

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

Maestría y Doctorado en Ciencias de la Salud



**Optimización de la purificación de la proteína MAP3773c
de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis***

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS DE LA SALUD
P R E S E N T A**

Biol. Jorge Luis Arámburo Guerrero

Director de Tesis: Dra. Bertha Landeros Sánchez

Tijuana, B. C.

Febrero de 2016.

Universidad Autónoma de Baja California
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA
COORDINACIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

FOLIO No. 169
Tijuana, B. C., a 22 de enero de 2016

C. Jorge Luis Aramburo Guerrero
Pasante de: Maestro en Ciencias de la Salud
Presente

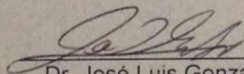
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

Es propuesto, por la C. Dra. Bertha Landeros Sánchez

Quien será el responsable de la calidad de trabajo que usted presente, referido al
tema "Optimización de la purificación de la proteína MAP3773c de
Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis".

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

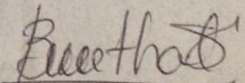
- I.- INTRODUCCIÓN
- II.- JUSTIFICACIÓN
- III.- HIPOTESIS
- IV.- OBJETIVOS
- V.- MATERIALES Y MÉTODOS
- VI.- RESULTADOS
- VII.- DISCUSIONES
- VIII.- CONCLUSIONES
- IX.- BIBLIOGRAFÍA

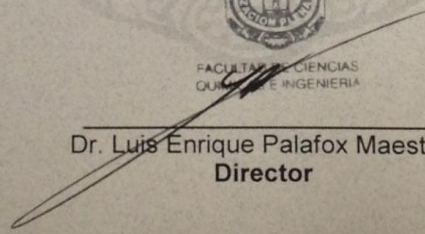

Dr. José Luis González Vázquez
Sub-Director Secretario

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERÍA


Dra. Bertha Landeros Sánchez
Directora de Tesis


Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director

Resumen

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP), el agente causal de la paratuberculosis, representa un microorganismo patógeno de impacto a nivel mundial, que afecta a una gran variedad de especies animales, incluyendo a aquellas de importancia comercial, como lo es el ganado vacuno. Dada la necesidad de encontrar medidas para el tratamiento, control y entendimiento de la paratuberculosis, el presente estudio se centra en la purificación y secuenciación de la proteína MAP3773c de MAP, cuya secuencia representa posiblemente a una proteína reguladora de hierro, de tipo Fur. El hierro es un elemento clave de las infecciones bacterianas en animales y por tal motivo, constituye un blanco para la búsqueda de nuevos enfoques terapéuticos de la paratuberculosis. El contar con metodologías, para la obtención de la proteína MAP3773c recombinante en cantidades suficientes para su estudio, permitirá esclarecer su posible función como regulador del metabolismo del hierro y su papel en la patogenicidad de esta bacteria. Mediante el empleo de la cromatografía de afinidad por inmovilización de metales, fue posible la purificación de la proteína MAP3773c en cantidades adecuadas para su caracterización mediante las técnicas de SDS-PAGE y Westernblot, demostrando así la factibilidad de esta técnica para la purificación de proteínas recombinantes, cuyo estado de conformación y/o solubilidad dificultan su purificación por técnicas cromatográficas convencionales.

Abstract

Mycobacterium avium subsp. *paratuberculosis* (MAP), the causal agent of paratuberculosis, represents a pathogenic microorganism which has an impact worldwide, affecting numerous animal species, including those of economic importance such as cattle. Due to the need to find measures for the treatment, control and understanding of paratuberculosis, the present study aimed to the purification and sequencing of the protein MAP3773c, of MAP, which possibly represents a protein regulator of iron, a type of Fur. Iron is a key element of bacterial infections in animals and for this reason constitutes a target for new therapeutic strategies of paratuberculosis. Having methodologies available for obtaining recombinant MAP3773c protein in quantities sufficient for its study, will enable to clarify its function as regulator of the iron metabolism and its role in pathogenicity in this bacteria. By using the immobilized metal affinity chromatography, it was possible to purify the protein MAP3773c in sufficient quantities for its characterization by the techniques of SDS-PAGE and Westernblot, demonstrating the feasibility of this technique for the purification of recombinant proteins of which its conformation and/or solubility impairs its purification by conventional chromatographic techniques.

TABLA DE CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	4
ÍNDICE DE TABLAS	5
1. INTRODUCCIÓN.....	6
1.1. Paratuberculosis	6
1.1.2. MAP y su implicación en la enfermedad de Crohn.	10
1.1.3. Estadios de la infección por MAP	13
1.2. Mycobacterium avium subsp. paratuberculosis (MAP)	16
1.3. Metabolismo del hierro	22
1.4. Purificación de proteínas	33
1.4.1. Purificación por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (Ni-NTA).....	33
1.5. Cuerpos de inclusión.	38
1.6. Fur 40	40
2. JUSTIFICACION	53
3. HIPÓTESIS	53
4. OBJETIVOS	53
4.1. Objetivo general	53
4.2. Objetivos específicos	53
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
5.1. Oligonucleótidos iniciadores empleados en la secuenciación de MAP3773c.	54
5.2. Amplificación por PCR del Inserto del gen MAP3773c clonado en pRSETA para la confirmación del inserto.	54
5.3. Purificación del plásmido pRSET con el inserto de MAP3773c para su secuenciación.	55
5.4. Secuenciación del inserto de MAP3773c en el plásmido pRSET.	57
5.5. Alineamiento y análisis de la secuencia del inserto de MAP3773c en el plásmido pRSET de E. coli BL21(DE3).....	57
5.6. Expresión de la proteína producto del gen MAP3773c.	57
5.7. Purificación de la proteína producto del gen MAP3773c.	59
5.7.1. Lisis celular de la clona 3 de E. coli BL21(DE3) con el plásmido pRSET-MAP3773c.	59
5.7.2. Procedimiento de purificación del producto de expresión de la clona 3 de E. coli BL21(DE3) con el plásmido pRSET-MAP3773c.	59
5.8. Inmunización de conejos con el producto de expresión de la clona 3 de E. coli BL21(DE3) con el plásmido pRSET-MAP3773c.	60
5.9. Western blott del producto de expresión de la clona 3 de E. coli BL21(DE3) con el plásmido pRSET-MAP3773c.....	60

6. RESULTADOS.....	62
6.1. Confirmación del inserto del gen MAP3773c clonado en pRSETA a partir de la Clona 3 de E. coli BL21(DE3).....	62
6.2. Secuenciación del inserto del gen MAP3773c clonado en pRSETA de la cepa BL21(DE3) de E. coli obtenido de la clona 3.	63
6.3. Análisis de la secuencia del inserto de MAP3773c de la clona 3 de E. coli BL21(DE3).....	63
6.4. Purificación del producto de expresión del Inserto del gen MAP3773c expresado en la clona 3 de E. coli BL21(DE3).	64
7. DISCUSIONES.....	67
8. CONCLUSIONES.....	69
9. BIBLIOGRAFÍA.....	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo inmunopatológico de la paratuberculosis.....	10
Figura 2. Representación esquemática del fenómeno Iceberg de la JD.....	16
Figura 3. La reacción Fenton.....	28
Figura 4. Programación del metabolismo dependiente de MAP de Ganado (MAP C) y de borregos (MAP S).....	29
Figura 5. Modelo de interacción entre residuos de la etiqueta His y el ion metálico en los ligandos de IMAC tri- (IDA), tetra- (NTA) y pentadentado (TED).	35
Figura 6. Secuencia del fragmento de ADN de <i>M. tuberculosis</i> conteniendo el promotor inducible por estrés oxidativo. A) Secuencia de la región -50/+10 de <i>M. tuberculosis</i>	46
Figura 7. Modelos para las interacciones de Fur-ADN.....	48
Figura 8. Modelo del complejo formado entre DtxR y el operador de ADN, ilustrando el papel de dos dímeros de DtxR en el reconocimiento.....	52
Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa para la verificación del inserto del gen MAP3773c.....	61
Figura 10. Resultado del alineamiento del inserto secuenciado con el gen MAP3773c de MAP (GenBank: AE016958.1), utilizando el program BioEdit.....	62
Figura 11. Purificación del producto de expresión del inserto del gen MAP3773c expresado en la clona 3 de <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	64
Figura 12. Purificación del producto de expresión del inserto del gen MAP3773c expresado en la clona 3 de <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	65
Figura 13. Western blot del producto de expresión del inserto del gen MAP3773c expresado en la clona 3 de <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	65

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Resumen del genoma completo de <i>M. paratuberculosis</i> K-10 y comparación con otras especies de micobacterias.....	21
Tabla 2. Proteínas del Hierro Clave Involucradas en la respuesta inmune.....	33
Tabla 3. Condiciones de PCR para MAP3773c.....	54
Tabla 4. Condiciones de temperatura de PCR para MAP3773c.....	55
Tabla 5. Método para el gel separador.....	58
Tabla 6. Método para el gel concentrador.....	58
Tabla 7. Resultados del análisis de la secuencia del inserto de la clona 3 de <i>E. coli</i> BL21(DE3).....	63

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Paratuberculosis

Hace alrededor de 100 años, los científicos alemanes, H. A. Johne y L. Frothingham, aislaron una bacteria ácido-alcohol resistente de animales con una enfermedad caracterizada por una inflamación crónica granulomatosa que afecta principalmente el íleon. El aislamiento de esta bacteria lo hicieron a partir de una vaca que no podía producir leche ni aumentar de peso satisfactoriamente, al examinar los intestinos y omento, estos científicos encontraron engrosamiento tanto en la mucosa intestinal como en nódulos mesentéricos. En la examinación histológica, encontraron que la pared intestinal se encontraba fuertemente infiltrada por leucocitos y células epitelioides y ocasionalmente por células gigantes. Usando la tinción de Ziehl-Neelsen, observaron bacterias ácido-alcohol resistentes abundantes (teñidas de rojo) en todos los tejidos inflamados, similares a la bacteria causante de la TB (tuberculosis). Los Doctores Johne y Frothingham concluyeron que la enfermedad observada en esta vaca fue causada por la bacteria que causa la tuberculosis en aves (después llamada *Mycobacterium avium*) y propusieron llamarla “enteritis pseudotuberculosa” (Berh y Collins, 2010). Para principios de los 1900, la pseudoparatuberculosis entérica era reconocida como una enfermedad nueva con una morfología bien descrita. Fue hasta 1906 cuando el reconocido veterinario británico inglés, John McFadyean, quien trabajaba de manera activa con la TB, acuñó el término enfermedad de Johne en el reporte anual del principal Colegio Real de Veterinaria (Dunlop y Williams, 1996; en Berh y Collins, 2010). El aislamiento, del agente etiológico de la enfermedad de Johne fue llevado a cabo de manera accidental, por el científico británico Frederick William Tworth, al notar unas colonias bacterianas periféricas alrededor de colonias más grandes del bacilo común del heno, *Mycobacterium phlei*. Tworth incorporó una preparación del *M. Phlei* inactiva en su medio de cultivo, proporcionó de esta manera un medio que soportaba el crecimiento de esta nueva bacteria a quien llamó *Mycobacterium enteriditis chronicae pseudoparatuberculosis bovis*, Johne (Tworth e Ingram, 1912; en Berh y Collins, 2010).

La paratuberculosis fue descrita en animales en los continentes Africano y Asiático en los 1920's y fue encontrada en Sudamérica y en la India durante los 1930's. Para los años setentas estaba claro que esta enfermedad tenía una distribución mundial, a tal grado que la USDA (departamento de agricultura de los Estados Unidos) declaró lo siguiente: La enfermedad de Jonhe puede tornarse muy predominante y problemática en los Estados Unidos a menos que se ponga más atención en su diagnóstico y control. Sin embargo esta declaración es pertinente no solo para EEUU sino para todos los países con industria ganadera (Berh y Collins, 2010). El organismo fue re-clasificado de especie (*M. paratuberculosis*) a subespecie (*M. avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)), basándose en estudios de análisis de hibridización de ADN-ADN (Thorel *et al.*, 1990; en Berh y Collins, 2010).

La enfermedad de Jonhes (JD) es una enfermedad común en todos los países con una industria lechera significativa, especialmente en áreas de clima moderado y húmedo (Nielsen y Toft, 2009, en Berh y Collins, 2010). Típicamente, se ha reportado que la incidencia es menor en ganado para carne que en ganado lechero (Merkal *et al.*, 1987; en Berh y Collins, 2010).

Esta enfermedad animal se conoce como enfermedad de Johne o paratuberculosis. *Mycobacterium avium* subsp *paratuberculosis* (MAP) es un patógeno veterinario agudo (Dama *et al.* 2011; en Singh *et al.* 2013 y es el causante inequívocamente de la paratuberculosis o enfermedad de Johne (JD, por sus siglas en inglés), una gastroenteritis granulomatosa crónica en rumiantes domésticos y salvajes, con una distribución mundial (Clarke, C.J., 1997, Olsen *et al.*, 2002, Arsenault *et al.*, 2012, Dobson *et al.*, 2013, Singh *et al.*, 2013). Esta enfermedad ha sido reportada en todos los continentes. (Greig *et al.*, 1999, Singh *et al.*, 2013) y causa serias pérdidas económicas a la industria de lácteos debido a que hay disminución de la producción de leche y a que se sacrifican animales de manera prematura (Harris y Barletta, 2001, Singh *et al.*, 2013). La mayoría de estudios de la enfermedad, epidemiología, incidencia, distribución, pérdidas económicas, diagnóstico, patología, control y manejo se han realizado en países desarrollados, mientras que la información sobre la infección y enfermedad por MAP en los países pobres y en desarrollo

está limitada (Singh *et al.*, 2013). Esto se debe principalmente a la complejidad de la infección por MAP y a problemas en el diagnóstico de la enfermedad. No obstante, estudios en la India han mostrado una alta incidencia en animales domésticos (cabras, borregos, bovinos y búfalos) y en animales salvajes (camello, conejo, etc.) y primates (Singh *et al.*, 2011). MAP también se ha reportado en fuentes medioambientales (leche pasteurizada, suelo, ríos, aguas, etc.) (Shankar *et al.*, 2010, Whan *et al.*, 2001, Singh *et al.*, 2013).

La JD causa pérdidas económicas debido a que causa una baja producción de leche (Lombard *et al.*, 2005), menor valor de venta en rastros, aumento en el sacrificio involuntario de animales, incremento en los intervalos de parto e infertilidad, por diagnóstico y el posible tratamiento. Las pérdidas económicas debidas a la JD en ganado lecheros en EEUU se han estimado entre 200-250 millones de dólares anualmente (Ott *et al.*, 1999; Berh y Collins, 2010). A la fecha solo un estudio ha estimado los beneficios económicos del control de la JD a nivel nacional en EEUU, tomando en cuenta la fuente potencial y los efectos en precio. Sin considerar los costos de la prevención y control y asumiendo una erradicación inmediata, se estimó que la JD resulta en una pérdida total en la economía de EEUU de \$200 millones $\pm$ \$160 millones (Berh y Collins, 2010).

MAP tiene un amplio espectro de huéspedes, es comúnmente encontrado en rumiantes, en particular en el ganado lechero, pero hay un número limitado de estudios en especies no bovinas. Las infecciones en especies no rumiantes incluyen caballos, cerdos, camélidos, perros, primates no humanos y humanos. MAP ha sido aislado de numerosas especies salvajes (Berh y Collins, 2010), por ejemplo de zorros (*Vulpes vulpes*), armiños (*Mustela erminia*), comadrejas (*Mustela nivalis*), tejón (*Meles meles*), ratón de madera (*Apodemus silvaticus*), ratas (*Ratus norvegicus*), liebre marrón (*Lepus europaeus*), grajilla (*Corvus monedula*), grajo (*Corvus frugilegus*), y cuervos (*Corvus corone*) (Berh y Collins, 2010).

Un aspecto importante a destacar de la paratuberculosis, es que no es un agente infeccioso clásico, en el sentido de que no cumple completamente con los postulados de Koch, ya que muchas infecciones experimentales fallan en establecer al agente infeccioso

en el tejido intestinal y por lo tanto no logran establecer la enfermedad (Harris y Barletta, 2001; Bastida y Juste, 2011). También es sabido que las infecciones focales frecuentemente no progresan a los estadios clínicos. De esta manera se pueden observar múltiples formas de infección en los animales infectados por MAP y esto depende no solo de la progresión de la infección o del estadio de la enfermedad, sino también de muchos otros factores, incluyendo la resistencia genética por individuo o la susceptibilidad al patógeno, la edad al tiempo de la infección y la exposición previas a otras micobacterias del medioambiente. Esto se muestra en la Figura 1, en donde se ilustra el balance entre la infección y el sistema inmune del animal, además de sus formas correspondientes de infección. De acuerdo con diferentes estudios, aproximadamente el 46% del Ganado vacuno, el 51% del Ganado ovino y el 50% del Ganado caprino en un ambiente contaminado con MAP, no muestra ningún signo de infección. Ya que estos animales viven en ambientes muy contaminados, deben estar continuamente expuestos a MAP, y por lo tanto previenen la infección o la eliminan muy rápidamente. Debido a que no es raro para tales animales portar MAP y debido a que existe evidencia experimental de que la administración de grandes cantidades de MAP no siempre resultan en el desarrollo de una infección en su totalidad, sino por el contrario frecuentemente producen lesiones muy regresivas, la explicación más probable es que hay un balance entre MAP y el huésped de manera que en aproximadamente la mitad de individuos expuestos son capaces de contener la infección (Figura 1). Más allá de este balance hay diferentes estadios de infección. Aproximadamente el 19% del ganado vacuno, 24% del ganado ovino y 12% del ganado caprino desarrollan una infección que es muy focal y delimitada. Alrededor del 17% y 9% de vacas y borregos respectivamente, tienen infecciones multifocales. De los animales que presentan formas difusas, aproximadamente 19% del ganado bovino, 16% del ganado ovino y 38% del ganado caprino se presenta en formas difusas que conducen a que los animales muestren signos clínicos y a la muerte (Bastida y Juste, 2011).

