

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS E INGENIERÍA



"Interacción de la proteína MAP3773c de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* con el ADN de ferroportina 1 de ratón"

TESIS

Que presenta para obtener el grado de MAESTRO EN CIENCIAS

QFB. Quintero Chávez Kaina

Dra. Bertha Landeros Sánchez

Director de tesis

Dra. Mirna del Carmen Brito Perea

Codirector de tesis

Tijuana B. C. Noviembre 2022

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

Folio No.337

Tijuana, B.C., a 17 de noviembre del 2022

C. Kaina Quintero Chávez
Pasante de: Maestría en Ciencias
Presente

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

Es propuesto, por los C. Dra. Bertha Landeros Sánchez y
Dra. Mirna Del Carmen Brito Perea.

Quienes serán las responsables de la calidad del trabajo que usted presente,
referido al tema “Interacción de la proteína MAP3773c
de *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis* con el ADN de ferroportina 1
de ratón ”

El cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

- I. INTRODUCCIÓN
- II. MARCO TEÓRICO
- III. METODOLOGIA
- IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES
- V. REFERENCIAS
- VI. APÉNDICE



Dra. Ana Alejandra Ramirez Rodriguez
Sub-Directora



M.C. Roberto Alejandro Reyes Martinez
Director

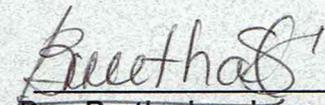
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN



Dra. Mirna Del Carmen Brito Perea
Co - Directora de Tesis



Dra. Bertha Landeros Sánchez
Directora de Tesis

DEDICATORIA

A mis padres y hermanas, quienes siempre me han apoyados en todo lo que me propongo y por su paciencia.

A mis amigos que siempre me dieron ánimos para seguir adelante con mis estudios y levantaron cuando más lo necesitaba.

Finalmente quiero dedicar esta tesis a mis sinodales y tutores, en especial a la Dra. Bertha Landeros, a quien le doy mi respeto y admiración, por ser mi guía durante todo este proceso y por todo su apoyo y motivación.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada, a la Universidad Autónoma de Baja California, tanto a la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería (FCQI) Campus Tijuana como al el Laboratorio de la Dra. Bertha Landeros Sanchez

Contenido

DEDICATORIA	2
AGRADECIMIENTOS	3
CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN	6
1.1 Antecedentes	8
1.1.1 Homología y Docking.....	8
1.1.2 <i>Mycobacterium avium</i> subs. <i>paratuberculosis</i>	10
1.1.4 Regulación de Ferroportina.....	12
1.1.5 Efectos potenciales en la salud pública	13
1.2 Justificación	14
1.3 Hipótesis.....	15
1.4 Objetivo General	15
1.5 Objetivos específicos	15
CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO	17
2.1 Ferroportina.....	17
2.1.1 Control de señales intracelulares Ferroportina	18
2.2 Hierro	19
2.2.1 Importación de hierro a las células	20
2.2.2 Exportación de hierro.....	21
2.2.3 Reciclaje de hierro	22
3. <i>Mycobacterium avium</i> subsp. <i>paratuberculosis</i>	23
3.1.2 Taxonomía y Propiedades.....	23
3.1 Enfermedad de Johne's	25
3.2 Histopatología	26
3.3 Respuesta inmunitaria.....	26
3.3 Epidemiología	28
4. Fur: regulador de captación férrico.....	29
4.1 Proteína Fur: Propiedades generales.....	29
4.1.1 Proteína MAP3773c.....	31

CAPITULO III. METODOLOGÍA Y MATERIALES	31
3.1 Predicción in <i>Silico</i>	31
3.1.1 Predicción de estructura molecular de MAP3773c basada en un modelo.	31
3.1.1.2 Chimera 1.12.....	34
3.1.1.2 Requisitos.....	34
3.1.2 Preparación de la proteína objetivo para el análisis superposición	35
3.1.3 Hex 8.0	36
3.2 Preparación de Cromatografía en columna de intercambio iónico en Sefarosa	39
3.3 Purificación y lisis celular.....	40
3.4 Análisis por electroforesis SDS-PAGE y diálisis	41
3.5 Preparación de EMSA.....	42
3.5.1 Preparación de gel Acrilamida: Bisacrilamida 29:1 (solución al 30 %/electroforesis), Fisher BioReagents.....	42
3.5.2 Preparación de muestras y revelación de gel	42
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	44
5.1 Estructura 2O03	67
5.2 Estructura 3MWM	69
5.3 Estructura 5FD6	70
5.4 Estructura 4RB1	71
CAPITULO VI. CONCLUSIÓN.....	73
Abreviaturas	74
APÉNDICE	76

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

Paratuberculosis (PTB), también conocida como enfermedad de Jonhe's (JD) es una enteritis crónica causada por *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP) que afecta a rumiantes y mamíferos salvajes en todo el mundo (Elmagzoub et al., 2020). También está implicado como la causa de la enfermedad de Crohn, una enfermedad inflamatoria en humanos (Ssekitoleko et al., 2021). La enfermedad JD durante la fase clínica lo cual conduce a reducción de la producción de leche y/o muerte prematura. (DeKuiper et al., 2020).

Paratuberculosis es una de las enfermedades infecciosas más graves del ganado lechero, provocando enormes pérdidas económicas en la producción en términos de pérdida de leche, reducción de la ganancia de peso, muertes y aumento del costo del control de enfermedades (Ssekitoleko et al., 2021). Se han reportado pérdidas económicas debido a la paratuberculosis, pero los estudios son difíciles de cuantificar. Una pérdida anual aproximada para la industria láctea de EE. UU. de \$200 millones a \$1.3 mil millones entre \$21 y \$79 por vaca. Este es un factor clave para el control de enfermedades. Además, no solo afectan a las granjas infectadas, sino que también tienen un impacto económico negativo en los consumidores (DeKuiper et al., 2020) (Whittington et al., 2019).

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* tiene requisitos especiales de hierro, requisitos indispensables para su supervivencia y rutas metabólicas. El hierro, es vital para los procesos biológicos fundamentales regulados por ferroportina, sin embargo, las altas concentraciones intracelulares de hierro libre son tóxicas para las bacterias. Como tal, las células han desarrollado procesos estrictamente regulados para la homeostasis de metales intracelulares. Las bacterias controlan la homeostasis de los metales mediante la activación de un conjunto de genes regulados por factores de transcripción de detección de metales conocidos como proteínas

metalorreguladoras. En procariotas, existen dos familias principales de metalorreguladores: la toxina diftérica (DtxR) y el regulador de absorción férrica (Fur) (Ganusov et al., 2015).

Con la finalidad de estudiar estas rutas metabólicas y la proteína de interés tipo Fur MAP3773c los avances de tecnología nos disponen de herramientas computacionales para predecir y/o modelar proteínas aún no disponibles en PDB así como predecir la interacción de proteínas-proteínas y ADN. Con el propósito de obtener una estructura lo más cercano a lo real. En este texto se demostrará la interacción entre MAP3773c y secuencias de ADN que interaccionan con la caja de hierro de bacterias, micobacterias de ferroportina 1, con el objetivo de proporcionar información futura sobre el mecanismo transcripcional.

Los modelos de homología ahora se pueden producir rápidamente para casi cualquier tamaño o secuencia de proteína. Cuando se utilizan en lugar de estructuras experimentales para actividades como la detección virtual de drogas, las redes troncales para servidores de acoplamiento pueden lograr una precisión comparable a la que se obtiene con las estructuras experimentales. Por lo tanto, es crucial decidir en qué punto se debe esperar que estas investigaciones de acoplamiento produzcan los mismos resultados en un modelo de homología que en una estructura real. Debido a que el acoplamiento puede dar varias respuestas desde el mismo punto de partida inicial de coordenadas atómicas moleculares y proteicas, determinar este umbral es particularmente difícil. Por lo general, el acoplamiento se utiliza para brindar una explicación más completa de la información obtenida de los estudios experimentales. Sin embargo, la herramienta de acoplamiento se puede utilizar de manera más amplia como una forma de describir la forma y las características interfaciales de una proteína sin intentar relacionar los resultados con los datos experimentales. El acoplamiento no es perfecto, pero

demostramos aquí que las variaciones en su nivel de repetibilidad pueden ser instructivas en sí mismas (Lagares et al., 2020).

1.1 Antecedentes

1.1.1 Homología y Docking

Erva et al., 2016 en un estudio de leucemia linfocítica aguda (LLA) una enfermedad terrible que afecta a personas de todo el mundo. Donde la desaminación de L-asparagina y L-glutamina es esencial para tratar la LLA. A través de estudios experimentales, otros investigadores han validado el papel de Elspar® (L-asparaginasa de *Escherichia coli*) en el control de L-Asn y L-Gln. Debido a la escasez de conocimientos sobre las interacciones moleculares de Elspar® con sustratos de aminoácidos, la investigación terapéutica contra la LLA seguía siendo un desafío. En el estudio se encontraron residuos clave en los mecanismos de unión y unión de ligandos empleando varios métodos de acoplamiento y cavidades de unión. Se llevaron a cabo simulaciones MD para la enzima en estado apo y los complejos en estado unido al ligando. La relación entre L-Asn y la enzima L-asparaginasa en el sistema dinámico con menos estabilidad que el complejo L-Gln acoplado se estableció mediante análisis de trayectoria durante una ejecución de 30 ns.

El análisis computacional utilizó acoplamiento molecular como Hex 8.0, PatchDock, FireDock y Pymol para describir el proceso de unión a nivel molecular por patrón de unión de ligando en 1NNS con L-Asn L-Asn y L-Gln. Los resultados del acoplamiento se usaron para identificar cavidades de unión y residuos críticos en la unión. Los hallazgos de estos estudios *in silico* respaldan un estudio estructural adicional sobre la L-asparaginasa para diseñar nuevos inhibidores que puedan usarse en el tratamiento eficaz de la LLA.

En general, los resultados confirmaron sustancialmente la bi-funcionalidad del fármaco enzimático. Debido a la interacción del ligando, la estructura 1NNS experimentó una cantidad significativa de cambios conformacionales. Los hallazgos del estudio actual brindan mucha más información sobre los elementos estructurales y funcionales de la asparaginasa de interacción L de *E. coli* con sus ligandos, lo que puede ser beneficioso para desarrollar tratamientos efectivos para la LLA. El cual tiene como objetivo comprender la información molecular sobre la enzima y sus interacciones con los sustratos a través del acoplamiento y probar la estabilidad de la enzima y los complejos acoplados en condiciones fisiológicas utilizando dinámica molecular y métodos de simulación (Erva et al., 2016).

La predicción de la estructura de las proteínas ha sido durante mucho tiempo un importante desafío de investigación en biología computacional. Aunque las simulaciones de dinámica molecular son computacionalmente costosas para proteínas medianas y grandes, los científicos las han utilizado para obtener información sobre el plegamiento de proteínas, particularmente para proteínas diminutas. Independientemente del tamaño de una proteína, el modelo de homología ha demostrado ser un método relativamente rápido para obtener una estructura de proteína predicha basada en estructuras experimentales que se encuentran en el Banco de datos de proteínas. La disponibilidad de plantillas de estructuras experimentales ha puesto restricciones en el modelado de homología, y la calidad del modelo está influenciada por la distancia evolutiva entre las proteínas diana y la plantilla. Una herramienta común en el descubrimiento de fármacos asistido por computadora es el acoplamiento molecular. Es un enfoque computacionalmente barato para comprender las interacciones fármaco-proteína. Incluida la conformación y afinidad de unión de un fármaco (Plonski & Reed, 2022).

Se ha reconocido que los modelos *in silico* son herramientas útiles, y las estrategias utilizadas son métodos de predicción basados en ligandos o basados en estructuras. Se ha utilizado ampliamente para predecir la actividad biológica utilizando la relación cuantitativa estructura-actividad (QSAR), una técnica convencional basada en ligandos, que ofrece plataformas de detección rápidas y asequibles para la identificación. Sin embargo, cuando se dispone de estructuras de alta resolución de los receptores, los enfoques basados en la estructura (como el acoplamiento molecular) permiten la investigación de las interacciones ligando-receptor a nivel atómico. Debido a que las estructuras de proteínas resueltas experimentalmente no siempre están disponibles, los estudios de acoplamiento en proteínas se han visto limitados en su capacidad para comprender los perfiles de interacción del sitio de unión (Lagares et al., 2020)

1.1.2 *Mycobacterium avium* subs. *paratuberculosis*

Las micobacterias patógenas experimentan una amplia gama de tensiones dentro de las células huésped. La capacidad de las micobacterias patógenas para superar la escasez y la toxicidad del hierro es un factor de virulencia clave por su capacidad para superar la privación y la toxicidad del hierro. Recientemente Janagama y colaboradores en el 2010 demostraron que, en presencia de hierro, IdeR de MAP reconoce una secuencia consenso en el promotor conocido como "caja de hierro" y regula la expresión de genes implicados en la adquisición (*mbt*) y el almacenamiento (*bfrA*) de hierro. La represión de *bfrA* por IdeR en presencia de hierro sugiere diferencias en los mecanismos de almacenamiento de hierro y/o requerimientos de hierro en las cepas de MAP bovinas y ovinas. Ambas cepas de MAP regularon al alza la expresión de genes implicados en la biosíntesis de sideróforos (*mbt*), la adquisición de hierro a partir de sideróforos sintetizados (*esx-3*) y el transporte de hierro a la bacteria (*irtAB*). Además, en condiciones

limitantes de hierro, la cepa MAP de ganado aumentó la transcripción de aconitasa mientras disminuye su expresión proteica. Esto nos dio una idea del mecanismo en el que *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* tiene identificado y caracterizado sus vías clave dependientes del hierro (Janagama et al., 2010)

Shoyama et al., 2020 pudieron confirmar una isla genómica específica de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* lleva un operón de transporte de metal putativo que incluye MAP3773c, que codifica una proteína similar a Fur. Aunque está bien caracterizado como un regulador global de la homeostasis del hierro en múltiples bacterias, se desconoce la función de Fur en MAP, ya que este organismo también lleva IdeR, una proteína reguladora de hierro nativa específica de las micobacterias. El análisis computacional que llevaron a cabo PRODORIC identificó 23 vías diferentes involucradas en la respiración, el metabolismo y la virulencia que probablemente estaban reguladas por MAP3773c (Shoyama et al., 2020).

Deng y colaboradores en el 2015 describen como el regulador de absorción férrico juega un papel clave en la homeostasis del hierro de los procariontes, como los patógenos bacterianos, pero los mecanismos moleculares y la base estructural de la unión de Fur-ADN aún no se conocen por completo. Describen estructuras de alta resolución de *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 Fur en cuatro estados diferentes: apo-Fur, holo-Fur, el complejo operador Fur-feoAB1 y el complejo Fur-*Pseudomonas aeruginosa* caja Fur. Apo-Fur es un dímero independiente de iones de metales de transición cuya interacción induce cambios conformacionales profundos y confiere capacidad de unión al ADN. La caracterización estructural, la mutagénesis, la bioquímica y los datos in vivo revelan que Fur reconoce el ADN usando una combinación de lectura de bases a través de contactos directos en la ranura principal, así como también la lectura de forma a través del reconocimiento del potencial electrostático de

ranura menor por parte de la lisina. La flexibilidad conformacional resultante permite la unión de Fur a diversos sustratos. Estos resultados brindan información sobre la activación de iones metálicos y el reconocimiento de sustratos por parte de Fur que sugieren vías para diseñar bacterias magnetotácticas y fármacos antipatógenos (Deng et al., 2015)

1.1.4 Regulación de Ferroportina

Los autores Verma et al., 2019 demostraron que la microbiota influye en la homeostasis del hierro sistémico en modelos de ratón con colitis, al alterar la expresión inducida por inflamación de la hormona hepcidina que regula el hierro, en su estudio examinaron el impacto de la bacteria comensal intestinal *Bacteroides fragilis* en la expresión del exportador de hierro ferroportina, el tipo de célula que juega un papel fundamental en el reciclaje del hierro. En los macrófagos derivados de médula ósea de ratón, se encontraron que en *B. fragilis* la disminución de la regulación de transcripción de ferroportina es independientemente de la viabilidad bacteriana. El medio condicionado por la bacteria también redujo la expresión de ferroportina, lo que indica la participación de factores solubles, posiblemente ligandos de receptores tipo Toll. De acuerdo con esta idea, varios de estos ligandos pudieron regular la disminución de ferroportina. Este decremento de ferroportina inducida por *B. fragilis* fue funcionalmente importante ya que produjo un aumento significativo en las concentraciones de hierro intracelular que evitó los efectos del agente quelante de hierro deferoxamina en la producción de IL-6 e IL-1 β inducida por *Salmonella entérica* serovariedad *Typhimurium*. Estos resultados revelan que *B. fragilis* puede influir en el manejo del hierro en el macrófago y las respuestas inflamatorias modulando la expresión ferroportina.

Se ha propuesto la alteración de Fpn para limitar el acceso del hierro de los macrófagos a los patógenos intracelulares. En estudios recientes demostrados por (Willemetz et al., 2017), se

reveló que la infección por *Salmonella* entérica serotipo Typhimurium en ratones mostró macrófagos tisulares con alto contenido de hierro (AcB61), niveles bajos de hierro basal o bajos de hierro Hamp knock out, Hamp (- / -). La presencia de hierro en los macrófagos AcB61 debido a la hemólisis extravascular y la alta actividad de eritrofagocitosis promovieron la proliferación de *Salmonella* en el bazo y el hígado con una disminución concomitante en la expresión de la proteína FPN. La expresión de FPN en los niveles de ARNm y proteína disminuyó fuertemente durante la infección con *Salmonella* en ratones Hamp -/-. También se observó inhibición del ARNm de Fpn en macrófagos en cultivo infectados con *Salmonella*. Además, la regulación a la baja de FPN se asoció con una disminución de las reservas de hierro en el hígado y el bazo en ratones infectados. Estos resultados sugieren que durante la infección por *Salmonella*, la FPN es reprimida por un mecanismo independiente del hierro y la hepcidina.

Las interacciones entre las proteínas y el ADN juegan un papel importante en muchos procesos biológicos esenciales, como la replicación, transcripción, empalme y reparación del ADN. La identificación de los residuos de aminoácidos involucrados en los sitios de unión al ADN es fundamental para comprender el mecanismo de estas actividades biológicas. En la última década, se han desarrollado numerosos enfoques computacionales para predecir los sitios de unión al ADN de proteínas basados en secuencias de proteínas y/o información estructural, que juegan un papel importante en el complemento de las estrategias experimentales (Si et al., 2015).

1.1.5 Efectos potenciales en la salud pública

Numerosos artículos han discutido la conexión entre MAP y los trastornos humanos. Los autores de una serie de artículos de revisión utilizando metodologías rigurosas llegaron a la conclusión de que había fuentes de exposición humana y que, a pesar de que *M. paratuberculosis*

tiene un impacto significativo en el desarrollo y la progresión de la enfermedad humana, su impacto en la salud pública no ha sido mayor. Aún no ha sido cuantificado o descrito. Entonces, si bien MAP puede infectar a los humanos, la infección puede conducir o no a la enfermedad de Crohn, con la que MAP se asocia con mayor frecuencia. Los evaluadores llegaron a la conclusión de que las consideraciones económicas y de salud animal impiden tomar más medidas más allá de los programas que las industrias láctea y de rumiantes habían diseñado previamente (Whittington et al., 2019).

1.2 Justificación

El conocimiento y entendimiento de las rutas de mecanismo transcripcional nos proporcionan información de cómo funcionan las herramientas de trabajo de los seres vivos. También nos proporcionan blancos para desarrollar vacunas, medicamentos y soluciones para enfermedades. En este texto se pretende proporcionar información sobre la interacción de MAP3773c con ferroportina con la finalidad de proveer nueva información para un nuevo mecanismo de regulación de expresión a nivel transcripcional. Sabemos que hay una inmensa cantidad de factores involucrados en la activación y represión de la expresión génica, lo cual suelen ser proteínas que interactúan con regiones específicas promotoras echando a dar una cadena de respuestas. La regulación de la transcripción puede ser un proceso sumamente complejo resultante de la interrelación entre varios reguladores. Con el objetivo de controlar la cantidad y la naturaleza de los genes. En esta tesis estaremos enfocados en el tema sobre la interacción de la proteína tipo Fur con una secuencia específica caja de hierro para la regulación de hierro y como afecta la expresión de ferroportina.

Actualmente, el sistema modelo de JD carece de correlatos indefinidos de protección y las fuentes de información debidas a JD. Como alternativa para estudiar comúnmente la respuesta inmune, como el paradigma de las rutas metabólicas, se ha sugerido una proteína tipo Fur aún no muy estudiada como blanco para conocer estas rutas metabólicas. Los efectos acumulativos de una infección en etapa subclínica prolongada, la falta de una vacuna eficaz y los peajes de diagnóstico insensibles han dificultado el control de la JD. con la información descubierta para finalizar el objetivo de comprender las vías potenciales para su supervivencia y así encontrar nuevas dianas para controlar o encontrar una vacuna eficaz con la finalidad de disminuir los porcentajes de infecciones y muertes (Whittington et al., 2019).

1.3 Hipótesis

La proteína MAP3773c de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* participa en el mecanismo de regulación a nivel transcripcional de la Ferroportina 1.

1.4 Objetivo General

Determinar la interacción de la proteína Map3773c de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*, en el ADN de Ferroportina 1 *in silico* e *in vitro*, para analizar un nuevo mecanismo de regulación de la expresión a nivel transcripcional.

1.5 Objetivos específicos

1. Crear un modelo de MAP3773c a partir de proteínas por homología.
2. Caracterizar parcialmente la proteína MAP3773c.
3. Realizar experimentos de interacción del monómero de MAP3773C, con la región GATAATGAGTGTTATCCTTAT, por la técnica de predicción utilizando programas de pruebas *in silico*.

4. Realizar experimentos de interacción del monómero de MAP3773C, con la región CACCTTACAGGCAGAAAAG, por la técnica de predicción utilizando programas de pruebas *in silico*.
5. Purificar la proteína MAP3773c mediante una Cromatografía en columna de intercambio iónico en Sefarosa.
6. Realizar ensayos con la proteína MAP3773c y la región GATAATGAGTGTTATCCTTAT, por la técnica de EMSA.
7. Realizar ensayos con la proteína MAP3773c y la región CACCTTACAGGCAGAAAAG, por la técnica de EMSA.
8. Evaluar los resultados *in silico* e *in vivo*.

CAPÍTULO II. MARCO TEÓRICO

2.1 Ferroportina

Las células pueden exportar hierro al torrente sanguíneo a través de la ferroportina, el único exportador de hierro. La ferroportina pertenece a la superfamilia facilitadora principal de transportadores secundarios y se expresa en muchos tipos de células. Se observa una alta expresión de ferroportina en enterocitos duodenales y macrófagos tisulares, que son fundamentales para la absorción de hierro en la dieta y el reciclaje de hierro de los glóbulos rojos senescentes, respectivamente. La ferroportina también se expresa en la mayoría de las otras células, incluidos los hepatocitos, y está involucrada en la movilización de hierro almacenado bajo deficiencia sistémica de hierro (Katsarou & Pantopoulos, 2020).

La ferroportina, un integrante del núcleo familiar de los portadores de solutos, se llama SLC40A1 sistemáticamente. La proteína humana tiene 571 aminoácidos para un peso molecular de cerca de 65-70 kD. La alteración en la masa molecular se debería posiblemente a la glicosilación específica del tejido, empero las secuelas funcionales de las diferencias de glicosilación en medio de las maneras purificadas de los enterocitos duodenales, hepatocitos y macrófagos todavía no se entienden. Estructuralmente, la ferroportina se basa en 2 haces de 6-transmembrana-hélice (lóbulo N y lóbulo C) ligados por un asa citoplasmática, con C- y N-terminal localizados en el citoplasma. Ambas asas de hélices encierran una cavidad por medio de la cual se considera que el hierro sale de la célula. Los exámenes estructurales de ferroportina indican que hay 2 sitios de alianza a metales divalentes, uno en cada lóbulo, ante la cavidad interna de la ferroportina (Nemeth & Ganz, 2021).

