>Persulfato de amonio (10x)</b>	40 µL	
<b>TEMED</b>	4 µL	

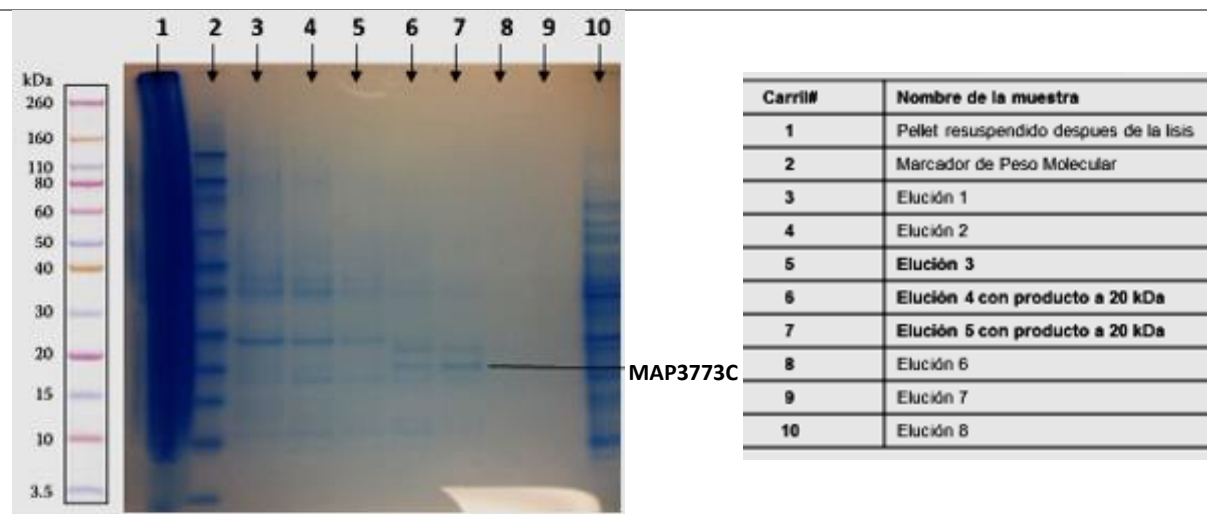
**Tabla 14**

Pasado el periodo de incubación, se cargaron 20  $\mu$ L de cada una de las reacciones, mezcladas con el buffer de carga 6x EMSA gel loading solution de Thermofisher (4 $\mu$ L), en el gel de acrilamida/bisacrilamida. Se utilizó el marcador de peso molecular Quick-Load<sup>®</sup> 2-Log DNA Ladder (0.1 – 10.0 Kb) para los experimentos 4, 5, 6, y 7 mientras que para los experimentos 9 y 10 se empleó el marcador de peso molecular 50 bp DNA Ladder de BioLabs<sup>®</sup>

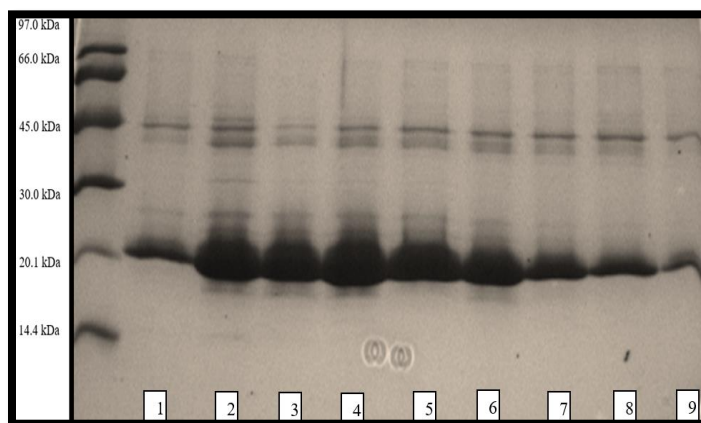
Una vez cargado el gel en la cámara se encendió la fuente de poder a 100 V y se dejó correr 1 hora, 40 minutos, utilizando TBE 1x como buffer de corrida. Terminada la electroforesis, se desmontó la cámara y con mucha precaución se tiñó el gel con Bromuro de Etidio (10 mg/ml) y se observó en una cámara de luz UV.

## VII. RESULTADOS Y DISCUSION

### 7.1 Proteína MAP3773c

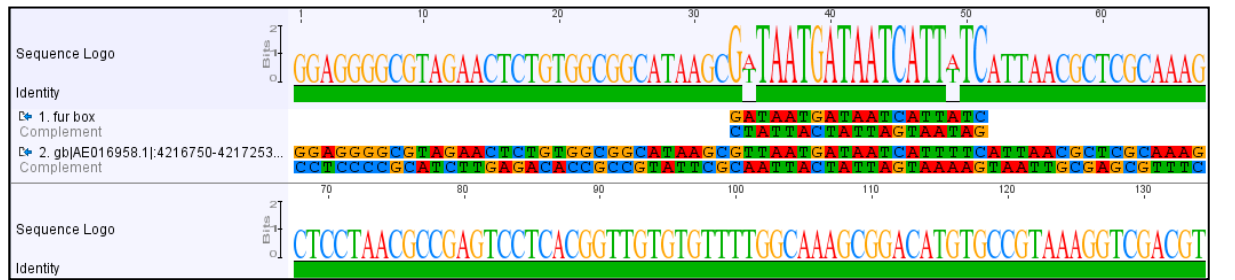


**Figura 1. Electroforesis SDS-PAGE de la purificación de la proteína MAP3773c.**

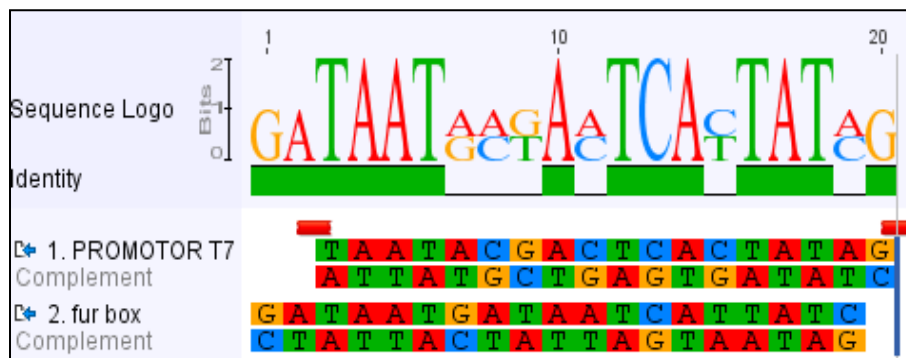


**Figura 2. Electroforesis SDS-PAGE en el intervalo de eluciones donde se encuentra la proteína recombinante MAP3773c. Carril 1: Marcador de peso molecular, Carril 2: Elución 9, Carril 3: Elución 10, Carril 4: Elución 11, Carril 5: Elución 12, Carril 6: Elución 13, Carril 7: Elución 14, Carril 8: Elución 15, Carril 9: Elución 16, Carril 10: Elución 17.**

## 7.2 Alineamiento de la región del promotor T7, con la región de regulación de *map3773c*.



**Figura 3.** Alineamiento de la caja Fur de *E. coli* anterior al codón de inicio de *map3773c*. El posible inicio de la caja de hierro está a 51 pares de bases después del codón de inicio, TCA, para la traducción de MAP3773c.