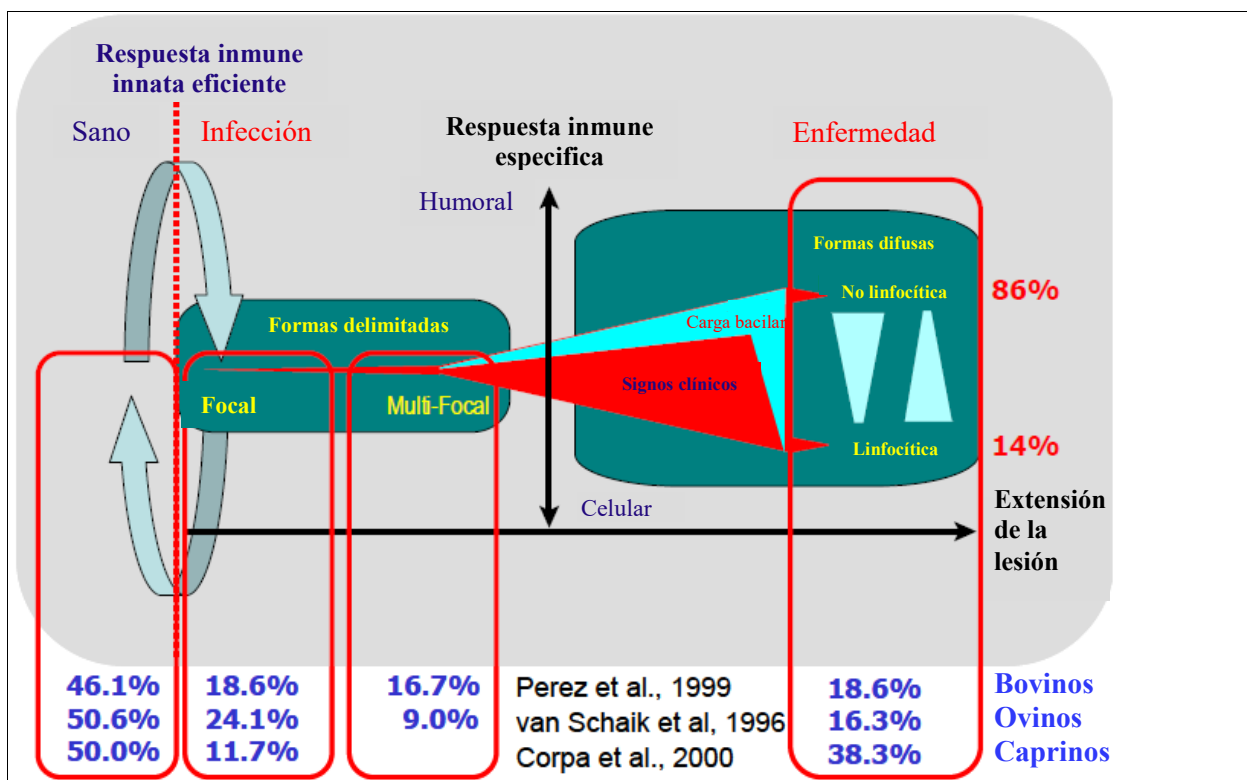


Figura 1. Modelo inmunopatológico de la paratuberculosis. La exposición continua a MAP genera un balance dinámico donde la infección nunca se establece o es controlada por una respuesta del sistema inmune innata eficiente en cerca de la mitad de la población de ganado, mientras que en la otra mitad progresa a formas subclínicas delimitadas focales o a formas multifocales, y en una fracción más pequeña, se difunde a linfocítica (celular o de tipo Th1) o no-linfocítica (humoral o de tipo Th2, estas formas resultaran en una enfermedad clínica manifiesta. Adaptado a partir del artículo Paratuberculosis control: a review with a focus on Vaccination. Felix Bastida y Ramon A. Juste. Journal of Immune Based Therapies and Vaccines 2011 | Volume 9 | Edición 8

1.1.2. MAP y su implicación en la enfermedad de Crohn.

Algunos estudios han demostrado la implicación de MAP como el agente causal de algunos casos de la enfermedad de Crohn (CD, por sus siglas en inglés), una enfermedad gastrointestinal en humanos que presenta características histopatológicas similares a aquellas encontradas en la enfermedad de JD (Hermon-Taylor, J. 2009, Singh *et al.*, 2013). Las similitudes de los síntomas clínicos y patología macroscópica entre la enfermedad de Crohn y la de Jonhe fueron notadas por primera vez hace 80 años. Recientemente, la cuestión del papel de MAP en la enfermedad de Crohn ha generado considerable

controversia dentro de las comunidades científica y médica y aun no se ha establecido de manera unánime a MAP como la causa de esta enfermedad humana, sin embargo, las evidencias muestran algún tipo de asociación aunque no necesariamente causal, entre MAP y algunos casos de la enfermedad de Crohn (CD, por sus siglas en inglés) (Grant, I.R, 2005, Singh *et al.*, 2013).

Estudios recientes en la India reportan una alta presencia de MAP en pacientes con CD, en personas que sufren de la Enfermedad del Intestino Irritable (IBD, por sus siglas en inglés), colitis y en personas aparentemente en buen estado de salud, en cuidadores de animales, en personas sin relación alguna con animales, etc. Tanto las pruebas directas como indirectas (PCR en sangre, ELISA y cultivo de sangre) registraron una alta presencia de MAP en sus muestras de heces (cultivo, examen microscópico y cultivo sanguíneo) (Singh *et al.*, 2011; Singh *et al.*, 2013). Durante muchos años se pensó que el elemento de inserción IS900 era específico para MAP. Por lo tanto esta secuencia fue empleado en el diseño de iniciadores para las pruebas de PCR (reacción en cadena de la polimerasa o PCR, según las siglas en inglés) para la detección de MAP en muestras veterinarias, clínicas y de alimentos o para confirmar los aislados ácido-alcohol resistentes como MAP era la base para los métodos de tipificación molecular, tales como el análisis de fragmentos de restricción polimórficos (RFPL, por sus siglas en inglés) (Singh *et al.*, 2013). No obstante, algunos reportes de secuencias similares a la IS900 presentes en otras micobacterias generan dudas respecto a la especificidad de esta secuencia para el PCR de MAP (Englund, *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2013). Esto ha generado que algunos investigadores busquen algunas otras secuencias específicas para MAP y se han reportado varias alternativas de blancos específicos para MAP. Por ejemplo, se han reportado, la IS-Mav2, proteína HspX y la F57 (Poupart *et al.*, 1993). Un análisis reciente de la secuencia genómica de MAP ha puesto al descubierto dos secuencias nuevas sin homólogos en otras micobacterias; IS_MAP02 (con seis copias) y IS_MAP04 (con cuatro copias) (Li, *et al.*, 2005, Singh *et al.*, 2013).

La JD es una enfermedad animal única ya que se distingue por que ha sido reportada en todos los países en que se ha investigado dicha enfermedad. Tiene un efecto

devastador en la productividad del ganado (sacrificios tempranos y baja productividad de leche) y la industria ganadera genera grandes pérdidas económicas (Harris y Bartletta, 2001, Rowe y Grant, 2006). MAP es transmitido en los rebaños tanto directamente a través del semen, leche, calostro e *in-utero* e indirectamente por vía oral a través del alimento, pastura, agua, forraje, etc. (vía fecal oral) (Lombard *et al.*, 2006, Singh *et al.*, 2013). Los programas para el control de la infección por MAP en ganado doméstico a nivel nacional están en progreso en muchos países desarrollados. Para reducir la incidencia o para eliminar la infección de MAP, las medidas usadas son la prueba y el sacrificio de los animales infectados o la despoblación de hatos de animales infectados. No obstante MAP puede sobrevivir por periodos prolongados en el medio ambiente, particularmente en las áreas de pastado, en cuerpos de agua, lo que le permite soportar la ausencia periódica de un huésped adecuado (Singh *et al.*, 2013).

MAP es descrito taxonómicamente como un patógeno y un parasito obligado de animales y teóricamente puede ser erradicado por remoción de todos los animales infectados en el rebaño (Singh *et al.*, 2013).

MAP, el agente causal de la enfermedad de Johne (JD) en rumiantes, es una de las infecciones con mayor prevalencia y de las mejores documentadas en el mundo. A la fecha la erradicación de la JD es imposible y los esfuerzos de control son impedidos debido a la persistencia de MAP dentro del suelo y el agua, así como también la diseminación fecal por el ganado con sintomatología clínica y subclínica (Whittington *et al.*, 2004, Dhand *et al.*, 2009, Lamont *et al.* 2012).

La paratuberculosis es una enfermedad infecciosa de lento desarrollo, caracterizada por una enterocolitis granulomatosa crónica y por una linfangitis y linfadenitis regional, conducente a los signos típicos de una pérdida de peso progresiva. El organismo infeccioso, *Mycobacterium avium* subespecie *paratuberculosis*, puede causar una infección intracelular persistente en los macrófagos intestinales y provocar reacciones inmune e inflamatoria en los tejidos del huésped (Clarke, 1997). La principal fuente de infección son las heces donde los animales que desarrollan la fase clínica, excretan en forma masiva al agente (la

concentración bacteriana puede exceder 108 bacilos/gramo (Harris y Barleta, 2001; Cocito *et al.*, 1994), con las cuales se contaminan agua y alimento, se considera que la dosis infectante necesaria para becerros es de 50 a 1000 unidades formadoras de colonias (UFC) (Bull *et al.*, 2003) o bien durante la lactancia, a causa de la contaminación de la ubre con heces y por la eliminación del microorganismo a través de la leche y calostro (Santillan, 2010).

1.1.3. Estadíos de la infección por MAP

La infección por MAP ha sido dividida en cuatro estadíos, dependiendo de la severidad de los signos clínicos, el potencial para diseminar microorganismos al medioambiente y a la facilidad con que la enfermedad puede ser detectada empleando metodologías actuales. Por cada vaca con una JD avanzada la cual ha nacido en el mismo rebaño, es probable que haya de 15 a 25 vacas igualmente infectadas. Solo el 25-30% de estos animales infectados será detectado, incluso empleando las técnicas moleculares más sensibles. El animal clínico es lo que se conoce como “la punta del iceberg”, dicho fenómeno se ilustra en la figura 2. A manera de ejemplo, considerando un rebaño de 100 vacas adultas y 100 reemplazos jóvenes. Dos vacas nacidas en el rebaño varios años antes de que se desarrollen signos clínicos de la enfermedad, es decir con la pérdida de peso y diarrea. Es probable que otras 30-50 vacas estén infectadas, pero menos del 30% de estas será detectada por cultivo fecal y/o por metodología de PCR. Es también razonable concluir que, si de 25-30 individuos que resultan positivos en un cultivo fecal del rebaño, entonces la mayoría del rebaño ha sido expuesto y probablemente pueda estar infectado (Berh y Collins, 2010). Los animales jóvenes (de aproximadamente menos de seis meses de edad) se piensa que son más susceptibles a la infección a través del contacto estrecho con heces contaminados (Manning y Collins, 2001).

Estadío I: Infección silenciosa (becerros, novillos, juveniles y ganado adulto)

Este proceso de infección inicia con la resorción de MAP por las células fagocíticas intestinales y su translocación dentro de la mucosa intestinal. Esto es seguido por la diseminación de la infección a nódulos linfáticos adyacentes y eventualmente a una

infección diseminada. Una vez que la infección ocurre, el microorganismo prolifera lentamente a la mucosa del yeyuno e íleon y se disemina a los nódulos linfáticos (Clarke, 1997). Esta etapa silenciosa dura usualmente dos años y algunas veces puede durar 10 años o más, el ganado en el estadio I puede proceder al estadio II e incluso al estadio III (JD clínica) en un año de edad en rebaños con una alta incidencia de JD (Berh y Collins, 2010).

Estadio II: Adultos portadores asintomáticos

El ganado ingresa al estadio II de la enfermedad con altas concentraciones de MAP en sus tejidos intestinales. Estos animales no manifiestan pérdida de peso o diarrea pero pueden tener una respuesta inmune alterada, con una producción de interferón gamma aumentada por parte de las células T sensibilizadas a mitógenos específicos y/o un aumento en la respuesta de anticuerpos a MAP (Bassey y Collins, 1997). La mayoría de animales en estadio II excretan MAP en sus heces, contaminando el ambiente y sirviendo como fuentes de infección para otros animales dentro del rebaño (Berh y Collins, 2010).

Estadio III: Enfermedad clínica

Los animales en el estadio III tienen pérdida gradual de peso y diarrea. El apetito permanece normal y la diarrea intermitente se presenta comúnmente durante semanas. Los signos vitales, ritmo cardíaco, tasa de respiración y temperatura son normales. La demacración y caquexia se desarrollan gradualmente, con un decremento en la producción de leche. Casi todos los animales en estadio III son positivos al cultivo fecal y usualmente tienen anticuerpos aumentados detectables mediante la prueba de ELISA comercial y en la prueba de inmunodifusión en agar. El ganado en este estadio de infección raramente permanece en el rebaño por más de unas pocas semanas y es sacrificado por pérdida de peso y por una diarrea irremediable (Berh y Collins, 2010). En este estadio, la población de MAP en las células de la mucosa intestinal es muy alta. La capacidad de absorción del intestino es abrogada, generando una pérdida de peso asociada a una enteropatía con pérdida de proteína. Una característica progresión de la enfermedad es denotada por un engrosamiento de la mucosa intestinal y una linfadenopatía en una porción sustancial del

intestino delgado. La proliferación de linfocitos reactivos, macrófagos epitelioides y células gigantes resultan en vellosidades romas reposadas con una capacidad de absorción disminuida (Berh y Collins, 2010).

Estadio IV: Enfermedad clínica avanzada.

Los animales en el estadio IV de la enfermedad son débiles, demacrados y tienen usualmente diarrea profusa crónica. Son característicos de esta fase, el edema intermandibular o mandíbula de botella. Los animales pueden progresar del estadio II al estadio IV, algunas veces en unas pocas semanas, sin embargo la progresión gradual es más común. Una vez que la diarrea profusa y la hipoproteinemia ocurren, la condición de salud del animal se deteriora rápidamente, comúnmente en cuestión de días. Posteriormente ocurre la muerte, en cuestión de días (Berh y Collins, 2010).

Fenómeno de Punta de Iceberg de la Enfermedad de Johne

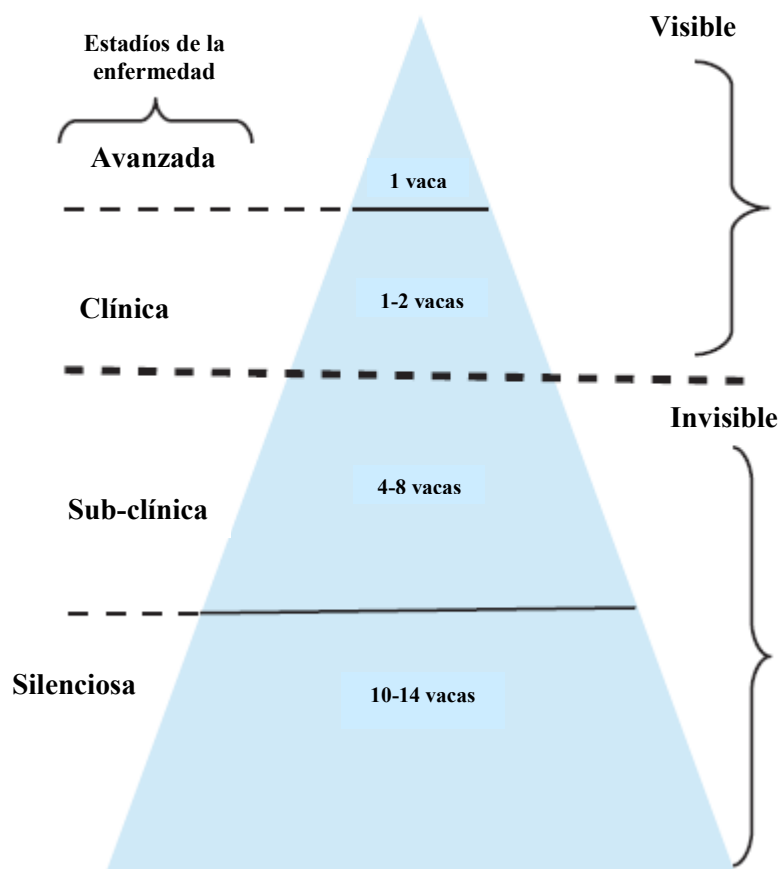


Figura 2. Representación esquemática del fenómeno Iceberg de la JD. Adaptado a partir del artículo Evaluation of the “Iceberg Phenomenon” in Johne’s Disease through Mathematical Modelling. Gesman Magombedze, Calistus N. Ngonghala, Cristina Lanzas. PLoS ONE | Octubre 2013 | Volumen 8 | Edición 10 | e76636.

1.2. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (MAP)

Mycobacterium avium subespecie *paratuberculosis* (*M. a. paratuberculosis*) está clasificado dentro del complejo *Mycobacterium avium-intracellulare*, en el cual se encuentran: *M. avium* subsp. *avium*, *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, *M. avium* subsp. *silvaticum* y *M. intracellulare* y se diferencia de las otras subespecies del complejo por su dependencia de micobactina para su crecimiento *in Vitro* y la estimulación de su crecimiento con piruvato (Santillan, 2010). Es un microorganismo anaerobio facultativo, intracelular con un prolongado periodo de incubación, pudiendo tardar su crecimiento de cuatro a dieciséis semanas; es bacilo no móvil, de 1.5 a 2 μm de longitud por 0.5 μm de ancho, débilmente Gram-positivo, ácido-alcohol resistente, característica que le confiere su

compleja pared celular (rica en ácidos micólicos, peptidoglicanos y arabinogalactanos) lo que la hace resistente al agua, desinfectantes, y condiciones medio ambientales. Tiende a agruparse y producir así colonias de 1 a 5 mm de diámetro que pueden ser firmes y suaves, lisas o rugosas con una variación en su color que va de amarillo a naranja. El medio de elección para su crecimiento es el de Herrold adicionado con yema de huevo y micobactina. Es una bacteria resistente a condiciones ambientales y a desinfectantes suaves, puede permanecer viable 270 días en charcos, 11 meses en suelos fertilizados y 47 meses en materia orgánica desecada (Clarke, 1997; Santillan, 2010).

En cultivo, es un organismo de lento crecimiento y fastidioso y, como otras micobacterias, requiere de una fuente orgánica de hierro; el hierro es quelado extracelularmente por exoquelinas y después intercambiado por micobactinas asociadas a las membranas. *M. a. paratuberculosis* es resistente a sequias, condiciones acidas y a ciertos desinfectantes y puede sobrevivir durante varios meses en agua, suelo y heces. La compleja pared celular micobacteriana es relativamente impermeable y es rica en lípidos, está compuesta de una capa interna de péptidoglicanos, una capa intermedia asimétrica de ácidos grasos de cadena larga, (ácidos micólicos) unidos a arabinogalactano, y una capa externa de peptidoglicolípidos (micósidos). El lipoarabinomannano (LAM), es un glicolípido anclado a la membrana insertado en la pared celular, es uno de los varios componentes inmunomodulatorios de la pared celular (Clarke, 1997).

Después de ser ingeridas, las micobacterias son endocitadas por las células M del domo del epitelio suprayacente a las placas de Peyer organizados en los tejidos linfoides del yeyuno e íleon. Hay evidencia de que pequeños números de células de las vellosidades epiteliales adyacentes a las regiones del domo son infectadas, pero los enterocitos en otras áreas no son afectados (García Marín *et al.*, 1992; en Clarke, C. J., 1997). El macrófago intestinal es la célula blanco para la infección por *M. a. paratuberculosis* (Clarke, 1997).

Después de la absorción, los microorganismos *M. a. paratuberculosis* son objeto de actividades de degradación y aniquilación por parte del macrófago. Los eventos intracelulares están bien documentados para micobacterias; incluyen la formación del

fagosoma, fusión del fagolisosoma, efectos de la explosión de la respiración oxidativa, y la generación de intermediarios tóxicos de especies reactivas de oxígeno por las rutas de la mieloperoxidasa y la alfa-independiente. Las defensas no oxidativas incluyen proteínas catiónicas, lisozima y otras enzimas lisosómicas y la producción de óxido nítrico (Liew and Cox, 1991; en Clarke, 1997).