En estudios recientes, (Billesbølle et al., 2020) mencionan que la estructura de la ferroportina tiene dos sitios de unión de metales dentro de los dominios N y C terminales en los que el hierro se une al dominio N, lo que demuestra que el sitio principal para el eflujo de hierro y el sitio de unión de metales del dominio C es importante para la unión a la hepcidina. Concluyendo que la unión de la hepcidina a FPN es potenciada en gran medida por el propio hierro, potencialmente debido al efecto estabilizador que el hierro tiene sobre el sitio de unión de la hepcidina a FPN.

2.1.1 Control de señales intracelulares Ferroportina

Ferroportina está regulada por circunstancias intracelulares además del control sistémico por la hepcidina circulante. Estos mecanismos reguladores locales pueden reducir la toxicidad del hierro celular, mantener el hierro celular en momentos de insuficiencia sistémica de hierro o aumentar el efecto de las alteraciones sistémicas de la hepcidina. Además, los ligandos del receptor tipo Toll pueden reducir directamente los niveles de ARNm de ferroportina celular y disminuir la exportación de hierro celular al plasma (Nemeth & Ganz, 2021)

Mecanismo	Modo	Tipo de célula	Efecto celular en FPN
IRE-IRP	transcripcional	macrófago	↑ hierro celular = ↑ FPN
Hierro vía Nrf2	transcripcional	Macrófago	↑ hierro celular = ↑ FPN
miR-485-3p	Traducción	Múltiples tipo de células	↓ hierro celular = ↓ FPN
HIF2 α	transcripcional	eritrocito	↑ miRNA = ↓ FPN

Tabla 1. Hecidina- independiente mecanismo que regula a ferroportin. Tabla modificada de Nemeth & Ganz, 2021

El sistema IRE-IRP funciona en la mayoría de las células para coordinar la traducción de ferroportina con niveles de hierro intracelular. El ARNm de ferroportina contiene 5' IRE. Bajo deficiencia de hierro, la asociación de IRP1/2 con 5' IRE inhibe la traducción de ferroportina, limita la exportación de hierro y retiene el hierro en las células. Los niveles bajos de hepcidina en la deficiencia de hierro y la anemia permiten la exportación continua de hierro de los enterocitos, lo que lleva a la activación del sistema HIF de los enterocitos (especialmente HIF2 α), que mejora aún más la transcripción de ferroportina. HIF2 α también media un aumento en otras proteínas que codifican ARNm involucradas en la absorción apical de hierro en la dieta (DCYTB y DMT1), lo que da como resultado un aumento coordinado en el transporte de hierro apical y basal y un aumento general en la absorción de hierro en el duodeno.

2.2 Hierro

El hierro es un oligoelemento esencial para la mayoría de todos los organismos. A pesar de que el hierro es uno de los elementos más abundantes en la corteza terrestre, el hierro férrico, una forma oxidada común en el ambiente rico en oxígeno en la superficie de la Tierra, es poco soluble y difícil de acceder por la mayoría de las formas de vida. En consecuencia, los organismos biológicos han desarrollado mecanismos que conservan el hierro y lo reciclan internamente. En humanos adultos, el contenido total de hierro corporal es de aproximadamente 3-4 g, mientras que las pérdidas diarias normales son de 1-2 mg. Para mantenerse en equilibrio de hierro, los humanos sanos deben absorber una cantidad similar de hierro de sus dietas (Nemeth & Ganz, 2021).

El hierro se encuentra en estado de oxidación férrica en soluciones acuosas y en presencia de oxígeno, que es poco soluble y requiere la unión a proteínas o quelantes hidrofílicos para ser

fisiológicamente accesible. El hierro libre es un arma de dos filos: es necesario para la vida pero también extremadamente dañino debido a su reactividad química. El hierro, necesario para una amplia gama de reacciones de oxidación / reducción y como sustrato para el grupo hemo. A pesar de este papel central, el hierro ferroso libre Fe^{2+} es tóxico. En exceso, el hierro puede catalizar la producción de radicales libres, lo que lleva al daño celular. Por lo tanto, el hierro está estrechamente controlado, tanto a nivel celular como de organismo (Marchetti et al., 2020).

El secuestro de hierro dentro de las proteínas tiene el doble beneficio de controlar y regular su reactividad y al mismo tiempo suprimir el desarrollo bacteriano. Weinberg acuñó el término "inmunidad nutricional" en la década de 1970 para describir el uso de la extracción de hierro para limitar los nutrientes disponibles para las bacterias y, por lo tanto, suprimir su proliferación en el huésped humano. Además, en entornos de infección/inflamación, esta defensa de primera línea se activa, lo que da como resultado hipoferremia relacionada con la infección (Marchetti et al., 2020).

(Van Zandt et al., 2008) han demostrado que la infección de macrófagos con el patógeno intracelular *Mycobacterium avium* da como resultado un aumento en la expresión de ARNm para las proteínas de transporte de hierro Nramp1 (Slc11a1) y Nramp2 (Slc11a2) y una disminución en la expresión del ARNm del receptor de transferrina. Regulación de FPN1 en macrófagos por infección y estímulo inflamatorio tiende a tener un efecto regulatorio negativo en la expresión de FPN1.

2.2.1 Importación de hierro a las células

El hierro intracelular es necesario para una variedad de propósitos; cuando no se utiliza, se almacena en ferritina o se exporta mediante ferroportina para mantener la reserva de hierro

lábil dentro de límites estrechos para evitar la toxicidad. Si bien todas las células pueden importar, exportar o almacenar hierro, algunas tienen funciones únicas: por ejemplo, los eritroblastos se especializan en la ingesta de hierro, mientras que los macrófagos y los enterocitos se especializan en la exportación de hierro y los hepatocitos en el almacenamiento de hierro. La mayor parte del hierro dentro de las células se transporta a las mitocondrias para la formación de grupos de hemo y Fe/S. El hemo es necesario para la función de la hemoglobina, los citocromos y las enzimas. La biogénesis del grupo Fe/S es un proceso que se ha conservado desde la levadura hasta los humanos: este grupo protésico es necesario para las proteínas implicadas en el mantenimiento del genoma, la conversión de energía, la gestión del hierro y la traducción de proteínas.

La ferritina puede contener hasta 4.500 átomos de hierro en una estructura similar a una concha formada por 24 cadenas, incluidas cadenas pesadas (H) y ligeras (L) con actividad ferroxidasa. El almacenamiento de ferritina de hierro protege contra el daño oxidativo y al mismo tiempo almacena un ingrediente vital para uso futuro. La supresión de la ferritina H es incompatible con la vida, y su supresión condicional en el estómago interrumpe el delicado mecanismo de absorción del hierro, lo que provoca una sobrecarga de hierro. Las mutaciones heterocigotas de L-ferritina son poco comunes y están restringidas al elemento regulador de hierro (IRE) 5', lo que da como resultado el síndrome de hiperferritinemia-cataratas y el escape del control de la proteína reguladora de hierro (IRP) y la producción constitutiva de ferritina alta.

2.2.2 Exportación de hierro

Para exportar a la circulación sanguínea, el omnipresente ubicuo-exportador de hierro ferroportina coopera con las oxidasas ceruloplasmina o hefestina, para liberar hierro férrico a la

transferrina. Enterocitos, macrófagos, hepatocitos y trofoblastos expresan altos niveles de ferroportina por sus funciones específicas en la homeostasis del hierro. Bloquear la exportación de hierro puede ser peligroso en algunas células. Por ejemplo, la delección condicional de ferroportina en cardiomiocitos murinos conduce a una sobrecarga local de hierro e insuficiencia cardíaca; además, la delección específica de ferroportina en eritroblastos y eritrocitos conduce a anemia hemolítica, debido a la toxicidad del hierro derivado de la oxidación de la hemoglobina en un ambiente (glóbulos rojos) con capacidad antioxidante limitada (Camaschella et al., 2020; Nemeth & Ganz, 2021).

2.2.3 Reciclaje de hierro

La homeostasis de hierro se mantiene por la absorción intestinal de hierro de la dieta y por el reciclaje del hierro de los eritrocitos senescentes. El sistema reticuloendotelial recicla 25 mg de hierro cada día de ~ 360 mil millones de eritrocitos senescentes. El transporte de hierro está mediado por proteínas de transporte expresadas en el duodeno y los macrófagos reticuloendoteliales, por ejemplo, la proteína dos de macrófagos asociada a la resistencia natural (Nramp2; Slc11a2) que es responsable del transporte de hierro dietético en el enterocito duodenal y en otras células, que transporta hierro al citosol desde el reciclaje del endosoma (Billesbølle et al., 2020; Van Zandt et al., 2008).

Una vez adquirido, el hierro se absorbe en la unión gastro intestinal donde la membrana tiene proteínas especializadas para el transporte. El citocromo b duodenal (DCYTB), cuya función es reducir el hierro férrico a hierro no hemático en la dieta y se transporta a través del epitelio intestinal. Una vez que es convertido de Fe^{3+} a Fe^{2+} , es capaz de transportar el metal divalente 1 (DMT1), también conocido como SLC11A2, NRAMP2 y DCT1. La apoferritina se adhiere a Fe^{2+} y se convertirá en ferritina. Donde cada célula del cuerpo tiene receptor de

transferrina (TfR1), la unión a la transferrina del receptor ubicuo a su entrega hierro a las células a través del conocido ciclo endosomal, donde fosas endocitosis recubiertas con claritina y las vesículas resultantes se revuelven para convertirse en endosomas. La ATPasa vacuolar acidifica la endosoma a un pH de 5.5 y se libera (disocia el complejo) hierro de la transferrina y es transportado a través de la membrana endosomal en el citoplasma (Camaschella et al., 2020; Raje et al., 2007).

3. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

3.1.2 Taxonomía y Propiedades

Mycobacterium avium subespecie es una micobacteria Gram positiva, de 0,5 x 1,5 µm, aeróbica, móvil, no formadora de esporas, perteneciente al género *Mycobacterium* de la familia *Mycobacteriaceae*, miembro del complejo *Mycobacterium avium* (MAC). La pared celular es gruesa y cerosa y consta de capas de micolato y peptidoglicano unidos por arabinogalactano (Rathnaiah et al., 2017). Los MAC son omnipresentes en el medio ambiente, los animales sanos y los humanos. Pertenecen a un grupo de micobacterias de crecimiento lento que forman colonias visibles en un plazo de 8 a 16 semanas en medios sólidos como el medio Löwenstein-Jensen, el medio de yema de huevo de Herrold y medios a base de huevo como el medio sintético. Fenotípicamente, MAP difiere de *M. avium* y *M. silvaticum* en que depende de la micobactina y tiene genotípicamente 15 o 20 copias del elemento de inserción IS900. Desde el punto de vista bioquímico, los MAP se clasifican como dependientes de la micobactina administrada exógenamente, aunque se ha descubierto que algunas cepas son independientes de la micobactina (Phillips, 2020; Ssekitoleko et al., 2021).

El ADN tiene una composición de bases del 66-67% G+C, similar a *M. tuberculosis* y *M. bovis* al 65% y 64%, respectivamente. Hasta la fecha, no se ha informado de ADN de plásmido endógeno para aislados de MAP. Un análisis reciente mostró que la cepa MAP K10 tiene un genoma de 5 MB en un cromosoma circular con más de 4000 genes. (Lilenbaum et al., 2007)

Se ha estimado que el tamaño del genoma de MAP es de 4,4 a 4,7 Mb. En comparación con otras micobacterias, esto es similar al genoma de *M. tuberculosis* de 4,41 Mb y al genoma de *M. bovis* de 4,4 Mb, pero ligeramente más grande que el tamaño estimado del genoma de *M. leprae* (3,3 Mb). MAP DNA tiene una composición de bases de 66 a 67% G+C, similar a *M. tuberculosis* y *M. bovis*, con 65% y 64%, respectivamente. Hasta el momento no se ha informado de ADN plásmido endógeno para ningún aislado de MAP (Harris & Barletta, 2001). Análisis recientes demostraron que la cepa MAP K10 posee un genoma de 5Mb en un cromosoma circular con más de 4000 genes.

Los análisis de genes de ARNr (ADNr) de micobacteria han resultado en una división de dos géneros con dos racimos separados, esto corresponde a la micobacteria tradicional de crecimiento rápido, y a micobacteria de crecimiento lento. El gene ADNr reflexiona esta división entre rápido o lento crecimiento, los de crecimiento rápido tiene dos pares del gen ARNr, mientras los de crecimiento lento como *M. paratuberculosis* y *M. avium* solo contiene una sola copia (Harris & Barletta, 2001).

Como es una bacteria intracelular obligada de animales donde solo puede reproducirse con una célula huésped (macrófago) de una especie susceptible y no puede reproducirse fuera de este entorno (Manning & Collins, 2001). Se demostró que MAP es dependiente de micobactina, necesario para la síntesis de factores esenciales para crecimiento que otras especies son capaces de hacer sin micobactina. La micobactina es un quelante de hierro, necesario para el transporte

de este metal hacia el interior de la célula. Desde entonces la dependencia de micobactina se ha considerado una característica taxonómica de MAP (Rathnaiah et al., 2017).(Álvarez Sánchez, 2008).

3.1 Enfermedad de Johne's

La patología de Johne's se caracteriza por diarrea crónica intermitente con excreción bacilar en las heces. Progresar por medio de algunas fases y, generalmente, tarda diversos años en presentarse con signos clínicos. Generalmente, los rumiantes se infectan a una edad temprana de la vida por ingestión de leche contaminada con MAP, por contacto con heces de rebaños infectados o podría ser transmitida a lo largo del embarazo en estado avanzado de la patología. Luego de una infección inicial, existe una fase subclínica extensa sin desprendimiento del microorganismo. Esta fase puede durar de dos a cinco años.

MAP prolifera en el intestino y los ganglios linfáticos mesentéricos. Alternativamente, la infección puede propagarse por todo el cuerpo. En los rumiantes, el foco de la patología está en las regiones ileocecales y yeyunal. Al igual que con otras enfermedades micobacterianas, la formación de granulomas ocurre en el sitio de la infección, pero la patología más común es la enteritis granulomatosa difusa con engrosamiento de la mucosa por numerosos macrófagos infiltrantes.

La enfermedad avanza en tres etapas: en la primera etapa, los animales están infectados pero no muestran indicaciones clínicas de la enfermedad ni excreción de microbios. Durante la segunda fase, cuando la excreción bacteriana es esporádica, no aparecen indicadores distintivos y el rebaño tiene pérdida de producción seguida de síntomas inespecíficos como reducción de la fertilidad y mastitis. Finalmente, la diarrea severa que no responde a la terapia se desarrolla en la

etapa avanzada y se asocia con una menor capacidad de la mucosa intestinal para retener nutrientes. Este consumo insuficiente da como resultado pérdida de peso, emaciación y mortalidad. (Lilenbaum et al., 2007).

3.2 Histopatología

Las lesiones se caracterizan por su apariencia generalizada y granulomatosa, naturaleza no necrótica, hiperemia y fibrosis reactiva. Las lesiones pueden ser nodulares (tuberculoides) o diseminadas histológicamente (lepromatosas). Los macrófagos gigantes rodean la lámina propia de la mucosa. Las vellosidades del intestino están corrugadas y deformadas. Las lesiones tempranas son de apariencia multifocal y tuberculoide, pero se desarrollan y se combinan progresivamente para comprimir y destruir las criptas intestinales. Los bacilos se ven comúnmente en los macrófagos. Los linfocitos se pueden encontrar de forma difusa o como agregados. Pueden formarse focos de necrosis dentro del infiltrado inflamatorio durante las últimas fases de la infección. Los bacilos acidorresistentes se encuentran en cantidades variables en los ganglios linfáticos, según la etapa de la enfermedad. Los bacilos suelen ser escasos en cantidad durante las fases subclínica y temprana. Como resultado, debido a que las lesiones son más puntuales, la histopatología puede no detectar la enfermedad (Lilenbaum et al., 2007).

3.3 Respuesta inmunitaria

La respuesta inmune temprana a MAP consiste en numerosos macrófagos infectados con mayores cantidades de moléculas de adhesión, lo que resulta en la formación de granulomas en los que los bacilos permanecen aislados durante un largo período de tiempo (Ssekitoleko et al., 2021). MAP se encuentra con una variedad de sistemas de defensa del huésped que deben evitarse o subvertirse para que el patógeno establezca la infección, sin embargo, no se entiende

completamente cómo MAP navega con éxito el estómago forestal de las especies de rumiantes y supera las barreras intestinales.

MAP reconoce y se une a una variedad de receptores, los macrófagos y las células dendríticas primero deben reconocer al patógeno invasor para montar un ataque inmunogénico. Los macrófagos reclutados en un sitio de infección o lesión muestran un fenotipo proinflamatorio, secretando una variedad de mediadores inflamatorios como las células Th1, el $IFN\gamma$ proinflamatorio y el factor de necrosis tumoral α e IL. En respuesta, las especies micobacterianas suprimen la activación de los macrófagos para promover la supervivencia y la persistencia bacteriana. Los mecanismos utilizados por las especies micobacterianas para sobrevivir dentro de los fagocitos profesionales no se limitan a la supresión. Otras estrategias empleadas por las micobacterias para evitar el ataque enzimático y tóxico dentro de los macrófagos incluyen evitar la maduración fagosomal y la fusión fagosoma-lisosoma, así como la modificación del contenido lisosomal (Marquetoux et al., 2018; Phillips, 2020).

Las micobacterias, a diferencia de otras bacterias patógenas, carecen de los factores de virulencia clásicos, como las toxinas; utilizan otros mecanismos de virulencia que les permiten sobrevivir en el entorno intracelular de los macrófagos. Los mecanismos utilizados por MAP para entrar y sobrevivir en los macrófagos huésped incluyen la resistencia a la degradación intracelular por macrófagos y la inhibición de la apoptosis y la interferencia con la producción de citoquinas por parte de los macrófagos. Sin embargo, los mecanismos de virulencia responsables de la colonización, la entrada y la persistencia de MAP en los macrófagos y el eventual desarrollo de enfermedades siguen siendo difíciles de alcanzar (Ssekitoleko et al., 2021).

3.3 Epidemiología

Varios países han informado derrames de vida silvestre o aparente endemismo, con impactos económicos en el ganado e impactos de conservación no identificados en la vida silvestre, especies en peligro de extinción o programas de cría en cautiverio. Los MAP a menudo pasan desapercibidos. Ningún país puede considerarse libre del riesgo de introducción de enfermedades. Por lo tanto, demostrar el estado libre de enfermedad es difícil y requiere vigilancia e informes intensivos (Whittington et al., 2019).

El perfil de edad dentro de los rebaños y el ganado es un factor que influye en el desarrollo de la enfermedad clínica debido a su prolongado período de incubación. El inicio de la paratuberculosis clínica suele ser en la edad adulta, pero muchas personas se infectan después de la exposición al MAP de animales envejecidos que eliminan la bacteria en sus heces en las primeras semanas de vida. El MAP se transmite principalmente directamente por vía fecal-oral, incluida la contaminación fecal de las ubres y los pastos, pero la formación de aerosoles puede llevar la bacteria a nichos ambientales desde donde se puede propagar a las vacas ingenuas. No deben ignorarse otras vías, como la intrauterina (Whittington et al., 2019).

En México, se ha demostrado PTB en ovejas en varios estados, incluidos San Luis Potosí, Guanajuato, Querétaro, Ciudad de México, Estado de México y Veracruz. En particular, en Aguascalientes, al igual que el resto del país, la ganadería ovina ha crecido en más del 100% desde 1990, con una producción de carne de unas 612 toneladas en 2018, y la zona del valle de Aguascalientes, Estado de San, constituye la comuna. de Francisco de los Romo, Rincón de Romos, Jesús María, Pabellón de Arteaga y Setz concentran el 85% de la producción estatal de carne ovina y ganadera en general (Pallás-Guzmán et al., 2021)

Se realizó un estudio transversal en 43 parvadas entre febrero de 2012 y diciembre de 2014. Se recogieron muestras de suero de 1178 ovejas para la detección de anticuerpos contra MAP mediante inmunodifusión en gel de agar. La prevalencia real de MAP fue del 7,48 % (IC del 95 %: 5,98, 8,98), y el 53,5 % de los rebaños tenían al menos un animal seropositivo. Los animales son seropositivos si están en rebaños grandes (> 300 animales; OR 3,52, 95 % IC 1,24, 9,99) y es más probable que nazcan fuera de la granja (OR 6,24; 95 %: 2,9-1, 3,52). Este es el primer informe de seroprevalencia de la subespecie *Mycobacterium avium* paratuberculosis en ovinos de Sonora, México. Los rebaños grandes y la entrada en el rebaño de nuevos animales fueron factores de riesgo significativos asociados con la seropositividad de MAP (Morales-Pablos et al., 2020)

4. Fur: regulador de captación férrico

4.1 Proteína Fur: Propiedades generales

La familia Fur (regulador de absorción de hierro) un polipéptido de 17-21kDa, son reguladores transcripcionales que controlan la expresión de genes sensibles al hierro (El-Gebali et al., 2019).

Los reguladores de la familia Fur generalmente se dividen en tres grupos funcionales, es decir, los miembros del grupo Fur que detectan el hierro y participan en la homeostasis y la virulencia del hierro, los miembros del grupo Zur que detectan el zinc y están involucrados en la captación de zinc, la virulencia y el reordenamiento de las proteínas ribosómicas, y los miembros del grupo PerR que detectan los peróxidos y juegan un papel importante en la regulación de la respuesta al estrés por peróxido. Además, los reguladores de la familia Fur que responden a otros metales incluyen sensores de manganeso (Mur) y níquel (Nur) (Díaz-Mireles et al., 2004)

Para acoplar la percepción del metal y la unión al ADN, las proteínas de la familia Fur se pliegan de manera conservadora en una arquitectura de dos dominios y con frecuencia utilizan dos o más sitios de unión al metal para la regulación conformacional dependiente del metal. Las estructuras de la familia Fur disponibles revelan un ensamblaje dimérico y una organización de dominio modular para cada monómero, que contiene un dominio de unión a ADN (DBD) N-terminal, un dominio de dimerización (DD) C-terminal y una región bisagra que une los dos dominios. La capacidad de una proteína Fur para unirse a su ADN diana depende de la conformación exacta de la proteína, que a su vez depende del tipo y la cantidad de metales de unión, así como del lugar al que se unen los metales (Lee & Helmann, 2007).

El sitio 1 es un sitio estructural común con cuatro cisteínas conservadas para la coordinación del zinc; se cree que el sitio 2 es el principal sensor de metal ubicado entre DBD y DD; mientras que la función del sitio 3 ubicado en DD es menos clara. Posiblemente la unión de metales en el sitio 2 podría afectar la orientación mutua de los dos dominios y regular la unión del ADN.

Cuando las bacterias tienen una gran cantidad de hierro, Fur se une al ion Fe^{2+} y sufre modificaciones conformacionales. Fur se dimeriza y se une a las cajas de hierro, bloqueando la transcripción de todos los genes y operones sensibles al hierro. Cuando el hierro es limitado, el complejo se disocia de los promotores diana y se libera el ion Fe^{2+} , lo que permite que la ARN polimerasa se una y comience la transcripción. También se sabe que Fur se autorregula en presencia y ausencia de hierro. Este consenso, según el modelo de hexámero más reciente, tiene repeticiones consecutivas de tres hexámeros directo-inverso (5'-GATAAT-3') con una unidad de reconocimiento Fur (5'-NAT(A/T)AT-3') (Hernández et al., 2006) (Kaushik et al., 2016).

4.1.1 Proteína MAP3773c

MAP7337c es un gen de 420 pares de bases, dentro del genoma de la cepa de *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. MAP3773c codifica una proteína de 139 aa con una masa de 16,229 Da (<https://www.uniprot.org/uniprot/Q73TE5>), 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 (Shoyama et al., 2020)(Landeros-Sánchez et al., 2016).

CAPITULO III. METODOLOGÍA Y MATERIALES

3.1 Predicción in *Silico*

3.1.1 Predicción de estructura molecular de MAP3773c basada en un modelo.

Se determinó la secuencia de la proteína MAP3773c con acceso AAS06323.1 en formato FASTA en la página del National Center For Biotechnology information (NCBI). La secuencia MAP3773c de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* K-10 (strain: K-10, sub-species: paratuberculosis) en formato FASTA, se introdujo al software JPRED 4 en línea (Drozdetskiy et al., 2015) que es un Servidor de Predicción de Estructura Secundaria de Proteínas, luego se realizó una búsqueda de identidad en Chimera 1.12 (UCSF Chimera), un sistema de visualización para investigación exploratoria y análisis.