**Figura 4.** Alineamiento de las regiones del promotor T7 en *pRSET-A* y la proteína Fur de la caja de hierro.

## 7.3 Diseño de sondas de DNA para la región del promotor T7.

5'GGG GGG GGG GGG GGG GGG GGT AAT AGG GGG GGG GGG GGG GGG GGG 3'

5'CCC CCC CCC CCC CCC CCC CCA TTA TCC CCC CCC CCC CCC CCC CCC 3'

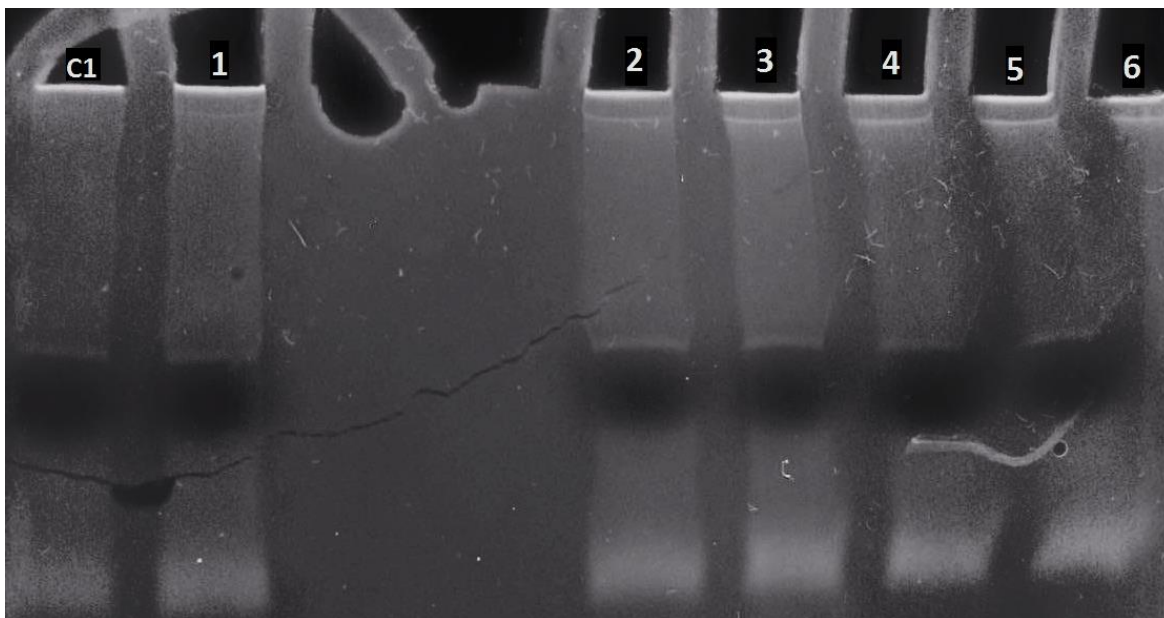
## 7.4 PCR para la amplificación del DNA no relacionado



**Figura 5.** PCR del DNA no relacionado en electroforesis en Gel de Agarosa.

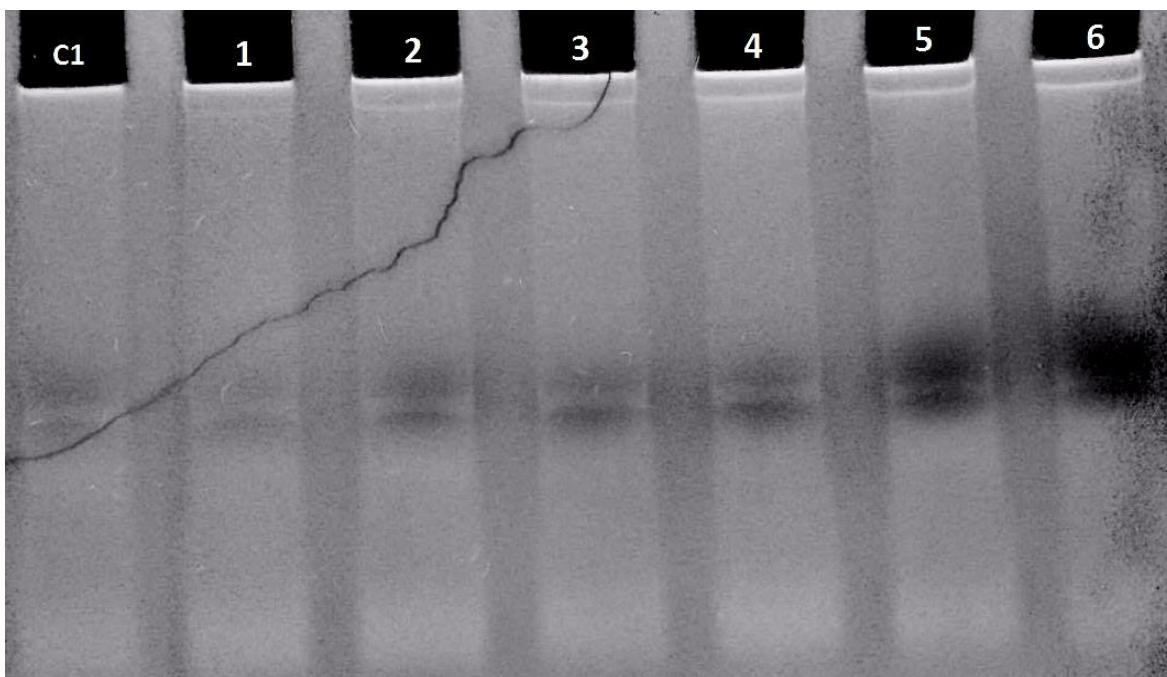
### 7.5 EMSA (Electrophoretic mobility shift assay)

Los gels de acrilamida/bisacrilamida en los que se llevó a cabo la electroforesis para las reacciones de EMSA, descritas previamente, fueron teñidos y observados en luz UV, las imágenes se muestran a continuación.



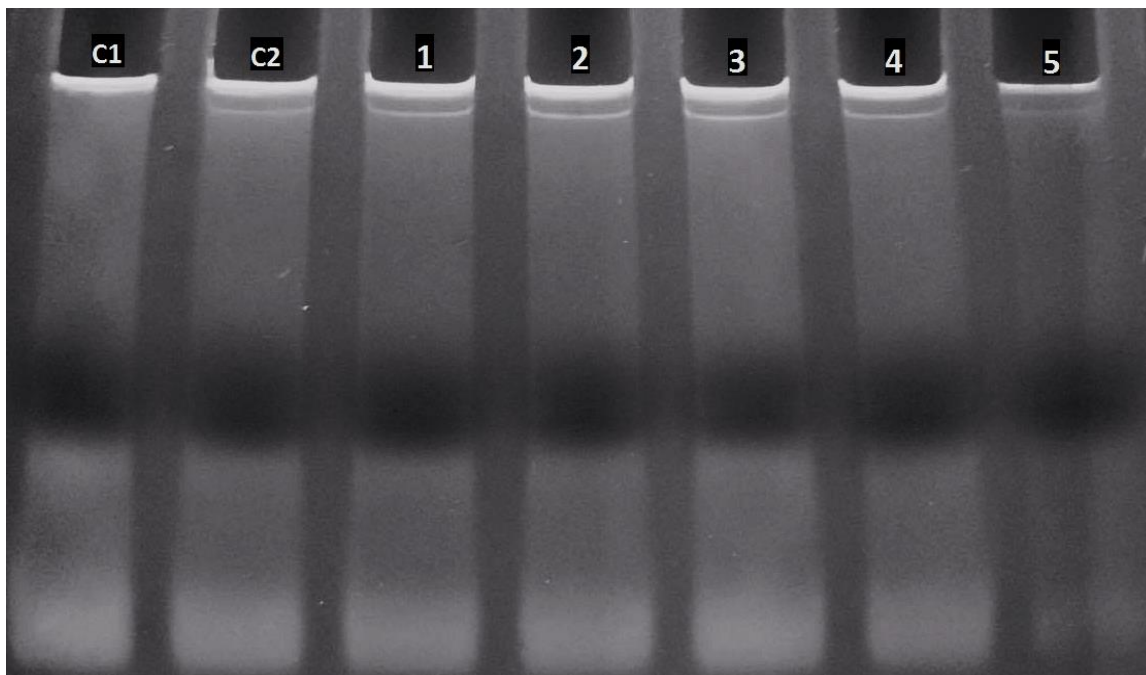
**Figura 6a.** EMSA en Gel de poliacrilamida teñido con Bromuro de Etidio. De izquierda a derecha: control con solución madre, sin proteína (C1). Reacciones con solución madre, con mezcla proteína MAP3773c en su forma de monómero, dímero y trímero; 1  $\mu$ L (1), 2  $\mu$ L (2), 3  $\mu$ L (3), 4  $\mu$ L (4), 5  $\mu$ L (5), 6  $\mu$ L (6).