Las micobacterias representan un grupo de organismos altamente exitosos que varían desde saprofitos a aquellos adaptados a una dependencia total de su huésped. Durante su ciclo de vida, las especies micobacteriales pueden encontrar un sinnúmero de condiciones de estrés incluyendo la ausencia de nutrientes, hipoxia, pH ácido y la competencia con otros microorganismos por recursos limitados y ocupación de un nicho específico, tal como el suelo o el agua. Para poder sobrevivir en condiciones favorables, las micobacterias han desarrollado mecanismos para lograr la latencia y resistencia (Lamont *et al.*, 2012).

Las especies micobacterianas de *M. avium* están actualmente subdivididas en tres subespecies, *M. avium* subsp. *avium* (*M. avium*), *M. avium* subsp. *paratuberculosis*, and *M. avium* subsp. *silvaticum* (*M. silvaticum*). La designación de subespecie de *M. paratuberculosis* está basada en estudios de hibridización de ADN-ADN y en análisis de taxonomía numérica. Aunque comúnmente son agrupados con *M. avium* en el complejo *Mycobacterium avium intracellulare*, *M. intracellulare* es una especie genéticamente distinta. A nivel de subespecie, *M. paratuberculosis* puede ser diferenciado fenotípicamente de *M. avium* and *M. silvaticum* por su dependencia de la micobactina y genotípicamente por la presencia de múltiples copias de un elemento de inserción, IS900. El análisis de los genes de ARNr (ADNr) de las micobacterias ha generado la división de este género en dos clusters o grupos separados. Estos corresponden a las micobacterias tradicionales de rápido crecimiento, representadas por aislados no patogénicos y las micobacterias de lento crecimiento, conteniendo la mayoría de los patógenos conocidos. El número de copias del ADNr también refleja la división entre las micobacterias de rápido y lento crecimiento; las micobacterias de rápido crecimiento contienen dos conjuntos de genes de ARNr, mientras que las de lento crecimiento incluyendo *M. paratuberculosis* y *M. avium*, contienen solo

una copia. En *M. paratuberculosis*, como en otras micobacterias, los genes de ADN_r, se encuentran dentro de un solo operón. Tanto *M. paratuberculosis* como *M. avium* tienen una inserción inusual de aproximadamente 16 nucleótidos en el gen de ARNr 23S, el cual también se encuentra en los genes de ARNr de otras micobacterias. Esta inserción parece ser variable entre las micobacterias. La comparación de las secuencias entre *M. paratuberculosis* y *M. avium* muestra un solo no apareamiento, mientras que esta misma secuencia contiene 4 pb adicionales en *M. phlei*. El gen *dnaJ* codifica para una proteína de choque térmico altamente conservada y ha sido usada en el mapeo filogenético en otros géneros de bacterias. Este gen fue secuenciado en 19 especies de micobacterias y la relación filogenética inferida a partir de estos datos esta en estrecha relación con la clasificación tradicional basada en la secuenciación del ARNr 16S para las micobacterias de lento crecimiento. Como es de esperarse la homología entre los genes de *dnaJ* de *M. avium* y *M. paratuberculosis* es de 99%, confirmando la relación previamente establecida entre estas dos especies de micobacterias (Harris y Barletta, 2001).

Las micobacterias son notablemente resistentes a factores físicos y químicos. *Mycobacterium paratuberculosis* parece estar entre los más resistentes de este grupo. Esto explica la habilidad de este organismo para resistir al ambiente, una característica integral para la epidemiología de la infección. *Mycobacterium paratuberculosis* es más resistente que *M. avium*, *M. chelonae*, *M. phlei*, *M. scrofulaceum* y *M. xenopi*. *Mycobacterium avium* es más resistente al cloro libre que la mayoría de las otras micobacterias. A una concentración de 1 mg/ml, el tiempo para una reducción de 1 base log₁₀ en conteos viables de *M. avium* es de aproximadamente 50 min (extrapolando de los datos de Taylor *et al.* 2000). En contraste el tiempo para alcanzar una reducción de 1 log₁₀ en *E. coli* es de 28 segundos (Manning y Collins, 2001).

En términos generales, las cepas de MAP pueden dividirse en dos grupos principales (o tipos de cepas), los cuales pueden definirse de acuerdo a sus características de crecimiento, preferencias de huésped y patogenicidad. Históricamente, estos tipos de cepas fueron primero nombradas a partir de donde fueron aisladas y fueron designadas como borrego (o S, por la letra inicial de la palabra borrego en inglés) y de ganado (o C,

por la letra inicial de la palabra ganado en inglés) (Behr y Collins, 2010). Sin embargo, en estudios más recientes se distingue tres tipos principales de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* que han sido clasificados en base a la electroforesis de pulsos en campo eléctrico (PFGE), análisis de fragmentos de restricción de IS900, PCR y análisis de restricción enzimático de *gyrB*, electroforesis en gradiente desnaturalizante y técnicas de cultivo convencionales. Estos incluyen la tipo I (anteriormente descrita como de “tipo borrego”, comprendiendo cepas pigmentadas y no pigmentadas aisladas de borregos en Marruecos, Escocia, Islandia, Sudáfrica, Australia y Nueva Zelanda, las cepas aisladas a partir de ganado Bovino en Australia e Islandia, y algunas cepas aisladas de caprinos de Noruega y Nueva Zelanda; la tipo II (previamente descrita como de “tipo bovino”), la cual es asociada principalmente con el ganado bovino pero que también puede aislarse de un amplio rango de huéspedes, incluyendo humanos; y la tipo III (de tipo intermedio), la cual ha sido descrita en unos pocos aislados de ovinos de Sudáfrica, Canadá e Islandia, además de un aislado porcino de Canadá, así como también un aislado caprino y uno bovino de España. Hibridizaciones genómicas comparativas anteriores (CGH, por sus siglas en inglés) entre cepas de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y otros miembros del complejo de *M. avium* (MAC, por sus siglas en inglés) han demostrado la presencia de amplias diferencias genómicas, llamadas islas genómicas, que comprenden regiones de genes contiguos probablemente adquiridos como unidades individuales por transferencia horizontal o grandes secuencias polimórficas (LSPs, por sus siglas en inglés). Algunos LSPs se asocian específicamente con distintos tipos de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* y han indicado que las cepas encontradas predominantemente en borregos están mucho más estrechamente emparentadas a otros miembros de MAC de lo que están las cepas más comúnmente aisladas de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* tipo II, sugiriendo que las cepas tipo II de *M. avium* subsp. *paratuberculosis* tienen un complemento genómico reducido (Castellanos et. al., 2009).

El análisis de Map K-10 muestra que tiene una sola secuencia de ADN circular de 4, 829,781 pares de bases, con un contenido de G+C de 69.3% (Ver la Tabla 1). El presunto origen de replicación fue identificado basándose en la presencia de las cajas de *dnaA*, el sesgo característico de oligómeros y el contenido G-C entre los presuntos genes *dnaA* y

dnaN. El codón de iniciación para el gen *dnaA* se eligió como el punto de partida para la numeración del genoma (Fig. 1). El contenido G+C es relativamente constante en todo el genoma. El análisis también revela solo unas pocas regiones genómicas con bajo contenido G+C correspondientes a secuencias de profagos o a secuencias codificantes de ARN (Fig. 1). (Li *et al.*, 2005).

Tal como en los otros tres genomas de micobacterias secuenciados a la fecha, *M. tuberculosis* (*Mtb*), *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium bovis*, solo se identificó un solo operon *rrn* (16S-23S-5S) en la cepa K-10, junto con 50 genes adicionales codificantes de moléculas funcionales de ARN. El operón *rrn* está localizado a 2.75 Mb del presunto *oriC* en la hebra opuesta. Esto es 1.3 Mb más allá del *OriC* descrito para *Mtb* (Li *et al.*, 2005).

Propiedad	Map	Mav	Mtb	M. bovis	M. leprae	M. smegmatis
Tamaño del Genoma, bp	4,829,781	5,475,738	4,411,532	4,345,492	3,268,203	6,988,209
Contenido G+C, %	69.30	68.99	65.61	65.63	57.79	67.40
Codificación de proteínas, %	91.30	NA	90.80	90.59	49.50	92.42
ORFs	4,350	NA	3,959	3,953	1,604	6,897
Densidad de genes, bp por gen	1,112	NA	1,114	1,099	2,037	1,013
Promedio de extensión por gen, bp	1,015	NA	1,012	995	1,011	936
ARNt's	45	45	45	45	45	47
Operon de ARNr	1	1	1	1	1	2

Tabla 1. Resumen del genoma completo de *M. paratuberculosis* K-10 y comparación con otras especies de micobacterias. Adaptado a partir del artículo The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. Lingling Li, *et. al.* | July 13, 2005 | PNAS.

1.3. Metabolismo del hierro

El hierro es un importante elemento esencial para el crecimiento de casi todos los seres vivos. El hierro es necesario para funciones celulares importantes, tales como el transporte y almacenamiento del oxígeno y como un catalizador en los procesos de transporte de electrones. Debido a que el hierro tiene un potencial redox extremadamente amplio, abarcando aproximadamente 1 V, es un biocatalizador muy versátil. Una variedad de enzimas que requieren hierro para su actividad han sido caracterizadas; estas incluyen la ribonucleótido reductasa, nitrogenasa, peroxidasa, catalasa, citocromos y la deshidrogenasa succínica. Estas enzimas participan en importantes roles celulares, tales como la reducción de los ribonucleótidos y el dinitrógeno y la activación y descomposición de peróxidos. El hierro es abundante en la corteza terrestre, siendo el cuarto elemento más abundante. Sin embargo, en presencia del oxígeno, el hierro se oxida a su estado férrico y puede formar hidróxido férrico, el cual es insoluble en soluciones acuosas a pH neutro o alcalino y este no es fácilmente accesible para las bacterias. Debido a la insolubilidad del hierro, los microorganismos han evolucionado un sinnúmero de mecanismos para la adquisición de hierro a partir del medio ambiente; estos mecanismos están estrechamente ligados a la virulencia de las bacterias. El crecimiento competitivo y la supervivencia de las bacterias en el huésped requiere de respuestas adaptativas por parte de las bacterias; la adquisición de hierro es una de las más importantes de estas respuestas adaptativas para la patogénesis bacteriana. El hierro libre es extremadamente limitado en el huésped mamífero, haciendo la adquisición del hierro por los patógenos invasores especialmente difícil. El cuerpo humano contiene alrededor de 3 a 5 gramos de hierro, pero la mayoría de este hierro no es fácilmente accesible para las bacterias. El hierro es mantenido en una forma soluble por estar unido a proteínas portadoras o reducido a hierro ferroso dentro de las células. La mayoría del hierro intracelular se encuentra como hemoglobina, grupo hemo, ferritina y hemosiderina. Las cantidades traza de hierro presentes extracelularmente está unido por las proteínas de unión al hierro de alta afinidad transferrina y lactoferrina. En el suero humano normal, la cantidad de hierro libre en equilibrio con el hierro unido a la transferrina ha sido calculada por Bullen y colaboradores en aproximadamente de 10^{-18} M. Esto es muy por debajo del nivel requerido para el crecimiento bacteriano. La transferrina no saturada

parece contribuir a la actividad bacteriocida del plasma humano normal, mientras que la lactoferrina puede jugar un papel similar en las superficies secretoras y es también un componente importante de las células fagocíticas. Se ha encontrado a la hemoglobina extracelular y al grupo hemo como fuente de hierro para muchas bacterias. No obstante, son rápidamente unidas por dos proteínas séricas, la haptoglobulina y la hemopexina, respectivamente, y son removidas de la circulación (Litwin y Calderwood, 1993).

Durante la infección, la disponibilidad del hierro es limitada aun mas por la inducción de la hipoferremia la cual ha sido reconocida como un componente de la fase de respuesta aguda a la infección. Esta respuesta de la fase aguda a la infección, la cual puede ser inducida por microbios y por ciertos productos microbianos tales como las endotoxinas, es mediada a través de un aumento en la liberación de varias citocinas, particularmente la interleucina-1 y el factor de necrosis tumoral alfa (catequina). La saturación del hierro en el suero disminuye con un acompañado incremento en el nivel de la transferrina, limitando la disponibilidad del hierro para las bacterias. Los niveles de lactoferrina también se ven incrementados en la sangre durante la respuesta inflamatoria. La liberación de apolactoferrina por los leucocitos ocurre durante la desgranulación y fagocitosis, la cual adicionalmente incrementa la concentración local de la lactoferrina en los sitios de infección. Varios estudios han demostrado la resistencia aumentada contra la infección en animales en los cuales los niveles de hierro en suero han sido reducidos por una dieta deficiente en hierro. Esta resistencia a la infección es revertida, si los ratones deficientes en hierro, son inyectados con suficiente hierro, para restablecer los niveles normales de hierro en el suero. Si la hipoferremia limita la infección, entonces la sobrecarga crónica de hierro, puede esperarse que incremente la susceptibilidad a la infección. Numerosos estudios han demostrado, que la inyección de hierro exógeno para producir una sobrecarga de hierro en animales, aumenta la susceptibilidad a la infección bacteriana. El hierro excesivo puede aumentar la infección invirtiendo la misma limitación del hierro y estimulando el crecimiento bacteriano. Alternativamente, otros investigadores han sugerido que la sobrecarga de hierro puede interferir con los mecanismos de defensa del huésped tales como la inmunidad mediada por células y la actividad bactericida de los leucocitos. Por lo tanto, puede ser difícil, separar la contribución de la sobrecarga del hierro en estimular el

crecimiento bacteriano de su contribución en la interferencia con los mecanismos de defensa del huésped. Para que las bacterias patogénicas sean capaces de establecer una infección, deben de ser capaces de obtener el hierro del huésped. Debido a que el hierro está limitado en el huésped, las bacterias han evolucionado un sinnúmero de mecanismos, ya sea para liberar el hierro de las fuentes del huésped o para utilizar los compuestos de captura de hierro del huésped directamente. Muchas bacterias secretan quelantes de alta afinidad por hierro, de bajo peso molecular, conocidos como sideróforos, en respuesta al estrés por hierro. Estos sideróforos pueden solubilizar el hierro a partir de compuestos minerales complejos del medioambiente y pueden competir efectivamente con los compuestos de unión al hierro del huésped, la transferrina y lactoferrina, para movilizar el hierro para uso bacteriano. El transporte subsecuente de los complejos de hierro-sideróforos hacia la bacteria requiere de receptores de membrana específicos para cada complejo de sideróforo. Otros patógenos bacterianos secretan agentes reductores, los cuales remueven el hierro férrico de la transferrina o utilizan citrato como acarreador de hierro orgánico (Litwin y Calderwood, 1993).

Las micobacterias, como la mayoría de microorganismos vivos, requieren de hierro para muchas funciones vitales. El hierro forma el centro catalítico esencial del sitio activo de muchas enzimas, permitiendo las reacciones enzimáticas. La habilidad de aceptar y donar electrones del hierro, mediante la oscilación entre los estados oxidativos ferroso (Fe^{2+}) y férrico (Fe^{3+}) permite a las enzimas llevar a cabo reacciones redox. Por esta razón, el hierro está comúnmente asociado con los citocromos responsables de la fosforilación oxidativa y de la producción de energía. Los grupos de hierro-azufre son cofactores esenciales de muchas enzimas implicadas en la biogénesis de aminoácidos y pirimidinas, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos y también del transporte electrónico. El hierro es uno de los elementos más abundantes de la tierra, sin embargo, bajo el ambiente oxidante de la tierra a pH fisiológico, el hierro existe predominantemente como sales férricas insolubles, tales como el óxido de hierro, el hidróxido de hierro y el fosfato de hierro, los cuales no pueden ser asimilados por las bacterias. Por lo tanto, los iones de hierro libres son escasos. La adquisición de hierro, es incluso más difícil de obtener para las bacterias patogénicas, debido a que los iones de hierro están unidos a las proteínas portadoras del hierro del

huésped, tales como la ferritina y lactoferrina, las cuales sirven como transportadores de hierro del huésped, la proteína de almacenamiento de hierro ferritina y las hierro-protoporfirinas de las hemoproteínas. Durante la infección, el huésped restringe la cantidad de hierro circulante en el cuerpo unido a la transferrina y reduce la resorción del hierro de la dieta empleando la limitación del hierro como un mecanismo de defensa del huésped. No obstante, las micobacterias patógenas son capaces de causar enfermedad independiente de la severa limitación del hierro en el ambiente del huésped. Para superar esta limitación del hierro, las micobacterias patógenas han evolucionado rutas de adquisición de hierro, las cuales son más eficientes que las de los huéspedes vertebrados. Un mecanismo principal empleado por las micobacterias para competir por el hierro disponible limitadamente, es el uso de queladores de hierro de alta afinidad, los sideróforos, los cuales son principalmente producidos durante la escasez del hierro. Hay tres tipos de sideróforos, micobactina, carboximicobactina y exoquelina, mientras que la micobactina y la carboximicobactina comparten una estructura medular, la cual es distinta de la exoquelina. La micobactina está asociada a la envoltura celular y facilita el transporte hacia el interior del citoplasma mientras que la carboximicobactina y exoquelina son secretados como queladores de hierro los cuales adquieren hierro del medio intracelular y lo transportan hacia el citoplasma bacteriano (Fang, *et al.*, 2015).

Las micobactinas pueden ser aisladas de la mayoría de especies micobacterianas, excepto de *Mycobacterium microti*, *Mycobacterium paratuberculosis* y *Mycobacterium vaccae*. Tienen una estructura núcleo que comprende 5 aminoácidos con un anillo de fenioxazolidina, derivado del salicilato con cadenas naturales de alquilo saturadas o insaturadas de varios tamaños en el residuo de lisina hidroxilada en el centro de la molécula. La cadena larga de alquilos, le confiere la propiedad lipofílica de la micobactina y por lo tanto el anclaje a la envoltura celular. Estudios recientes crearon confusión mediante el uso del término exoquelina para referirse a todos los sideróforos extracelulares aislados tanto de micobacterias saprofíticas como de patógenas. Esto se volvió inapropiado, cuando se encontró que la estructura del núcleo de la exoquelina de micobacterias patógenas, tiene una estructura similar a la micobactina, pero con cadenas laterales de alquilo más cortas, las cuales terminan ya sea con grupos carboxilo o con un metil éster.

Esta característica hace que las exoquelinas sean más hidrofílicas que las micobactinas lipofílicas. Estas moléculas fueron renombradas como carboximicobactinas, aunque el término exomicobactinas, es usado también, pero con menor frecuencia. Las micobacterias no pueden sobrevivir sin hierro; un malfuncionamiento de las vías de adquisición de hierro causa defectos en el crecimiento *in vitro* y en los macrófagos y atenúa a *M. tuberculosis* en estos modelos experimentales de ratones. Las estrategias de intervención que tienen como blanco la adquisición de hierro mediada por sideróforos pueden ser efectivas ya que esta vía no solo es esencial en *M. tuberculosis*, sino que también está ausente del huésped humano (Fang, *et al.*, 2015); esta misma estrategia se pudiese aplicar a MAP.