La alineación se realizó utilizando el algoritmo needleman-wunsch, con una matriz bloosum 62. El modelado se realizó por homología utilizando el software SWISS-MODEL (<https://swissmodel.expasy.org/>). Para obtener los modelos se introdujo la secuencia de aminoácidos en formato fasta para obtener un modelo por homología con varias proteínas comparando la identidad de secuencia dada en porcentaje, el Global Model Quality Estimation

(GMQE) es una estimación de calidad que combina las propiedades de la alineación de la plantilla de destino y la estructura de la plantilla y finalmente el RMSD que en bioinformática, es la desviación cuadrática media de las posiciones atómicas, o simplemente desviación cuadrática media (RMSD), es la medida de la distancia promedio entre los átomos (generalmente los átomos de la columna vertebral) de las proteínas superpuestas.. Posterior a la finalización del modelo y la comparación procedimos a la revisión del residuo de aminoácidos (uno por uno). Donde obtuvimos las secuencias de las proteínas con mayor similitud (2O03, 3MWM, 4RAZ, 5FDE6).

Finalmente realizamos la visualización de topología, estructural y búsqueda de los residuos de aminoácidos conservados y no conservados. Para la observación de las características aminoacídicas del exterior de la superficie de la proteína, el cual se realizó mediante la adición de cargas a cada residuo de aminoácido y se generó una superficie con coloración coulombica utilizando los programas Chimera UCSF y Pymol.

En el modelado comparativo, se genera un modelo de proteína 3D de una secuencia objetivo extrapolando información experimental de una estructura de proteína relacionada con la evolución que sirve como plantilla. En SWISS-MODEL, el flujo de trabajo de modelado predeterminado consta de los siguientes pasos principales:

1. Datos de entrada: la proteína objetivo se proporciona como secuencia de aminoácidos, en formato FASTA.
2. Búsqueda de plantillas: los datos proporcionados en el paso 1 sirven como una consulta para buscar estructuras de proteínas relacionadas con la evolución en la biblioteca de plantillas SWISS-MODEL SMTL. SWISS-MODEL realiza esta tarea utilizando dos métodos de búsqueda en bases de datos: BLAST, que es rápido y lo suficientemente

preciso para plantillas estrechamente relacionadas, y HHblits, que agrega sensibilidad en caso de homología remota.

3. Selección de plantillas: cuando se completa la búsqueda de plantillas, las plantillas se clasifican según la calidad esperada de los modelos resultantes, según lo estimado por la estimación de calidad del modelo global (GMQE) y la estimación de calidad de la estructura cuaternaria (QSQE). Las plantillas y alineaciones mejor clasificadas se comparan para verificar si representan estados conformacionales alternativos o cubren diferentes regiones de la proteína objetivo. En este caso, se seleccionan varias plantillas (2O03, 3MWM, 4RAZ, 5FDE6) y se construyen diferentes modelos en consecuencia.
4. Creación de modelos: para cada plantilla seleccionada, se genera automáticamente un modelo de proteína 3D transfiriendo primero las coordenadas atómicas conservadas según lo definido por la alineación de la plantilla de destino. Las coordenadas de residuos correspondientes a inserciones/eliminaciones en la alineación se generan mediante el modelado de bucle y se obtiene un modelo de proteína de átomo completo mediante la construcción de las cadenas laterales de aminoácidos no conservadas. SWISS-MODEL se basa en el marco de biología estructural computacional OpenStructure y el motor de modelado ProMod3 para realizar este paso. Para obtener información más detallada sobre la creación de modelos, consulte una sección dedicada en Resultados.
5. Estimación de la calidad del modelo: para cuantificar los errores de modelado y dar estimaciones sobre la precisión esperada del modelo, SWISS-MODEL se basa en la función de puntuación QMEAN. QMEAN utiliza potenciales estadísticos de fuerza media para generar estimaciones de calidad global y por residuo. Las estimaciones de calidad local se ven reforzadas por restricciones de distancia por pares que representan

información del conjunto de todas las estructuras de plantilla encontradas. esta información es arrojada al momento de hacer las comparaciones de homología.

3.1.1.2 Chimera 1.12

El software Chimera de la UCSF (Universidad de California, San Francisco) se utiliza para la visualización y el análisis de mapas de densidad, microscopía 3D, estructuras moleculares y los datos asociados. Este software aborda los desafíos en el alcance, el tamaño y los tipos de datos utilizados con los métodos experimentales de vanguardia. Proporciona opciones avanzadas para renderizado de alta calidad (cálculos confiables de la superficie molecular, oclusión ambiental interactiva, etc.) y proporciona enfoques profesionales para el diseño y distribución del software.

3.1.1.2 Requisitos

El acoplamiento requiere lo siguiente: sistema operativo Windows 7, 8 o 10 o Mac y Linux, y UCSF Chimera 1.12.

Las instrucciones paso a paso para el acoplamiento se proporcionan a continuación:

1. Recuperación: Se recuperó la estructura de proteína objetivo-requerida de la base de datos que anteriormente se crearon utilizando SWISS-MODEL como un archivo PDB.
2. Se ingresa el PDB ID de la proteína. Cuando se busca la proteína, su estructura se descarga a través del sitio web. En este caso de SWISS-MODEL en formato PDB.
3. Cree un directorio de trabajo para el proyecto de acoplamiento al que es conveniente acceder, como Usuarios/Escritorio/Docking/.

3.1.2 Preparación de la proteína objetivo para el análisis superposición

1. Obtener una estructura del Command: Protein Data Bank: abrir 3MWM

La estructura contiene dos cadenas.

Eliminar solvente y una cadena B:

command: del solvente

command: del :b

2. superponer estructuras 3MWM y modelo MAP3773c de 3MWM, luego crear una alineación de secuencia superposición de la cadena A de ambas estructuras dimerica.

command: open 3MWM (receptor)

command: open Modelo MAP3773c-3MWM (ligand)

3. Use la configuración de las cintas (que puede o no cambiar la apariencia, dependiendo de su preferencia): *Menu:* Presets... Interactive 1 (ribbons)

Este ajuste preestablecido muestra cintas más iones, ligandos y cadenas laterales cercanas.

4. Las estructuras deben superponerse para poder compararlas. Inicie MatchMaker haciendo clic en tools> structure comparison > matchMaker> Refernces Structre > Structure to Match > OK

MatchMaker superpone estructuras por pares alineando primero sus secuencias y luego ajustando los carbonos α de los residuos en las mismas columnas de la alineación de secuencias. Por lo general, el ajuste se itera para que los pares de residuos alineados en secuencia, pero muy separados en el espacio no se utilicen en la coincidencia 3D final.

Varios parámetros controlan el paso de alineación de la secuencia:

algoritmo: Needleman-Wunsch (global; predeterminado) o Smith-Waterman (local)

Función de puntuación:

- matriz de similitud de residuos (BLOSUM-62 predeterminado)
- si se debe usar información de estructura secundaria (sí predeterminado)
- ponderación de la estructura secundaria y términos de similitud de residuos (por defecto 30% y 70%, respectivamente)
- penalizaciones por brecha

El número de pares de carbono α y RMSD en la iteración final de cada ajuste por pares se informa en el Registro de respuestas (en el menú debajo de Favoritos). Sin embargo, la simple inspección visual de las estructuras generales suele ser el indicador de éxito más útil.

5. Match->Align usa solo las distancias entre los carbonos α para crear una alineación. Los tipos de residuos y cómo se superpusieron las estructuras no son importantes. Todas las cadenas A ya deberían estar seleccionadas en el cuadro de diálogo; la cadena B de 3MWM no debe elegirse ya que es la misma cadena que A. Utilice un límite de 5,0 Å, especifique Residuo alineado en la columna si se encuentra dentro del límite de [al menos otro] y active Permitir permutación circular. Haga clic en Aceptar para iniciar el cálculo.

3.1.3 Hex 8.0

Para ejecutar un cálculo de acoplamiento en Hex 8.0, se deberá cargar un receptor y una estructura PDB de ligando mediante el menú desplegable Archivo.

En general, se eliminan las moléculas de agua y cualquier otra heteromolécula antes del acoplamiento. Puede hacer esto globalmente usando el panel de menú de Hetero Control.

Los cálculos de acoplamiento están controlados por las opciones del panel Control de acoplamiento. En frecuencia, la búsqueda de acoplamiento se realiza girando el receptor y el

ligando sobre sus centroides en cada una de las distancias intermoleculares. Al receptor y al ligando se les asignan dos ángulos de rotación de Euler, y la rotación final se define como un giro del ligando sobre el eje intermolecular. El comportamiento predeterminado es entonces realizar una búsqueda en seis dimensiones completa en los rangos de rotación completos.

El cálculo se organiza de modo que la búsqueda del ángulo de torsión intermolecular se encuentre en el bucle más interno de la búsqueda. La búsqueda alrededor del ángulo de torsión puede acelerarse utilizando una FFT 1D.

La configuración predeterminada es que el programa realice un Escaneo estérico inicial en N=16, seguido de una Búsqueda final en N=25, usando solo la contribución estérica a la energía de acoplamiento. De este modo, casi todas excepto las 30.000 orientaciones principales se descartan después del Steric Scan. El Steric Scan se puede desactivar, en cuyo caso cada orientación se evalúa usando una correlación estérica (y opcionalmente una correlación electrostática) para ordenar N, como se indica en el control deslizante Final Search. Sin embargo, esto puede aumentar significativamente los tiempos totales de acoplamiento. El uso de la búsqueda en dos pasos con N=16 y N=25 funciona bien en prácticamente todos los casos. La contribución electrostática a la correlación de ataque puede habilitarse usando la palanca Electrostática. La electrostática solo se calcula en la fase de búsqueda final.

1. Open: receptor: 3MWM

Open: ligand: DNA sequence

2. Abra el panel Control de acoplamiento y seleccione los siguientes valores (principalmente predeterminados) de los cuadros de selección:

Controls ... Docking ... Correlation Type ... Shape Only

Controls ... Docking ... FFT Mode ...	3D Fast Lite
Controls ... Docking ... Post Processing ...	None
Controls ... Docking ... Grid Dimension ...	0.6
Controls ... Docking ... Solutions ...	500
Controls ... Docking ... Receptor Range ...	45
Controls ... Docking ... Receptor Step Size ...	7.5
Controls ... Docking ... Ligand Range ...	45
Controls ... Docking ... Ligand Step Size ...	7.5
Controls ... Docking ... Twist Range ...	360
Controls ... Docking ... Twist Step Size ...	5.5
Controls ... Docking ... Distance Range ...	40
Controls ... Docking ... Scan Step ...	0.75
Controls ... Docking ... Substeps ...	2
Controls ... Docking ... Steric Scan ...	16
Controls ... Docking ... Final Search ...	25

Esto dice que la fase Steric Scan (N=16) del cálculo de acoplamiento se realizará en $(1+40)/0,75=53$ separaciones intermoleculares, en pasos de +/- de 0,75°Å a partir de la distancia actual publicada en el control deslizante R en el borde inferior de la ventana principal. La fase de búsqueda final (N=25) se aplicará a las orientaciones de exploración

de puntuación más alta en pasos de $0,75/2^\circ\text{A}$, como se describe anteriormente. La búsqueda rotacional utilizará incrementos angulares de aproximadamente 7,5 grados en cada uno de los dos ángulos de rotación del ligando y del receptor, y en pasos de 5,5 grados alrededor del ángulo de giro. Internamente, los tamaños de paso dados se ajustarán para dar números de muestras computacionalmente convenientes

3. Ahora comienza el cálculo:

Controls ... Docking ... Activate

4. obtención de resultados y nos arroja una Ilustración de las posibles conformaciones en la cual hay interacción, así como el delta G.
5. Finalmente se hace el análisis visual estructural.

3.2 Preparación de Cromatografía en columna de intercambio iónico en Sefarosa

Se lavó una columna de vidrio con abundante agua destilada. Se aplicó la cantidad necesaria de quelato de matriz Sepharose™ Fast Flor Suspension (General Electric Healthcare) para generar la matriz cromatográfica, que se empaqueta por gravedad en una columna de 10 ml de volumen y se lavó con 10 mililitros de volumen de columna con agua Milli-Q®. Se usó agua Milli-Q® (volumen de 1 columna = 10 ml) a una velocidad de flujo de 3 ml/min para eliminar el etanol derivado del conservante en la matriz quelante (la columna empaquetada nunca se secó). Se aplicó 3 volúmenes de columna de solución de ZnSO_4 0,25 M, pre-filtrada a través de papel de filtro Whatman®, se lava inmediatamente con 10 volúmenes de columna de agua Milli-Q® para eliminar el exceso de metales no unidos (todo a una velocidad de flujo de 3 mililitros/min). La columna se equilibró con 10 volúmenes de columna de tampón de equilibrio (anexo 1) pre-filtrado a través de papel Whatman®.

3.3 Purificación y lisis celular

Se descongelaron aproximadamente 13,0 g de biomasa celular en hielo triturado y se homogeneizaron muy bien con 6 volúmenes de columna de tampón A (anexo 2). De una solución concentrada, pre-filtrada con papel Whatman® y diluida con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF, un inhibidor de la proteasa) hasta una concentración final de 3 mM, disuelto en isopropanol (la suspensión se mantuvo en baño de hielo triturado en todo momento). Utilizando un sonicador homogeneizador ultrasónico, se sometió a ultrasonidos la suspensión celular en hielo picado durante 10 ciclos de 45 segundos al 90 % de amplitud y 0,5 ciclos con un descanso de 30 segundos entre cada ciclo. A continuación, la suspensión celular lisada se centrifugó 3 veces a 20.000 rpm durante 20 min a 4°C, recolectando el sobrenadante cada vez y descartando los restos celulares sedimentados. Finalmente, la suspensión celular se pasó a través de filtros de 0,80 µm y 0,22 µm (Millipore) y se extrajeron alícuotas de 100 µl para electroforesis SDS-PAGE. La suspensión lisada filtrada se aplicó a la matriz de cromatografía a una velocidad de flujo de 2 ml/min y se volvió a aplicar a la columna después de la recolección para garantizar la mayor recuperación de proteína recombinante (realizar electroforesis SDS-PAGE para confirmación). Se lave la columna con 5 volúmenes de columna de tampón de lavado 1 ((NH₄)₂SO₄ 0,5 M en tampón A, pre-filtrado con papel Whatman®) a una velocidad de flujo de 3 mL/min. Se lava la columna con un volumen suficiente de tampón de lavado 2 (glicina 35 mM en tampón A, pre-filtrado con papel Whatman®) hasta que la absorbancia del volumen de elucion sea menor a 0.1 a 280 nm, con un flujo de 3 mL/minuto, se tomó una alícuota de 100 lavado con El volumen final de solución de lavado se dispensó a 100 ml/min y se sometió a electroforesis SDS-PAGE. La proteína recombinante se eluye con un gradiente creciente de imidazol (0-1 M en tampón A, pre-filtrado en papel de filtro Whatman®) con un flujo de elución

de 2 ml/min para eluir 1 volumen de columna (descartado). Luego se recolecta aproximadamente entre 25-30 fracciones de 1 mL cada una y dividir 15 alícuotas en μL (para analizarlas en electroforesis SDS-PAGE), y el resultado se almacenó a 4°C hasta la diálisis. La columna se lavó con 30 mL de imidazol 1 M en tampón A (previamente filtrado con papel filtro Whatman®). La columna se lavó con 10 volúmenes de columna de agua Milli-Q. Las columnas se almacenaron pasando 10 volúmenes de etanol al 20 % a través de agua Milli-Q almacenada a 4°C .

3.4 Análisis por electroforesis SDS-PAGE y diálisis

Las proteínas se precipitaron a partir de alícuotas recogidas durante la purificación para eliminar el cloruro de guanidinio, que es incompatible con los geles de poliacrilamida. Se tomaron 15 μL de cada muestra y se concentraron, luego se agregaron 85 μL de agua destilada, se mezcló y se lavó con 100 μL % de ácido tricloroacético, luego se incubó en hielo triturado durante 20 minutos. Se centrifugaron a 20.000 rpm por 20 minutos a 4°C , se descartó el sobrenadante, cada sedimento se lavó con 1 ml de etanol al 95% frío, se volvió a centrifugar a 20.000 rpm por 20 minutos a 4°C y el sobrenadante. El sedimento se secó a temperatura ambiente y se re-suspendió muy bien (mediante agitación vorticial) en 15 μL de agua destilada. Se realizó una electroforesis en gel SDS-PAGE al 17% sobre las alícuotas concentrada en el paso anterior. Las áreas de fracciones de elución donde se identificaron las proteínas eluidas se confirmaron mediante electroforesis en gel SDS-PAGE al 10% (**Bio-Rad**). Se mezcló la elución que contenía la proteína y se continuó con la diálisis teniendo en cuenta el punto isoeléctrico teórico **pI = 9.23 (información obtenida por expasy)**. A continuación se sometieron a dializar donde las muestras fueron sumergidas en un vaso precipitado de 500ml con buffer acetato de sodio 10 mM pH 4.5 durante 24 horas con agitación. Estas muestras fueron previamente transferidas a una

membrana de diálisis con poros de tamaño 40 kDa a una temperatura de 4°C cambiando el buffer por lo menos 2 veces cada 12 horas. Finalmente se volvieron a correr en un gel SDS para su confirmación de la proteína.

3.5 Preparación de EMSA

3.5.1 Preparación de gel Acrilamida: Bisacrilamida 29:1 (solución al 30 %/electroforesis), Fisher BioReagents

Se preparará un gel de acrilamida/ bisacrilamida al 30% constituido por Acrilamida: Bisacrilamida 29:1, glicerol al 50%, TBE 5%, persulfato de amonio 10x, temed y finalmente agua destilada. Se mezcla y se deja reposar por 20 min a temperatura ambiente o hasta polimerizar y nuestro gel polimerizado se pre-corre con un buffer TBE 0.5X a partir de TBE50X [anexo 3] por 2 horas [anexo 4].

Desarrollo de mezcla madre

En un tubo eppendorf 1 ml se agrega binding buffer 40x, ficoll 40x, MnCl 100mM y KCl 2M [anexo 5]. En tubos eppendorf 100 µL se agrega la solución madre dividida en 6 tubos. Se separan para no tener contaminación cruzada al agregar nuestra ADN y proteína. Se utiliza un tubo uno como control negativo agregando MAP3769, tubo dos control positivo de ADN MAP3736c y se realiza las siguientes condiciones [anexo 5]. Concentraciones finales de MAP3773c y DNA 3736c, 3736c 100 pmol. La reacción se deja reposar 30 minutos.

3.5.2 Preparación de muestras y revelación de gel

Se utiliza la cámara de electroforesis (Mini-PROTEAN Tetra Cell Bio-Rad) con el gel ya pre-corrido y agregando solución de buffer hasta cubrir el gel. Agregando 5µl de buffer de carga 6x a cada tubo eppendorf incluyendo el marcador de peso molecular [cual]. Se corre a 100-120 V

por aproximadamente 1.5 - 2 horas. Una vez transcurrido el tiempo el gel es transferido a un recipiente con agua destilada donde se le agrega 5 μ l de bromuro de etidio y posteriormente revelado en una lámpara UV.

CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES

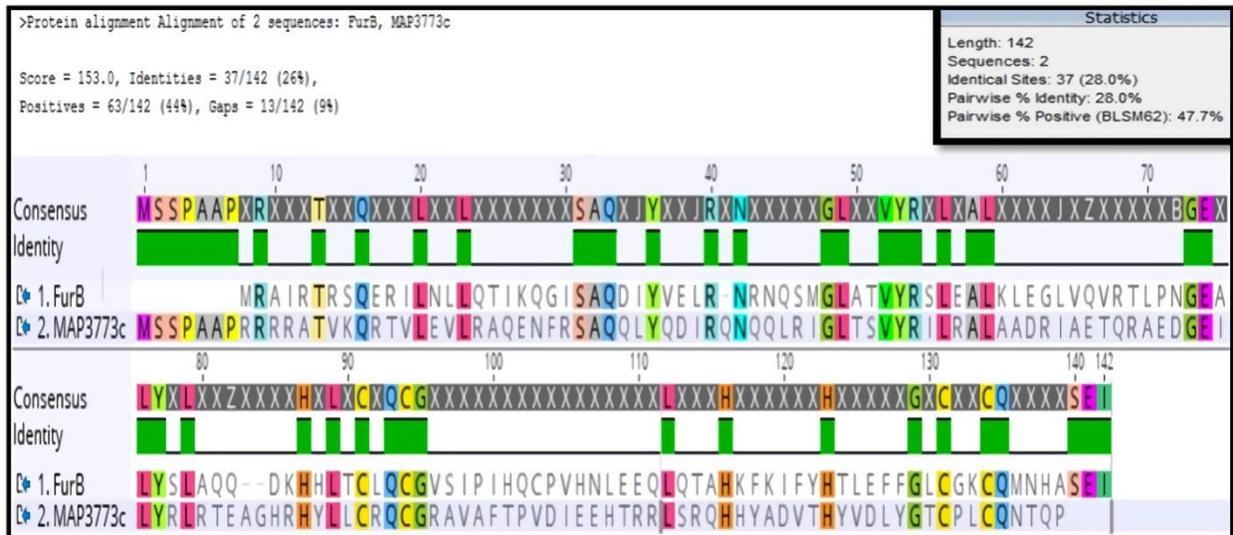


Figura 1. Alineamiento de MAP3773c proteína y secuencia de anabaena sp. PCC712. WP_010996629

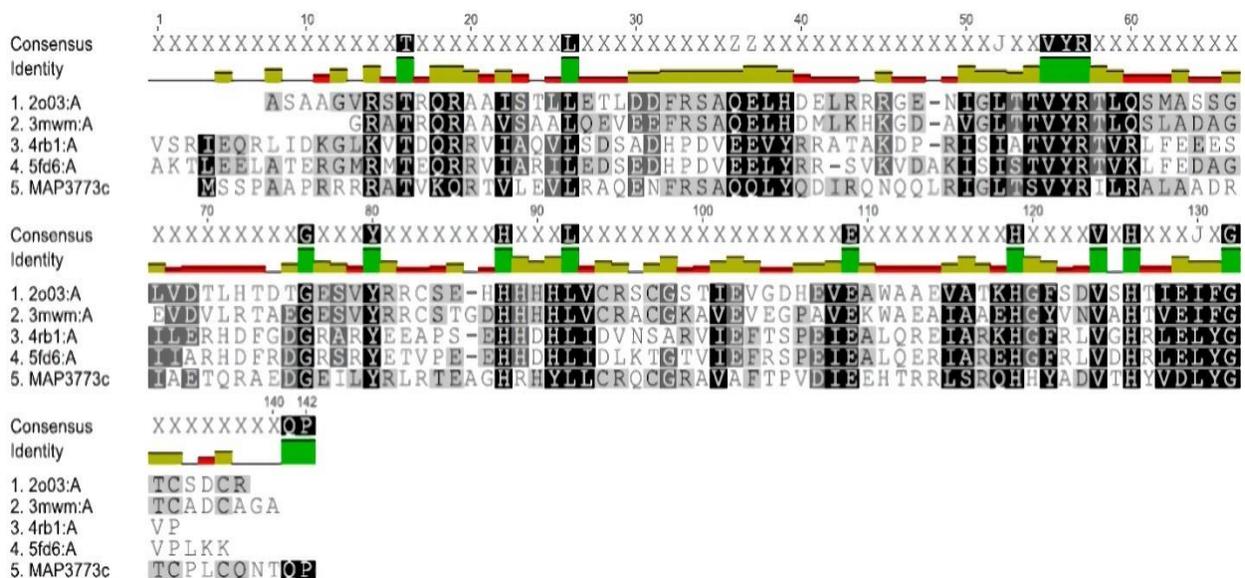


Figura 2. Alineación de secuencias de MAP3773c con proteínas FUR con estructuras disponibles que muestran la mayor similitud.