En el experimento descrito en la **tabla 4** se trabajó únicamente con la proteína MAP3773c en sus tres conformaciones (mezcla de monómero, dímero y trímero) observándose la banda de DNA no relacionado (**ver fig. 6a**). En la reacción del control C1 no se observó banda de retención, este control no contenía la proteína. En las siguientes reacciones se utiliza la proteína en concentraciones crecientes, observándose en todas ellas una banda de retención que se intensifica a medida que incrementa la concentración de la proteína. Estas observaciones demuestran la afinidad de la proteína, en al menos una de sus diferentes conformaciones, al DNA relacionado provocando el retardamiento. Es notable en los últimos carriles del gel una distorsión en la corrida, esto se debe a una deformación del gel al momento de colocarlo en la cámara de electroforesis.



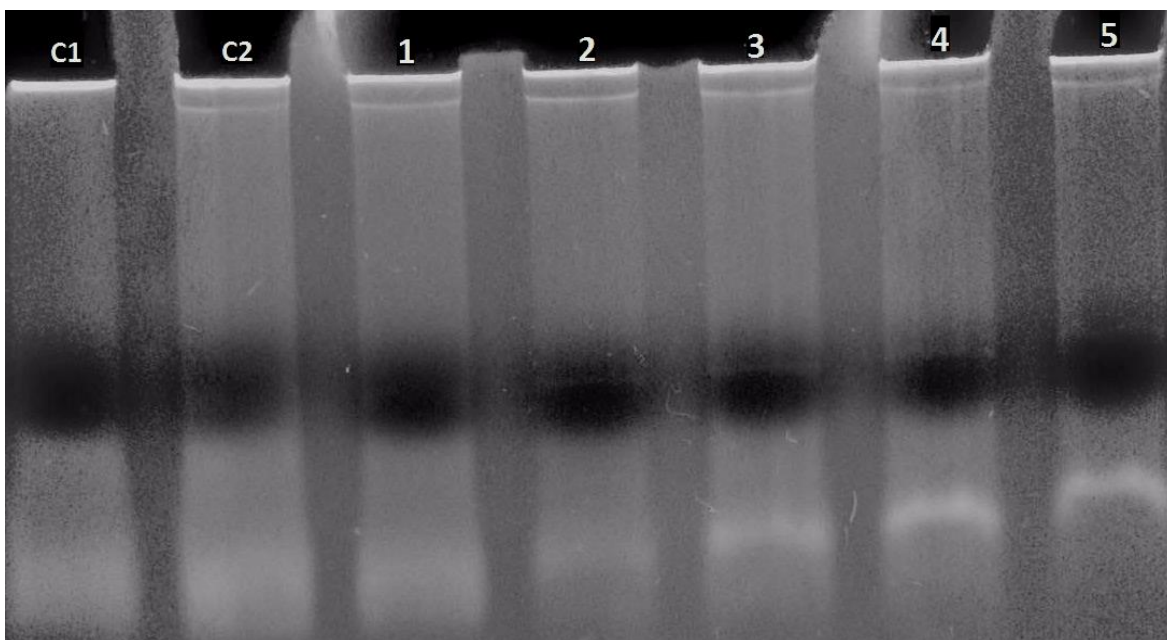
**Figura 6b. EMSA en Gel de poliacrilamida teñido con Bromuro de Etidio.** De izquierda a derecha: control con solución madre, sin proteína (C1). Reacciones con solución madre, con mezcla proteína MAP3773c en su forma de monómero, dímero y trímero; 1  $\mu$ L (1), 2  $\mu$ L (2), 3  $\mu$ L (3), 4  $\mu$ L (4), 5  $\mu$ L (5), 6  $\mu$ L (6).

Se realizó un segundo experimento con las especificaciones mostradas en la **tabla 4** (duplicado). Este experimento mostró una banda de DNA no relacionado en todas las reacciones y una banda tenue de retardamiento en las 6 reacciones que contienen la proteína MAP3773c (monómero, dímero y trímero) intensificándose en las reacciones conforme incrementa su concentración. El control C1, que no contiene la proteína, no presento esta banda de retardamiento (**Ver fig. 6b**).



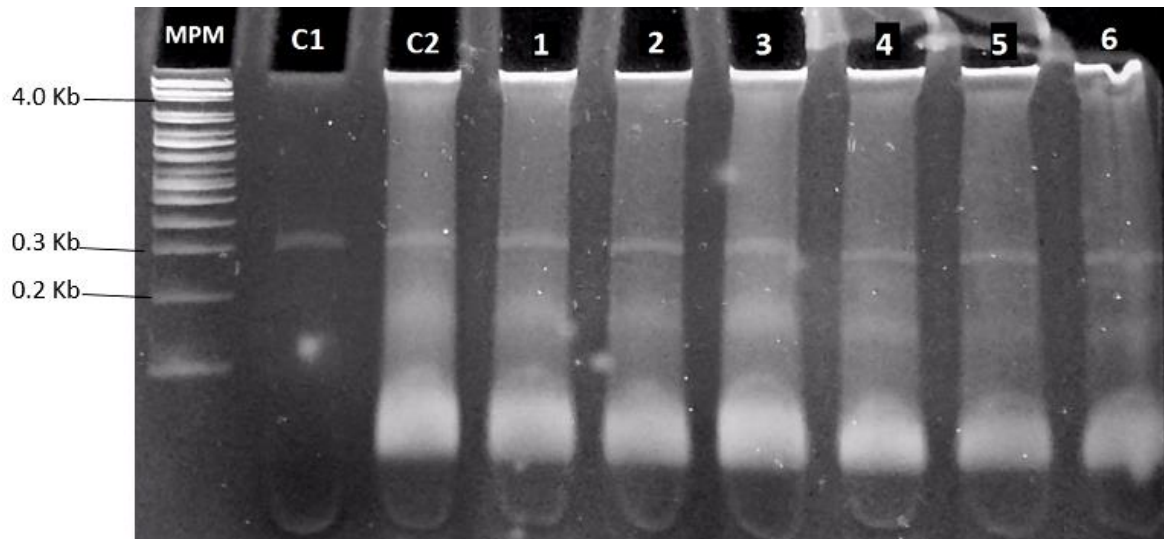
**Figura 7. EMSA en Gel de poliacrilamida teñido con Bromuro de Etidio.** De izquierda a derecha: control con solución madre, sin proteína y sin  $ZnSO_4$  (C1) y control con solución madre, con 5  $\mu L$  de proteína MAP3773c (mezcla de monómero, dímero y trímero) y sin  $ZnSO_4$  (C2). Reacciones con solución madre, 5  $\mu L$  proteína MAP3773c en su forma (mezcla de monómero dímero y trímero) y  $ZnSO_4$  en diferentes concentraciones; 25  $\mu M$  (1), 50  $\mu M$  (2), 100  $\mu M$  (3), 250  $\mu M$  (4), 500  $\mu M$  (5).

La **fig. 7** muestra los resultados obtenidos del experimento 2 descrito en la **tabla 5**. Dicho experimento muestra como resultado, además de la banda tenue de DNA no relacionado, una banda de retardamiento en el control C2 que contiene la proteína MAP3773c (monómero, dímero y trímero). En las reacciones que contienen la proteína y concentraciones crecientes de  $ZnSO_4$  se observa de igual manera esta banda de retardamiento, con una ligera disminución de la intensidad de la banda en la reacción 5 donde la concentración de  $ZnSO_4$  es mayor que en el resto de las reacciones (500  $\mu L$ ). En la reacción 5 se alcanza a apreciar un ligero retardamiento adicional en la corrida. En el control C1, donde no se agregó proteína para la reacción, no se observó banda de retardamiento.