Los huéspedes mamíferos restringen activamente las fuentes de hierro a los patógenos bacterianos. Las citoquinas pueden funcionar causando que los macrófagos limiten la concentración de hierro intracelular en un intento por limitar el crecimiento bacteriano. Los macrófagos activados suprimen la expresión de los receptores de transferrina, reduciendo los niveles de hierro. Nramp1, una proteína integral de la membrana celular expresada exclusivamente en el compartimento lisosomal de los monocitos y macrófagos, ha sido implicada en controlar la replicación micobacterial mediante la remoción activa de hierro o cationes divalentes del espacio fagosomal, disminuyendo la cantidad de hierro disponible para las bacterias intracelulares. Para recuperar el hierro en los ambientes en donde este se encuentra limitado, la mayoría de especies micobacterianas producen el sideróforo lipo-soluble micobactina y el sideróforo hidro-soluble exoquelina. Ya que *M. paratuberculosis* es un auxótrofo de la micobactina, es incapaz de producirla *in vitro* o *in vivo*, y solo puede sintetizar exoquelina. Estos dos sideróforos parecen ser relevantes en la patogenicidad de las micobacterias, ya que las mutaciones en genes de la ruta biosintética de la micobactina T en *M. tuberculosis*, impide su habilidad para replicarse en una línea celular de macrófagos de humano. La manera en que *M. paratuberculosis* puede sobrevivir intracelularmente cuando solo puede producir exoquelinas no está clara (Janagama *et al.*, 2010; Harris y Barletta, 2001). Sin embargo, aunque las razones de la dependencia *in vitro* de la micobactina de MAP no se conocen, Janagama y otros han demostrado que el promotor del operón de la micobactina (*mbt*) está activo y los genes de la micobactina son transcritos por MAP dentro de los macrófagos, y

también en tejidos animales naturalmente infectados (Janagama *et al.*, 2010). Las micobacterias patógenas encuentran un amplio número de factores de estrés en las células del huésped y su habilidad para superar la limitación del hierro y la toxicidad del hierro representa uno de los principales determinantes de virulencia. El perfil de transcripción de proteínas de MTB y otros patógenos en respuesta al estrés *in vitro* está muy bien documentado. Mientras que el perfil del transcriptoma o proteoma de MAP en respuesta al choque térmico, pH, estrés oxidativo y privación de nutrientes han sido demostradas, las respuestas al estrés por privación o suplementación de hierro están ausentes (Janagama, 2010).

El regulador dependiente de hierro (IdeR, por sus siglas en inglés) ha sido bien estudiado como un regulador global involucrado en mantener la homeostasis del hierro en *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). Recientemente, Janagama y otros demostraron que IdeR de MAP en presencia de hierro reconoce una secuencia consenso en un promotor llamado la “caja de hierro” y que regula la expresión de los genes involucrados en la adquisición (*mbt*) y almacenamiento del hierro (*bfrA*). También demostraron que el polimorfismo en el promotor del gen para el almacenamiento del hierro (*bfrA*) en las cepas S de MAP en comparación con las cepas C de MAP resulta en una regulación diferencial de genes. La represión de *bfrA* dependiente de IdeR en presencia de hierro, sugiere variaciones en los mecanismos de almacenamiento de hierro y/o en los requerimientos de hierro entre las cepas S y C de MAP. El hierro es un componente crítico de varias enzimas metabólicas. La mayoría de las bacterias responden a la limitación del hierro mediante un mecanismo regulatorio único llamado respuesta a la escasez del hierro. La escasez de hierro es un fenómeno fisiológico empleado por las células para incrementar el hierro intracelular, suprimiendo la síntesis post-transcripcional de las proteínas no esenciales que usan hierro y limitando el hierro a las funciones celulares esenciales. Por lo tanto, el paradigma es regular la transcripción de todos los sistemas de resorción de hierro positivamente, mientras se suprime las enzimas no esenciales mediante mecanismos de regulación pos-traducciona para sobrevivir en condiciones limitantes de hierro. Ambas cepas de MAP, regulan positivamente los genes involucrados en la biosíntesis del sideróforo (*mbt*), la habilidad para adquirir hierro a partir de los sideróforos sintetizados (*esx-3*) y el transporte de hierro

unido a sideróforos (*irtAB*) hacia el interior de la micobacteria. La mayoría de las micobacterias incluyendo *M. tuberculosis* (MTB) regulan positivamente al operón *SUF*. El *SUF* sintetiza grupos (Fe-S) y los transporta a proteínas conteniendo hierro-azufre involucradas en diversas funciones celulares tales como el balance redox y la regulación génica. Esto es crítico ya que a diferencia de *E. coli*, los genomas de MTB y MAP solo codifican un sistema de estos para sintetizar todo el [Fe-S] requerido por la célula, además de que los átomos de hierro y azufre son tóxicos para las células (ver figura 3). Janagama y otros demostraron que el operón *FUS* es regulado positivamente, a nivel de transcritos y proteínas en las cepas C y no así en las cepas S, bajo condiciones limitantes de hierro (Ver figura 4) (Janagama, 2010).

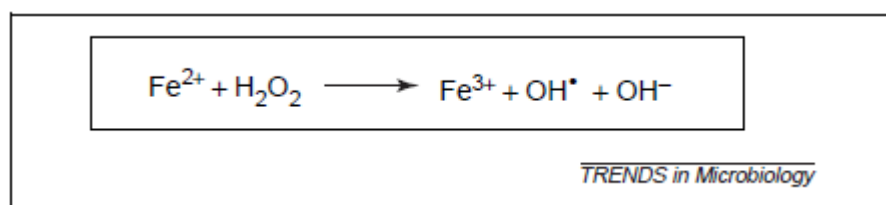


Figura 3. La reacción Fenton. En presencia de peróxido de hidrógeno, el hierro ferroso cataliza la reacción de Fenton para generar radicales tóxicos de oxígeno. Adaptado a partir del artículo, Control of iron metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*. G. Marcela Rodríguez. *TRENDS in Microbiology* | Julio 2006 | Volumen 7 | Edición 14.

Durante la infección, existe una competencia por el hierro entre el macrófago del huésped infectado y el patógeno. Los patógenos invasores secretan sideróforos o usan proteínas de transporte y almacenamiento del huésped para capturar el hierro del huésped. El macrófago huésped intenta suprimir la proliferación del patógeno mediante complejos mecanismos de retención del hierro. Uno de tales mecanismos involucra cambios en los niveles de las proteínas de transporte del hierro. Van Zandt y otros han demostrado que la infección de los macrófagos con el patógeno intracelular *Mycobacterium avium* genera un incremento en la expresión del ARNm para las proteínas de transporte del hierro (Slc11a1) y Nramp2 (Slc11a2) y una disminución de la expresión del ARNm del receptor de transferrina (Van Zandt *et al.*, 2008). Las micobacterias patógenas encuentran una gran variedad de factores de estrés en las células huésped y su habilidad para superar la

privación y toxicidad del hierro representa uno de los principales determinantes de la virulencia (Janagama *et al.*, 2010).

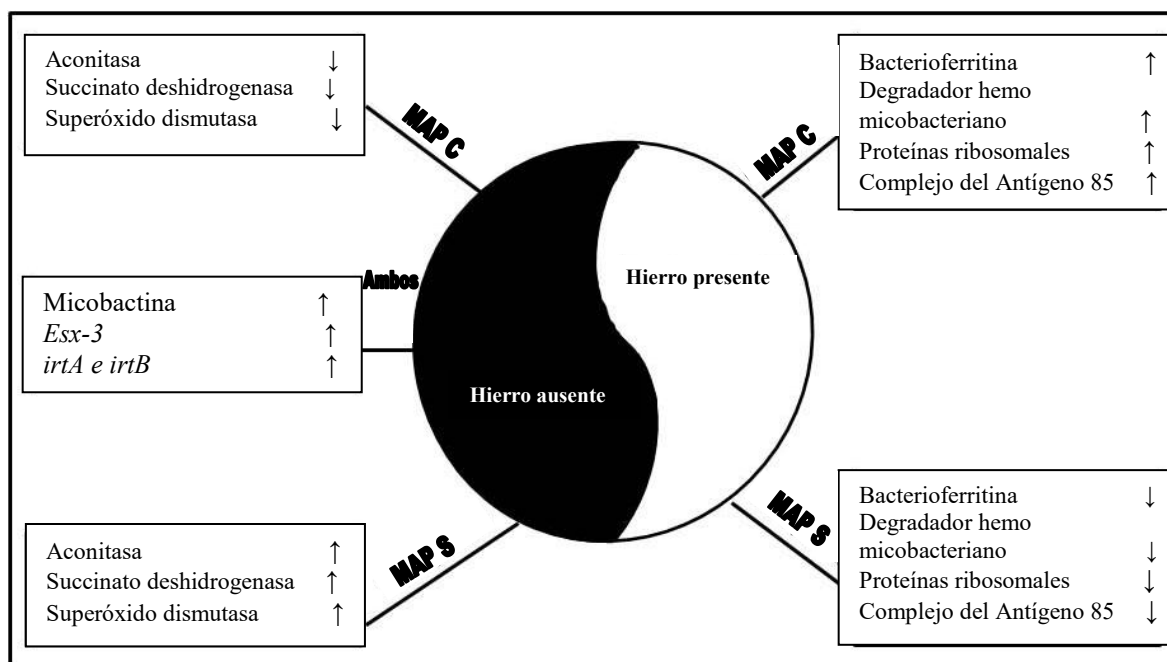


Figura 4. Programación del metabolismo dependiente de MAP de Ganado (MAP C) y de borregos (MAP S): Bajo condiciones de abundancia de hierro, hay una regulación positiva de las proteínas ribosómicas, bacterioferritina, hemo micobacteriano, proteínas empleadoras y degradadoras, en la cepa de ganado únicamente. Bajo condiciones limitantes de hierro, los genes de síntesis y transporte de sideróforos son regulados positivamente tanto en la cepa de ganado como en la de borregos. No obstante bajo la limitación de hierro, hay una regulación negativa de la aconitasa, succinato deshidrogenasa y superóxido dismutasa únicamente en la cepa de ganado. Adaptado a partir del artículo, Iron-sparing Response of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* is strain dependent. Harish K Janagama, Senthilkumar, John P Bannantine, Abirami Kugadas, Pratik Jagtap, LeeAnn Higgins, Bruce A Witthuhn, Srinand Sreevatsan. BMC Microbiology | 2010 | Volumen 10 | 268

La respuesta inmune innata sirve como la primera línea de defensa del huésped contra los patógenos que han sobrepasado las barreras mecánicas naturales tales como la piel, las mucosas y el ácido gástrico. Las células del sistema innato incluyen los monocitos, macrófagos, neutrófilos y células dendríticas, las cuales reaccionan rápidamente para controlar el crecimiento del patógeno, promover la inflamación y desarrollar la respuesta inmune adaptativa. La identificación inicial de los invasores foráneos está regida por los receptores de reconocimiento de patrones (PRRs, por sus siglas en inglés) para motivos específicos de patógenos (por ej. Peptidoglicanos, lipopolisacáridos, flagelina y ARN de

hebra viral) conocidos como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs, por sus siglas en inglés) o productos de daño celular del huésped (p. ej. ATP extracelular), los cuales son conocidos como patrones moleculares asociados al peligro (DAMPs, por sus siglas en inglés). Los PRRs son separados en dos categorías, la sensorial y la fagocítica, en base a la activación de cascadas de señalización proinflamatoria o la fagocitosis de patógenos, respectivamente. Estas rutas innatas inducen varios mecanismos antimicrobianos, incluyendo la limitación del hierro disponible para los patógenos a nivel sistémico y celular (Johnson y Wessling-Resnick, 2012).

El hierro que está asociado al grupo hemo representa el más grande reservorio de hierro del cuerpo y se requiere para el transporte de oxígeno en la hemoglobina, para el almacenamiento del hierro en la mioglobina y para el transporte de electrones para el funcionamiento del citocromo en la respiración aerobia. El segundo mayor reservorio de hierro en el cuerpo, se encuentra en forma no-hemo almacenado en la ferritina. Cuando se requiere, el hierro puede liberarse de la ferritina para abastecer la demanda del transporte de oxígeno y del metabolismo energético. Este mecanismo limita el exceso de hierro libre que de otra manera generaría especies reactivas de oxígeno. La transferrina circulante, la cual distribuye el hierro a las células a través de la resorción mediada por receptores, también provee un segundo reservorio para el almacenamiento de hierro, el cual es de naturaleza mas dinámico que el almacenamiento por ferritina mediante la distribución de hierro de los sitios de almacenamiento (p. ej., el hígado) a los tejidos periféricos (p. ej., músculo, médula ósea, etc.). El hierro que entra al sistema se une a la transferrina y es transportado por circulación portal al hígado. Mientras que cualquier exceso de hierro no-hemo puede ser almacenado en la ferritina del hígado, el reservorio metabólico inmediato circula unido a la transferrina. La transferrina es captada por receptores de la superficie celular y es internalizada por endocitosis mediada por receptores a los compartimentos ácidos en donde el hierro es liberado. Este mecanismo distribuye el hierro a los tejidos periféricos con fines metabólicos. Hay un complejo mecanismo sensorial que responde a la saturación de hierro por la ferritina y otras señales regulatorias (incluyendo la infección e inflamación) que ayudan a controlar estrechamente el metabolismo del hierro para limitar el exceso pero también para prevenir su deficiencia. La hepcidina, la hormona clave reguladora del hierro,

junto con otras proteínas del hierro implicadas en el transporte y regulación, soportan el papel clave del hierro en la respuesta inmune innata para modular el balance del hierro corporal y en el combate contra la infección. La hepcidina no solo juega un papel central en la integración del metabolismo, sino que también es una conexión crítica a la respuesta inmune para la infección e inflamación. Después de la activación de los PPRs sensores, la IL-6 (Interleucina-6) induce la expresión de hepcidina y su liberación del hígado. La hepcidina induce cambios transcripcionales para modular la respuesta inflamatoria aguda inducida por citocinas. La lactoferrina, un potente quelante del hierro férrico, esta también involucrado en la modulación de la disponibilidad del hierro extracelular. Los niveles de lactoferrina se encuentran constitutivamente altos en la mayoría de las superficies de secreción, incluyendo las lágrimas, saliva, bilis y leche materna. Las citocinas pro-inflamatorias, tales como el Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α), también inducen la liberación de lactoferrina de los gránulos neutrofílicos en el sitio de la infección. La siderocalina, la cual también se conoce como lipocalina-2 o lipocalina asociada a la gelatinasa de neutrófilos (Ngal), es producida por los gránulos de neutrófilos y en las células epiteliales en respuesta a la citocina pro-inflamatoria, IL-1 β . Numerosos microorganismos patogénicos secretan pequeñas cantidades de sideróforos orgánicos que atrapan el hierro. La siderocalina subvierte este sistema de adquisición del hierro mediante la unión de sideróforos cargados de hierro de tipo catecolato y derivados de salicilato tales como la enterobactina secretada por *E. coli* y la micobactina secretada por *M. tuberculosis*, respectivamente. La amplia mayoría del hierro en el cuerpo sirve como cofactor unido al grupo hemo de la hemoglobina. Cuando se libera por lisis celular, la hemoglobina y el grupo hemo son captados por la haptoglobulina y la hemopexina, respectivamente. La activación de los fagocitos vía PRRs y la citocina interferón- γ derivada de las células Th1, resulta en una disminución de la expresión de los receptores de transferrina y un aumento de la expresión de la proteína-1 asociada a la resistencia natural de los macrófagos (Nramp1, por sus siglas en inglés) y de ferroportina. El receptor de transferrina, es la vía principal de para distribuir el hierro a los tejidos periféricos a través de la endocitosis del ligando transferrina, el cual se une al hierro y circula en el plasma. La regulación negativa de este receptor, limita la habilidad de la célula para adquirir el hierro unido a la transferrina y reduce consecuentemente el reservorio de hierro endosomal accesible a los

parásitos intracelulares, tales como *L. pneumophila*, *M. tuberculosis* y *Mycobacterium avium* para limitar así su crecimiento. Nramp1 fue identificada en los ratones con una mutación que confería susceptibilidad a las infecciones y la pérdida de la función de Nramp1 en los ratones está asociada a una respuesta inmune inflamatoria reducida. Ciertas mutaciones en el gen humano también influyen en la respuesta a la infección, Nramp1 es un transportador de metales divalentes dependiente del pH que se localiza en los compartimentos fagosomales y reduce el hierro intrafagosomal, y el reciclaje de hierro en eritrocitos fagocitados es defectuoso en los ratones con el gen “knockout” para Nramp1. Se sabe que el gen Nramp1 funcional confiere resistencia a los parásitos intrafagosomales, incluyendo a *Mycobacterium bovis BCG*, *Leishmania donovani* y *Salmonella typhimurium*, mientras que a los parásitos que escapan al citosol tales como *Listeria monocytogenes*, no les afecta el estado funcional de Nramp1. Asimismo, la movilización del hierro por Nramp1 suprime la expresión de la citocina inhibitoria IL-10 y aumenta la producción de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS) limitando aun más el crecimiento bacteriano. La tabla 2 resume las proteínas relacionadas al hierro y su implicación en el sistema inmune del huésped (Johnson y Wessling-Resnick, 2012). Por último, se ha demostrado en modelos experimentales con ratones deficientes en la proteína HFE son más susceptibles a la infección por *Mycobacterium avium* (Gomes-Pereira, 2008).

Proteína	Función en el Metabolismo del Hierro	Influencia en la Infección
Hepcidina	Ligando para la proteína de exportación del hierro ferroportina; su baja expresión interrumpe la regulación de la ferroportina en la hemocromatosis	Regula el flujo de salida del hierro de los enterocitos y macrófagos para promover la hipoferremia; activa a JAK2 para modular la respuesta a citocinas
Ferroportina	Exportado de hierro en la membrana; su sobreexpresión conduce a la hiperferremia en la hemocromatosis	Hemocromatosis asociada con infecciones (<i>Vibrio</i> , <i>Yersinia</i> , <i>E. coli</i>) pero con la resistencia a los patógenos intracelulares (<i>Mycobacteria</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Legionella</i>)
HFE	Molécula similar a MHC Clase-I asociada con receptores de transferrina (TfRs, por sus siglas en ingles)	Las mutaciones en HFE están asociadas con la baja producción de hepcidina; es el origen genético más común en las hemocromatosis

Proteína	Función en el Metabolismo del Hierro	Influencia en la Infección
Receptores de Transferrina (TfR1y TfR2)	Transporta transferrina unida al hierro a las células; son sensores del estado del hierro a través de regulación de la HFE (principalmente en el hígado)	Su regulación negativa durante la infección reduce el hierro endosomal para el crecimiento microbiano (<i>Legionella</i> , <i>Mycobacteria</i>)
Lactoferrina	Esta presente en las secreciones para unir el hierro	Es liberada por los neutrófilos en el sitio de la infección para atrapar el hierro
Siderocalina (lipocalina-2 o Ngal)	Une los sideróforos de tipo catecolato y salicilato	Es liberado por los neutrófilos y el epitelio atrapando el hierro para limitar la infección
Nramp1	Transportador de metales divalentes localizados en la membrana fagosomal de los macrófagos	Confiere Resistencia a los patógenos intrafagosomales (<i>Mycobacteria</i> , <i>Leishmania</i> , <i>Salmonella</i>)

Tabla 2. Proteínas del Hierro Clave Involucradas en la respuesta inmune. Adaptado a partir del artículo Iron metabolism and the innate immune response to infection. Erin E. Johnson and Marianne Wessling-Resnick. *Microbes Infect.* | Marzo, 2012 | Volumen 14 | 3.