Figura 1 son una representación de FurB de anabaena sp y MAP3773c donde en color podemos identificar los dominios de conservcuin con un sitio de identificación de 28%. Figura 2 es la representación de un análisis de 36 proteínas en las cuales se escogieron a-4 las cauales

mostraron mayor similitud a MAP3773c, las cuales serán con las que trabajamos para crear el modelo MAP3773c.

De acuerdo con las estructuras seleccionadas dependiendo la conservación de dominios y porcentaje de similitud realizado en línea por NCBI JPRED 4 y SWISS MODEL. Las siguientes figuras representan los modelos *in silico* representando A MAP3773c en base al modelaje por homología de las siguientes proteínas 2O03 de *M. tuberculosis*, 3MWM de *S. coelicolor*, 4RB1 de *M. gryphiswaldense* y 5FD6 de *R. leguminosarum*. En muchas bacterias Gram-negativas y -positivas. Son responsables del control de una amplia variedad de procesos fisiológicos básicos y de la expresión de importantes factores de virulencia en patógenos humanos. Por lo tanto, Fur ha despertado un gran interés como objetivo potencial para nuevos antibióticos.

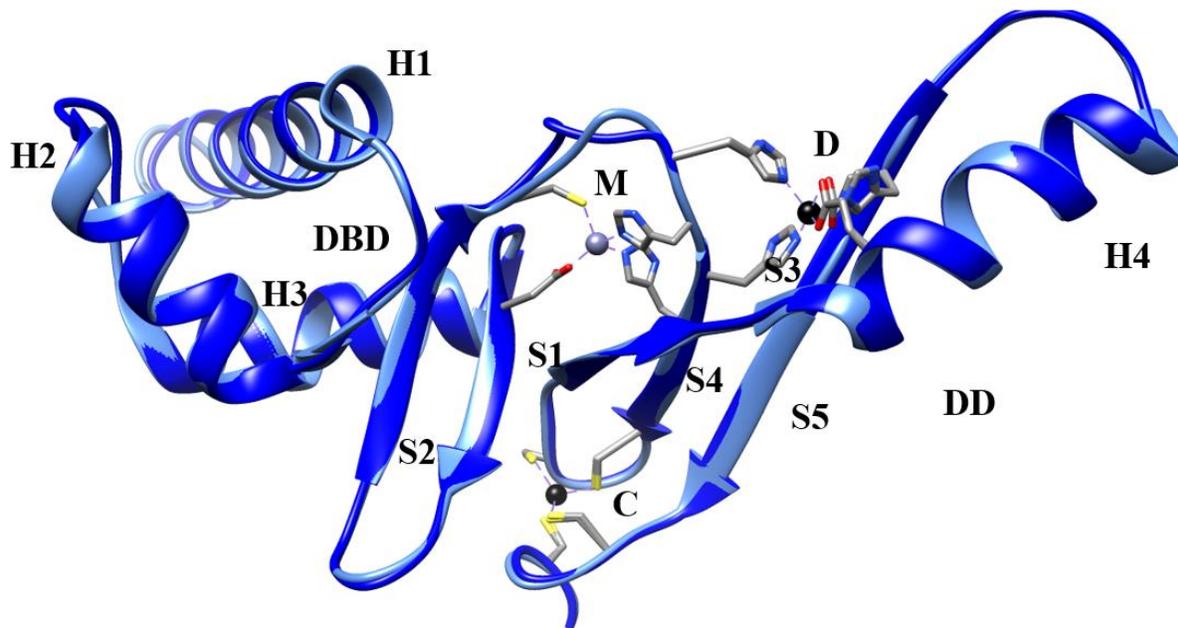


Figura 4. Superposición de 2O03 de *Mycobacterium tuberculosis*, cadena A (cornflower blue) vs. MAP3773C templado cadena A (azul): 34% identidad

RMSD: ca	1	11	21	31	41	
model.pdb, chain A	6	A P R R R R A T	V K Q R T V L E V L	R A Q E N F R S A Q	Q L Y Q D I R Q N Q	Q L R I G L T S V Y
2003, chain A	1	M A S A A G V R S T	R Q R A A I S T L L	E T L D D F R S A Q	E L H D E L R R R G	E N I G L T T V Y
RMSD: ca	51	61	71	81	91	
model.pdb, chain A	54	R I L R A L A A D R	I A E T Q R A E D G	E I L Y R L R T E A	G H R H Y L L C R Q	C G R A V A F T P V
2003, chain A	50	R T L Q S M A S S G	L V D T L H T D T G	E S V Y R R C S E H	H H H L V C R S	C G S T I E V G D H
RMSD: ca	101	111	121	131		
model.pdb, chain A	104	D I E E H T R R L S	R Q H H Y A D V T H	Y V D L Y G T C P L	C Q L	
2003, chain A	99	E V E A W A A E V A	T K H G F S D V S H	T I E I F G T C S D	C R S	

Figura 5. Alineación estructural y RMSD de 2003 de *Mycobacterium tuberculosis*, cadena A vs. MAP3773C templado cadena A: 34% identidad

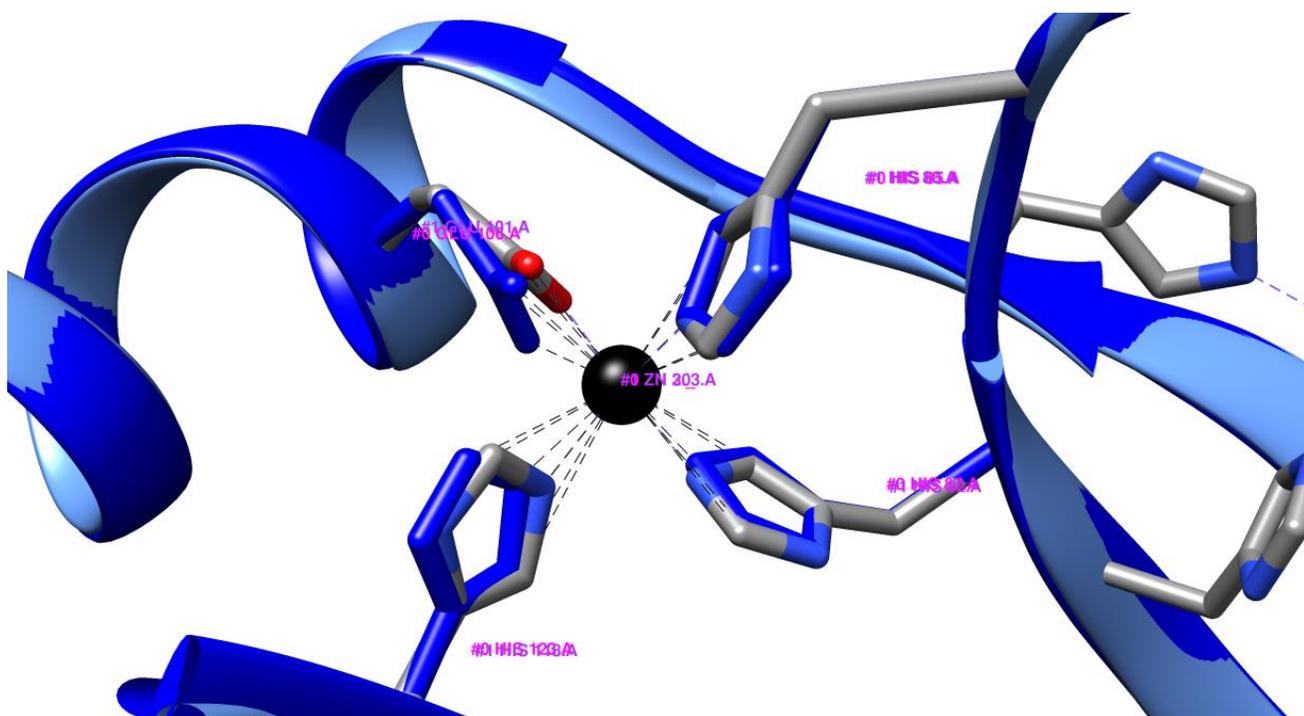


Figura 6. Superposición de 2003 de *Mycobacterium tuberculosis* (azul aciano), cadena A vs. MAP3773C templado cadena A (azul), Zn #3 y #203 (negro)

Modelo #0 is MAP3773C templado 2003
 Modelo #1 is 2003

1	#0 ZN 3._ ZN <> #0 GLU 106.A OE1: 1.87
2	#0 ZN 3._ ZN <> #0 HIS 87.A NE2: 2.01
3	#0 ZN 3._ ZN <> #0 HIS 85.A CE1: 3.24
4	#0 ZN 3._ ZN <> #0 GLU 106.A OE2: 2.39
5	#0 ZN 3._ ZN <> #0 HIS 87.A CD2: 3.17
6	#0 ZN 3._ ZN <> #0 HIS 123.A CD2: 3.26
7	#0 ZN 3._ ZN <> #0 HIS 123.A CE1: 3.24
8	#0 ZN 3._ ZN <> #0 HIS 87.A CE1: 2.73
9	#0 ZN 3._ ZN <> #0 HIS 85.A NE2: 2.14
10	#0 ZN 3._ ZN <> #0 GLU 106.A CD: 2.40
11	#0 ZN 3._ ZN <> #0 HIS 123.A NE2: 2.26
12	#0 ZN 3._ ZN <> #1 HIS 80.A CD2: 2.99
13	#0 ZN 3._ ZN <> #1 HIS 80.A CE1: 3.12
14	#0 ZN 3._ ZN <> #1 HIS 80.A NE2: 2.08
15	#0 ZN 3._ ZN <> #1 HIS 82.A CD2: 3.08
16	#0 ZN 3._ ZN <> #1 HIS 82.A CE1: 2.86
17	#0 ZN 3._ ZN <> #1 HIS 82.A NE2: 2.06
18	#0 ZN 3._ ZN <> #1 GLU 101.A CD: 2.50
19	#0 ZN 3._ ZN <> #1 GLU 101.A OE1: 2.01
20	#0 ZN 3._ ZN <> #1 GLU 101.A OE2: 2.38
21	#0 ZN 3._ ZN <> #1 HIS 118.A CD2: 3.26
22	#0 ZN 3._ ZN <> #1 HIS 118.A CE1: 2.85
23	#0 ZN 3._ ZN <> #1 HIS 118.A NE2: 2.08
24	#0 ZN 3._ ZN <> #1 ZN 203.A ZN: 0.00
25	#0 ZN 3._ ZN <> #0 HIS 85.A CD2: 3.02

Tabla 2. Distancias en Armstrong de la superposición de 2003 de *Mycobacterium tuberculosis* (azul aciano), cadena A vs. MAP3773C templado cadena A (azul), Zn #3 y #203 (negro) con residuos cercanos.

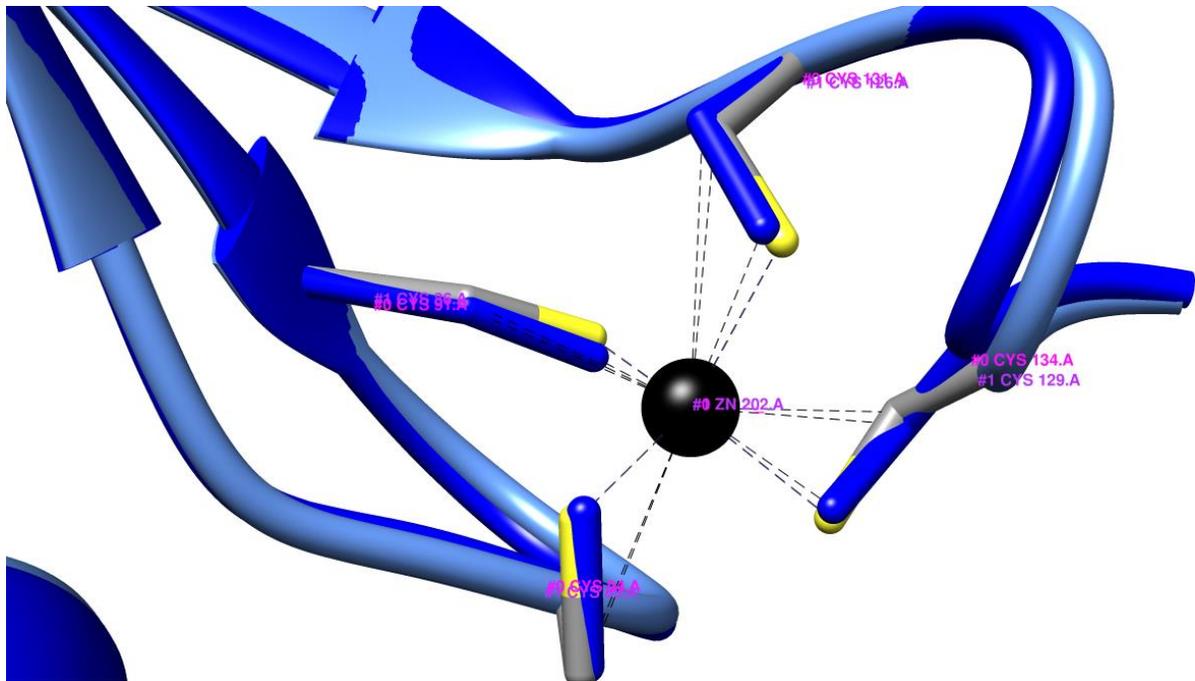


Figura 7. Superposición de 2O03 de *Mycobacterium tuberculosis* (azul aciano), cadena A vs. MAP3773C templado cadena A (azul), Zn #2 y #202 (negro)

Modelo #0 is MAP3773C TEMPLADO 2O03.pdb

Modelo #1 is 2O03

1	#0 ZN 2._ZN <> #1 CYS 89.A SG: 2.39
2	#0 ZN 2._ZN <> #1 CYS 86.A SG: 2.33
3	#0 ZN 2._ZN <> #0 CYS 91.A SG: 2.16
4	#0 ZN 2._ZN <> #0 CYS 134.A CB: 3.20
5	#0 ZN 2._ZN <> #1 CYS 126.A SG: 2.40
6	#0 ZN 2._ZN <> #0 CYS 94.A SG: 2.34
7	#0 ZN 2._ZN <> #0 CYS 134.A SG: 2.20
8	#0 ZN 2._ZN <> #0 CYS 91.A CB: 3.15
9	#0 ZN 2._ZN <> #1 CYS 86.A CB: 3.22
10	#0 ZN 2._ZN <> #1 CYS 129.A SG: 2.39
11	#0 ZN 2._ZN <> #1 CYS 129.A CB: 3.11
12	#0 ZN 2._ZN <> #0 CYS 94.A CB: 3.45
13	#0 ZN 2._ZN <> #1 CYS 89.A CB: 3.54
14	#0 ZN 2._ZN <> #0 CYS 131.A CB: 3.49
15	#0 ZN 2._ZN <> #1 CYS 126.A CB: 3.36
16	#0 ZN 2._ZN <> #1 ZN 202.A ZN: 0.00
17	#0 ZN 2._ZN <> #0 CYS 131.A SG: 2.47

Tabla 3. Distancias en Armstrong de la superposición de 2O03 de *Mycobacterium tuberculosis* (azul aciano), cadena A vs. MAP3773C templado cadena A (azul), Zn #2 y #202 (negro) con residuos cercanos.

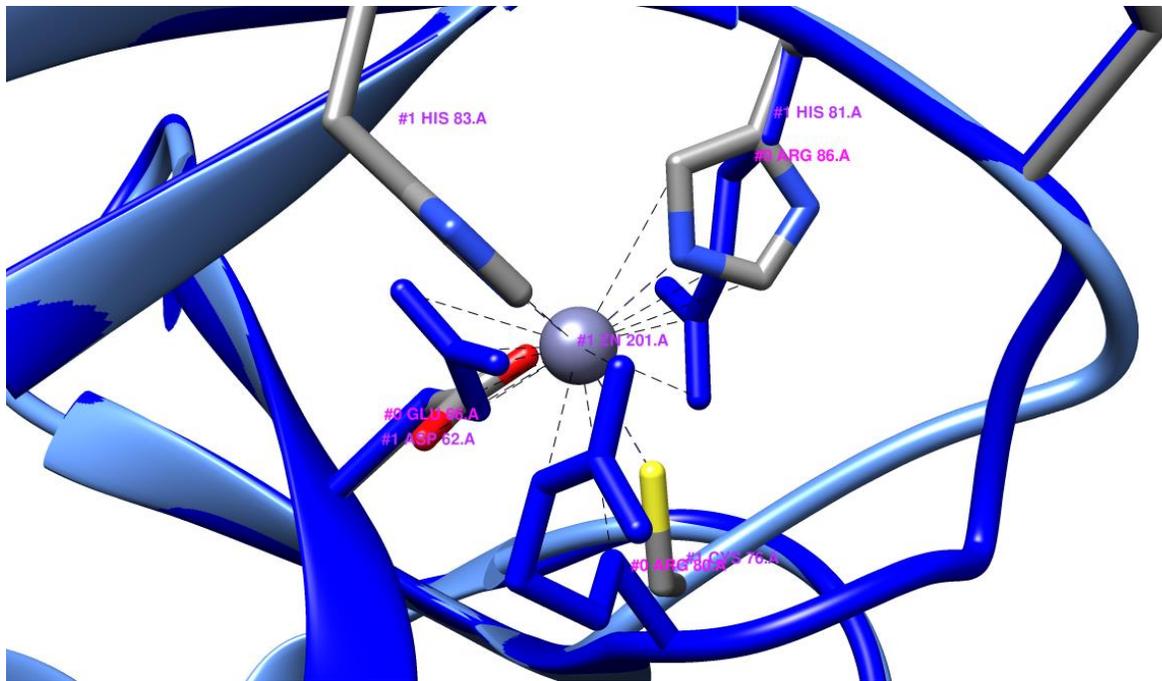


Figura 8. Superposición de 2O03 de *Mycobacterium tuberculosis* (azul aciano), cadena A vs. MAP3773C cadena A (azul).

Model #0 is MAP3773C TEMPLADO 2O03.pdb

Model #1 is 2O03

1	#1 ZN 201.A ZN <> #0 ARG 86.A NE:	2.97
2	#1 ZN 201.A ZN <> #1 ASP 62.A OD2:	2.00
3	#1 ZN 201.A ZN <> #1 HIS 83.A CE1:	3.20
4	#1 ZN 201.A ZN <> #1 ASP 62.A CG:	2.81
5	#1 ZN 201.A ZN <> #1 HIS 83.A CD2:	2.77
6	#1 ZN 201.A ZN <> #1 CYS 76.A SG:	2.35
7	#1 ZN 201.A ZN <> #0 ARG 86.A NH1:	3.10
8	#1 ZN 201.A ZN <> #0 GLU 66.A OE2:	1.32
9	#1 ZN 201.A ZN <> #0 ARG 86.A CZ:	3.16
10	#1 ZN 201.A ZN <> #0 GLU 66.A CD:	2.04
11	#1 ZN 201.A ZN <> #1 HIS 83.A NE2:	2.04
12	#1 ZN 201.A ZN <> #0 GLU 66.A OE1:	2.99
13	#1 ZN 201.A ZN <> #0 ARG 80.A NE:	3.03
14	#1 ZN 201.A ZN <> #1 HIS 81.A CE1:	3.05
15	#1 ZN 201.A ZN <> #0 ARG 80.A CB:	3.37
16	#1 ZN 201.A ZN <> #1 ASP 62.A OD1:	2.97
17	#1 ZN 201.A ZN <> #1 HIS 81.A CD2:	3.16
18	#1 ZN 201.A ZN <> #0 GLU 66.A CG:	2.66
19	#1 ZN 201.A ZN <> #1 HIS 81.A NE2:	2.12
20	#1 ZN 201.A ZN <> #0 ARG 80.A NH1:	3.47

Tabla 4. Distancias en Armstrong de la superposición de 2O03 de *Mycobacterium tuberculosis* (azul aciano), cadena A vs. MAP3773C templado cadena A (azul), Zn #201 con residuos cercanos.

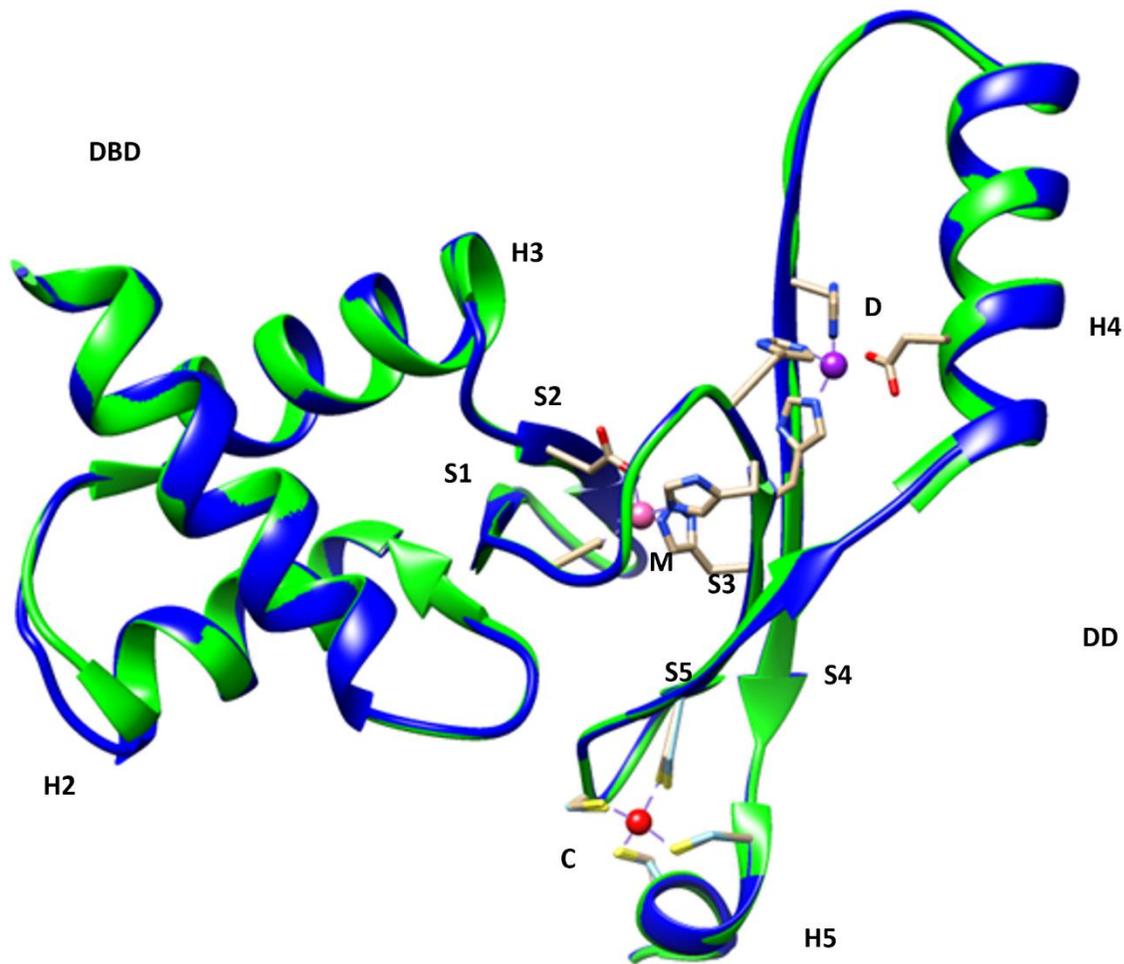


Figura 9 Superposición de 3MWM de *Streptomyces coelicolor*, cadena A (verde) vs. MAP3773C templado cadena A (azul): 33% identidad

	1	11	21	31	41
RMSD: ca					
006_3MWM.pdb, chain A	1	VTTAGPPVKG	RATRQRAAVS	AALQEVEEFR	SAQELH
006_Model_Chain_A.pdb	1	MSSPAAPRR	RATVKQRTVL	EVLRAQENFR	SAQQLY
					DMLK HK .
					GDAVGLT
	51	61	71	81	91
RMSD: ca					
006_3MWM.pdb, chain A	50	TVYRTLQSLA	DAGEVDVLRT	AEGESVYRRC	STGDHHHLV
006_Model_Chain_A.pdb	51	SVYRILRALA	ADRIAETQRA	EDGEILYRLR	TEAGHRHYLL
					CRACGKAVEV
					CRQCRAVAF
	101	111	121	131	
RMSD: ca					
006_3MWM.pdb, chain A	100	EGPAVEKWA	AIAAEHGYVN	VAHTVEIFGT	CADCAG
006_Model_Chain_A.pdb	101	TPVDIEEHR	RLSRQHYYAD	VTHYVDLYGT	CPLCQNTQP
					ASGG .