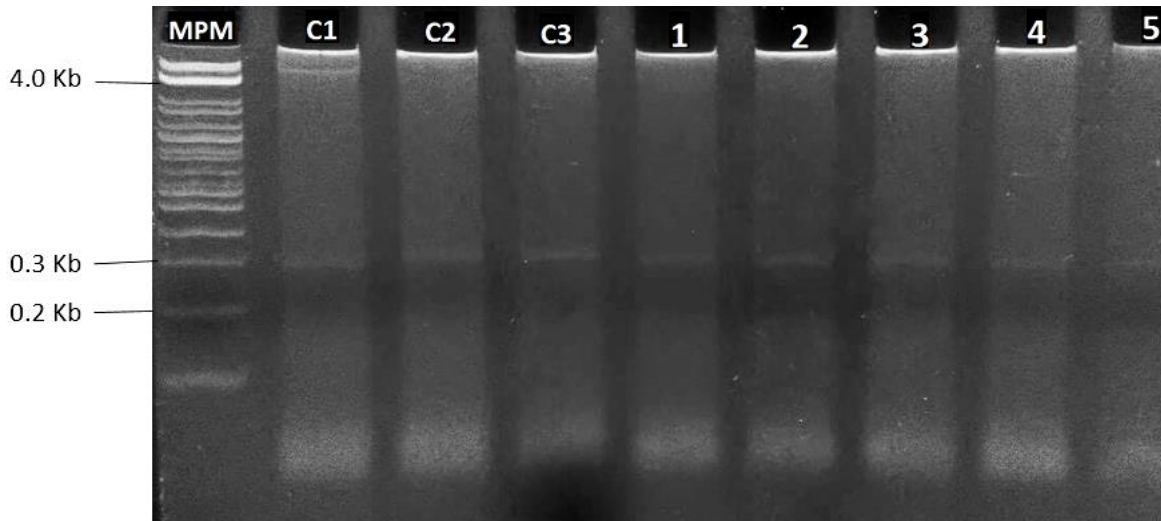
**Figura 8. EMSA en Gel de poliacrilamida teñido con Bromuro de Etidio.** De izquierda a derecha: Control con solución madre, sin proteína y sin  $ZnSO_4$  (C1) y control con solución madre, con 5  $\mu L$  de proteína MAP3773c (mezcla de monómero, dímero y trímero) y sin  $ZnSO_4$ . Reacciones con solución madre, 5  $\mu L$  proteína MAP3773c en su forma (mezcla de monómero dímero y trímero) y  $ZnSO_4$  en diferentes concentraciones; 500  $\mu M$  (1), 750  $\mu M$  (2), 1000  $\mu M$  (3), 1500  $\mu M$  (4), 2000  $\mu M$  (5).

En el experimento 3 (**ver tabla 6**) se realizaron reacciones con proteína MAP3773c (monómero, dímero y trímero) y  $ZnSO_4$  en concentraciones crecientes, mayores a las del experimento 2 (**Ver tabla 5**). Como resultado se pudo observar en estas reacciones una banda de retardamiento en cada una de ellas, al igual que el control C2 que contiene únicamente la proteína sin  $ZnSO_4$ . La banda de retardamiento no se observó en el control C1 donde se realizó la reacción sin la proteína (**Ver fig.8**) Se pueden observar también bandas de menor peso molecular que comienzan a retardarse a partir de la reacción 2 conforme incrementa la concentración de  $ZnSO_4$ .



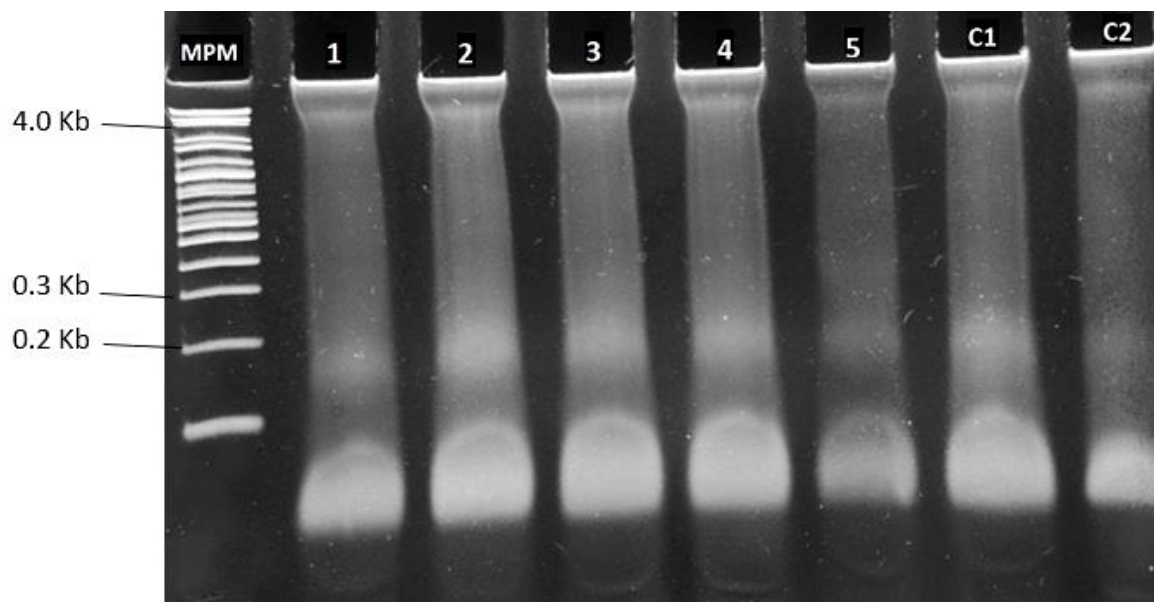
**Figura 9. EMSA en Gel de poliacrilamida teñido con Bromuro de Etidio.** De izquierda a derecha: Marcador de peso molecular (MPM), control con solución madre sin DNA relacionado (C1) y control con solución madre con DNA relacionado (C2). El resto de las reacciones con solución madre con DNA relacionado y proteína MAP3773c en su forma monomérica 0.5  $\mu$ L (1), 1  $\mu$ L (2), 1.5  $\mu$ L (3), 2  $\mu$ L (4), 3  $\mu$ L (5), 3.33  $\mu$ L (6).

En el experimento descrito en la **tabla 7**, se observó una banda constante en las 8 reacciones, correspondiente al DNA no relacionado que se utilizó en la reacción. Puesto que en el control C1 no se agregó DNA relacionado ni la proteína MAP3773c, no se observan más bandas. Se observa una banda muy tenue cerca de los 4.0 Kb. Sin embargo, el control C2 que no contiene proteína también presentó una banda muy tenue en esta posición, por lo cual no se consideró banda de retención.



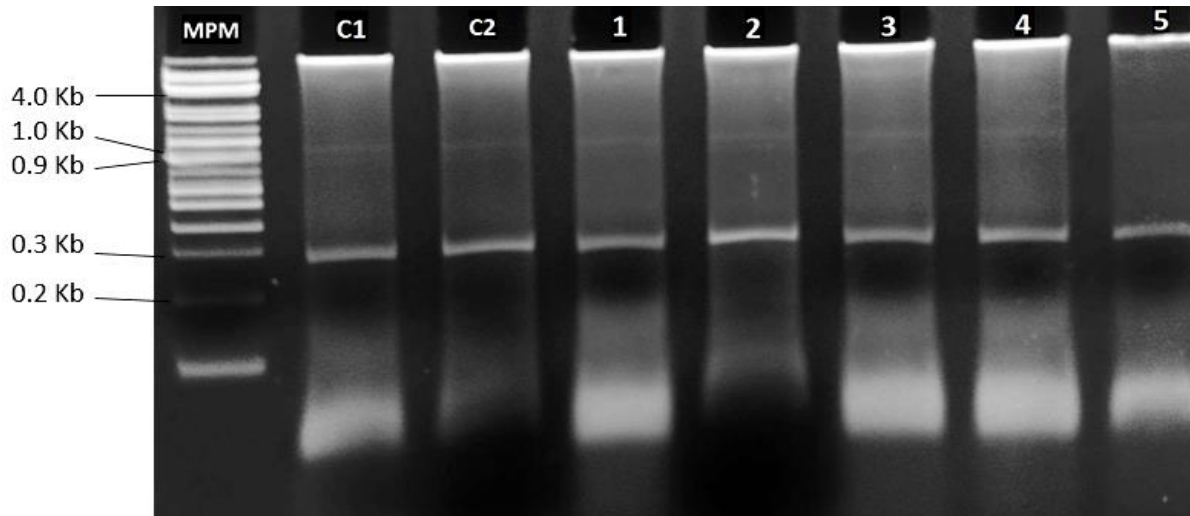
**Figura 10. EMSA en Gel de poliacrilamida teñido con Bromuro de Etidio.** De izquierda a derecha: Marcador de peso molecular (MPM), control (C1) con solución madre y 3  $\mu$ L de mezcla de proteína MAP3773c (monómero, dímero, trímero), sin  $ZnSO_4$ , control (C2) con solución madre, sin proteína y sin  $ZnSO_4$  y control (C3) con solución madre, con 3  $\mu$ L de proteína MAP3773c (monómero) y sin  $ZnSO_4$ . Reacciones con solución madre, 3  $\mu$ L proteína MAP3773c en su forma monomérica y  $ZnSO_4$  en diferentes concentraciones; 25  $\mu$ M (1), 50  $\mu$ M (2), 100  $\mu$ M (3), 250  $\mu$ M (4), 500  $\mu$ M (5).