1.4. Purificación de proteínas

La expresión y subsecuente purificación de proteínas recombinantes constituyen prácticas ampliamente usadas en estudios de bioquímica. Un método muy efectivo involucra el uso de etiquetas de péptidos de afinidad, los cuales se fusionan a la proteína de interés y son usados para agilizar la purificación de la proteína mediante el uso de cromatografía de afinidad (Bornhorst y Falke, 2000).

1.4.1. Purificación por cromatografía de afinidad con metales inmovilizados (Ni-NTA)

El concepto de cromatografía de afinidad por metal inmovilizado (IMAC), ha sido formulada y demostrado su factibilidad por primera vez por Porath *et al.* en 1975. Fue basado en la conocida afinidad de los metales de transición, tales como el Zn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} y el Co^{2+} a la histidina y cisteína en soluciones acuosas (Hearon, 1948; en Block *et al.* 2009)

y fue extendido a la idea de que iones metálicos “fuertemente fijados” a un soporte para fraccionar soluciones de proteínas. Como ligando quelante usado para fijar el metal a la matriz de agarosa Porath usó ácido iminodiacético (IDA), el cual es usado actualmente en muchas resinas comerciales de IMAC. En años posteriores a la publicaciones de Porath, la nueva tecnología de IMAC fue evaluada exitosamente mediante la purificación de diferentes proteínas y péptidos. Lo que empezó como un fraccionamiento de suero crudo pronto se convirtió en lo que hoy es la técnica cromatográfica más ampliamente usada (Biocompare, 2006; Derewenda, 2004; en Block *et al*, 2009). Este desarrollo fue acelerado por la rápida maduración de las técnicas recombinantes y de la biología molecular moderna de finales de la década de 1970 y por la invención de un ligando quelante mejorado, el ácido nitrilotriacético (NTA, por sus siglas en inglés) en los 1980 (Hochuli *et al.*, 1987; en Block *et al*, 2009). Asimismo la purificación de proteínas recombinantes genéticamente modificadas a nivel de la secuencia de ADN para poder generar polipéptidos de polihistidinas empleando soportes a base de NTA (Hochuli *et al.*, 1988; en Block *et al*, 2009) representa la más importante aplicación de IMAC. El principal mecanismo de la interacción de la proteína marcada con etiqueta-His con un ion metálico inmovilizado se observa en la figura 5 (Block *et al*, 2009).

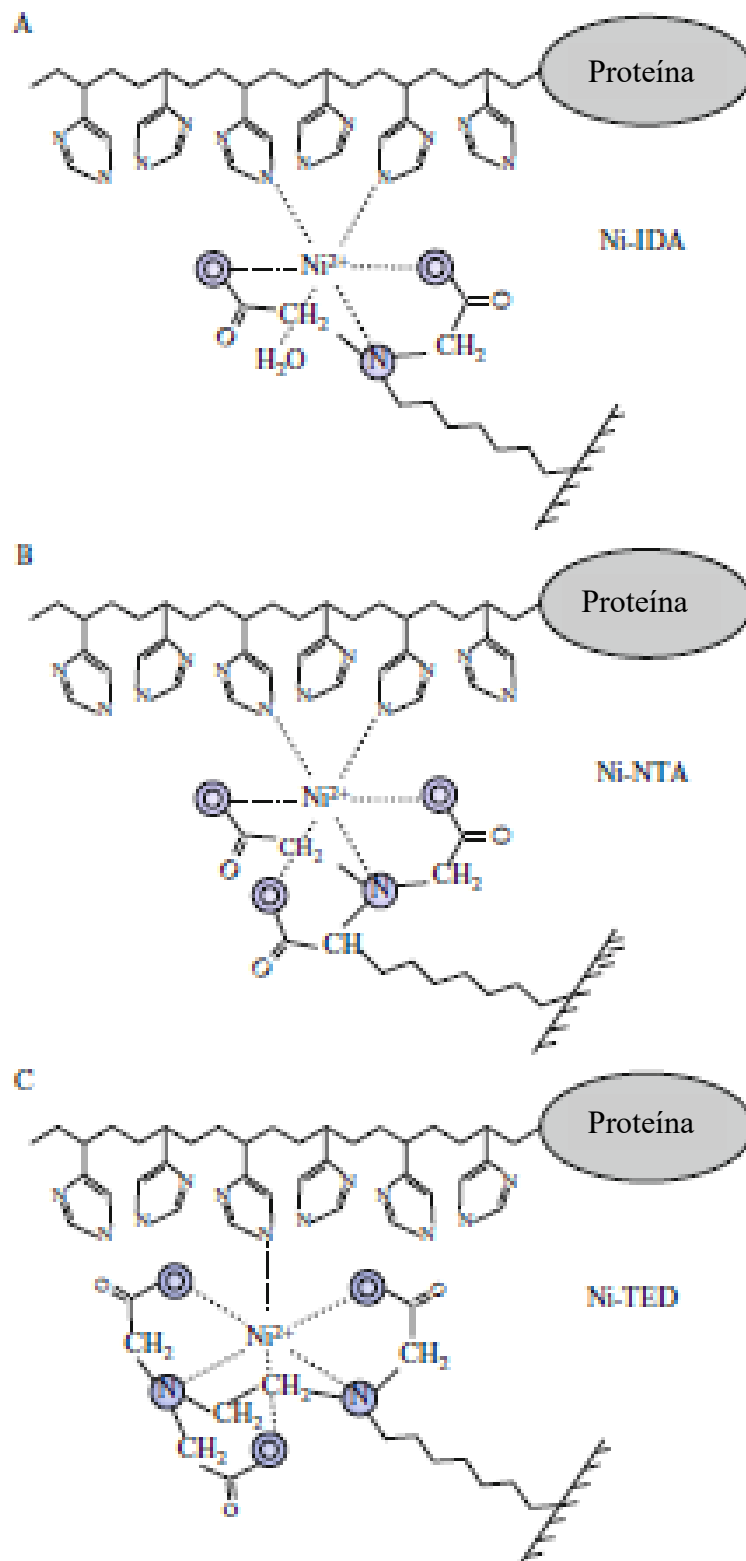


Figura 5. Modelo de interacción entre residuos de la etiqueta His y el ion metálico en los ligandos de IMAC tri- (IDA), tetra- (NTA) y pentadentado (TED). Adaptado a partir del libro Guide to protein purification, capítulo 27. Richard R. Burgess and Murray P. Deutscher | 2009 | Volumen 463 | 2.

Un posible modelo de la interacción del ion metálico con los residuos de histidina n y n+2 de una etiqueta His. Esto es confirmado por el hecho de que los ligandos de IMAC pueden unirse a las etiquetas His que constan de residuos de histidina continuos así como también a etiquetas alternantes. El ligando NTA coordina el Ni^{2+} con cuatro valencias (tetradentado, número de coordinación 4), como se muestra en la figura 5-B, y dos valencias están disponibles para la interacción con los anillos de imidazol de los residuos de histidina (Block *et al.*, 2009).

Esta proporción es la más efectiva para la purificación de proteínas etiquetadas con His. Otro ligando tetradentado es el carboximetil aspartato (CAM-Asp; Chaga *et al.*, 1999; en Block *et al.*, 2009), comercialmente disponible como resina de Talón cargada con cobalto. En contraste con los ligandos tetradentados, el IDA coordina un ion divalente con tres valencias (tridentado, número de coordinación 3) dejando tres valencias libres para la interacción con el anillo de imidazol, mientras que no está claro si la tercera es capaz de participar en la interacción. El número de coordinación parece jugar un papel importante en la calidad de la fracción de proteína purificada. Aunque la recuperación de proteína es usualmente similar entre la cromatografía basada en IDA y en NTA, se observa en general que hay una mayor lixiviación de iones del metal níquel de los ligandos de IDA en comparación con los ligandos de NTA (Hochuli, 1989; en Block *et al.*, 2009) e incluso se observa que aumenta en condiciones reductoras. Aunque el contenido de metal en las fracciones eluidas es mayor pero dentro del mismo orden de magnitud, lixivian significativamente más iones Ni^{2+} de la resina IDA en los pasos de equilibración y lavado. Además de una mayor lixiviación de metal, la purificación de proteínas con etiqueta His con las matrices de IDA, resultan en una menor pureza en comparación con la purificación basada en NTA (Block *et al.*, 2009).

La razón de la baja pureza puede ser que la lixiviación del metal del ligando tridentado genera grupos cargados los cuales pueden actuar como un intercambiador catiónico y uno grupos cargados positivamente en la superficie de las proteínas. La menor lixiviación de metal se obtiene si se emplea un ligando pentadentado el cual coordina los iones extremadamente fuerte y tales resinas pueden representar una alternativa válida si la

escasa lixiviación hacia la preparación de proteína es muy importante. No obstante, en este caso solo un sitio de coordinación está disponible para la unión de la etiqueta His y la recuperación de la proteína con etiqueta His es considerablemente menor que con IDA o con NTA (Block *et al.*, 2009).

La elección del ion metálico inmovilizado en el ligando IMAC depende de la aplicación. Mientras que los cationes trivalentes tales como Al^{3+} , Ga^{3+} y Fe^{3+} o tetraivalentes Zr^{4+} son preferibles para la captura de fosfoproteínas y fosfopéptidos, los iones divalentes Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} y Co^{2+} , son utilizados para la purificación de proteínas con etiqueta His. Las combinaciones del ligando tetradentado que aseguran una fuerte inmovilización y el ion metálico que deje dos sitios de coordinación libres para la interacción con los biopolímeros (Ni^{2+} , Co^{2+}) ha generado la mayor aceptación y genera una recuperación y pureza similar (Block *et al.*, 2009).

La histidina es el aminoácido que exhibe la interacción más fuerte con los iones metálicos inmovilizados en matrices, debido a que los grupos donadores de electrones en el anillo de imidazol forman fácilmente enlaces coordinados con el metal de transición inmovilizado. Los péptidos que contienen secuencias de residuos de histidina consecutivos son eficientemente retenidos en las matrices de las columnas de IMAC. Después del lavado del material de la matriz, los péptidos que contienen las secuencias de polihistidinas pueden ser fácilmente eluidos ya sea ajustando el pH de la columna o agregando imidazol libre al amortiguador de la columna (Schmitt *et al.* 1993; en Bornhorst y Falke, 2010). La IMAC es un método versátil que puede ser utilizado para purificar rápidamente proteínas marcadas para afinidad por polihistidinas, resultando en enriquecimientos de hasta cien veces en un solo paso de purificación. La pureza alcanzada en purificaciones por IMAC de proteínas marcadas puede alcanzar hasta un 95% en altos rendimientos. La purificación empleando marcaje de polihistidinas ha sido realizada exitosamente en numerosos sistemas de expresión, incluyendo *Escherichia coli*, *Sacharomyces cerivisiae*, células de mamífero y células de insecto infectadas con Baculovirus (Bornhorst y Falke, 2010).

1.5. Cuerpos de inclusión.

La amplia mayoría de purificación de proteínas ahora se hace mediante la clonación y expresión de proteínas recombinantes en un huésped apropiado. El huésped predominante es *E. coli*. Muchas proteínas expresadas se encuentran en una forma insoluble llamada “cuerpo de inclusión” o “IB, por sus siglas en inglés”. Ya que la proteína diana se encuentra relativamente pura en un cuerpo de inclusión lavado, el reto no es purificar la proteína diana, sino más bien solubilizar el cuerpo de inclusión y en plegar correctamente a la proteína en su conformación nativa, adquiriendo nuevamente su actividad biológica completa (Burgess, R. 2009).

Cuando las proteínas son expresadas en altos niveles en *Escherichia coli* y otros huéspedes de expresión, es común encontrar que la mayoría de la proteína no es soluble, si no que es una forma insoluble que se conoce como cuerpo de inclusión (IB, por sus siglas en inglés). Mientras que el mecanismo exacto para la formación del IB no se entiende completamente y puede variar para diferentes proteínas y condiciones de expresión, generalmente se piensa que las proteínas diana se están produciendo más rápidamente de lo que se pueden plegar en su estructura nativa. Si una proteína es plegada parcialmente o es plegada incorrectamente, tendrá generalmente regiones hidrofóbicas o “pegajosas” expuestas las cuales pueden interactuar con otras proteínas similares y formar agregados. Estos agregados forman IB que son cuerpos densos, refráctiles, con un diámetro de 0.2-0.5 μm . Una vez en un cuerpo de inclusión, la proteína se encuentra protegida del ataque proteolítico y es la proteína predominante. Los IB varían de estar constituidos principalmente de proteína nativa, relativamente fácil de solubilizar bajo condiciones suaves, a ser de proteínas mal plegadas y material irreversiblemente insoluble, que requiere de una alta concentración de agentes desnaturizantes para poderse solubilizar. Esta última categoría es la más común y la principal barrera para encontrar condiciones bajo las cuales la proteína desnaturizada pueda ser plegada eficientemente para obtener material nativo y activo (Burgess, R. 2009).

En los últimos 10 años, la iniciativa de estructura de proteínas (PSI, por sus siglas en inglés), a través de numerosos Centros de Genómica Estructural, clonó y expresó más de 110,000 proteínas (hasta diciembre del 2008), pero solo fueron capaces de purificar aproximadamente 29,000 (o el 26%); de estas las proteínas que pudieron ser expresadas en forma soluble en *E. coli*, fueron el 50% proteínas de origen Eubacteriano y Archeano y solo el 10% de origen eucariota (Burgess, R. 2009).

Algunos de los agentes solubilizantes más comunes son el hidrocloreto de guanidina, urea, sarkosyl y el dodesil sulfato de sodio. El hidrocloreto de guanidina es el agente solubilizante mas comúnmente usado, se emplea comúnmente en un amortiguador compatible a una concentración de 6 M. La mayoría de proteínas se desnaturalizan rápidamente en este agente caotrópico, pero en muchos casos puede ayudar el incubar a temperaturas mayores para alcanzar la solubilización completa. La urea es un agente solubilizador común, y es especialmente útil si se busca purificar posteriormente la proteína diana en el estado desnaturalizado (Knuth y Burgess, 1987; en Burgess, R. 2009). La urea a una concentración de 8 M, no es tan efectiva como el hidrocloreto de guanidina 6 M en solubilizar proteína y causar la desnaturalización completa. También se debe de tener precaución con la carbamilación de proteínas por el cianato que siempre está presente en soluciones de urea. Se ha encontrado que el sarkosyl es un agente solubilizante bastante efectivo que permite el replegamiento a mayores concentraciones de proteínas. El sarkosyl es un detergente aniónico fuerte, similar al dodecilsulfato de sodio (SDS, por sus siglas en inglés), pero parece unirse a las proteínas más débilmente y se disocia más fácilmente que el SDS. Usualmente, un pellet de IB puede solubilizarse en sarkosyl al 0.3%, pero no se puede solubilizar mas de aproximadamente el equivalente en peso de la proteína por peso de sarkosyl (Burgess, R. 2009).

La expresión de proteínas extrañas en altos niveles en *E. coli* comúnmente resulta en la formación de gránulos citoplásmicos o cuerpos de inclusión compuestos de agregados insolubles de la proteína expresada. Estos cuerpos de inclusión pueden verse por medio de un microscopio de contraste de fases y estos gránulos pueden separarse fácilmente del resto de los componentes celulares. Las células que expresan altos niveles de estas

proteínas foráneas son concentradas por centrifugación y lisadas por técnicas mecánicas, como la sonicación o por detergentes y lisozima. Los cuerpos de inclusión son recuperados por centrifugación y son lavados con Tritón X-100 y EDTA (Martson *et al.* 1984; en Sambrook *et al.* 2000) o mediante urea (Schoner *et al.* 1985; en Sambrook *et al.* 2000).

Algunos cuerpos de inclusión se encuentran casi en condición nativa y pueden ser solubilizados en condiciones moderadas por ejemplo mediante un detergente no iónico o incluso cloruro de sodio 0.5M; sin embargo en la mayoría de casos esto no funciona y se debe emplear condiciones desnaturalizantes mas fuertes (Burgess, R. 2009)

1.6. Fur

El regulador de la captación de hierro (Fur) es un regulador clave para la homeostasis del hierro, es una proteína rica en histidinas, ampliamente distribuida en las bacterias y cumple numerosos otros aspectos de la fisiología, incluyendo la tolerancia al ácido, el estrés oxidativo y factores de virulencia (Alhari *et al.*, 2006).

Los reguladores de la captación de hierro (Fur) forman una gran familia de proteínas de unión al ADN activadas por metales que controlan diversos conjuntos de genes a nivel transcripcional. *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causal de la tuberculosis, expresa dos miembros de la familia de Fur, designados Fur A y FurB. Aunque pertenecen a la misma familia, solo comparten aproximadamente el 25% de identidad en secuencias y como consecuencia, difieren significativamente en algunas funciones biológicas clave. FurA parece ser un regulador dependiente de hierro que controla al gen *KatG*, el cual codifica una catalasa-peroxidasa involucrada en la respuesta al estrés oxidativo en *M. tuberculosis*. La *KatG* es también una enzima clave responsable de la activación del fármaco de la primera línea de defensa contra la tuberculosis, la Isoniazida. FurB en contraste requiere de Zn^{2+} en vez de Fe^{2+} , para unirse a su secuencia blanco. El genoma de *M. tuberculosis* contiene genes para codificar para cuatro de estos reguladores pertenecientes a dos familias diferentes. El Regulador dependiente de Hierro (o IderR) y el

Represor regulatorio de hierro estafilococal (o SirR) pertenecen a la familia del represor de toxina de la difteria (DTxR, por sus siglas en inglés). FurA y FurB son miembros de la segunda familia, la familia del regulador de captación de hierro (Fur). IderR es una proteína esencial en *M. tuberculosis* y juega un papel central como regulador dependiente de hierro el cual controla una cohorte grande de genes codificantes de proteínas requeridos para la captación y almacenamiento del hierro. Fur fue identificado originalmente en *E. coli* donde actúa como un regulador global influenciando la expresión de aproximadamente 100 genes. Los miembros de la familia Fur afectan la expresión de un arreglo de genes, no solo asociados con la adquisición y almacenamiento del hierro, sino también involucrados en el metabolismo intermediario, en la regulación de funciones tan variadas como la respuesta al choque ácido, la detoxificación de radicales de oxígeno, la producción de toxinas y de factores de virulencia (Sala, 2003; Lucarelli, 2008).