Figura 10. Alineación estructural y RMSD de 3MWM de *Streptomyces coelicolor*, cadena A vs. MAP3773C templado cadena A: 23% identidad

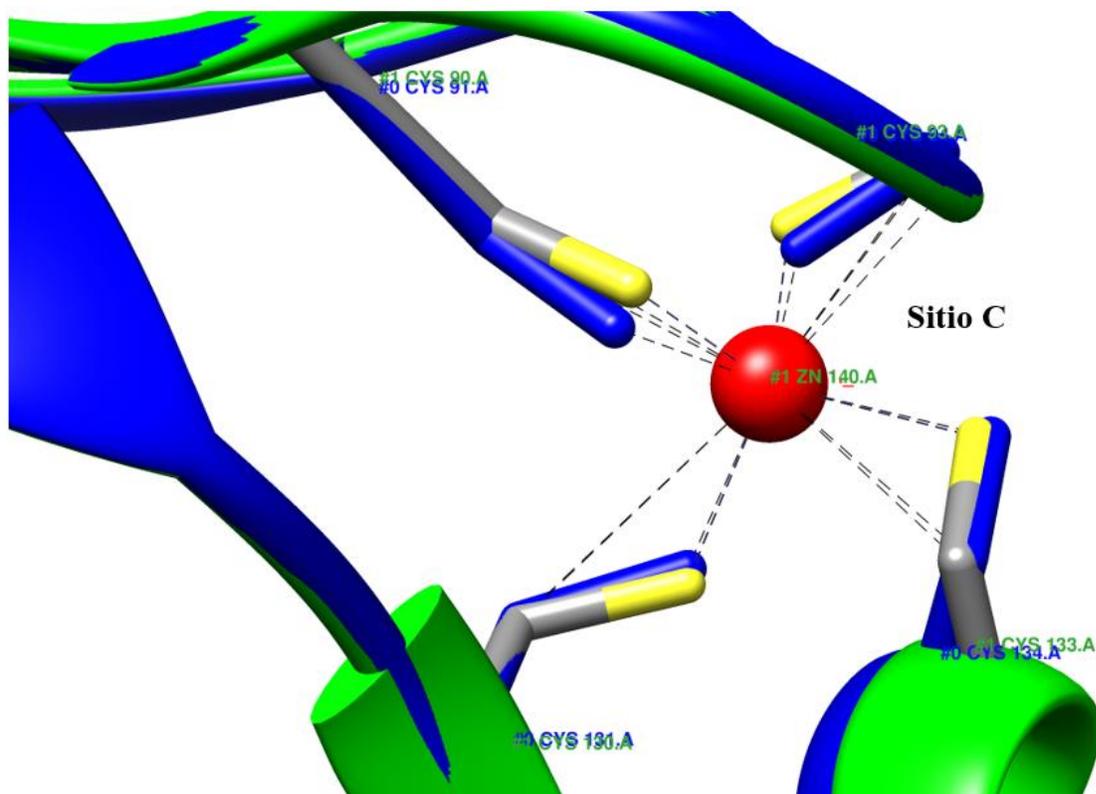


Figura 11. Superposición de 3MWM de *Streptomyces coelicolor*, cadena A (verde), cadena A vs. MAP3773C templado cadena A (azul)

Model #0 is MAP3773C TEMPLADO 3MWM.pdb

Model #1 is 3mwm

1	#0 ZN 1._ZN <> #1 CYS 133.A CB: 3.38
2	#0 ZN 1._ZN <> #0 CYS 94.A SG: 1.94
3	#0 ZN 1._ZN <> #1 CYS 130.A SG: 2.30
4	#0 ZN 1._ZN <> #1 CYS 93.A CB: 3.14
5	#0 ZN 1._ZN <> #1 CYS 93.A SG: 2.29
6	#0 ZN 1._ZN <> #1 CYS 133.A SG: 2.33
7	#0 ZN 1._ZN <> #1 ZN 140.A ZN: 0.00
8	#0 ZN 1._ZN <> #0 CYS 131.A SG: 2.18
9	#0 ZN 1._ZN <> #0 CYS 134.A CB: 3.37
10	#0 ZN 1._ZN <> #1 CYS 90.A SG: 2.34
11	#0 ZN 1._ZN <> #0 CYS 91.A SG: 2.31
12	#0 ZN 1._ZN <> #0 CYS 91.A CB: 3.22
13	#0 ZN 1._ZN <> #0 CYS 134.A SG: 2.42
14	#0 ZN 1._ZN <> #0 CYS 94.A CB: 3.17
15	#0 ZN 1._ZN <> #1 CYS 93.A N: 3.52
16	#0 ZN 1._ZN <> #1 CYS 90.A CB: 3.26
17	#0 ZN 1._ZN <> #1 CYS 130.A CB: 3.59
18	#0 ZN 1._ZN <> #0 CYS 131.A CB: 3.58

Tabla 5. Distancias en Armstrong de la superposición de 3MWM de *Streptomyces coelicolor*, cadena A (verde), cadena A vs. MAP3773C templado cadena A (azul), Zn #1 Y #140 con residuos cercanos.

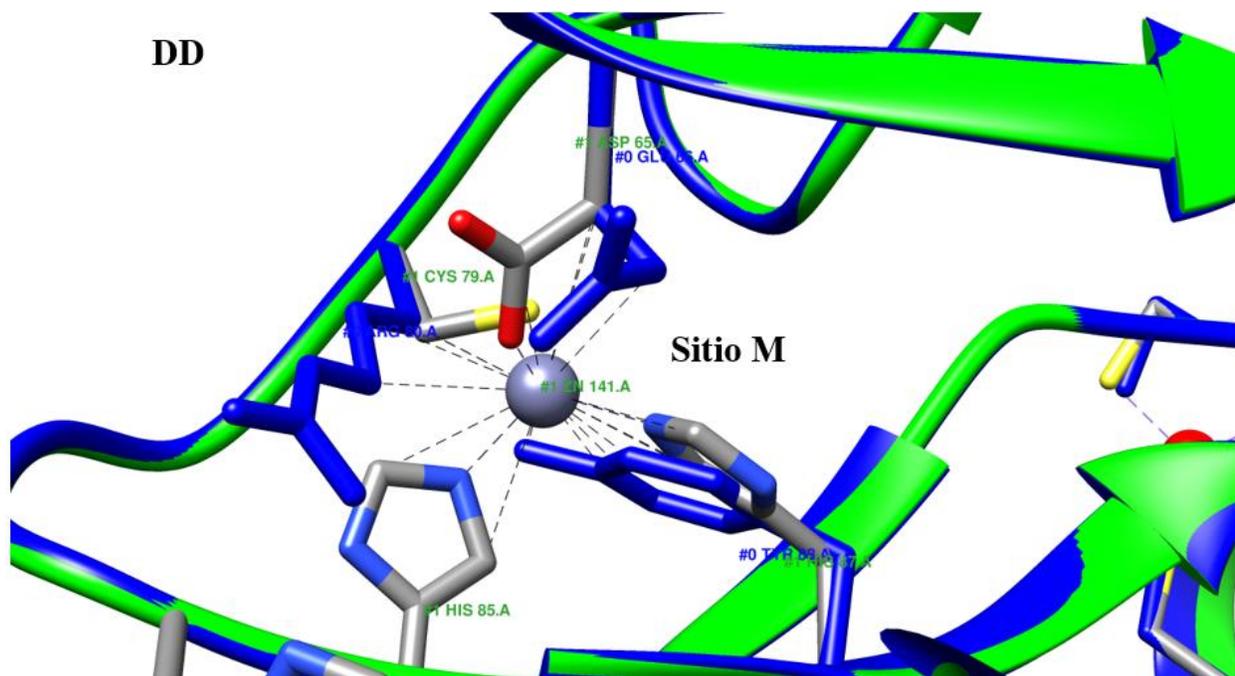


Figura 12. Superposición de 3MWM de *Streptomyces coelicolor*, cadena A (verde), cadena A vs. MAP3773C templado cadena A (azul)

Model #0 is MAP3773C TEMPLADO 3MWM.pdb

Model #1 is 3mwm

1	#1 ZN 141.A ZN <>	#1 HIS 85.A CE1:	2.96
2	#1 ZN 141.A ZN <>	#0 TYR 88.A CE1:	3.44
3	#1 ZN 141.A ZN <>	#1 HIS 87.A CE1:	3.03
4	#1 ZN 141.A ZN <>	#1 HIS 87.A CD2:	2.84
5	#1 ZN 141.A ZN <>	#1 HIS 85.A CD2:	2.92
6	#1 ZN 141.A ZN <>	#0 ARG 80.A CB:	3.36
7	#1 ZN 141.A ZN <>	#0 ARG 80.A CD:	2.79
8	#1 ZN 141.A ZN <>	#0 ARG 80.A CG:	3.45
9	#1 ZN 141.A ZN <>	#0 TYR 88.A OH:	1.97
10	#1 ZN 141.A ZN <>	#0 TYR 88.A CD2:	3.12
11	#1 ZN 141.A ZN <>	#0 TYR 88.A CZ:	2.08
12	#1 ZN 141.A ZN <->	#1 ASP 65.A OD2:	1.92
13	#1 ZN 141.A ZN <>	#0 GLU 66.A CB:	3.37
14	#1 ZN 141.A ZN <>	#1 ASP 65.A CB:	3.43
15	#1 ZN 141.A ZN <>	#0 GLU 66.A CG:	3.53
16	#1 ZN 141.A ZN <>	#1 HIS 85.A NE2:	1.97
17	#1 ZN 141.A ZN <>	#1 CYS 79.A CB:	3.17

18	#1 ZN 141.A ZN <> #1 CYS 79.A SG:	2.25
19	#1 ZN 141.A ZN <> #1 ASP 65.A CG:	2.93
20	#1 ZN 141.A ZN <> #1 HIS 87.A NE2:	1.97
21	#1 ZN 141.A ZN <> #0 TYR 88.A CE2:	1.80

Tabla 6. Distancias en Armstrong de la superposición de 3MWM de *Streptomyces coelicolor*, cadena A (verde), cadena A vs. MAP3773C templado cadena A (azul), Zn #1 Y #141 con residuos cercanos.

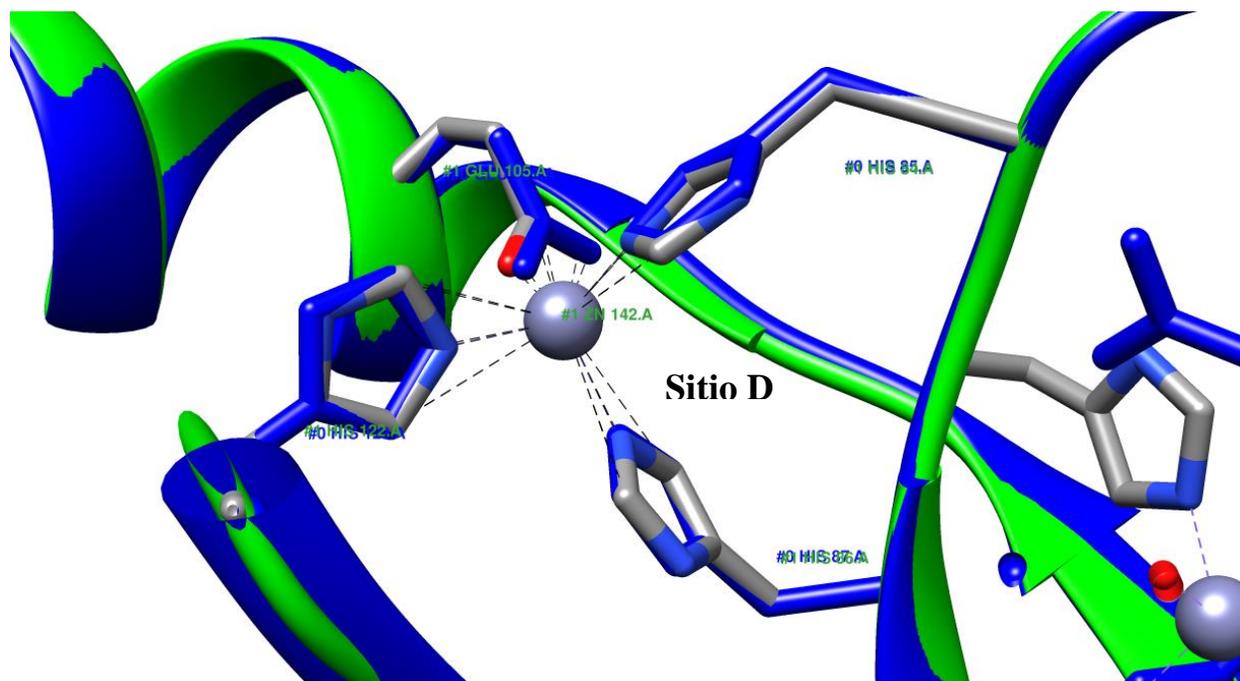


Figura 13. Superposición de 3MWM de *Streptomyces coelicolor*, cadena A (verde), cadena A vs. MAP3773C templado cadena A (azul)

Modelo #0 is MAP3773C TEMPLADO 3MWM.pdb

Modelo #1 is 3mwm

1	#1 ZN 142.A ZN <> #1 GLU 105.A CD:	2.67
2	#1 ZN 142.A ZN <> #0 HIS 85.A CD2:	2.92
3	#1 ZN 142.A ZN <> #0 HIS 85.A CE1:	3.04
4	#1 ZN 142.A ZN <> #1 HIS 122.A NE2:	2.04
5	#1 ZN 142.A ZN <> #0 HIS 87.A CD2:	3.11
6	#1 ZN 142.A ZN <> #0 HIS 85.A NE2:	1.99
7	#1 ZN 142.A ZN <> #0 GLU 106.A CD:	2.54
8	#1 ZN 142.A ZN <> #1 HIS 84.A CE1:	3.00
9	#1 ZN 142.A ZN <> #1 HIS 84.A CD2:	2.86
10	#1 ZN 142.A ZN <> #0 GLU 106.A OE2:	1.42
11	#1 ZN 142.A ZN <> #0 HIS 123.A NE2:	2.11
12	#1 ZN 142.A ZN <> #0 HIS 123.A CD2:	3.18

13	#1 ZN 142.A ZN <> #1 GLU 105.A OE2:	1.64
14	#1 ZN 142.A ZN <> #1 HIS 84.A NE2:	1.96
15	#1 ZN 142.A ZN <> #0 HIS 87.A CE1:	2.85
16	#1 ZN 142.A ZN <> #0 HIS 87.A NE2:	1.98
17	#1 ZN 142.A ZN <> #1 HIS 122.A CD2:	3.14
18	#1 ZN 142.A ZN <> #1 HIS 122.A CE1:	2.91
19	#1 ZN 142.A ZN <> #1 HIS 86.A NE2:	2.05
20	#1 ZN 142.A ZN <> #1 GLU 105.A OE1:	3.22
21	#1 ZN 142.A ZN <> #1 HIS 86.A CE1:	2.94
22	#1 ZN 142.A ZN <> #0 HIS 123.A CE1:	3.05
23	#1 ZN 142.A ZN <> #0 GLU 106.A OE1:	3.15
24	#1 ZN 142.A ZN <> #1 HIS 86.A CD2:	3.10

Tabla 7 Distancias en Armstrong de la superposición de 3MWM de *Streptomyces coelicolor*, cadena A (verde), cadena A vs. MAP3773C templado cadena A (azul), Zn #1 Y #142 con residuos cercanos.

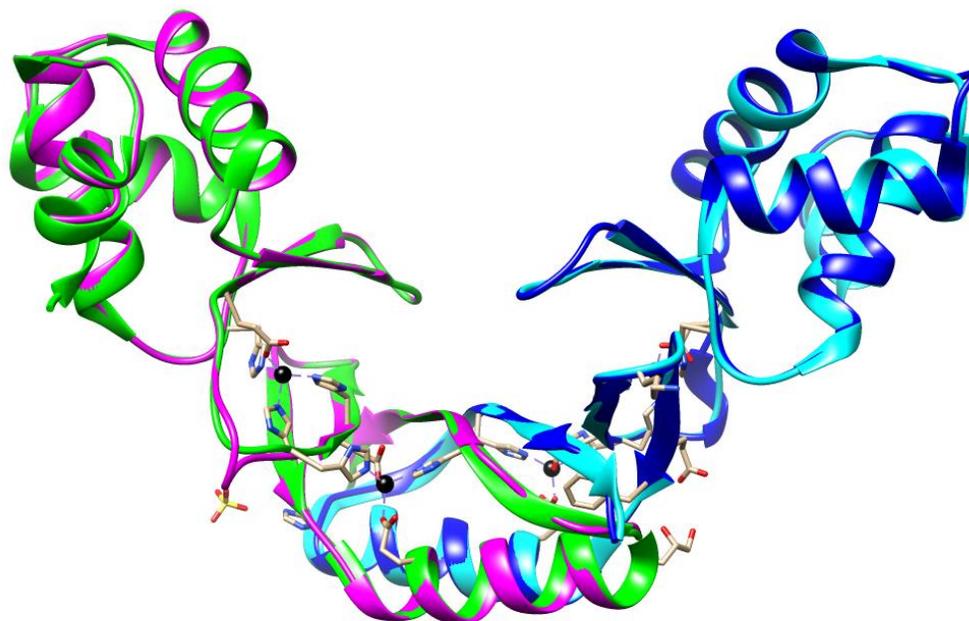


Figura 14 superposiciones de templado MAP3773c cadena A y B (rosa y azul) con proteína 5FD6 *Mur de Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* cadena C y D (azul cielo y verde)

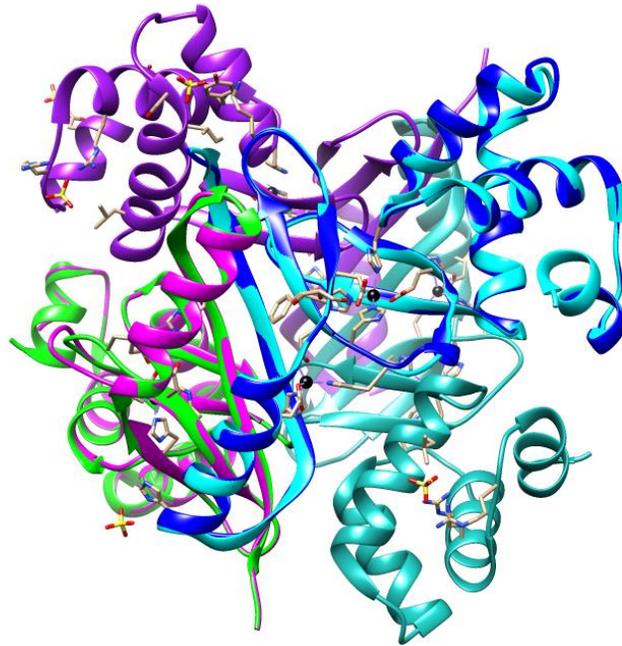


Figura 15. Superposición de templado MAP3773c cadena A y B (azul y rosa) con proteína 5FD6 *Mur de Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* cadena A, B, C y D 23%

	1	11	21	31	41
RMSD: ca					
007_5FD6.pdb, chain A	1 MTDVAKT	LEE LATERGMRMT	EQRRVIARIL	EDSEDHPDVE	ELYRRSVK.V
007_Model_Chain_A.pdb	1	MSS PAAPRRRRAT	VKQRTVLEVL	RAQENFRSAQ	QLYQDIRQNQ
RMSD: ca					
007_5FD6.pdb, chain A	50 DAKISISTVY	RTVKLFEDAG	IARHDFRDG	RSRYETVPEE	HHDHLIDLK.
007_Model_Chain_A.pdb	44 QLRIGLTSVY	RILRALAADR	IAETQRAEDG	EILYRLRTEA	GHRHYLLCRQ
RMSD: ca					
007_5FD6.pdb, chain A	99 TGTVIEFRSP	EIEALQERIA	REHGFRLVDH	RLELYGVPLK	KEDL..
007_Model_Chain_A.pdb	94 CGRAVAFTPV	DIEEHTRRLS	RQHHYADVTH	YVDLYGTCPL	CQNTQP

Figura 16. Alineación estructural y RMSD de 5FD6, cadena A vs. MAP3773C templado cadena A: 23% identidad

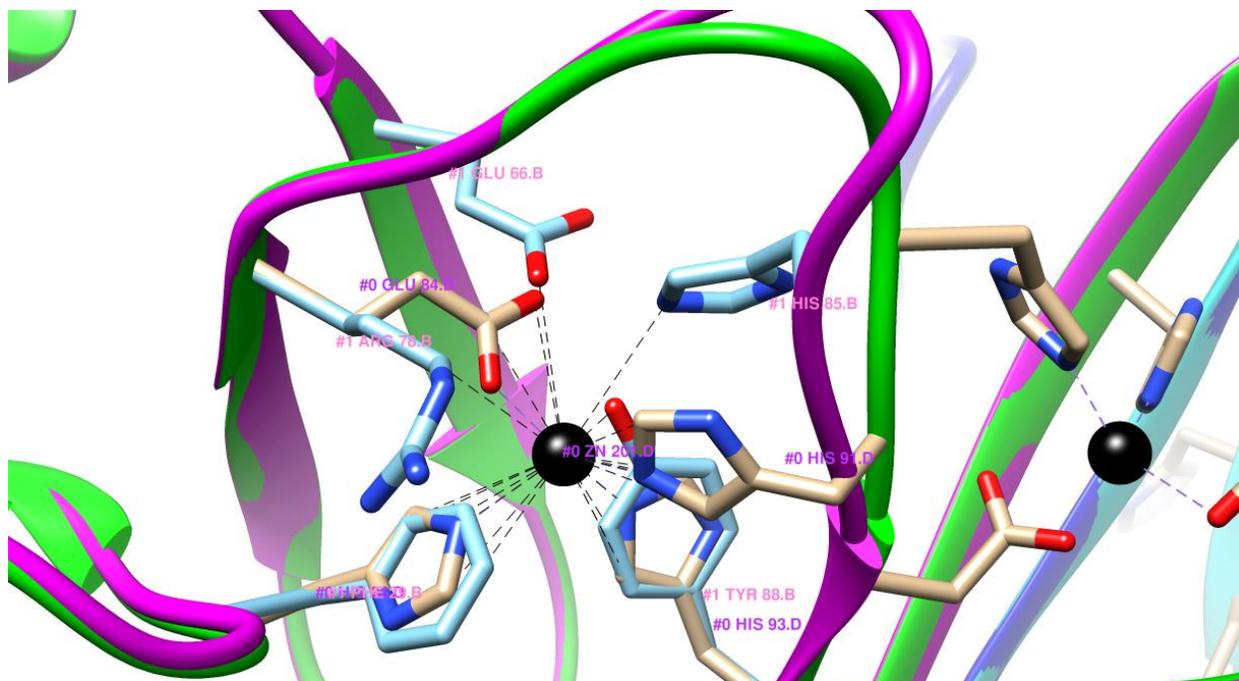


Figura 17. Superposición de templado MAP3773c cadena B (Rosa) con proteína 5FD6 *Mur de Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* cadena D (verde)

Model #0 is 5FD6

Model #1 is MAP337C TEMPLADO 5FD6.pdb

1	#0 ZN 201.D ZN <> #0 HIS 36.D CD2: 3.11
2	#0 ZN 201.D ZN <> #0 HIS 36.D CE1: 3.45
3	#0 ZN 201.D ZN <> #0 HIS 36.D NE2: 2.38
4	#0 ZN 201.D ZN <> #0 GLU 84.D CD: 2.87
5	#0 ZN 201.D ZN <> #0 GLU 84.D OE1: 3.17
6	#0 ZN 201.D ZN <> #0 GLU 84.D OE2: 1.92
7	#0 ZN 201.D ZN <> #0 HIS 91.D CD2: 3.34
8	#0 ZN 201.D ZN <> #0 HIS 91.D CE1: 3.02
9	#0 ZN 201.D ZN <> #0 HIS 91.D NE2: 2.25
10	#0 ZN 201.D ZN <> #0 HIS 93.D CD2: 3.27
11	#0 ZN 201.D ZN <> #0 HIS 93.D CE1: 3.27
12	#0 ZN 201.D ZN <> #0 HIS 93.D NE2: 2.34
13	#0 ZN 201.D ZN <> #1 PHE 29.B CD2: 3.26
14	#0 ZN 201.D ZN <> #1 PHE 29.B CE2: 2.17
15	#0 ZN 201.D ZN <> #1 PHE 29.B CZ: 2.79
16	#0 ZN 201.D ZN <> #1 GLU 66.B OE2: 3.51
17	#0 ZN 201.D ZN <> #1 ARG 78.B CD: 3.47
18	#0 ZN 201.D ZN <> #1 HIS 85.B NE2: 3.51
19	#0 ZN 201.D ZN <> #1 TYR 88.B CD1: 3.57
20	#0 ZN 201.D ZN <> #1 TYR 88.B CE1: 2.28
21	#0 ZN 201.D ZN <> #1 TYR 88.B CZ: 2.34

22 #0 ZN 201.D ZN <> #1 TYR 88.B OH: 1.76

table 8 Distancias en Armstrong de la superposición de *Mur de Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, cadena A (verde), cadena A vs. MAP3773C templado cadena A (azul), Zn #1 Y #201 con residuos cercanos.