En la **fig.10** podemos observar el resultado del quinto experimento realizado (**ver tabla 8**) donde se ve la banda de DNA no relacionado en todas las reacciones. Se observa una banda bien definida de retardamiento en el control C1 en el cual se utilizó una mezcla de la proteína MAP3773c en su forma de monómero, dímero y trímero. La banda de retardamiento no se observó en los controles C2 y C3, tampoco en el resto de las reacciones donde se utilizó la proteína MAP3773c en su forma monomérica.



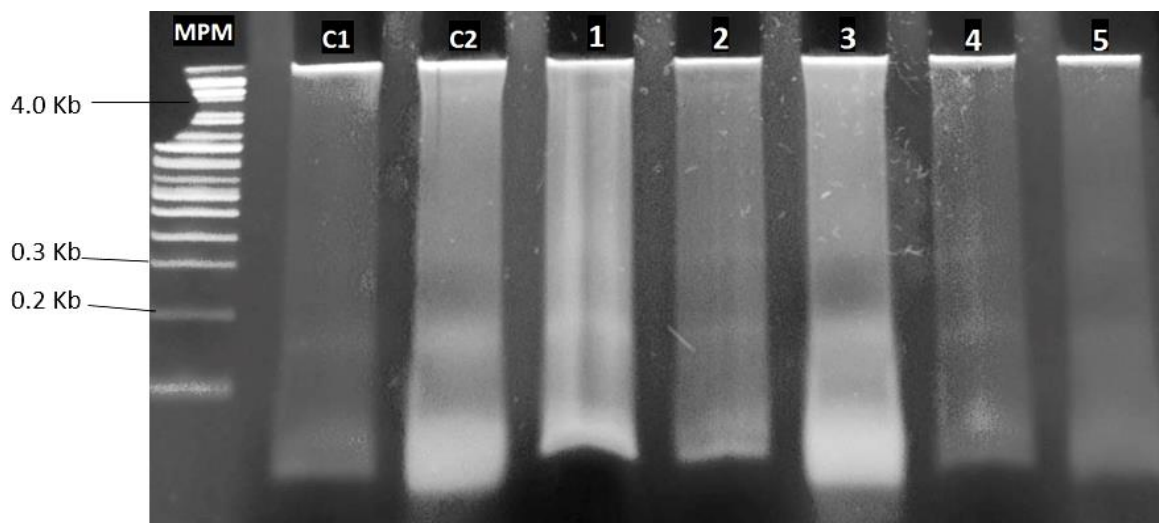
**Figura 11a. EMSA en Gel de poliacrilamida teñido con Bromuro de Etidio.** De izquierda a derecha: Marcador de peso molecular (MPM), 5 reacciones con solución madre, 3  $\mu$ L proteína MAP3773c en su forma monomérica y  $ZnSO_4$  en diferentes concentraciones; 25  $\mu$ M (1), 50  $\mu$ M (2), 100  $\mu$ M (3), 250  $\mu$ M (4), 500  $\mu$ M (5). Control con solución madre, sin proteína y sin  $ZnSO_4$  (C1) y control con solución madre, con proteína MAP3773c (monómero) y sin  $ZnSO_4$ .

Los resultados de este experimento (**Ver tabla 9**) se pueden apreciar en la **fig.11a**. En ninguna de las reacciones de este experimento se observó como resultado la banda de DNA no relacionado que se añadió con la solución madre, esto debido probablemente a que la amplificación del DNA por medio de PCR realizada previo al experimento, obtuvo un rendimiento nulo. Se observó una banda muy tenue en las 5 reacciones que contenían  $ZnSO_4$ . Sin embargo, los controles C1 y C2 presentaron esta misma banda. Este experimento se realizó por triplicado (**Ver Fig. 11b y 11c**).



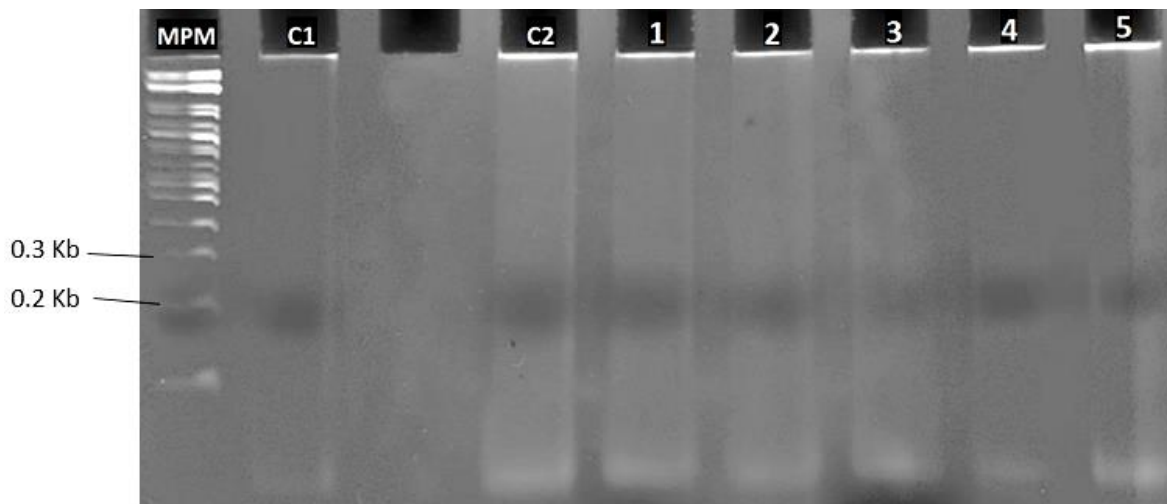
**Figura 11b. EMSA en Gel de poliacrilamida teñido con Bromuro de Etidio.** De izquierda a derecha: Marcador de peso molecular (MPM), control con solución madre, sin proteína y sin  $ZnSO_4$  (C1) y control con solución madre, con 3  $\mu L$  de proteína MAP3773c (monómero) y sin  $ZnSO_4$  (C2) Reacciones con solución madre, 3  $\mu L$  proteína MAP3773c en su forma monomérica y  $ZnSO_4$  en diferentes concentraciones; 25  $\mu M$  (1), 50  $\mu M$  (2), 100  $\mu M$  (3), 250  $\mu M$  (4), 500  $\mu M$  (5).

En la **fig. 11b** se puede apreciar el segundo resultado (duplicado) para el experimento anterior (**Ver tabla 9**). En la imagen se observa bien definida para todas las reacciones la banda de DNA no relacionado. Se observan dos bandas tenues de 0.9 y 1.0 Kb en todas las reacciones, incluidos los controles que pueden ser producto de contaminación del plásmido que se utilizó para amplificar el DNA no relacionado. Se observó retardamiento en el control C2 y en la reacción 2, esto probablemente debido a un error en la preparación de las mezclas.