Así como también en las respuesta a ambientes ácidos y al estrés oxidativo. Por otra parte, controlan la expresión de genes asociados a la virulencia de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas, de manera directa o indirecta. En el modelo de trabajo inicial se sugirió que Fur es activado por el ion férrico y después se une a la región del operador, una secuencia palindrómica de 19 pares de bases conocida como caja Fur. La unión a la región del operador de un gen regulado bloquea el acceso a la ARN polimerasa por lo tanto suprime la transcripción de los genes río abajo. Varios homólogos de Fur, incluyendo Fur de *E. coli* (Fur_{EC}) contienen por lo menos un ion de Zn^{2+} fuertemente unido que se cree cumple una función estructural en vez de reguladora. Por otra parte, ciertos miembros de la familia Fur son activados por metales de transición divalentes, diferentes del Fe^{2+} , los cuales incluyen el zinc, níquel y manganeso. Por lo tanto, tales miembros se han nombrado Zur, Nur y Mur, lo cual denota que estos miembros de la familia son capaces de unirse selectivamente a un metal de transición divalente diferente del Fe^{2+} para activar la función de unión al ADN. Adicionalmente, Fur también actúa como factor de regulación positiva, en vez de un represor clásico. Mientras que se han propuesto diferentes mecanismos para este tipo de regulación, en varios patógenos bacterianos, los homólogos de FUR suprimen directamente la expresión de ARNs no-codificantes pequeños, nombrados RyhB en *E. coli* y *V. cholerae*, PrrF en *P. aeruginosa* y NrrF en *Neisseria meningitidis* que a su vez

suprimen la expresión de ciertos genes. Bajo condiciones de inanición de hierro RyhB se expresa rápidamente y es estabilizado por la chaperona de ARN Hfq. El ARN de hebra sencilla en el complejo ARN-Hfq entonces se aparea con el ARN mensajero lo cual lo hace susceptible a la degradación (Lucarelli, 2008).

El gen *furA* está localizado corriente arriba del gen *katG* que codifica para una catalasa-peroxidasa. KatG está involucrado en la respuesta al estrés oxidativo y es un factor de virulencia significativo de *M. tuberculosis*. FurA es co-expresado junto con *katG* y auto-suprime su expresión mediante una secuencia única corriente arriba del gen *furA*. Aunque hay indicaciones de que esta proteína está involucrada en la regulación de otros genes, el papel biológico de FurA, en contraste con el papel de la mayoría de miembros de esta familia, parece ser más especializado. FurA puede representar un sensor de peróxido dependiente de metales similar al represor del regulón de peróxido PerR que ha sido extensamente caracterizado en *B. subtilis*. Ambas proteínas comparten una similitud de secuencia de aproximadamente 28%. PerR_{BS} adopta un pliegue similar a Fur_{PA} y contiene un Zn²⁺ estructural y un sitio regulatorio de unión Fe²⁺/Mn²⁺. Una vez activado y unido a su secuencia de ADN blanco, el regulador detecta el estrés oxidativo por la oxidación de la histidina catalizada por el hierro, lo que conduce a la pérdida de la actividad de unión al ADN. FurA es de particular importancia médica debido a que controla una proteína central para la terapia de la Tuberculosis. Aunque FurA y FurB pertenecen a la misma familia solo comparten una identidad de secuencia de aproximadamente el 25%. Por lo tanto, mientras es posible que tengan una similitud estructural en general, es probable que difieran en ciertos elementos clave de sus estructuras. Por ejemplo, algunos detalles estructurales difieren en el tipo metal de unión mientras que otros son críticos para el reconocimiento de motivos de secuencias de ADN en los operadores de los genes que regulan. (Lucarelli, 2008).

Se sabe que el nivel de hierro en el ambiente regula la expresión de genes codificando para muchas rutas de captación de hierro bacterianas de alta afinidad. Bajo condiciones ricas en hierro, la proteína Fur es activada cuando se une al Fe(II) como cofactor. Este represor activado, es entonces capaz de unirse a la “caja de hierro”, una

secuencia consenso localizada en la región del promotor de muchos genes bacterianos. En condiciones de privación de hierro, la proteína Fur no se une a la secuencia del promotor, permitiendo la transcripción de los genes. Se han encontrado muchos homólogos de Fur en muchas bacterias Gram-negativas. Sus secuencias parecen estar bien conservadas, con un alto grado de homología con respecto a la primera proteína Fur descubierta en *E. coli*, varían en esta homología de un 49% para la Fur de *Neisseria gonorrhoeae* hasta un 76% para la proteína Fur de *Vibrio vulnificus*. El homólogo de Fur de *M. tuberculosis* muestra menos identidad a las proteínas Fur de *E. coli* (22.9%), *Legionella pneumophila* (28.4%) y *N. gonorrhoeae* (25.4%). Originalmente se pensó que solo era un represor negativo, pero ahora se sabe que Fur también regula positivamente varios genes en *E. coli* y *Salmonella typhimurium*. Fur también actúa como un regulador global afectando la expresión de genes en respuesta a otras señales a parte de los niveles de hierro. Además, Fur puede ser parte de una cascada de elementos de control en los cuales regula la expresión de elementos regulatorios secundarios (Wong, 1999).

La respuesta al estrés oxidativo en micobacterias difiere de la inducción dependiente de OxyR observada en las bacterias Gram-negativas. Indudablemente, tanto *M. tuberculosis* como *Mycobacterium smegmatis* carecen de un gen OxyR funcional. En todas las especies de micobacterias estudiadas, la región de ADN inmediatamente corriente arriba de los genes *KatG* está altamente conservada y codifica el gen *furA*, sugiriendo el presunto involucramiento de la proteína FurA en la regulación de *katG*. Recientemente, Zahrt y otros demostraron que en *M. smegmatis* un mutante con FurA inactivado sobre-expresaba la catalasa-peroxidasa *KatG* y que este fenotipo alterado es complementado por la expresión de FurA; por lo tanto, FurA parece ser un regulador negativo de *katG*. Las proteínas de tipo FurA son represores transcripcionales que exhiben una actividad de unión a ADN dependiente del Fe^{2+} y regulan varios genes del metabolismo del hierro. Hay una íntima relación entre el metabolismo del hierro y el estrés oxidativo: indudablemente, los efectos citotóxicos de las especies reactivas de oxígeno son en gran medida mediados por el hierro y se ha demostrado en varios estudios que los reguladores de *E. coli* involucrados en la respuesta al estrés oxidativo, OxyR y SoxRS, activan la expresión de Fur, el represor global de la captación de hierro. Los mutantes de *E. coli* Δfur son más sensibles al peróxido de

hidrógeno de lo que lo son las cepas con un Fur funcional. En *M. smegmatis*, la sensibilidad al peróxido de hidrógeno se ve aumentada con la privación del hierro; en *Staphylococcus aureus*, Fur es necesario para la resistencia al estrés oxidativo y en *Streptomyces spp.*, las proteínas tipo Fur regulan los genes de catalasa-peroxidasa en una manera dependiente del hierro. La inspección de la secuencia de esta región revela la presencia de un marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés) que se predice que codifica para un polipéptido de 153 aminoácidos, con una masa molecular calculada de 17 kDa, con homología a las proteínas Fur. El gen fue nombrado *furA*, por analogía con los otros genes de fur localización corriente arriba en las micobacterias. Una secuencia Shine-Dalgarno está presente corriente arriba de *katG*, mientras que no hay una secuencia típica Shine-Dalgarno en la secuencia corriente arriba de *furA*. Milano y otros, clonaron y secuenciaron la región corriente arriba de *katG* de *M. smegmatis* y encontraron que contiene el gen *furA*, el cual codifica para la proteína FurA, una de las dos proteínas de tipo Fur identificadas en el genoma de *M. tuberculosis*. Zahrt y otros recientemente secuenciaron la misma región de *M. smegmatis* (Núm. de acceso del Gen Bank o banco de genes AF012631). Las proteínas FurA deducidas de estas dos secuencias difieren en algunos residuos, con FurA deducida de la secuencia con mayor similitud con el FurA de *M. tuberculosis*. La proteína FurA de *M. smegmatis* conserva tanto el dominio de unión hélice-vuelta-hélice como el dominio de unión al metal, sugiriendo que esta proteína puede llevar a cabo las funciones regulatorias en respuesta a condiciones de estrés, tales como la privación de hierro o el estrés oxidativo (Milano, 2001).

La organización de *furA-katG* esta conservada en muchas micobacterias, así como también en los estrechamente emparentados *Streptomyces coelicolor* y *Streptomyces reticuli*, y el papel regulatorio para la proteína FurS en la expresión de la catalasa-peroxidasa ha sido demostrada previamente en los estreptomicetos. La región altamente homóloga corriente arriba del gen *furA* se ha encontrado en varias micobacterias (*Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium fortuitum* y *Mycobacterium leprae*) y en *S. reticuli* corriente arriba de *furS*. Se ha demostrado que FurS, el equivalente de FurA en *Streptomyces*, se une a esta región de una manera redox-dependiente. Durante el estrés

oxidativo, el FurA oxidado puede perder su actividad de unión al ADN, permitiendo la transcripción a partir de *pfurA* (Milano, 2001).

Estas observaciones conducen a que las proteínas reguladoras tipo Fur, no solo sean consideradas represores transcripcionales, sino también reguladores globales. En *E. coli* la proteína Fur (17 kDa) contiene dominio de unión al ADN no clásico de hélice-giro-hélice y es activa como homodímero. En los ensayos in vivo se ha mostrado que el dominio N-terminal está involucrado en la unión al ADN y el dominio C-terminal está involucrado en la dimerización. El análisis bioquímico indica que la activación del represor ocurre debido a un cambio conformacional por la unión del metal al dominio C-terminal. La proteína Fur contiene dos sitios de unión a metales: el sitio regulatorio de unión al hierro y un sitio de unión al zinc que juega un papel en la estabilidad de la proteína. Varias proteínas sensoras-redox de la familia Fur han sido identificadas en varias bacterias. Su papel en la respuesta al estrés oxidativo, puede ser mediada por la oxidación catalizada por el metal en la proteína o por un cambio en el estado de oxidación del metal. Tal como es el caso de CatR en *Streptomyces coelicolor*, el cual regula su propio gen y la catalasa CatA, uniéndose a las secuencias del operador corriente arriba de sus promotores bajo condiciones reductoras. Similarmente, en *Streptomyces reticuli*, FurS en la forma tiol-reducida se une específicamente a una secuencia corriente arriba del gen *furS*. El gen *furA* ha sido identificado en *Mycobacterium tuberculosis* así como también en varias especies de micobacterias. FurS de *S. reticuli* y FurA de *M. tuberculosis* muestran una identidad del 53% y las estructuras secundarias predichas para ambas proteínas son similares (Sala, 2003).

La presencia de un promotor inducible por estrés oxidativo, corriente arriba del gen *furA*, se ha reportado previamente para *M. tuberculosis*, *Mycobacterium smegmatis* y *Mycobacterium bovis* BCG. En *M. bovis* BCG, el extremo 5' del transcrito de *furA* fue mapeado en correspondencia con el codón de inicio del gen *furA*. Una región rica en AT de 23 pb traslapándose con la región -35 de *pfurA*, se identificó y se encontró que está ampliamente conservada dentro de las micobacterias (Sala *et al.*, 2003).

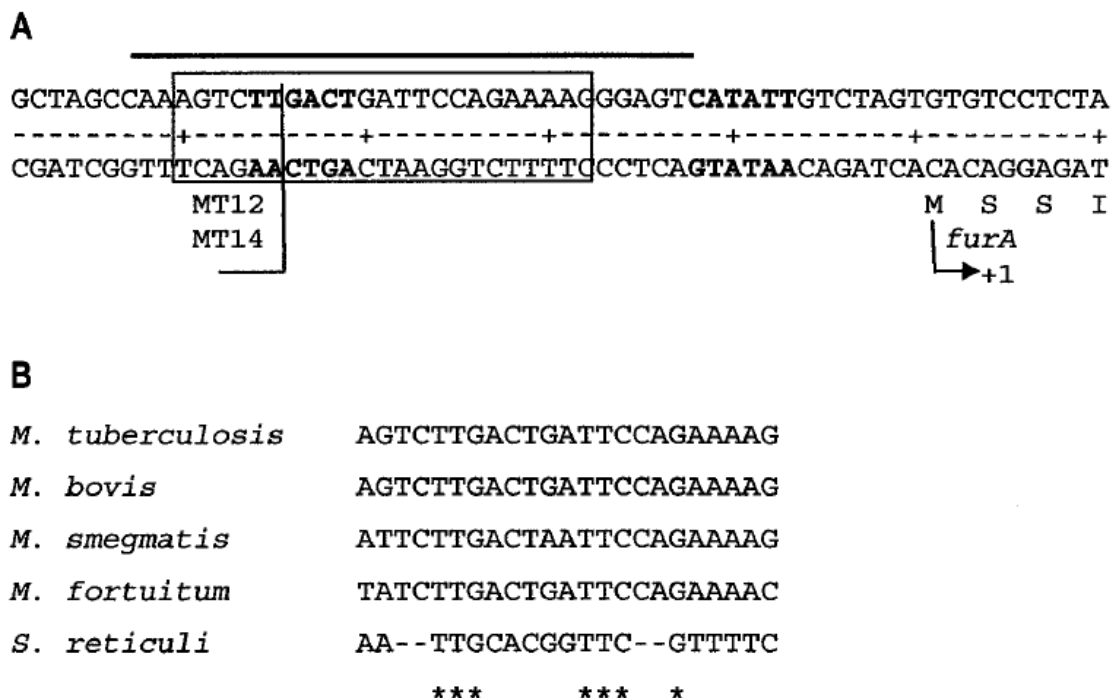


Figura 6. Secuencia del fragmento de ADN de *M. tuberculosis* conteniendo el promotor inducible por estrés oxidativo. A) Secuencia de la región -50/+10 de *M. tuberculosis*. Las coordenadas son arbitrarias, en donde +1 corresponde al primer nucleótido del gen *furA*. Las secuencias -35 y -10 están remarcadas en negritas. Le región rica en AT de 23pb está en recuadro. Los extremos de los fragmentos clonados en MT12 y MT14 se indican. La región protegida por FurA se indica con una línea por encima de la secuencia. B) Alineamiento de las regiones ricas en AT río arriba de *furA* en *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. smegmatis* y *M. fortuitum* y la secuencia río arriba de *furS* en *S. reticuli*. Las bases conservadas se indican con asteriscos. Adaptado a partir del artículo Mycobacterium tuberculosis FurA Autoregulates Its Own Expression. Claudia Sala, Francesca Forti, Elisabetta Di Florio, Fabio Canneva, Anna Milano, Giovanna Riccardi y Daniela Ghisotti. JOURNAL OF BACTERIOLOGY. Septiembre, 2003. Volumen 185. Edición No. 18

Fur es un dímero en solución, con cada monómero de 17 kDa y cada uno conteniendo dos sitios de unión a metales: una para un ion estructural de Zn (II) y otro para la asociación reversible del Fe (II) bajo condiciones ricas en hierro. Esta asociación con el Fe(II) reposiciona el dominio N-terminal en una configuración abierta, la cual se asocia con el ADN en un sitio consenso de 19-pb con la secuencia 5'-GATAATGATAATCATTATC-3'. Esta secuencia consenso fue derivada del alineamiento de múltiples secuencias de operones regulados por Fur, muchos de los cuales fueron seleccionados por análisis de titulación o por ciclos de selección. La unión a Fur ha sido analizada en detalle por una variedad de técnicas de análisis de huella, por análisis espectroscópicos y por microscopía

de fuerza atómica. Originalmente, se había propuesto que Fur reconocía esta secuencia como unas repeticiones de 9-pb invertidos por un solo par de bases (ver modelo clásico en Fig. 7); no obstante datos más recientes sugieren que el consenso es reconocido como tres unidades hexaméricas adyacentes de la secuencia 5'-GATAAT-3' (ver modelo hexamérico en Fig. 7) La habilidad de Fur de unirse a fragmentos de ADN sintético conteniendo de uno a cinco hexámeros adyacentes en la misma orientación fue probada en varios modelos en ensayos *in vitro*, incluyendo la retardación en gel, el footprinting de radical hidroxilo y de ADNasa I y por contactos "T perdidos". Estos estudios muestran que un mínimo de tres hexámeros adyacentes se requieren para la unión inicial y que otros hexámeros adicionales incrementan la afinidad de Fur por la secuencia. La secuencia de unión de Fur contiene dos hexámeros en orientación delantera separados por un solo par de bases de un tercer hexámero en orientación reversa; este arreglo fue también probado en estudios de hexámeros. Un nuevo modelo para las interacciones de Fur con el ADN ha sido propuesto recientemente, basado en estudios de unión *in vitro* entre la Fur purificada y de tipo salvaje y la región del promotor *fepD-entS* en sus formas mutada y de tipo salvaje en *E. coli*. Estos datos indican que el consenso de 19-pb está organizado en secuencias traslapantes de 13 porciones, con cada unidad de 13 porciones conteniendo los hexámeros invertidos 5'-GATAAT-3' interrumpidos por un solo nucleótido. En este modelo de unión de dímeros traslapantes, se predice que Fur interactúa con este sitio como dos dímeros posicionados en caras opuestas de la hélice de ADN. Esta interacción es similar a la que se ha visto en DtxR, un regulador transcripcional en las bacterias gram-positivas con función homóloga a la de Fur. DtxR y Fur no presentan homología significativa a nivel de secuencia. Pero sus estructuras secundarias predichas son muy similares, especialmente en los dominios N-terminal de unión al ADN (Lavrrar y McIntosh, 2003).

Fur, al igual que DtxR, contiene un patrón ala-hélice para la unión al ADN, un motivo o patrón encontrado en aproximadamente 50 reguladores transcripcionales, tanto en eucariotas como procariotas. Este patrón consiste de tres hélices- α seguidas de una lamina- β antiparalela, con la hélice interactuando con bases específicas de ADN en el surco mayor del sitio de unión y la lamina- β (formando un "ala") haciendo contacto secundario con el ADN en el surco menor. Evidencia adicional sugiere que los dominios de unión al ADN de

Fur y DtxR sufren cambios conformacionales similares después de la unión con el metal, causando que la región N-terminal se repositone para permitir la asociación con el ADN blanco. Las proteínas muestran patrones similares en la técnica footprint, con protección de una secuencia de 30-pb a 35-pb centrada alrededor de la secuencia consenso de 19-pb. La cristalografía de rayos-X de DtxR unido al ADN muestra que se une a la secuencia consenso como dos dímeros traslapantes en caras opuestas de la hélice. El modelo del dímero traslapante también explica porque Fur, una proteína rígida, es capaz de hacer contacto en ambos lados de la hélice de ADN (Lavrrar y McIntosh, 2003).