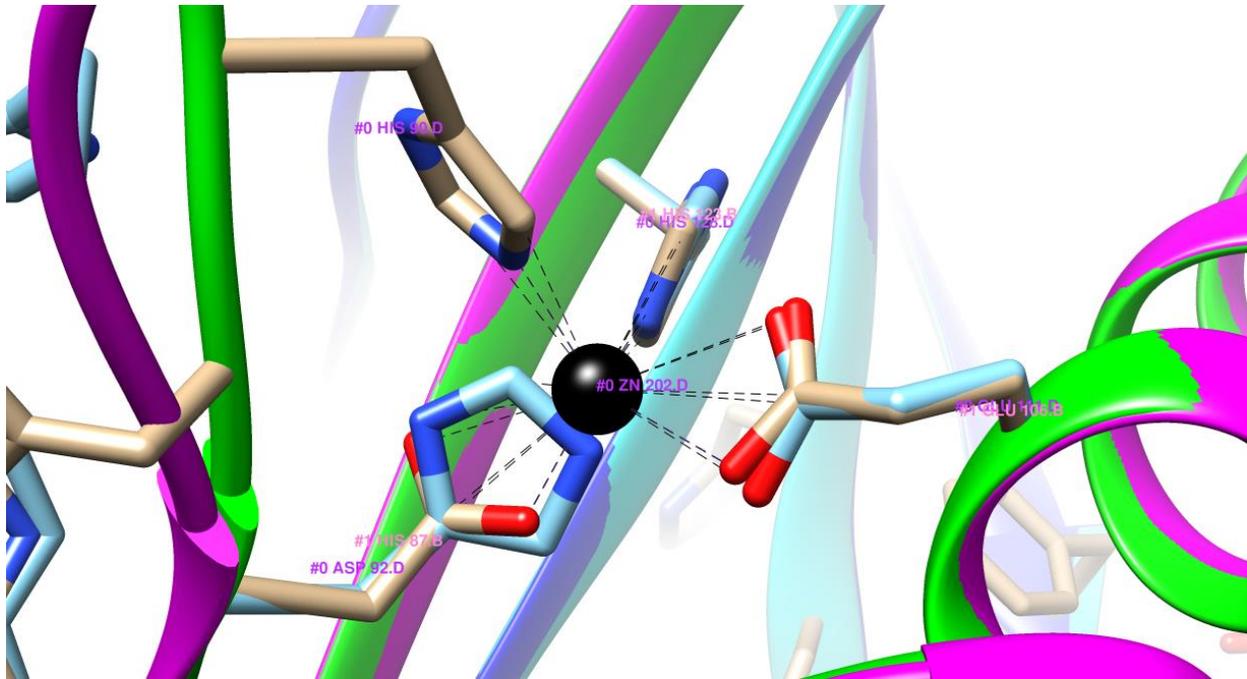


Figura 18 Superposición de templado MAP3773c cadena B (Rosa) con proteína 5FD6 *Mur de Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* cadena D (verde)

Model #0 is 5FD6 *Mur de Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*

Model #1 is MAP337C TEMPLADO 5FD6.pdb

1	#0 ZN 202.D ZN <> #0 HIS 90.D NE2: 2.12
2	#0 ZN 202.D ZN <> #1 HIS 87.B CD2: 2.19
3	#0 ZN 202.D ZN <> #0 HIS 128.D CE1: 3.03
4	#0 ZN 202.D ZN <> #1 HIS 87.B CG: 2.74
5	#0 ZN 202.D ZN <> #1 HIS 123.B CE1: 3.28
6	#0 ZN 202.D ZN <> #1 HIS 87.B CE1: 1.14
7	#0 ZN 202.D ZN <> #1 HIS 87.B ND1: 2.35
8	#0 ZN 202.D ZN <> #0 HIS 128.D NE2: 2.34
9	#0 ZN 202.D ZN <> #0 GLU 111.D OE1: 2.85
10	#0 ZN 202.D ZN <> #0 HIS 90.D CE1: 3.18
11	#0 ZN 202.D ZN <> #0 GLU 111.D OE2: 2.40
12	#0 ZN 202.D ZN <> #1 HIS 123.B NE2: 2.49
13	#0 ZN 202.D ZN <> #1 HIS 87.B NE2: 0.83
14	#0 ZN 202.D ZN <> #1 GLU 106.B CD: 3.00
15	#0 ZN 202.D ZN <> #1 GLU 106.B OE1: 2.63
16	#0 ZN 202.D ZN <> #0 HIS 128.D CD2: 3.52

17	#0 ZN 202.D ZN <> #0 ASP 92.D OD2:	1.97
18	#0 ZN 202.D ZN <> #0 HIS 90.D CD2:	3.01
19	#0 ZN 202.D ZN <> #0 ASP 92.D CG:	2.73
20	#0 ZN 202.D ZN <> #0 GLU 111.D CD:	2.96
21	#0 ZN 202.D ZN <> #1 GLU 106.B OE2:	2.72
22	#0 ZN 202.D ZN <> #0 ASP 92.D OD1:	2.85

Tabla 9 Distancias en Armstrong de la superposición de *Mur* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, cadena A (verde), cadena A vs. MAP3773C templado cadena A (azul), Zn #1 Y #202 con residuos cercanos.

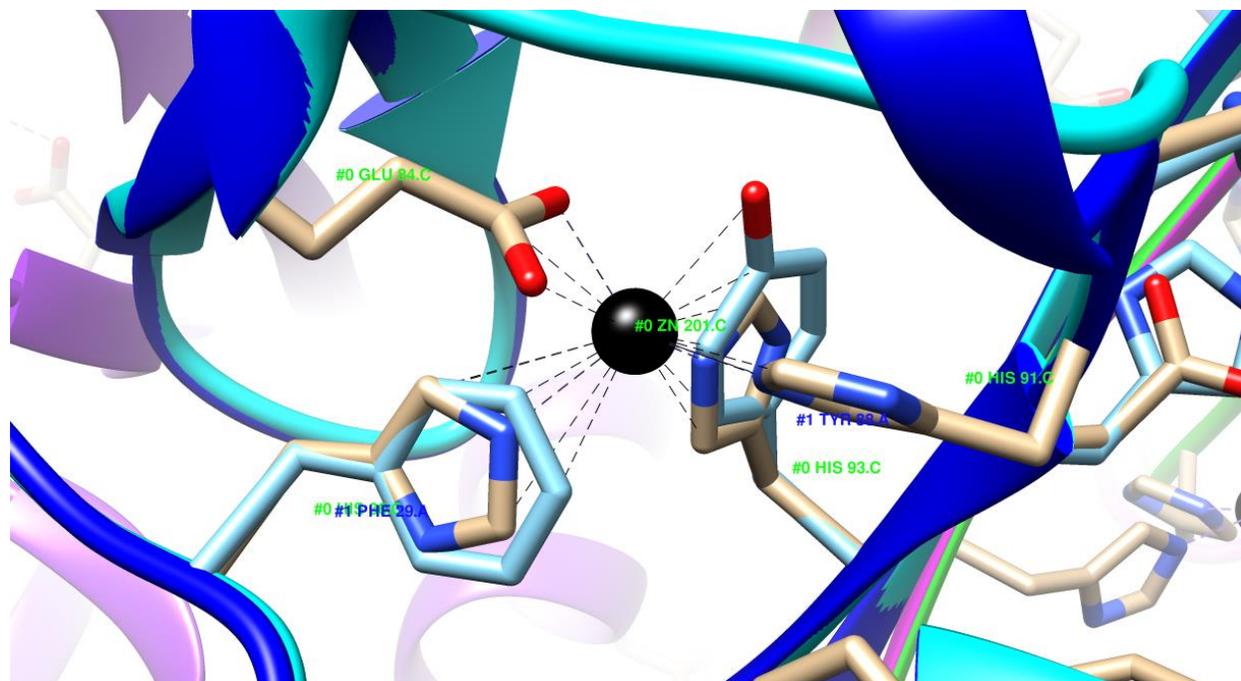


Figura 19. Superposición de templado MAP3773c cadena A (Azul) con proteína 5FD6 *Mur* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* cadena C (aqua azul)

Model #0 is 5FD6

Model #1 is MAP337C TEMPLADO 5FD6.pdb

1	#0 ZN 201.C ZN <> #0 HIS 91.C CE1:	3.28
2	#0 ZN 201.C ZN <> #0 GLU 84.C OE1:	2.15
3	#0 ZN 201.C ZN <> #0 GLU 84.C OE2:	2.87
4	#0 ZN 201.C ZN <> #1 PHE 29.A CD2:	3.08
5	#0 ZN 201.C ZN <> #0 HIS 36.C NE2:	2.27
6	#0 ZN 201.C ZN <> #0 HIS 36.C CD2:	3.05
7	#0 ZN 201.C ZN <> #0 HIS 36.C CE1:	3.27
8	#0 ZN 201.C ZN <> #0 HIS 91.C CD2:	3.20
9	#0 ZN 201.C ZN <> #0 HIS 93.C CE1:	3.03

10	#0 ZN 201.C ZN <> #1 TYR 88.A OH: 2.74
11	#0 ZN 201.C ZN <> #0 GLU 84.C CD: 2.78
12	#0 ZN 201.C ZN <> #1 TYR 88.A CZ: 2.81
13	#0 ZN 201.C ZN <> #1 TYR 88.A CE1: 2.05
14	#0 ZN 201.C ZN <> #0 HIS 91.C NE2: 2.28
15	#0 ZN 201.C ZN <> #1 PHE 29.A CE2: 1.92
16	#0 ZN 201.C ZN <> #0 HIS 93.C NE2: 2.10
17	#0 ZN 201.C ZN <> #1 TYR 88.A CD1: 3.15
18	#0 ZN 201.C ZN <> #1 PHE 29.A CZ: 2.45
19	#0 ZN 201.C ZN <> #0 HIS 93.C CD2: 3.13

tabla 10

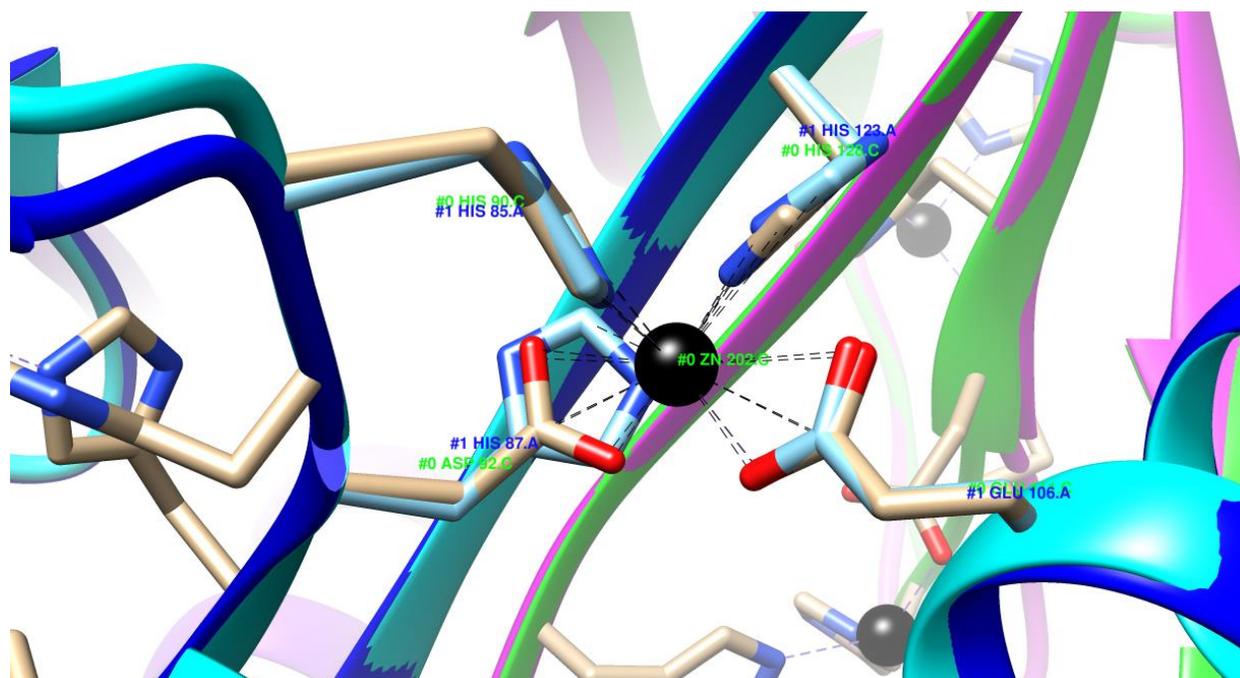


Figura 20. Superposición de templado MAP3773c cadena A (Azul) con proteína 5FD6 cadena C (aqua azul)

Model #0 is 5FD6

Model #1 is MAP337C TEMPLADO 5FD6.pdb

1	#0 ZN 202.C ZN <> #1 HIS 87.A NE2: 2.05
2	#0 ZN 202.C ZN <> #1 HIS 87.A CE1: 2.79
3	#0 ZN 202.C ZN <> #1 HIS 87.A ND1: 3.42
4	#0 ZN 202.C ZN <> #1 HIS 85.A NE2: 2.04
5	#0 ZN 202.C ZN <> #1 GLU 106.A CD: 2.78
6	#0 ZN 202.C ZN <> #1 HIS 87.A CD2: 2.28
7	#0 ZN 202.C ZN <> #1 HIS 85.A CD2: 3.25
8	#0 ZN 202.C ZN <> #1 HIS 123.A CD2: 3.48
9	#0 ZN 202.C ZN <> #1 HIS 123.A CE1: 3.53
10	#0 ZN 202.C ZN <> #0 HIS 128.C NE2: 2.14
11	#0 ZN 202.C ZN <> #1 HIS 123.A NE2: 2.61

12	#0 ZN 202.C ZN <> #0 HIS 90.C CD2:	3.24
13	#0 ZN 202.C ZN <> #0 HIS 90.C CE1:	2.75
14	#0 ZN 202.C ZN <> #0 HIS 90.C NE2:	2.04
15	#0 ZN 202.C ZN <> #0 GLU 111.C OE2:	2.14
16	#0 ZN 202.C ZN <> #0 ASP 92.C OD2:	1.98
17	#0 ZN 202.C ZN <> #0 HIS 128.C CE1:	2.75
18	#0 ZN 202.C ZN <> #0 HIS 128.C CD2:	3.37
19	#0 ZN 202.C ZN <> #0 ASP 92.C OD1:	2.82
20	#0 ZN 202.C ZN <> #0 ASP 92.C CG:	2.70
21	#0 ZN 202.C ZN <> #0 GLU 111.C CD:	2.87
22	#0 ZN 202.C ZN <> #0 GLU 111.C OE1:	2.91
23	#0 ZN 202.C ZN <> #1 HIS 85.A CE1:	2.79
24	#0 ZN 202.C ZN <> #1 GLU 106.A OE2:	2.13
25	#0 ZN 202.C ZN <> #1 GLU 106.A OE1:	2.79
26	#0 ZN 202.C ZN <> #1 HIS 87.A CG:	3.13

tabla 11 Distancias en Armstrong de la superposición de *Mur* de *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae*, cadena A (verde), cadena A vs. MAP3773C templado cadena A (azul), Zn #1 Y #202 con residuos cercanos.

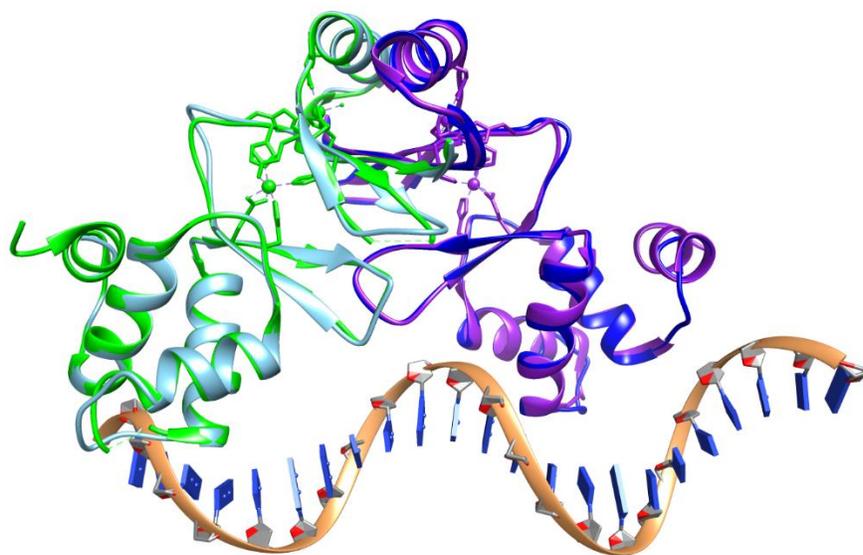


Figura 21. Superposición de templado MAP3773c cadena A (Azul) con proteína 4RB1 Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1 v2 cadena C (aqua azul) 26%

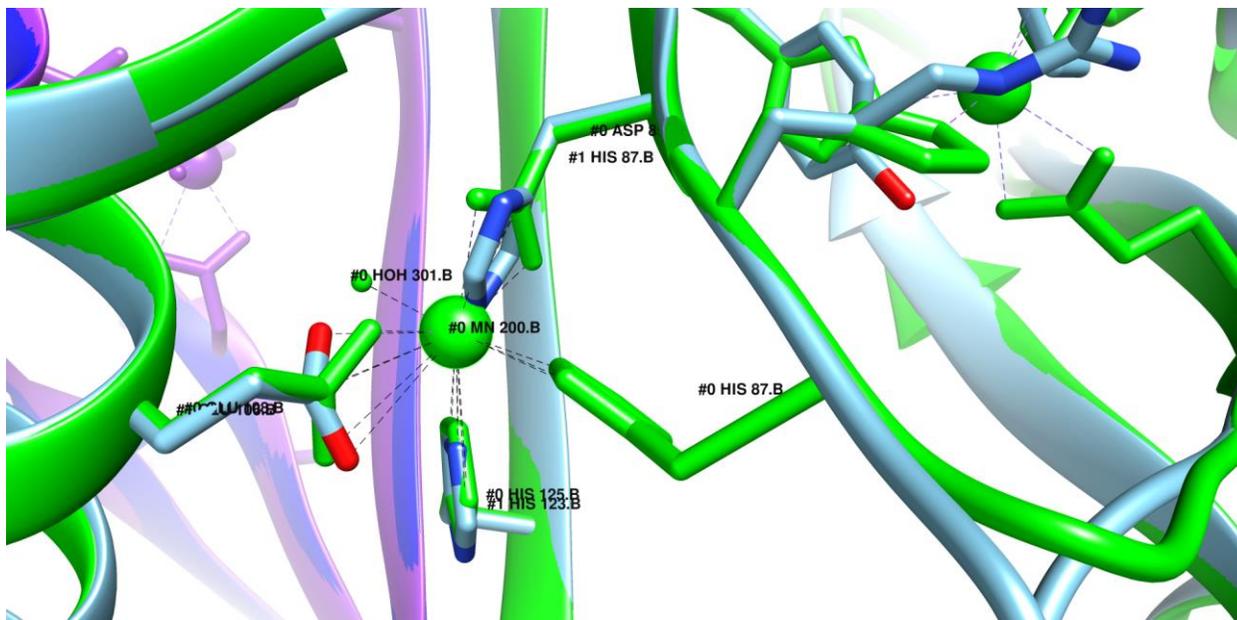


Figura 22. Superposición de templado MAP3773c cadena B (Azul cielo) con proteína 4RB1 *Magnetospirillum gryphiswaldense MSR-1 v2* cadena B (verde) 26%

Model #0 is 4rb1

Model #1 is map3773c modelo 4rb1.pdb

1	#0 MN 200.B MN <> #1 HIS 123.B CD2: 2.965
2	#0 MN 200.B MN <> #1 HIS 87.B CD2: 1.996
3	#0 MN 200.B MN <> #1 HIS 123.B NE2: 2.340
4	#0 MN 200.B MN <> #1 GLU 106.B CD: 3.388
5	#0 MN 200.B MN <> #1 HIS 87.B CE1: 1.570
6	#0 MN 200.B MN <> #0 GLU 108.B OE2: 2.412
7	#0 MN 200.B MN <> #0 GLU 108.B CD: 3.292
8	#0 MN 200.B MN <> #0 HIS 87.B NE2: 2.312
9	#0 MN 200.B MN <> #0 HOH 301.B O: 2.357
10	#0 MN 200.B MN <> #1 GLU 106.B OE1: 3.436
11	#0 MN 200.B MN <> #0 GLU 108.B OE1: 3.447
12	#0 MN 200.B MN <> #0 HIS 125.B CE1: 3.172
13	#0 MN 200.B MN <> #1 HIS 87.B NE2: 0.652
14	#0 MN 200.B MN <> #0 ASP 89.B CG: 2.626
15	#0 MN 200.B MN <> #0 HIS 125.B CD2: 2.911
16	#0 MN 200.B MN <> #1 GLU 106.B OE2: 2.702
17	#0 MN 200.B MN <> #1 HIS 87.B CG: 2.796
18	#0 MN 200.B MN <> #0 HIS 125.B NE2: 2.066
19	#0 MN 200.B MN <> #0 ASP 89.B OD1: 2.047

20	#0 MN 200.B MN	<>	#1 HIS 87.B ND1:	2.661
21	#0 MN 200.B MN	<>	#0 ASP 89.B OD2:	2.587
22	#0 MN 200.B MN	<>	#1 HIS 123.B CE1:	3.577
23	#0 MN 200.B MN	<>	#0 HIS 87.B CE1:	3.228
24	#0 MN 200.B MN	<>	#0 HIS 87.B CD2:	3.299

Table 12 Distancias en Armstrong de la superposición de 4RB1 *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 v2 cadena A (verde), cadena A vs. MAP3773C templado cadena A (azul cielo), Zn #1 Y #200 con residuos cercanos.