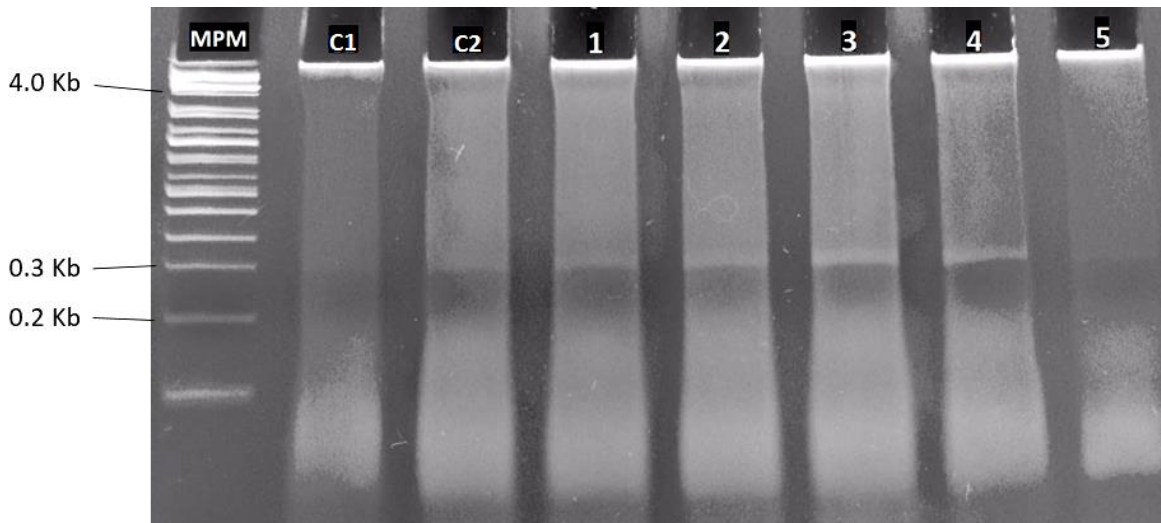
**Figura 11c. EMSA en Gel de poliacrilamida teñido con Bromuro de Etidio.** De izquierda a derecha: Marcador de peso molecular (MPM), control con solución madre, sin proteína y sin  $ZnSO_4$  (C1) y control con solución madre, con 3  $\mu L$  de proteína MAP3773c (monómero) y sin  $ZnSO_4$ . Reacciones con solución madre, 3  $\mu L$  proteína MAP3773c en su forma monomérica y  $ZnSO_4$  en diferentes concentraciones; 25  $\mu M$  (1), 50  $\mu M$  (2), 100  $\mu M$  (3), 250  $\mu M$  (4), 500  $\mu M$  (5).

El experimento se realizó por tercera ocasión (*ver fig. 11c*), como resultado se observó un ligero retardamiento en las reacciones 1, 2, y 4, probablemente debido a un error en las concentraciones de  $ZnSO_4$  añadidas las dichas reacciones.



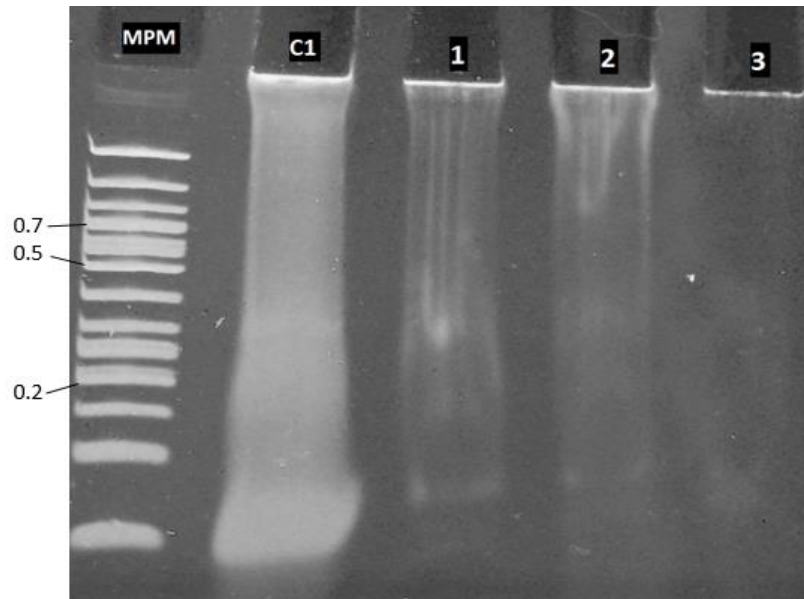
**Figura 12. EMSA en Gel de poliacrilamida teñido con Bromuro de Etidio.** De izquierda a derecha: Marcador de peso molecular (MPM), control con solución madre, sin proteína y sin  $ZnSO_4$  (C1) y control con solución madre, con 3  $\mu L$  de proteína MAP3773c (monómero) y sin  $ZnSO_4$ . Reacciones con solución madre, 3  $\mu L$  proteína MAP3773c en su forma monomérica y  $ZnSO_4$  en diferentes concentraciones; 25  $\mu M$  (1), 50  $\mu M$  (2), 100  $\mu M$  (3), 250  $\mu M$  (4), 500  $\mu M$  (5).

Para el experimento que se describe en la **tabla 10** se utilizaron las mismas concentraciones de  $ZnSO_4$  que se habían trabajado previamente, para este experimento se utilizaron en la solución 3  $\mu L$  de DNA no relacionado. Al teñir y observar el gel (**Ver fig.12**) no se encontraron bandas.



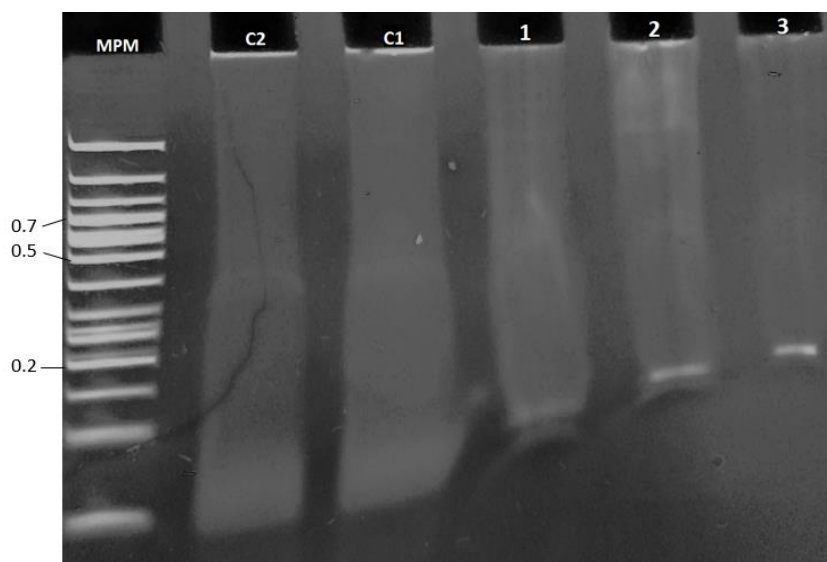
**Figura 13. EMSA en Gel de poliacrilamida teñido con Bromuro de Etidio.** De izquierda a derecha: Marcador de peso molecular (MPM), control con solución madre, sin proteína y sin  $ZnSO_4$  (C1) y control con solución madre, con 3  $\mu L$  de proteína MAP3773c (monómero) y sin  $ZnSO_4$ . Reacciones con solución madre, 3  $\mu L$  proteína MAP3773c en su forma monomérica y  $ZnSO_4$  en diferentes concentraciones; 25  $\mu M$  (1), 50  $\mu M$  (2), 100  $\mu M$  (3), 250  $\mu M$  (4), 500  $\mu M$  (5).

En los resultados del experimento 8 (**ver tabla 11**) observamos la banda de DNA no relacionado en todas las reacciones, sin embargo, no se observó banda de retardamiento (**Ver fig. 13**).