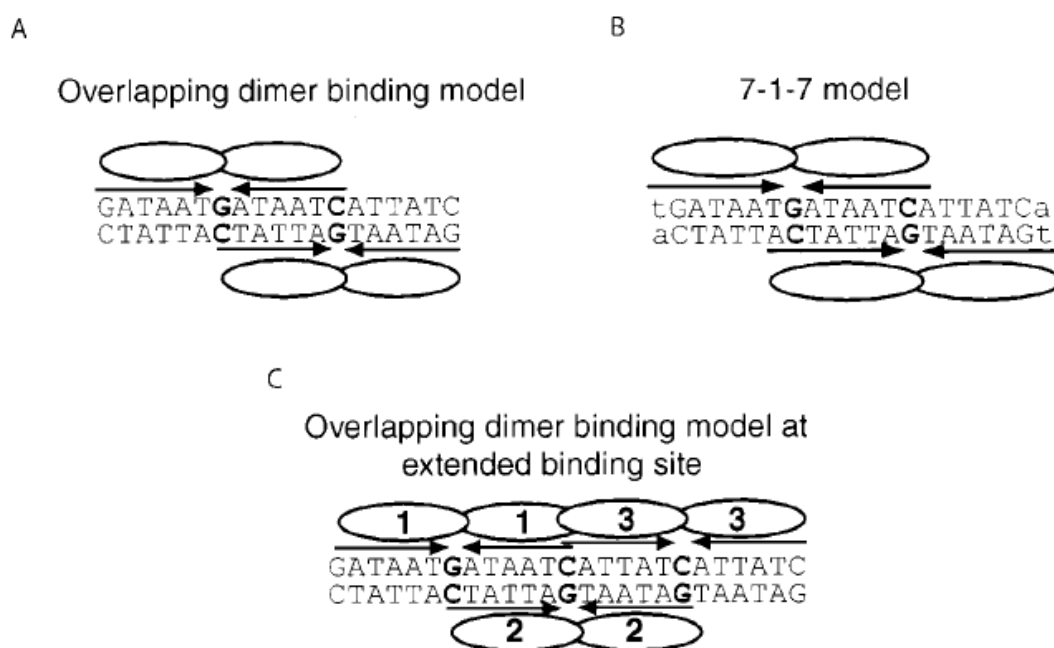


Figura 7. Modelos para las interacciones de Fur-ADN. A) Representa el modelo de unión de dímero traslapante. En este modelo, cada monómero (mostrado como un óvalo) se une al hexámero invertido, mostrado como una flecha, con dos dímeros requeridos por unión a la región consenso de 19-pb, de tal manera que F-F-x-R se refiere en general a la arquitectura del sitio de 19-pb. Los espaciadores C:G se muestran en letras negritas. B) Muestra el modelo 7-1-7, como fue descrito recientemente. Las flechas representan los heptámeros reconocidos por cada monómero del dímero. Las bases en negritas representan la base que separa a cada heptámero en una unidad. C) Es una aplicación del modelo de unión del dímero traslapante a un sitio de unión extendido, tal como se describe en el texto. Los espaciadores de pares de bases C:G se muestran en negritas. Los números 1, 2 y 3 se refieren a los dímeros 1, 2 y 3 como se describe en el texto. Adaptado a partir del artículo Architecture of a Fur Binding Site: a Comparative Analysis. Jennifer L. Lavrrar y Mark A. McIntosh. JOURNAL OF BACTERIOLOGY. Abril, 2003. Volumen 185. Edición No. 7.

Lavrrar *et al.* (2003) en base a resultados obtenidos proponen el modelo de unión de dímero traslapante, sugiriendo que la secuencia consenso de 19-pb consiste de secuencias de 13-meros, con cada 13-mero en caras opuestas de la hélice (Fig. 7A). Estudios recientes con Fur de *Bacillus subtilis* sugieren que Fur reconoce la secuencia consenso como dos repeticiones invertidas 7-1-7 las cuales se traslapan por 9 pb (Fig. 7B), de tal manera que un sitio de 21-pb es requerido para las interacciones de alta afinidad. El modelo 7-1-7 se considera para la región del par espaciador C:G en la secuencia consenso y sugiere que otro par espaciador C:G, localizado en la posición 8 de la secuencia, es también importante. Además, la mayoría de los reguladores bacterianos son diméricos en naturaleza y se unen a operadores consistiendo de repeticiones invertidas, con cada monómero reconociendo una de estas repeticiones. El modelo 7-1-7 sugiere que el sitio mínimo de unión para que los dos dímeros se unan es una secuencia consenso de 19-pb flanqueada por una T en el extremo 5' y una A en el extremo 3' y estas bases están usualmente presentes en muchos sitios de unión de Fur en *E. coli*. Una exanimación de los presuntos sitios de unión de Fur a través del genoma de *E. coli* muestra que la mayoría de sitios pueden contener regiones de unión traslapantes. Lavrrar *et al.*, en el mismo estudio también sugiere que los sitios de unión traslapantes pueden permitir la asociación de dímeros adicionales (Fig. 7C). Los sitios de traslape permitirían la asociación de por lo menos un dímero adicional, aunque otros dímeros pudieran fácilmente asociarse corriente arriba del sitio de unión inicial, dependiendo de la conservación del sitio de unión inicial en sí mismo y de la riqueza de A-T de la secuencia corriente arriba. El sitio de unión para el dímero 3 se traslapa con la del dímero 1, lo cual indica que ocurren interacciones proteína-proteína entre los dímeros conforme mas se asocian a la secuencia. Estas interacciones proteína-proteína permitirían la polimerización fácilmente de la proteína con el ADN, conforme dímeros adicionales pudieran asociarse con secuencias de ADN menos conservadas dependiendo de interacciones proteína-proteína. El modelo de unión del dímero traslapante muestras como la proteína dimérica puede reconocer su secuencias de unión como hexámeros invertidos en oposición a hexámeros directos (Lavrrar y McIntosh, 2003).

M. tuberculosis contiene cuatro reguladores dependientes de hierro potenciales pertenecientes a dos familias diferentes de proteínas metaloreguladoras. Dos genes, *furA* y

furB, codifican para proteínas de la familia Fur, mientras que IdeR y SirR son miembros de la familia de la toxina diftérica represora (DtxR, por sus siglas en inglés), IdeR es el único de estas proteínas micobacterianas que ha sido bien caracterizado en cuanto a estructura y función. Es una proteína de unión a metal y a ADN. Como Fur y DtxR, IdeR une hierro y después interactúa con una secuencia específica en las regiones de los operadores de los genes regulados por hierro para controlar su transcripción. El papel de IdeR en la regulación del hierro fue demostrado por primera vez en *Mycobacterium smegmatis*, en la cual se encontró que IdeR es responsable de la represión de sideróforos dependientes de hierro, este gen es esencial en las micobacterias y está relacionado también al estrés oxidativo y a la producción de sideróforos dependientes de hierro (Rodríguez *et al.*, 2002).

La proteína Fur de *E. coli* fue detectada como un regulador del transporte del hierro y la biosíntesis de sideróforos. Después se encontró que Fur además regulaba los genes de la respuesta al estrés oxidativo, al metabolismo del hierro y a determinantes de virulencia de bacterias patogénicas. Esta proteína actúa principalmente como un represor con el Fe^{2+} como correpresor. El dominio N-terminal contiene un patrón o motivo hélice-vuelta-hélice necesario para la unión a la secuencia palindrómica del sitio del operador llamado también caja Fur la cual se encuentra principalmente en los promotores de los genes regulados por hierro. La mitad C-terminal de Fur contiene un pequeño grupo de histidinas y cuatro cisteínas, dos de las cuales se unen al zinc. El Fe^{2+} está unido por histidina y aspartato o glutamato (Hantke, 2002).

En la secuencia del genoma de *Bacillus subtilis* se encuentran tres genes tipo *fur*, uno llamado *fur*, regulando la captación de hierro, el segundo llamado *perR* (en inglés: peroxide regulon repressor), regulando la respuesta al estrés oxidativo y el tercero llamado *zur* regulando los genes de la captación de zinc (Hantke, 2002).

El promotor *sodA* contiene dos cajas de hierro y la transcripción de *sodA* se ha demostrado que es reprimida por Fur de una manera dependiente de hierro. Unos pocos casos de activación mediada por Fur han sido reportados. Fur activa la expresión de *ftn* y *bfr* (almacenamiento del hierro), *acnA* y *fumA* (ciclo de Krebs) y *sodB* (FeSOD). Los

efectos positivos de Fur han sido detectados por análisis del proteoma después del estrés ácido (Dubrac y Touati, 2002).

La mayoría de proteínas que utilizan el patrón o motivo de unión al ADN de hélice-vuelta-hélice interactúan con los operadores cerca de las 12-pb de largo en vez de las 19-pb de largo. Similarmente, el grado de interacción de Fur con el ADN, como se visualiza empleando la técnica footprinting con ADNasa I, es típicamente de 30 pb y corresponde a tres vueltas de la hélice en vez de las dos esperadas. Finalmente, Fur y los homólogos de Fur comúnmente despliegan regiones extendidas de unión al ADN, particularmente a concentraciones más altas de proteínas. La relación entre la secuencia consenso de 19-pb de la caja Fur y la tendencia de Fur a polimerizar en el ADN no ha sido resuelta (Baichoo y Helmann, 2002).

Las similitudes entre Fur y DtxR son incluso más aparentes cuando la estructura de los sitios del operador es considerada. Ambas proteínas reconocen operadores inicialmente definidos como secuencias invertidas repetidas de 19-pb conduciendo a un footprint con ADNasa I típico de 30 pb. El operador de DtxR ahora se concibe como dos repeticiones invertidas traslapadas con una simetría 7-0-7 compensado por 5 pb. Por lo tanto, el reconocimiento de DtxR es mediado por dos proteínas que se unen a caras opuestas de la hélice de ADN (ver figura 8). El reconocimiento del ADN es mediado por el contacto directo entre los aminoácidos y las orillas de las bases en el surco mayor y por contacto con los fosfatos del esqueleto de azúcares en el ADN (Baichoo y Helmann, 2002).

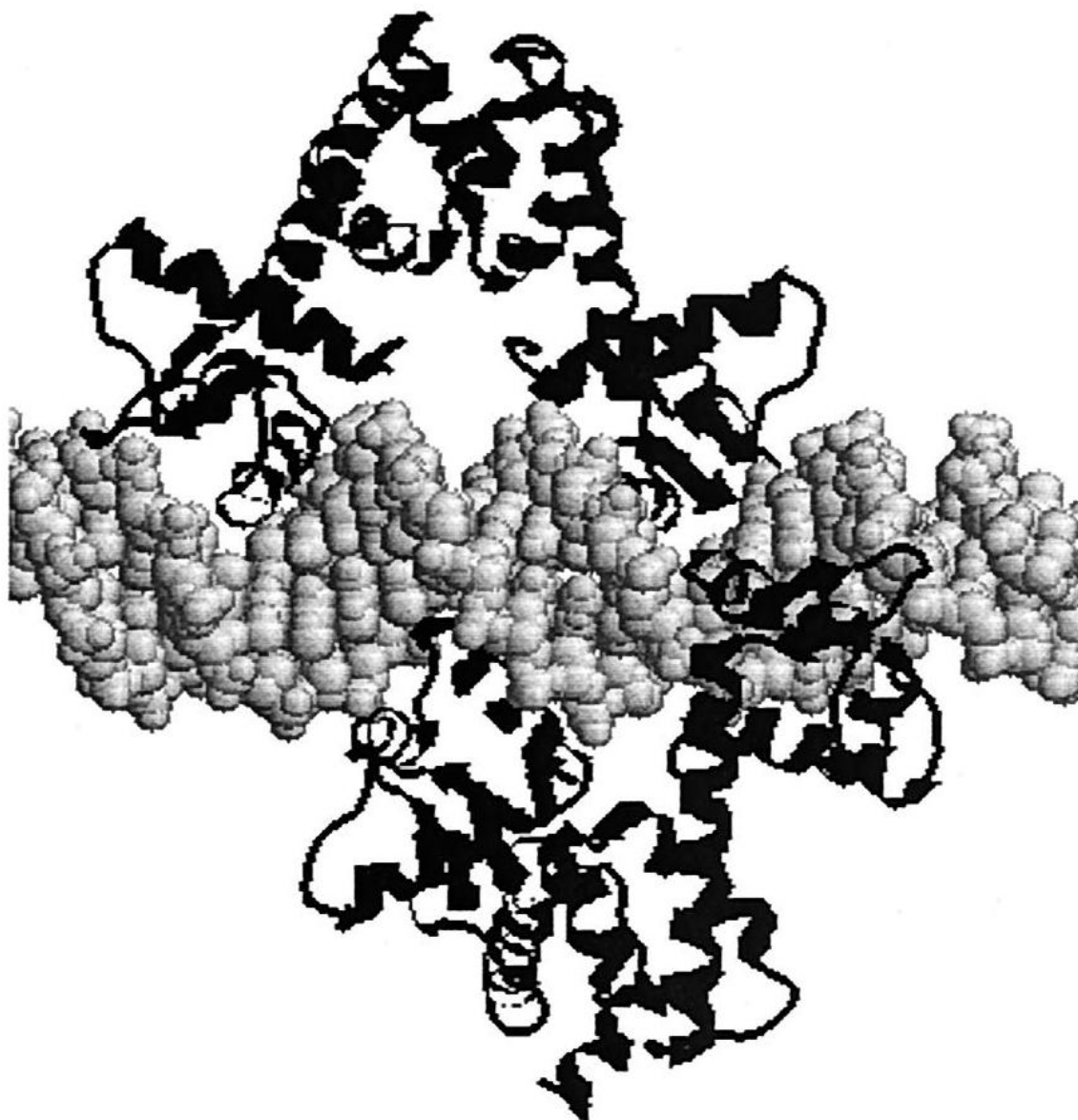


Figura 8. Modelo del complejo formado entre DtxR y el operador de ADN, ilustrando el papel de dos dímeros de DtxR en el reconocimiento. Adaptado a partir del artículo Recognition of DNA by Fur: a Reinterpretation of the Fur Box Consensus Sequence. Noel Baichoo y John D. Helmann. JOURNAL OF BACTERIOLOGY. Noviembre, 2002. Volumen 184. Edicion No. 21.

2. JUSTIFICACION

Dado que la función de MAP3773c no se conoce, es necesario obtener cantidades suficientemente abundantes de esta proteína para poder realizar estudios *in vitro* e *in vivo* a cerca de su actividad y de su papel o función dentro de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*.

3. HIPÓTESIS

MAP3773c se expresa en *E.coli* BL21(DE3) con el plásmido pRSET-MAP3773c y por lo tanto se puede purificar.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Elaborar un protocolo de purificación que permita la obtención de MAP3773c de MAP en cantidades suficientes para estudios de funcionalidad ulteriores.

4.2. Objetivos específicos

- Confirmación del inserto MAP3773c en el plásmido de expresión en *E. coli* pRSET-A mediante PCR.
- Purificar el plásmido de expresión en *E. coli* pRSET-A que contenga MAP3773c.
- Secuenciar el plásmido de expresión en *E. coli* pRSET-A que contenga MAP3773c una vez purificado.
- Expresar la proteína MAP3773c, por inducción con IPTG.
- Purificar la proteína MAP3773c por medio de una columna agarosa Ni-NTA.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Oligonucleótidos iniciadores empleados en la secuenciación de MAP3773c.

Los oligonucleótidos iniciadores utilizados empleados en la secuenciación del inserto de MAP3773c fueron los siguientes:

Delantero: 5' - TAATACGACTCACTATAGGG - 3'

Reverso: 5' - GCTAGTTATTGCTCAGCGG - 3'

5.2. Amplificación por PCR del Inserto del gen MAP3773c clonado en pRSETA para la confirmación del inserto.

Se realizó la amplificación del gen MAP3773c bajo las siguientes condiciones descritas en la Tabla 3 y con las condiciones de temperatura descritas en la Tabla 4. La reacción de amplificación se llevó a cabo en un Termociclador marca Eppendorf.

Tabla 3. Condiciones de PCR para MAP3773c.

Reactivos	Cantidades (1 reacción)	Cantidades (4 reacciones)
dNTP'S	1.5 µl	6 µl
Amortiguador 10X	2.5 µl	10 µl
Oligonucleótido R	2.5 µl	25 µl
Oligonucleótido F	2.5 µl	25 µl
DMSO	1.25 µl	5 µl
Agua estéril	12.25 µl	49 µl
Taq polimerasa	0.25 µl	1 µl
ADN	2 µl	8 µl*

Las condiciones de temperatura para MAP3773c en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fueron las siguientes:

Tabla 4. Condiciones de temperatura de PCR para MAP3773c.

Temperatura	Tiempo estimado	
94 °C	10 minutos	
94 °C	30 segundos	} 30 ciclos
63 °C	30 segundos	
72 °C	30 segundos	
72 °C	10 minutos	

Todas las reacciones de PCR se hicieron a un volumen final de 25µL, utilizando como control positivo el plásmido pRSET-MAP3773c, previamente purificado y como control negativo agua estéril exclusivo para biología molecular de SIGMA. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio.

5.3. Purificación del plásmido pRSET con el inserto de MAP3773c para su secuenciación.

Empleando el kit PrepEase™ Plasmid Purification (USB Corporation, Núm. de parte: 78700/1) se procedió a obtener el plásmido purificado de la siguiente manera:

1. Se preparó un cultivo de la clona 3 de *E.coli* BL21(DE3) con el plásmido pRSET-MAP3773c.

Se inoculó con una colonia bacteriana aislada a partir de una placa reciente 10 mL medio Luria Bertani (LB) LB Broth MILLER, EMD Millipore, USA, suplementado con 50mg/mL de ampicilina. Incubar durante la noche a 37°C con agitación durante 12-16 horas.

2. Cosecha de las células bacterianas.

Se cosechó el cultivo bacteriano por centrifugación a 4,500 x g por 15 min at ambiente. Se descartó el sobrenadante cuidadosamente.

Nota: Mientras se cosechaba el cultivo, se puso a enfriar el amortiguador S3 a 4°C y se disolvió la ARNasa A en Amortiguador S1.

3. Lisis celular.

- a. Se resuspendió el pellet de las células bacterianas en 0.4 mL de Amortiguador S1 con ARNasa A.

b. Se agregó 0.4 mL de Amortiguador S2 a la suspensión, mezclando suavemente por inversión del tubo 8 veces. Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 3 min.

c. Se agregó 0.4 mL de amortiguador S3 pre-enfriado (4°C) a la suspensión. Se mezcló inmediatamente el lisado por inversión del tubo 8 veces, hasta que en la suspensión homogénea se formara un floculado blanquecino. Se incubó la suspensión en hielo por 5 min.

Nota: Se equilibró la columna durante este tiempo.

4. Equilibración de la columna.

Se equilibró la columna con 1 mL de amortiguador N2, dejando que la columna se vaciara por gravedad.

5. Clarificación del lisado.

Se centrifugó la suspensión a 12,000 x g por 15 minutos a 4°C.

6. Unión del plásmido a la columna.

Se cargó la columna con el lisado clarificado del paso 5 en la columna PrepEase™ Equilibrada, dejando que la columna se vaciara por gravedad.

7. Lavado de la columna

Se lavó la columna con 1.5 mL de amortiguador N3, repitiendo una vez este paso.

8. Elución del ADN.

Se eluyó el plásmido de ADN con 1 mL de Amortiguador N5.

9. Precipitación del ADN

Se agregó 1.5 mL de isopropanol a temperatura ambiente, se mezcló y centrifugó a 15,000 x g por 30 min a 4°C.