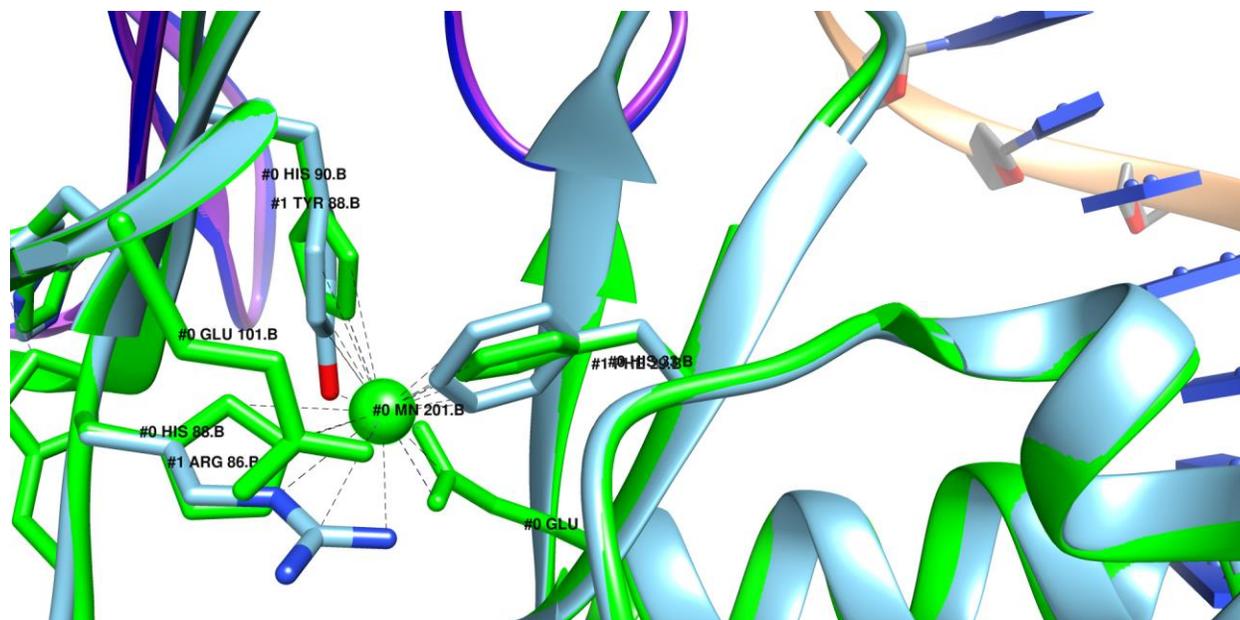


Figura 23. Superposición de templado MAP3773c cadena B (Azul cielo) con proteína 4RB1 cadena B (verde) 26%

Model #0 is 4rb1

Model #1 is map3773c modelo 4rb1.pdb

1	#0 MN 201.B MN	<>	#1 TYR 88.B CE1:	2.391
2	#0 MN 201.B MN	<>	#1 TYR 88.B CD1:	3.494
3	#0 MN 201.B MN	<>	#1 ARG 86.B NE:	2.703
4	#0 MN 201.B MN	<>	#0 GLU 101.B OE2:	2.517
5	#0 MN 201.B MN	<>	#1 TYR 88.B OH:	2.574
6	#0 MN 201.B MN	<>	#0 HIS 33.B CE1:	3.048
7	#0 MN 201.B MN	<>	#0 HIS 90.B NE2:	2.457
8	#0 MN 201.B MN	<>	#1 ARG 86.B NH1:	2.760
9	#0 MN 201.B MN	<>	#0 HIS 90.B CE1:	3.560
10	#0 MN 201.B MN	<>	#0 HIS 88.B CD2:	3.063
11	#0 MN 201.B MN	<>	#1 TYR 88.B CZ:	2.790
12	#0 MN 201.B MN	<>	#0 HIS 90.B CD2:	3.232
13	#0 MN 201.B MN	<>	#0 GLU 81.B CD:	2.737
14	#0 MN 201.B MN	<>	#1 PHE 29.B CE1:	1.792

15	#0 MN 201.B MN	<>	#0 HIS 88.B CE1:	3.069
16	#0 MN 201.B MN	<>	#0 HIS 33.B NE2:	1.970
17	#0 MN 201.B MN	<>	#0 HIS 88.B NE2:	2.108
18	#0 MN 201.B MN	<>	#1 ARG 86.B CZ:	3.048
19	#0 MN 201.B MN	<>	#0 GLU 81.B OE1:	2.516
20	#0 MN 201.B MN	<>	#1 PHE 29.B CD1:	3.141
21	#0 MN 201.B MN	<>	#0 HIS 33.B CD2:	2.856
22	#0 MN 201.B MN	<>	#1 PHE 29.B CE2:	3.224
23	#0 MN 201.B MN	<>	#0 GLU 101.B CD:	3.155
24	#0 MN 201.B MN	<>	#1 PHE 29.B CZ:	1.874
25	#0 MN 201.B MN	<>	#0 GLU 81.B OE2:	2.315

Tabla 13 Distancias en Armstrong de la superposición de 4RB1 *Magnetospirillum gryphiswaldense* MSR-1 v2 cadena A (verde), cadena A vs. MAP3773C templado cadena A (azul cielo), Zn #1 Y #201 con residuos cercanos.

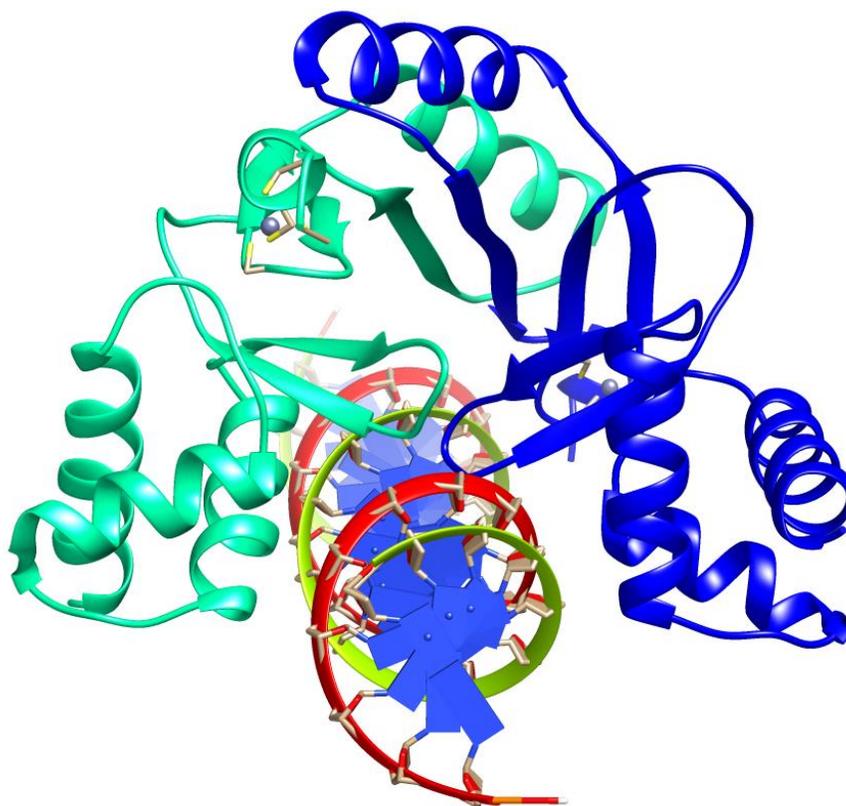


Figura 24 Interacción MAP3773c con secuencia de FPN de bacterias en FPN1 $\Delta = -766.4$. MAP3773c cadena A y B (azul cian y azul), secuencia de bacterias (rojo con amarillo) y nucleótidos (azul).

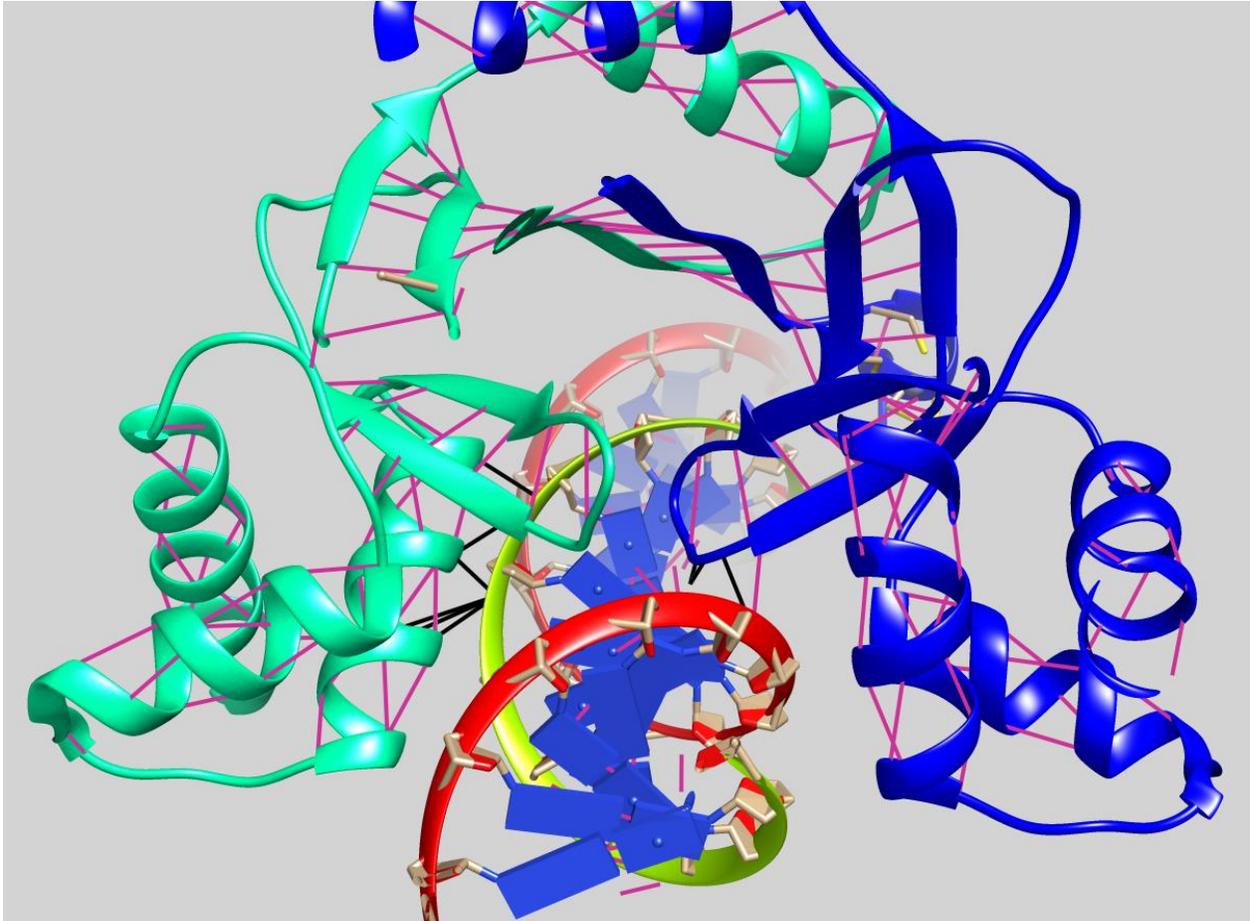


Figura 25 Interacción DNA-proteína (Enlaces) color rosa enlaces de hidrogeno y enlaces negros interacción aminoácido y base DNA. Secuencia FPN de bacterias y MAP3773c cadena A y B (azul cyan y azul), secuencia de bacterias (rojo con amarillo) y nucleótidos (azul).

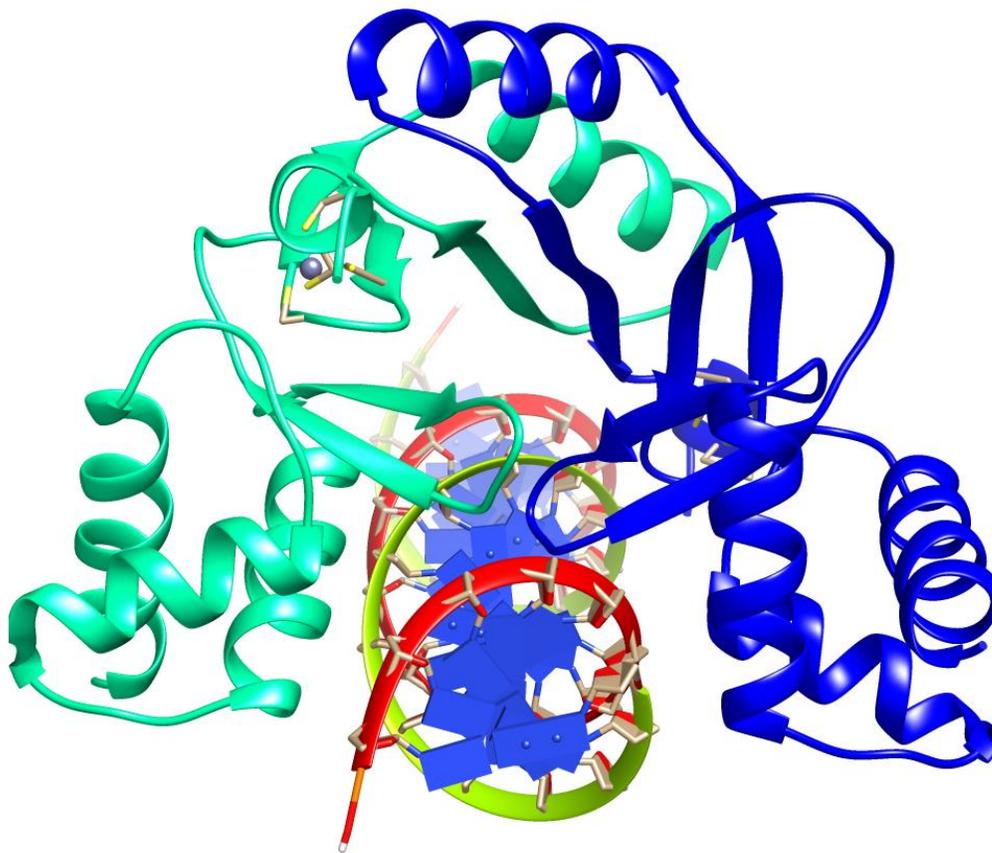


Figura 26 Interacción MAP3773c con secuencia de FPN de micobacterias con un $\Delta = -736.59$. MAP3773c cadena A y B (azul cyan y azul), secuencia de micobacterias (rojo con amarillo) y nucleótidos (azul).

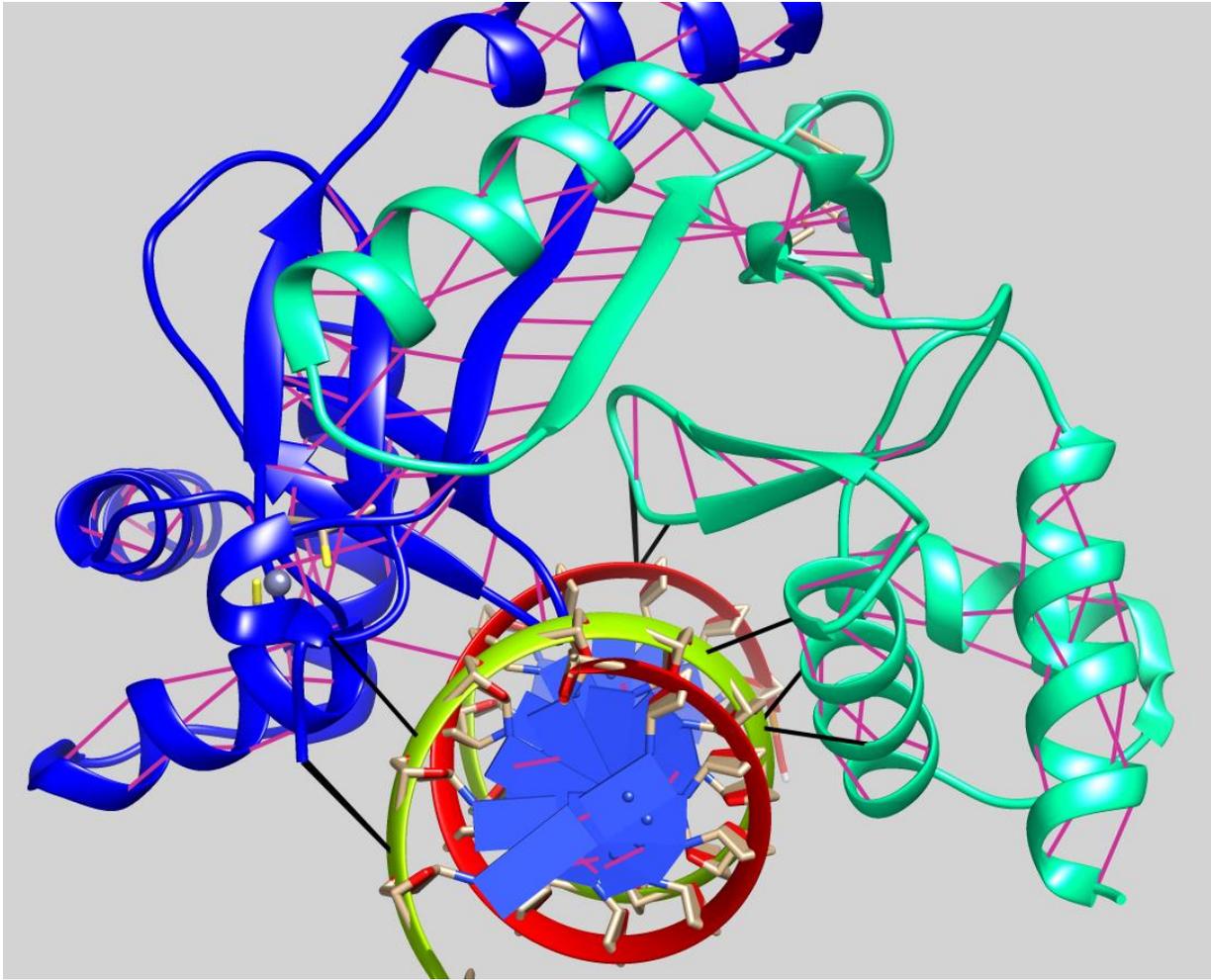


Figura 27 Interacción DNA-proteína (Enlaces) color rosa enlaces de hidrogeno y enlaces negros interacción aminoácido y base DNA. Secuencia FPN de micobacterias. MAP3773c cadena A y B (azul cyan y azul), secuencia de micobacterias (rojo con amarillo) y nucleótidos (azul).

Purificación de MAP3773c.

En los experimentos de purificación las muestra de proteína purificada y eluida se realizó con 30 mL de imidazol en buffer A, de los cuales se obtuvieron 25 mL eluidos, los cuales pusimos en electroforesis una muestra precipitada, en un gel de acrilamida al 12%. En la Figura 26 se puede observar que las eluciones con más cantidad de proteína fueron del tubo 1 al 8, aun así rescatamos los tubos hasta la elución 16 y posteriormente los pusimos a dializar para usar la proteína purificada y dializada para los experimentos de EMSA.

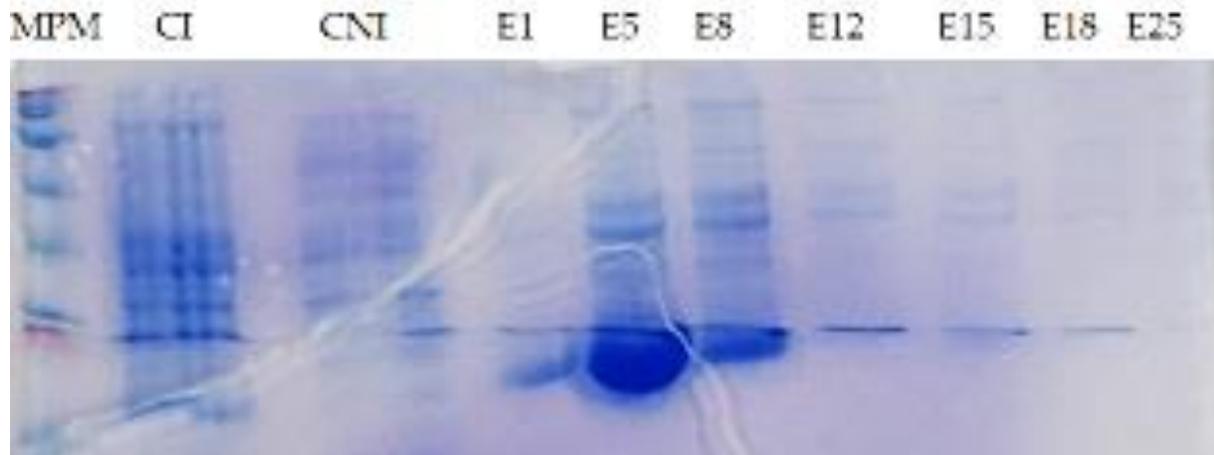


Figura 26.- Purificación de la proteína MAP3773c en un gel de SDS12%, en el carril MPM, marcador de peso molecular, carril CI, cultivo inducido, CNI, cultivo no inducido, E1 a la E25 son eluciones de 1ml, tomadas de la columna, precipitadas en ácido tricloroacetico al 10%, como lo marca la metodología en materiales y métodos.

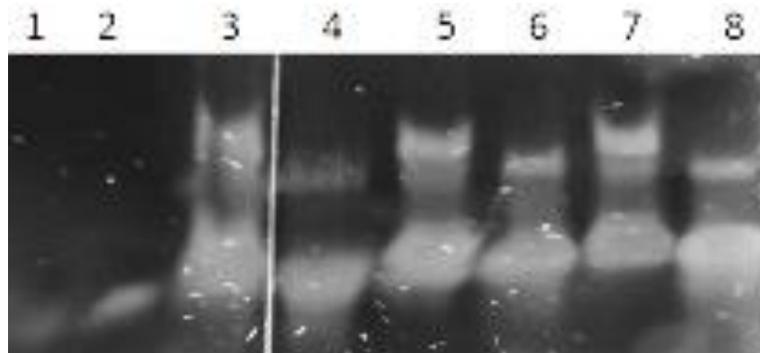


Figura 27. EMSA, de las cajas Fur de bacterias y micobacterias localizadas en Ferroportina 1 de ratón y proteína MAP3773c, en el carril 1 ADN no relacionado, 2, ADN no relacionado con MAP3773c, 3, ADN no relacionado, sonda de ADN de caja Fur de micobacterias sin manganeso ni zinc, 4, lo mismo que en carril 3 pero con caja Fur de *E.coli*, 5, ADN no relacionado, sonda de ADN de caja Fur de micobacterias con manganeso, 6, lo mismo que carril 5, pero con caja Fur de *E.coli*. Carril 7 y 8, ADN no relacionado, sonda de ADN de caja Fur de micobacterias con zinc en carril 7 y 8 lo mismo pero con caja Fur de *E.coli*.

5.1 Estructura 2003

2003 pertenece a la familia de reguladores de captación férrico/zinc (Fur/Zur) son las proteínas reguladoras centrales dependientes de metales. Consta de dos dominios el dominio de unión al ADN N-terminal (residuos 1–77) y el dominio de dimerización C-terminal (residuos 78–131). El

dominio de unión al ADN se compone de tres hélices α seguidas de una hoja β antiparalela de dos cadenas. Este dominio exhibe el típico motivo de hélice alada con un haz de tres hélices (H1, H2 y H3), donde la hélice H3 es la supuesta región de reconocimiento de ADN (residuos 34–54). El dominio de dimerización está constituido por tres cadenas β antiparalelas (S3, S4 y S5) y una hélice α larga (H4) estabilizada por uno de los sitios de unión a metales. Las hebras β S3–S5 forman una lámina β antiparalela de seis hebras con sus compañeros de simetría S5'–S3'. Además, hay una serie de contactos hidrofílicos e hidrofóbicos desde la hélice H1 hasta el H4' relacionado con la simetría. Figura 5 representa la alineación con un RMSD de 1 y un 34% de similitud.

La estructura cristalina de FurB posee tres sitios distintos de zinc (figura 4). Dos de los iones metálicos están en el dominio de dimerización y uno está ubicado en la región bisagra entre la dimerización y el dominio de unión al ADN. Cada uno de los sitios de metal exhibe diferentes ambientes estructurales y químicos dependiendo de su rol funcional.