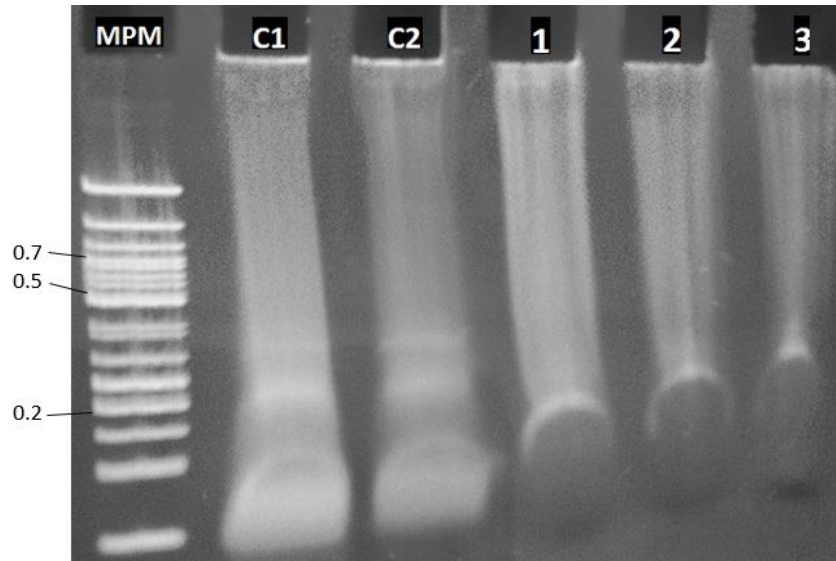
**Figura 14. EMSA en Gel de poliacrilamida teñido con Bromuro de Etidio.** De izquierda a derecha: Marcador de peso molecular, control con solución madre, con 3  $\mu\text{L}$  de proteína MAP3773c (monómero) y sin  $\text{ZnSO}_4$  (C1) Reacciones con solución madre, 3  $\mu\text{L}$  proteína MAP3773c (monómero) y  $\text{ZnSO}_4$  en diferentes concentraciones; 100 mM (1), 150 mM (2), 200 mM (3).

En el experimento que se describe en la **tabla 12**, una vez teñido se puede apreciar un retardamiento en las reacciones 1 y 2, en el experimento 3 no es visible el retardamiento.



**Figura 15a. EMSA en Gel de poliacrilamida teñido con Bromuro de Etidio.** De izquierda a derecha: Marcador de peso molecular, control con solución madre, sin proteína y sin  $ZnSO_4$  (C1) control con solución madre, con  $3 \mu L$  de proteína MAP3773c (monómero) y sin  $ZnSO_4$  (C2) Reacciones con solución madre,  $3 \mu L$  proteína MAP3773c (monómero) y  $ZnSO_4$  en diferentes concentraciones; 100 mM (1), 150 mM (2), 200 mM (3).

En este experimento se observaron ligeramente las bandas correspondientes al DNA no relacionado en todas las reacciones. Se observaron bandas de retardamiento en las 3 reacciones, que fueron mostrando un incremento en la intensidad y en el peso molecular a medida que incrementaban las concentraciones del  $ZnSO_4$ . En las reacciones empleadas como controles no se observaron bandas de retardamiento (**Ver fig. 15a**).



**Figura 15b. EMSA en Gel de poliacrilamida teñido con Bromuro de Etidio.** De izquierda a derecha: Marcador de peso molecular, control con solución madre, sin proteína y sin ZnSO<sub>4</sub> (C1) control con solución madre, con 3 μL de proteína MAP3773c (monómero) y sin ZnSO<sub>4</sub> (C2) Reacciones con solución madre, 3 μL proteína MAP3773c (monómero) y ZnSO<sub>4</sub> en diferentes concentraciones; 100 mM (1), 150 mM (2), 200 mM (3).

En este experimento se logró observar una banda de retardamiento para cada una de las reacciones, dicha banda incrementa su peso molecular conforme incrementa la concentración de ZnSO<sub>4</sub>. En los controles no se observaron bandas de retardamiento (**Ver fig. 15b**).

## VIII. CONCLUSIONES

Los resultados presentados en este trabajo señalan que la proteína MAP3773c tiene afinidad por la región TAATAG del promotor T7, y proporcionan, además, información sobre la influencia de la estructura de la proteína en su afinidad por dicha región, en condiciones de presencia y ausencia de zinc.

Como se pudo ver en los experimentos realizados con la mezcla de sus formas monomérica, dimérica y trimérica, al observarse banda de retardamiento, la proteína tiene afinidad por la región TAATAG. Sin embargo, en los experimentos realizados con la proteína únicamente en su forma monomérica no hubo banda de retardamiento visible, por lo cual podemos atribuir esta afinidad por la región TAATAG a una conformación oligomérica de la proteína MAP3773c.

Los experimentos realizados en condiciones de disposición de zinc revelaron que este elemento no modifica la afinidad observada de la forma dimérica/trimérica de MAP3773c al observarse de igual forma la banda de retardamiento. Sin embargo, una banda de retardamiento de menor peso molecular es visible a partir de la adición de  $ZnSO_4$  en los experimentos realizados con MAP3773c monomérica al igual que en los experimentos realizados con la mezcla monómero/dímero/trímero, lo cual deja ver que la afinidad de la forma monomérica de la proteína es favorecida en presencia de zinc en concentraciones elevadas.

Esta información nos deja saber que la forma dimérica y/o trimérica de la proteína MAP3773c tiene una afinidad por la región TAATAG independientemente de las condiciones de zinc existentes en el medio. Mientras que, por otro lado, la forma monomérica, que en condiciones carentes de este elemento no muestra afinidad por la región TAATAG, en un ambiente con exceso de zinc ve incrementada dicha afinidad. Estos datos revelan la posibilidad de que el zinc favorezca la oligomerización de la proteína adoptando una conformación más favorable para la unión con la región del DNA.

Tomando en cuenta que MAP3773c, como proteína Fur, participa en los mecanismos de defensa de *M. avium subsp. paratuberculosis* evitando específicamente el exceso de hierro intracelular, a través de su unión a regiones TAATAG para su autorregulación o represión de genes relacionados con la captación del hierro, el conocimiento de las condiciones que anulan o favorecen su afinidad con estas regiones brinda las pautas necesarias el diseño de nuevos fármacos auxiliares en el tratamiento y prevención de las enfermedades ocasionadas por MAP.

## IX. BIBLIOGRAFIA

1. Rindi, L. a. (2014). Genetic diversity and phylogenetic of *Mycobacterium avium*. *Infection, Genetics and Evolution.*, 21, 375-383.
2. Retamal, P. B. (2011). *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* y enfermedad de Crohn: evidencia de una zoonosis. *Rev Med Chile*, 139, 794-801.
3. Stratmann, J. S. (2004). A 38-Kilobase Pathogenicity Island Specific for *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Encodes Cell Surface Proteins Expressed in the Host. *Infection and Immunity.*, 72(3), 1265-1274. doi:10.1128/IAI.72.3.1265-1274.2004
4. Manning, E. a. (2001). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz*, 20(1), 133-150.
5. Sánchez, A. A. (2009). *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* infection in a criollo limonero herd. *Rev. Cient. (Maracaibo)*, 19(6). Obtenido de [http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0798-22592009000600002](http://www.scielo.org.ve/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0798-22592009000600002)
6. Cirone, K. M. (2007). *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: presencia en los alimentos y su relación con la enfermedad de Crohn. *Rev. argent. microbiol*, 39(1). Obtenido de [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0325-75412007000100014](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0325-75412007000100014)
7. Li, L. B. (2005). The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. *PNAS*, 102(35), 12344-12349.
8. OIE. (2008). Manual de la OIE sobre animales terrestres. Obtenido de [http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf\\_es\\_2008/2.01.11.%20Paratuberculosis.pdf](http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es_2008/2.01.11.%20Paratuberculosis.pdf)
9. Delgado, A. S. (01 de 2017). Actualidad Ganadería. Obtenido de <http://www.actualidadganadera.com/articulos/paratuberculosis-una-enfermedad-emergente.html>
10. Iowa State University. (04 de 2007). The center for food security and public health. Obtenido de <http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/paratuberculosis-es.pdf>
11. Fillat, M. (2014). The Fur (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 546, 41-52
12. Escolar, L. P.-M. (1999). Opening the Iron Box: Transcriptional Metalloregulation by the Fur Protein. *Journal of Bacteriology.*, 181(20), 6223-6229.
13. Chantes, A. N. (2012). El hierro, elemento metálico importante en la vida y en los procesos infecciosos. *Ciencia y Cultura Elementos*, 19(85), 41. Obtenido de <http://www.elementos.buap.mx/num85/htm/41.htm>
14. Carpenter, B. W. (2009). This Is Not Your Mother's Repressor: The Complex Role of Fur in Pathogenesis. *Infection and Immunity*, 77(1), 2590-2601. doi:10.1128/IAI.00116-09
15. Troxell, B. y. (2013). Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.*, 3. doi:10.3389/fcimb.2013.00059
16. Wang, E. O. (1999). The Ferric Uptake Regulation (Fur) Repressor Is a Zinc Metalloprotein. *Biochemistry*, 38, 6559-6569.
17. MiST2.2. (s.f.). Obtenido de <http://mistdb.com/proteins/view/1226669>

18. UniProt Consortium. (2016). UniProt. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2757439/>
19. Ibarra, G. (s.f.). Colloque ICP. Obtenido de [https://colloque.inra.fr/icp2016/layout/set/print/Submission/Self-regulation-of-the-map3773c-gene-of-Mycobacterium-avium-subsp.-paratuberculosis/\(offset\)/1](https://colloque.inra.fr/icp2016/layout/set/print/Submission/Self-regulation-of-the-map3773c-gene-of-Mycobacterium-avium-subsp.-paratuberculosis/(offset)/1)
20. Hellman, L. a. (2007). NCBI. doi: 10.1038/nprot.2007.249

## ANEXO I. SOLUCIONES Y REACTIVOS

1. ABS – Albumina sérica bovina

2. Binding Buffer 5x

Hepes 1M	800 $\mu$ L
DTT 1M	10 $\mu$ L
EDTA 0.5M	8 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	2 mL

3. Buffer 10x

4. Cloruro de manganeso (86.91 mM)

5. Dimetil sulfoxido

6. dNTP's (Mezcla)

2' Deoxyadenosine 5'	10 $\mu$ L
DT – 103F	10 $\mu$ L
2' Deoxycytidine 5'	10 $\mu$ L
2' Deoxyguanosine 5'	10 $\mu$ L
H <sub>2</sub> O	60 $\mu$ L

7. DTT

8. Fenol/Cloroformo/Isoamilico (50:49:1)

Fenol	50 ml
Cloroformo	49 ml
Alcohol Isoamilico	1 ml

9. Ficoll 40x

10. Glicerol 50%

Glicerol	5 ml
H <sub>2</sub> O	5 ml

11. Persulfato de amonio 10x

12. Sulfato de zinc 4000  $\mu$ M

ZnSO <sub>4</sub>	35.89 mg
H <sub>2</sub> O	Hasta a 5 ml

13. Sulfato de zinc 10000  $\mu$ M

ZnSO <sub>4</sub>	89.72 mg
H <sub>2</sub> O	Hasta a 5 ml

14. Sulfato de zinc 20000  $\mu$ M

ZnSO <sub>4</sub>	179.45 mg
H <sub>2</sub> O	Hasta a 5 ml

15. Sulfato de zinc 1000 mM

ZnSO <sub>4</sub>	8,972.5 mg
H <sub>2</sub> O	Hasta a 5 ml

16. TAE 50x

17. TAE 1x

TAE 50x	10 ml
H <sub>2</sub> O	Hasta 500 ml

18. TBE 5x

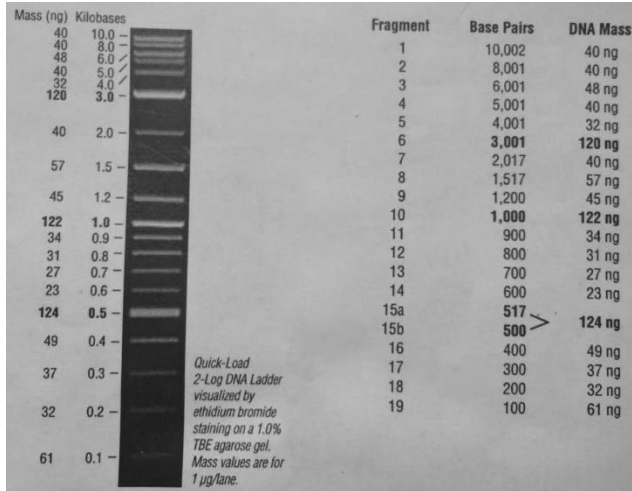
EDTA	4.6875 g	
Trizma Base	54 g	Ajustar
Ácido Bórico	27.5 g	pH = 8.3
H <sub>2</sub> O	Hasta 1 L	

19. TBE 1x

TBE 5x	200 ml
H <sub>2</sub> O	Hasta 1L

## ANEXO II. MARCADOR DE PESO MOLECULAR

### Quick-Load® 2-Log DNA Ladder (0.1 – 10.0 Kb)



**Quick-Load® 2-Log DNA Ladder (0.1–10.0 kb)**

1-800-632-7799  
info@neb.com  
www.neb.com

**N0469S**

125-250 gel lanes (1.25 ml) Lot: 0171209  
100 µg/ml Store at 4°C Exp: 9/14

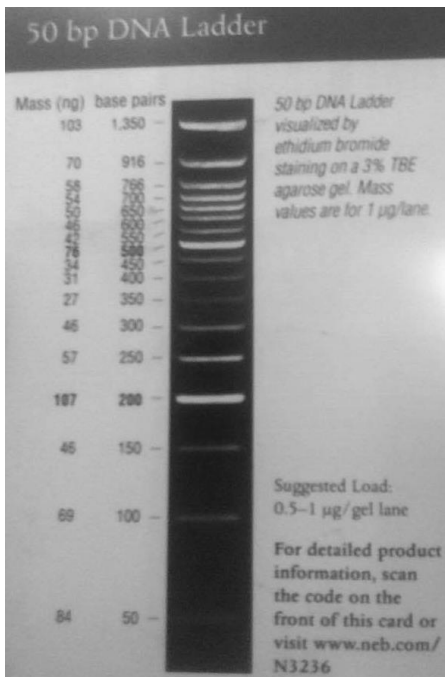
**Description:** Quick-Load® 2-Log DNA Ladder is a pre-mixed, ready-to-load molecular weight marker containing bromophenol blue as a tracking dye.

The DNA Ladder consists of proprietary plasmids which are digested to completion with appropriate restriction enzymes to yield 19 bands suitable for use as molecular weight standards for agarose gel electrophoresis. This digested DNA includes fragments ranging from 100 bp to 10 kb. The 0.5, 1.0 and 3.0 kb bands have increased intensity to serve as reference bands.

**Usage Recommendation:** We recommend loading 5–10 µl (0.5–1.0 µg) of Quick-Load 2-Log DNA Ladder per gel lane. The Quick-Load 2-Log DNA Ladder is not intended for precise quantification of DNA mass but can be used for approximating the mass of DNA in comparably intense samples of similar size. The approximate mass of DNA in each of the bands in our Quick-Load 2-Log DNA Ladder is indicated assuming a 10 µl (1.0 µg) load.

Ready-to-load, Stable at 25°C

### 50 bp DNA Ladder, BioLabs®



### ANEXO III. ABREVIATURAS.

1. C1; Control 1
2. C2; Control 2
3. C3; Control 3
4. EMSA; *Electrophoretic mobility shift assay*, por sus siglas en ingles. Se traduce como: Ensayo de cambio en la movilidad electroforética.
5. Grado BM; Agua grado Biología Molecular, hace referencia al agua libre de proteasas, DNAsas y RNAasas.
6. Kb; Kilobases, equivalente a 1000 pares de bases.
7. mg; miligramo.
8. mL; mililitro.
9. MPM; Marcador de peso molecular.
10. Pb; Pares de bases
11. PCR; Reacción en cadena de la polimerasa.
12.  $\mu$ L; microlitro.
13.  $\mu$ M; micromolar.