El sitio 1 está rodeado por Asp₆₂, Cys₇₆, His₈₁ y His₈₃ (Fig. 8) el modelo MAP3773c no presenta un zinc tiene en esa posición Arg₈₆, Glu₆₆ y Arg₈₀ como tal no cumple los requisitos para un ion de zinc estar en esta posición. Normalmente la familia Fur conserva tener eso sitios en una coordinación geométrica tetraedro con 4, 5 o 6 enlace, entre ellos moléculas de agua. Este sitio ocupa una posición estratégica en la estructura de la proteína porque está coordinado por dos aminoácidos del dominio de unión al ADN (Asp₆₂ y Cys₇₆) y dos del dominio de dimerización (His₈₁ e His₈₃). El sitio 2 está tetraédricamente coordinado con un grupo de ligandos de azufre de la siguiente manera: Cys₈₆ y Cys₈₉ del dominio de dimerización y Cys₁₂₆ y Cys₁₂₉ ubicados en el extremo C, MAP3773c cys₉₁, cys₁₃₄, cys₉₄, cys₉₀ (Fig. 7) nuestro modelo aquí presenta un zinc estructural debido a que cumple con los requisitos de zinc. Esta geometría tetraédrica ya se ha

observado en muchas otras proteínas de zinc, y los parámetros geométricos concuerdan con los informados previamente en la literatura. El sitio 3 (figura 6) está ubicado en el núcleo del dominio de dimerización. Aquí, el ion Zn^{2+} está tetraédricamente coordinado por tres histidinas (His₈₀, His₈₂ y His₁₁₈) y un glutamato (Glu₁₀₁). Aquí nuestro modelo MAP3773c también representa un zinc estructural debido que presenta una estructura similar (Glu₁₀₆, His₈₇, His₈₅ y His₁₂₃) esto claramente en comparación de 2O03 podemos notar que el bucle no tiene la misma torsión pero compensa debido a que el sitio de zinc aun cumple con los requisitos de tener un centro hidrofóbico con aminoácidos hidrofóbicos.

5.2 Estructura 3MWM

Los miembros de la familia Fur demuestran una estructura disponible que son homodiméricas y que cada monómero (Figura 9) consiste en un dominio de unión al ADN (DBD) N-terminal (residuos 1-77) con el motivo de hélice alada consta de una composición de tres hélices (H1-H3) y una hoja de dos hebras (S1-S2) siguiente de un dominio de dimerización (DD) C-terminal (residuos 86-145) que contiene tres- hebras dobles (S3-S5) con una hélice larga(H4) y una hélice corta (H5) en el lado opuesto de la hoja. Figura 9 representa la superposición del modelo MAP3773c por homología de la proteína 3MWM de *Streptomyces coelicolor*, cadena A. Figura 10 representa el alineamiento de la proteína 3MWM de *S. coelicolor* con un porcentaje de similitud del 33%. Proteína 3MWM presenta tres sitios de unión de zinc en cada monómero (imagen de estructura homodimérica no presente) sitio 1 (M), 2 (C) y 3 (D) (figura 9), los cuales todos presentan una geometría tetraédrica. Nuestro modelo de MAP3773c presenta un sitio de unión (figura11), sitio C del modelo MAP3773c reside en el dominio DD constituido por histidinas conservadas del modelo básico de FUR His₉₁, His₉₄, His₁₃₁ y His₁₃₄, siendo estos cuatro enlaces que le proporciona la coordinación a zinc (tabla 5).

Figura 12 constituye el sitio M en la interfaz del dominio está formado por Glu₆₆, Tyr₈₈ y Arg₈₀ en MAP3773c y en 3MWM Asp₆₅, Cys₇₉, His₈₅ y His₈₇ del dominio DBD (S1-S3). Figura 13 el sitio D está ubicado en el otro extremo del dominio DD, donde His₈₄, His₈₆, Glu₁₀₅ y His₁₂₂ participan en la coordinación de zinc. MAP His₈₇, His₈₅, Glu₁₀₆, His₁₂₃, esta interpretación nos indica que es posibles que el modelo podría tener zinc en este sitio.

5.3 Estructura 5FD6

Figura 14 es la superposición de templado MAP3773c con proteína 5FD6 cadena C y D y figura 15 de la estructura 5FD6 con sus cuatro cadenas sobrepuesto con templado MAP3773c (cadena A: Azul y cadena B: rosa). Figura 16 análisis de RMSD del alineamiento de la cadena A de 5FD6 y Modelo MAP3773c cadena A con un 23% de similitud y una resolución de 2.4 Å. 5FD6 es una proteína tipo tetrámero que consta de un total de ocho zincs, dos por cadena. Modelo MAP3773c no presenta sitios de unión de metal. Figura 17 se observa los residuos presentes en la proteína 5FD6 (His₃₆, Glu₈₄, His₉₁ y His₉₃) mientras que los residuos que estarían presentes en caso de tener un zinc estructural en el modelo MAP3773c serían Phe₂₉, Glu₆₆, Arg₇₈, His₈₅ y Tyr₈₈ (tabla 8). En figura 18 podemos ver los residuos por parte del modelo MAP3773c His₈₇, His₁₂₃ y Glu₁₀₆ (tabla 9) donde estos le proporcionarían un centro hidrofóbico para su estabilidad, en el caso de ser una estructura tetraédrica las moléculas de agua podrían jugar un papel importante para este caso. Figura 19 proteína 5FD6, los residuos que forman la coordinación tetraédrica son His₉₁, Glu₈₄, His₃₆ y His₉₃, mientras modelo MAP3773c Phe₂₉, y Tyr₈₈ (tabla 10). Figura 20 es una superposición de ambos modelos, en donde MAP3773c no presenta zinc estructural solo 5FD6, pero si presenta los residuos necesarios para condicionar un sitio de unión para zinc, ya que estos residuos cumplen con los requisitos de conservación, así como un centro hidrofóbico (tabla 11).

5.4 Estructura 4RB1

Apo-Fur consta de dos monómeros que forman dímeros estables, ambos de los cuales consisten en los residuos 1–134 y nueve residuos C-terminales desordenados figura 21. Cada monómero tiene una estructura modular que consta de un DBD N-terminal y un DD C-terminal conectados por una bisagra flexible formada por los residuos 83–88. El DBD consta de cuatro hélices α consecutivas (α_1 , α_2 , α_3 y α_4) y una lámina β antiparalela (β_1 - β_2). DD contiene un dominio mixto α/β donde α_5 corta entre β_4 y β_5 . La interfaz de dimerización está formada principalmente por el DD, que consta de dos interacciones hidrofóbicas intermoleculares que forman α_5 y dos β_5 y una hoja β antiparalela figura 21. El modelo de MAP3773c obtuvo un 26% de similitud con 4RB1 con excepción que no contiene ningún metal estructural. 4RB1 tiene presente dos metales estructurales de manganeso en cada cadena un total de cuatro metales de Mn^{2+} . Modelo MAP3773c presenta los mismos residuos con una resolución de 2.75 Å y una distancia mayor en comparación de 4RB1 figura 19. 4RB1 a diferencia de las proteínas antes mencionadas contiene manganeso con una estructura una geometría de coordinación mixta con un número de coordinación de 5 y una geometría trigonal bipyramide o número de coordinación 6 y estructura octaedro. En el caso de modelo de MAP3773c figura 22 podemos observar cómo Mn^{2+} tiene interacción con tres residuos (His₈₇, His₁₂₃ y Glu₁₀₆), cuando el modelo 4RB1 tiene interacción con cinco residuos (Glu₁₀₈, His₈₇, Asp₈₉, His₁₂₅ y H₂O). En literatura escrita por S., U., 2020 menciona la interacción de Mn^{2+} y aminoácidos donde describe como el metal prefiere tener interacción con 5-6 residuos para obtener un estabilidad y función biológica, lo cual podría ser razón que en este modelo MAP3773c no contiene Mn^{2+} o al menos no contiene un sitio para este metal, por la falta de interacción con cinco o más vecinos, lo cual podría ser que en vez de Mn^{2+} la estructura podría tener Zn como alternativa.

Figura 24 representa la interacción entre MAP3773c y caja de hierro de bacteria en FPN1 GATAATGAGTGTTATCCTTAT. Esta unión se hizo con el programa HEX 8.0 con una energía libre de Gibbs de Δ -766.4 lo cual tiene una afinidad estable. Figura 26 es el docking de MAP3773c con caja de zinc de MAP en FPN1: CACCTTACAGGCAGAAAAG la cual también tiene una energía de Gibbs de Δ -650.4. Figura 25. Es una representación de la interacción entre FPN1 de bacterias. Los siguientes son enlaces tipo hidrogeno e interacciones electrostáticas de los residuos de aminoácidos y las bases de DNA: Ala₆₀-dT, Arg₅₇-dT, Arg₅₇-dA, Arg₅₄-dT, Gly₇₃-dT, Glu₇₄-dT, Ile₇₈-dT (enlace tipo hidrogeno). Figura 27. Es una representación de la interacción entre FPN1 de micobacterias. Los siguientes son enlaces tipo hidrogeno e interacciones electrostáticas de los residuos de aminoácidos y las bases de DNA: Tyr₁₃₇-dC, Cys₁₃₄-dA, Arg₅₄-dA, Arg₅₇-dA, Glu₇₄-dT, Asp₇₄-dT, Ala₆₁-dC. Se identificaron los choques y contactos interatómicos según los radios VDW. Estas interacciones son tipo choques: interacciones desfavorables en las que los átomos están demasiado juntos y contactos cercanos; contactos: todo tipo de interacciones directas: polares y no polares, favorables y desfavorables. Los enfoques teóricos que utilizan la ecuación $overlap_{ij} = rVDW_i + rVDW_j - d_{ij} - allowance_{ij}$ para analizar las interacciones entre estas macromoléculas altamente cargadas para formar estructuras conocidas. Para confirmar los análisis realizados, ejecutamos pruebas in vivo para confirmar la interacción de MAP3773c con las siguientes secuencias. Figura 26 es un gel SDS 12% con la extracción de proteínas, podemos confirmar una banda con un peso molecular de 20 kDa. Figura 27 demuestra EMSA con donde se puede ver retención en carriles 3-8 lo cual nos indica que en efectivo MAP3773c tienen interacción con las cajas de hierro de Fpn 1 en ratón.

CAPITULO VI. CONCLUSIÓN

MAP3773c de MAP es una proteína hipotética, con las aplicaciones disponibles es posibles construir un modelo a base de homología y analizar a más detalle las posibles interacciones que podría tener con el DNA, así como predecir si tendrá una interacción satisfactoria y estable. La paratuberculosis es una enfermedad crónica que contagia a los rumiantes y se asocia con la enfermedad de Crohn en humanos. Sin embargo, la importancia de desarrollar nuevas tecnologías para el diagnóstico adecuado y determinado de MAP es importante para *M. paratuberculosis*. Los resultados mostraron que *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* su extracto de proteína cruda tiene interacción con ferroportina 1 (FPN1). Estos resultados revelan el efecto que los mecanismos bacterianos de MAP pueden alterar las condiciones reguladoras del hierro del huésped para protegerlo contra lo que se conoce como inmunidad nutricional de los macrófagos. Los ensayos de *in silico* para corroborar esta interacción fueron exitosos lo cual un método eficaz para analizar las interacciones proteína-ADN. Por lo tanto, MAP3773c exhibe interacción con cajas de hierro tanto en bacterias como en micobacterias. Esto con una objetivo utilizar estos datos para futuros ensayos importantes en el sector público granero como de salud.

Abreviaturas

Aa: aminoácido

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNr: ADN ribosómico

ARNm: ácido ribonucleico mensajero

ARNr: ácido ribonucleico ribosómico

ATPasa: adenosina trifosfato

Da: Dalton

DCYTB: citocromo b duodenal

DMT1: transportar el metal divalente 1

DtxR: toxina diftérica

Fpn: ferroportina

Fur: regulador de absorción férrica

IdeR: regulador dependiente de hierro

IFN γ : Interferón gamma

IL: interleucina

JD: Enfermedad de Jonhe's

kD: kilo Dalton

MAC: complejo *Mycobacterium avium*

MAP: *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*

PTB: Paratuberculosis

SLC11A2, NRAMP2 y DCT1

SLC40A1:

TfR1: transferrina

Th1: linfocitos T helper 1

Uv: Ultravioleta

sideróforos sintetizados (esx-3

APÉNDICE

Anexo 1

tampón de equilibrio

KCl 0,4 M en tampón A

Anexo 2

tampón A

Cloruro de guanidinio 191,06 g/ L

NaH ₂ PO ₄ 13,8 g/L

Tris-HCl, 2,42 g/ L ajuste el tampón a pH 8,0).

Anexo 3 Buffer TAE 50X

Tris base, 242 g

ácido acético glacial, 57.1 ml

0.5 M EDTA pH 8, 100 ml.

Ajustar hasta 1 litro con agua destilada o desionizada.

Anexo 4 TBE 0.5X

Tris base, 54 g

ácido bórico, 27.5 g

0.5 M EDTA pH 8, 20 ml

Ajustar hasta 1 litro con agua destilada o desionizada.

Anexo 5

binding buffer 40x	1 μ
ficoll 40x	2.5 μ
KCl 2M	1 μ
ZnZl ₂	1 μ
Sonda	1 μ
DNA	1 μ
agua	Agujatr a 20 μ

Anexo 6 caja de Fpn 1

Bacterias	GATAATGAGTGTTATCCTTAT
micobacteria	CACCTTACAGGCAGAAAAG

REFERENCIAS

- Álvarez Sánchez, J. (2008). Complejo mycobacterium avium: diagnóstico, caracterización molecular e interferencia con el diagnóstico de la tuberculosis.
- Billesbølle, C. B., Azumaya, C. M., Kretsch, R. C., Powers, A. S., Gonen, S., Schneider, S., Arvedson, T., Dror, R. O., Cheng, Y., & Manglik, A. (2020). Structure of hepcidin-bound ferroportin reveals iron homeostatic mechanisms. *Nature*, 586(7831), 807–811. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2668-z>
- Camaschella, C., Nai, A., & Silvestri, L. (2020). Iron metabolism and iron disorders revisited in the hepcidin era. In *Haematologica* (Vol. 105, Issue 2, pp. 260–272). Ferrata Storti Foundation. <https://doi.org/10.3324/haematol.2019.232124>
- DeKuiper, J. L., Cooperider, H. E., Lubben, N., Ancel, C. M., & Coussens, P. M. (2020). Mycobacterium avium Subspecies paratuberculosis Drives an Innate Th17-Like T Cell Response Regardless of the Presence of Antigen-Presenting Cells. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 108. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00108>
- Deng, Z., Wang, Q., Liu, Z., Zhang, M., Machado, A. C. D., Chiu, T. P., Feng, C., Zhang, Q., Yu, L., Qi, L., Zheng, J., Wang, X., Huo, X. M., Qi, X., Li, X., Wu, W., Rohs, R., Li, Y., & Chen, Z. (2015). Mechanistic insights into metal ion activation and operator recognition by the ferric uptake regulator. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms8642>
- Díaz-Mireles, E., Wexler, M., Sawers, G., Bellini, D., Todd, J. D., & Johnston, A. W. B. (2004). The Fur-like protein Mur of Rhizobium leguminosarum is a Mn²⁺ - responsive transcriptional regulator. *Microbiology*, 150(5), 1447–1456.

<https://doi.org/10.1099/mic.0.26961-0>

- Drozdetskiy, A., Cole, C., Procter, J., & Barton, G. J. (2015). JPred4: A protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Research*, *43*(W1), W389–W394. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv332>
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., Qureshi, M., Richardson, L. J., Salazar, G. A., Smart, A., Sonnhammer, E. L. L., Hirsh, L., Paladin, L., Piovesan, D., Tosatto, S. C. E., & Finn, R. D. (2019). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D427–D432. <https://doi.org/10.1093/nar/gky995>
- Elmagzoub, W. A., Adam, N. M., Idris, S. M., Mukhtar, M. E., Abdelaziz, S. A., Okuni, J. B., Ojok, L., Wahed, A. A. El, Eltayeb, E., Gameel, A. A., & Eltom, K. H. (2020). Seroprevalence of mycobacterium avium subsp. Paratuberculosis in dairy cattle in Khartoum state, Sudan. *Veterinary Sciences*, *7*(4), 1–8. <https://doi.org/10.3390/vetsci7040209>
- Erva, R. R., Rajulapati, S. B., Potla Durthi, C., Bhatia, M., & Pola, M. (2016). Molecular dynamic simulations of Escherichia coli l-asparaginase to illuminate its role in deamination of asparagine and glutamine residues. *3 Biotech*, *6*(1), 1–7. <https://doi.org/10.1007/s13205-015-0339-9>
- Ganusov, V. V., Klinkenberg, D., Bakker, D., & Koets, A. P. (2015). Evaluating contribution of the cellular and humoral immune responses to the control of shedding of Mycobacterium avium spp. paratuberculosis in cattle Modeling Johne's disease: From the inside out Dr Ad Koets and Prof Yrjo Grohn. *Veterinary Research*, *46*(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0204-1>

- Harris, N. B., & Barletta, R. G. (2001). Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis in Veterinary Medicine. In *Clinical Microbiology Reviews* (Vol. 14, Issue 3, pp. 489–512). <https://doi.org/10.1128/CMR.14.3.489-512.2001>
- Hernández, J. A., López-Gomollón, S., Muro-Pastor, A., Valladares, A., Bes, M. T., Peleato, M. L., & Fillat, M. F. (2006). Interaction of FurA from Anabaena sp. PCC 7120 with DNA: A reducing environment and the presence of Mn²⁺ are positive effectors in the binding to isiB and furA promoters. *BioMetals*, *19*(3), 259–268. <https://doi.org/10.1007/s10534-005-7750-3>
- Janagama, H. K., Senthilkumar, Bannantine, J. P., Kugadas, A., Jagtap, P., Higgins, L., Witthuhn, B. A., & Sreevatsan, S. (2010). Iron-sparing Response of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis is strain dependent. *BMC Microbiology*, *10*(1), 268. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-10-268>
- Katsarou, A., & Pantopoulos, K. (2020). Basics and principles of cellular and systemic iron homeostasis. In *Molecular Aspects of Medicine* (Vol. 75). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2020.100866>
- Kaushik, M. S., Singh, P., Tiwari, B., & Mishra, A. K. (2016). Ferric Uptake Regulator (FUR) protein: properties and implications in cyanobacteria. *Annals of Microbiology*, *66*(1), 61–75. <https://doi.org/10.1007/s13213-015-1134-x>
- Lagares, L. M., Minovski, N., Alfonso, A. Y. C., Benfenati, E., Wellens, S., Culot, M., Gosselet, F., & Novič, M. (2020). Homology modeling of the human p-glycoprotein (Abcb1) and insights into ligand binding through molecular docking studies. *International Journal of Molecular Sciences*, *21*(11), 1–37. <https://doi.org/10.3390/ijms21114058>
- Landeros-Sánchez, B., Gutierrez-Pabello, J. A., Medina-Basulto, G. E., Renteria-Evangelista, T.

- B., Díaz-Aparicio, E., & Oshima, S. (2016). Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis down-regulates mRNA expression of iron-induced macrophage Ferroportin 1. *Veterinaria México OA*, 3(1 SE-Original Research Articles). <https://doi.org/10.21753/vmoa.3.1.361>
- Lee, J. W., & Helmann, J. D. (2007). Functional specialization within the fur family of metalloregulators. *BioMetals*, 20(3–4), 485–499. <https://doi.org/10.1007/s10534-006-9070-7>
- Lilenbaum, W., Marassi, C. D., & Oelemann, W. M. R. (2007). Paratuberculosis: an update. *Brazilian Journal of Microbiology*, 38(4), 580–590. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822007000400001>
- Manning, E., & Collins, M. T. (2001). Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis: Pathogen, pathogenesis and diagnosis. *Revue Scientifique et Technique (International Office of Epizootics)*, 20, 133–150. <https://doi.org/10.20506/rst.20.1.1275>
- Marchetti, M., De Bei, O., Bettati, S., Campanini, B., Kovachka, S., Gianquinto, E., Spyarakis, F., & Ronda, L. (2020). Iron metabolism at the interface between host and pathogen: From nutritional immunity to antibacterial development. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Issue 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21062145>
- Morales-Pablos, M. I., Mejía-Sánchez, P., Díaz-Aparicio, E., Palomares-Resendiz, E. G., Gutiérrez-Hernández, J. L., Reyna-Granados, J. R., Luna-Nevárez, P., Munguía-Xóchihua, J. A., Segura-Correa, J. C., & Leyva-Corona, J. C. (2020). Risk factors associated with the seroprevalence of paratuberculosis in sheep flocks in the hot-arid region of Sonora, México. *Tropical Animal Health and Production*, 52(3), 1357–1363. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-02139-y>

- Nemeth, E., & Ganz, T. (2021). Hcpidin-ferroportin interaction controls systemic iron homeostasis. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Issue 12). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22126493>
- Pallás-Guzmán, Gabriel, Quezada-Tristán, Teódulo, Chávez-Gris, Gilberto, Maldonado-Castro, Edith, Chávez-González, Leticia, & García-Munguía, C. (2021). Mycobacterium avium ssp. paratuberculosis identification and seroprevalence in sheep flocks in Aguascalientes. *Abanico Veterinario*, 11(e105), 1–13. <https://doi.org/10.21929/abavet2021.5>
- Plonski, A. P., & Reed, S. M. (2022). Assessing Protein Homology Models with Docking Reproducibility. *BioRxiv*, 2022.02.17.480964. <https://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.02.17.480964v1%0Ahttps://www.biorxiv.org/content/10.1101/2022.02.17.480964v1.abstract>
- Raje, C. I., Kumar, S., Harle, A., Nanda, J. S., & Raje, M. (2007). The macrophage cell surface glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is a novel transferrin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 282(5), 3252–3261. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608328200>
- Rathnaiah, G., Zinniel, D. K., Bannantine, J. P., Stabel, J. R., Gröhn, Y. T., Collins, M. T., & Barletta, R. G. (2017). Pathogenesis, Molecular Genetics, and Genomics of Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis, the Etiologic Agent of Johne's Disease. *Frontiers in Veterinary Science*, 4(NOV). <https://doi.org/10.3389/fvets.2017.00187>
- Shoyama, F. M., Janetanakit, T., Bannantine, J. P., Barletta, R. G., & Sreevatsan, S. (2020). Elucidating the Regulon of a Fur-like Protein in Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP). *Frontiers in Microbiology*, 11(April), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00598>

- Si, J., Zhao, R., & Wu, R. (2015). An overview of the prediction of protein DNA-binding sites. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 16, Issue 3, pp. 5194–5215). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms16035194>
- Ssekitoleko, J., Ojok, L., Abd El Wahed, A., Erume, J., Amanzada, A., Eltayeb, E., Eltom, K. H., & Okuni, J. B. (2021). Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis Virulence: A Review. *Microorganisms*, 9(12), 2623. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9122623>
- Van Zandt, K. E., Sow, F. B., Florence, W. C., Zwilling, B. S., Satoskar, A. R., Schlesinger, L. S., & Lafuse, W. P. (2008). The iron export protein ferroportin 1 is differentially expressed in mouse macrophage populations and is present in the mycobacterial-containing phagosome. *Journal of Leukocyte Biology*, 84(3), 689–700. <https://doi.org/10.1189/jlb.1107781>
- Verma, S., Prescott, R., & Cherayil, B. J. (2019). The commensal bacterium Bacteroides fragilis down-regulates ferroportin expression and alters iron homeostasis in macrophages. *Journal of Leukocyte Biology*, 106(5), 1079–1088. <https://doi.org/10.1002/JLB.2A1018-408RR>
- Whittington, R., Donat, K., Weber, M. F., Kelton, D., Nielsen, S. S., Eisenberg, S., Arrigoni, N., Juste, R., Sáez, J. L., Dhand, N., Santi, A., Michel, A., Barkema, H., Kralik, P., Kostoulas, P., Citer, L., Griffin, F., Barwell, R., Moreira, M. A. S., ... De Waard, J. H. (2019). Control of paratuberculosis: Who, why and how. A review of 48 countries. In *BMC Veterinary Research* (Vol. 15, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12917-019-1943-4>
- Willemetz, A., Beatty, S., Richer, E., Rubio, A., Auriac, A., Milkereit, R. J., Thibaudeau, O., Vulont, S., Malo, D., & Canonne-Hergaux, F. (2017). Iron- and hepcidin-independent

downregulation of the iron exporter ferroportin in macrophages during Salmonella infection. *Frontiers in Immunology*, 8(MAY). <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00498>

UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. Pettersen EF, Goddard TD, Huang CC, Couch GS, Greenblatt DM, Meng EC, Ferrin TE. *J Comput Chem*. 2004 Oct;25(13):1605-12.

Schrödinger, L., & DeLano, W. (2020). PyMOL. Retrieved from <http://www.pymol.org/pymol>

Hex 8.0 is available at <http://www.biochem.abdn.ac.uk/hex/>.