10. Lavado y Secado del pellet o paquete de ADN.

Se agregó 500 µl de etanol al 70%, dando vortex brevemente y centrifugando a 15,000 x g por 10 min a temperatura ambiente.

b. Se removió el etanol del tubo con una pipeta, dejando que el pellet o paquete celular se secara a temperatura ambiente durante 10 minutos.

11. Suspensión del ADN.

Se disolvió el pellet o paquete de ADN en 500 µl de agua libre de nucleasas, con agitación suave durante 60 min.

Todas las reacciones de PCR se hicieron a un volumen final de 25µl, utilizando como control positivo el plásmido pRSET-MAP3773c y como control negativo agua estéril exclusivo para biología molecular de SIGMA. Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1.5% teñidos con bromuro de etidio.

5.4. Secuenciación del inserto de MAP3773c en el plásmido pRSET.

La secuenciación del inserto de MAP3773c en el Plásmido pRSET purificado a partir de la clona 3, se realizó por la compañía Eton Bioscience, Inc.

5.5. Alineamiento y análisis de la secuencia del inserto de MAP3773c en el plásmido pRSET de *E. coli* BL21(DE3).

A partir de la secuencia del inserto de MAP3773c en el plásmido pRSET purificado a partir de la clona 3 de *E. coli* BL21(DE3), se realizó un alineamiento con el gen MAP3773c (GenBank: AE016958.1) de MAP, obtenido a partir del Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), empleando el programa, BioEdit versión 7.2.5. Asimismo, el análisis de la secuencia se llevó a cabo empleando el programa ApE-A plasmid Editor v2.0.47. Por último, empleando la herramienta de “protein BLAST” del Centro Nacional para Información Biotecnológica, de la Librería Nacional de Medicina de los Estados Unidos (NCBI, por sus siglas en inglés), del sitio de internet <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>, se realizó un alineamiento de la secuencia peptídica traduciéndola a partir del inserto de la clona 3, el cual fue secuenciado.

5.6. Expresión de la proteína producto del gen MAP3773c.

1. Se inoculó 5 mL de medio LB conteniendo ampicilina (50 µg/mL) usando una sola colonia de *E. coli* BL21 (DE3). Se cultivó durante la noche a 37°C con agitación.
2. Al siguiente día, se inoculó 100 mL de medio LB sin antibiótico a una OD de 0.1 a 600 nm empleando el cultivo crecido durante la noche anterior.
3. Se incubó el cultivo a 37°C con agitación vigorosa a una OD de 0.4 a 0.6 a 600 nm.

4. Se removió una alícuota de 1 mL del cultivo antes de la inducción con IPTG, se centrifugó la muestra en una microcentrífuga y se aspiró el sobrenadante. Se congeló el pellet o paquete celular a -20°C . Esta muestra se considera un control del cultivo sin inducción.
5. Una vez alcanzada la OD del paso 3, se agregó IPTG hasta obtener una concentración final de 1 mM y se continuó el crecimiento de las células durante 4 a 6 horas.
6. Se centrifugó el cultivo a 6000 rpm de $2-8^{\circ}\text{C}$, se descartó el sobrenadante y se almacenó el pellet o paquete celular a -20°C , hasta su uso en la purificación de la proteína producto del gen MAP3773c.

La expresión de MAP3773c en la cepa de *E. coli* BL21(DE3) de la clona 3 con el plásmido pRSET-MAP3773c, se confirmó con la presencia de la proteína por electroforesis en gel de poliacrilamida y tinción con azul de Coomassie. Se realizó un gel de poliacrilamida en gradiente al 12% (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) en cámara chica en las siguientes condiciones como se muestra en la Tabla no. 4 y Tabla no. 5.

Tabla 5. Método para el gel separador:

REACTIVOS	CANTIDADES
	12 %
Solución de monómeros	2.40 ml
Tris 1.5 M, pH 8.8	1.50 ml
SDS 10%	0.12 ml
Agua bidestilada	2.00 ml
Persulfato de amonio 10%	0.045 ml
TEMED	0.003 ml

Tabla 6. Método para el gel concentrador:

REACTIVOS	CANTIDADES
Solución de monómeros	0.33 ml
Tris 0.5 M, pH 6.8	0.50 ml
SDS 10%	0.04 ml
Agua bidestilada	1.22 ml
Persulfato de amonio 10%	0.025 ml
TEMED	0.002 ml

5.7. Purificación de la proteína producto del gen MAP3773c.

5.7.1. Lisis celular de la clona 3 de *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pRSET-MAP3773c.

1. Se desheló el paquete celular (pellet) durante 15 min en hielo y se re-suspendió en amortiguador de lisis (Fosfato de sodio 100 mM, Tris-HCl 10 mM, Urea 8M, pH 8.0), usando 5 mL de amortiguador por gramo de peso húmedo.
2. Se agitó las células durante una hora a temperatura ambiente agitando suavemente con ayuda de un vortex y evitando formar espuma.
3. Se centrifugó el lisado a 10,000 x g durante 20 min a temperatura ambiente para precipitar los restos celulares.
4. Se agregó 5 µl de amortiguador SDS-PAGE para muestras (2x) a 5 µL de sobrenadante, para analizar por SDS-PAGE.

5.7.2. Procedimiento de purificación del producto de expresión de la clona 3 de *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pRSET-MAP3773c.

1. Se equilibró el gel en una columna de cromatografía (Marca Biorad, de 1 x 15 cm) con amortiguador de lisis (Fosfato de sodio 100 mM, Tris-HCl 10 mM, Urea 8M, pH 8.0), usando al menos 10 volúmenes de columna (VC).
2. Se mezclaron 2 mL de gel de agarosa Ni-NTA (Marca Goldbio, Núm. de parte: H-320-5) con 6 ml lisado celular y se mezcló con agitación suave en un agitador rotatorio e incubando por 1 hora a temperatura ambiente.
3. Se colectó el exceso de líquido que pasó a través de la columna en un tubo de 15 mL para su análisis posterior por SDS-PAGE.
4. Se pasaron 15 veces el volumen de columna (VC) de amortiguador de lavado (Fosfato de sodio 100 mM, Tris-HCl 10 mM, Urea 8M, pH 6.3), para lavar el gel y eliminar impurezas del producto de purificación.
5. Se eluyó la proteína recombinante (MAP 3773c) con 5 veces el VC de amortiguador de elución (Fosfato de sodio 100 mM, Tris-HCl 10 mM, Urea 8M, pH 5.9), seguido de 5 veces

el VC de amortiguador de elución (Fosfato de sodio 100 mM, Tris-HCl 10 mM, Urea 8M, pH 4.5). Se colectaron fracciones de 1 mL cada una como producto de la elución y se analizó por SDS-PAGE (Protocolo adaptado a partir de los manuales: ProBond™ Purification System, 2012 y The QIAexpressionist™, 2003).

5.8. Inmunización de conejos con el producto de expresión de la clona 3 de E. coli BL21(DE3) con el plásmido pRSET-MAP3773c.

Los conejos fueron inmunizados con 100µg de MAP3773c purificada más 1mL de adyuvante completo de Freund (Sigma Aldrich) en la primera inmunización. En la segunda inmunización a los 15 días fue igual solo se utilizó adyuvante incompleto de Freund, en la tercera inmunización 100 µg de proteína diluida en PBS1X por vía intravenosa. Para la cuarta inmunización a los 31 días, inmunizamos con 200µg, por vía intravenosa y la quinta inmunización con 200µg por vía intravenosa. El sangrado se realizó en el día 39. La sangre fue recolectada en la oreja y el suero fue recolectado por centrifugación y almacenado a -20°C, hasta su uso.

5.9. Western blott del producto de expresión de la clona 3 de E. coli BL21(DE3) con el plásmido pRSET-MAP3773c.

Para el caso de la electrotransferencia se realizó como lo describió Towbin et al, 1979, se realizó la electrotransferencia, a una membrana de nitrocelulosa (marca) se realizó con anticuerpos anti his tag Recombinant Rabbit Oligoclonal Antibody de (Invitrogen, India) a una dilución de 1:5000, conjugado con peroxidasa de rábano, y con anticuerpos de conejo inmunizados con la proteína purificada, diluidos 1:5. Posteriormente las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Pierce, Illinois, USA), estas fueron bloqueadas con leche Svelty 5% en PBS 1X, por 1 hora a 37°C, se lavaron con PBS1X - Tween 20 0.1%, 5 veces y se trataron con el anticuerpo diluido 1:5000, en PBS1X - Leche 5%, se incubaron durante 1 hora a 37°C, posteriormente se lavó la membrana nuevamente como el paso anterior, se agregó un segundo anticuerpo anti IgG de conejo (1:5000),

conjugado a peroxidasa y las bandas de las proteínas se revelaron con 3-amino etilcarbazol (Sigma-aldrich).

6. RESULTADOS

6.1. Confirmación del inserto del gen MAP3773c clonado en pRSETA a partir de la Clona 3 de *E. coli* BL21(DE3).

Se confirmó la presencia del gen de MAP 3773c mediante una electroforesis en gel de agarosa al 2%, teñida con bromuro de etidio, obteniendo el fragmento esperado de aproximadamente 420 pb, tal como se muestra en la figura 9.

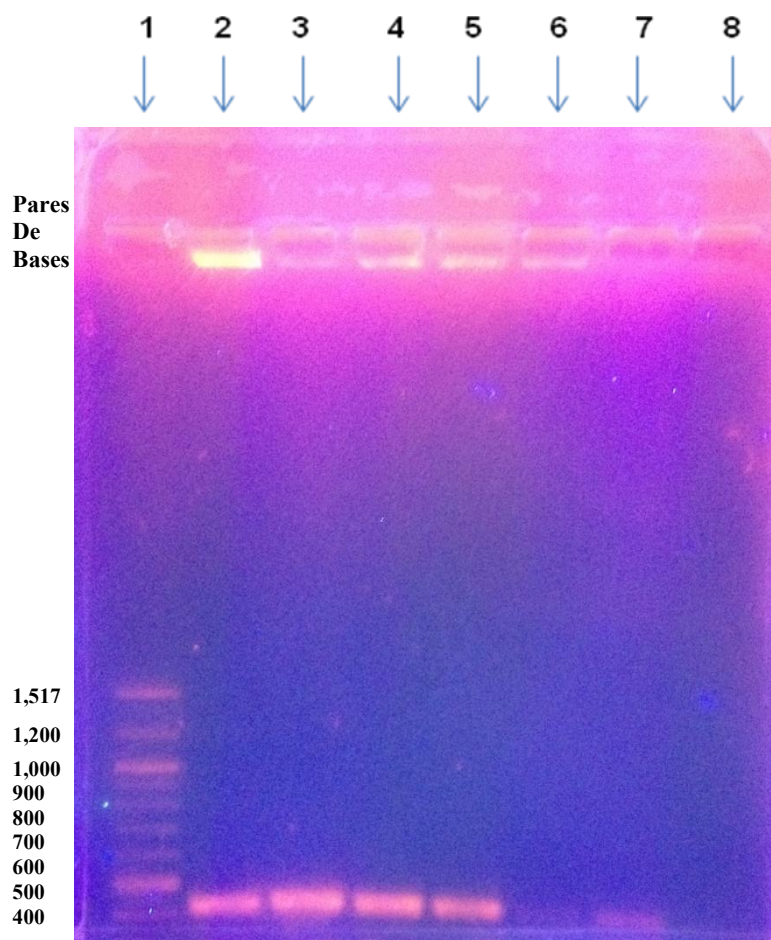


Figura 9. Electroforesis en gel de agarosa para la verificación del inserto del gen MAP3773c, con el tamaño esperado de aproximadamente 420pb. Carril 1, Marcador de peso molecular; carriles 2 al 6 clonas de *E. coli* BL21(DE3) pRSET-MAP3773c; carril 7, control positivo; carril 8, control negativo.

6.2. Secuenciación del inserto del gen MAP3773c clonado en pRSETA de la cepa BL21(DE3) de *E. coli* obtenido de la clona 3.

Se obtuvo la secuencia del inserto del gen MAP 3773c mediante la purificación y secuenciación del plásmido y a partir de esta secuenciación, se realizó un alineamiento empleando el programa BioEdit versión 7.2.5., obteniendo una identidad de 0.9952494 y un puntaje de alineamiento del 838, con lo que se corrobora la identidad y correcta clonación del inserto de MAP3773 en el plasmido pRSET de la clona 3 de *E. coli* BL21(DE3). Este alineamiento se representa gráficamente en la figura 10.

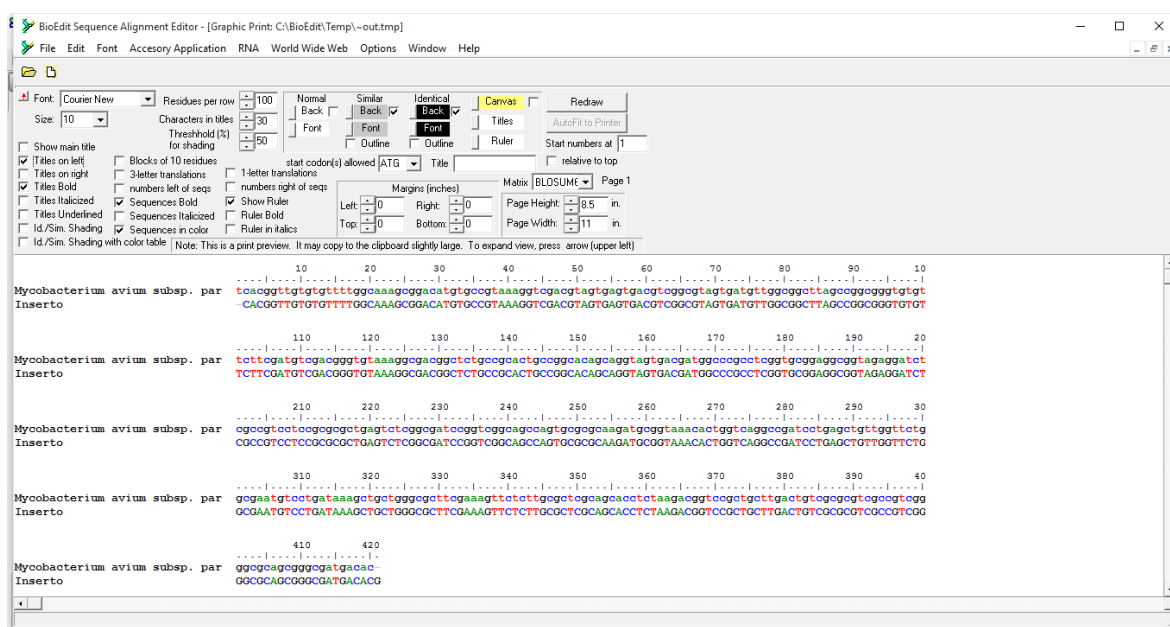


Figura 10. Resultado del alineamiento del inserto secuenciado con el gen MAP3773c de MAP (GenBank: AE016958.1), utilizando el program BioEdit.

6.3. Análisis de la secuencia del inserto de MAP3773c de la clona 3 de *E. coli* BL21(DE3).

Empleando el programa ApE-A plasmid Editor v2.0.47, se analizó la secuencia del inserto corroborando de esta manera el peso molecular del inserto y la secuencia peptídica como resultado de la traducción realizada por el mismo programa, ambos resultados se muestran en la tabla 7. Asimismo, empleando la secuencia traducida por el programa ApeA plasmid editor, se realizó una alineamiento con el programa “protein BLAST” del Centro

Nacional para Información Biotecnológica, de la Librería Nacional de Medicina de los Estados Unidos (NCBI, por sus siglas en inglés).

Tabla 7. Resultados del análisis de la secuencia del inserto de la clona 3 de *E. coli* BL21(DE3):

ORF	Del 46 al 579
Tamano de la traduccion	177 a.a.
Peso Molecular	20569.69 Da
Secuencia en Aminoácidos	MRGSHHHHHHGMASMTGGQQ MGRDLYDDDDKDRWGSELVS SPAAPRRRRATVKQRTVLEV LRAQENFRSAQQLYQDIRQN QQLRIGLTSVYRILRALAAD RIAETQRAEDGEILYRLRTE AGHRHYLLCRQCGRAVAFTP VDIEEHTRRLSRQHHYADVT HYVDLYGTCPLCQNTQP*

6.4. Purificación del producto de expresión del Inserto del gen MAP3773c expresado en la clona 3 de *E. coli* BL21(DE3).

Se confirmó la presencia del gen de MAP 3773c mediante mediante la técnica SDS-PAGE, obteniendo el fragmento esperado de aproximadamente 20kDa, tal como se muestra en la figura 11.

El proceso de purificación se optimizó aumentando la cantidad de los lavados, hasta 15 volúmenes de columna con la solución de lavado, logrando así la obtención de un producto de purificación con mayor pureza, tal como se puede apreciar en la figura 12.

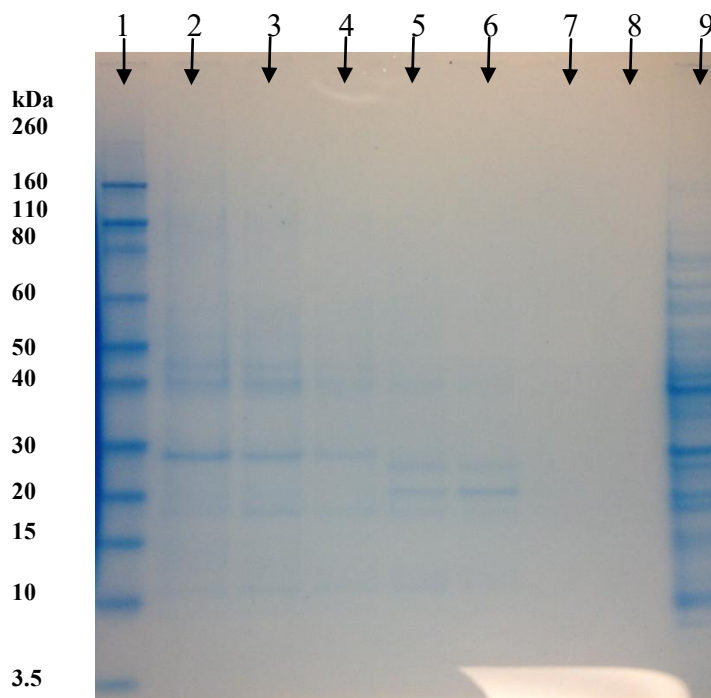


Figura 11. Purificación del producto de expresión del inserto del gen MAP3773c expresado en la clona 3 de *E. coli* BL21(DE3), analizado por SDS-PAGE. Carril 1 Marcador de Peso Molecular, carril 2 elución 1, carril 3 elución 2, carril 4 elución 3, Carril 5 elución 4, carril 6 elución 5, carril 7 elución 6, carril 8 elución 7 y carril 9 post-carga.

Se realizó un western blot (véase fig. 13) empleando el anti-suero de conejo, generado mediante la inmunización con el producto de la elución MAP3773c, purificado mediante cuentas de agarosa con níquel-NTA, obteniéndose una banda con un peso molecular aparente de aproximadamente 30,000 daltones.

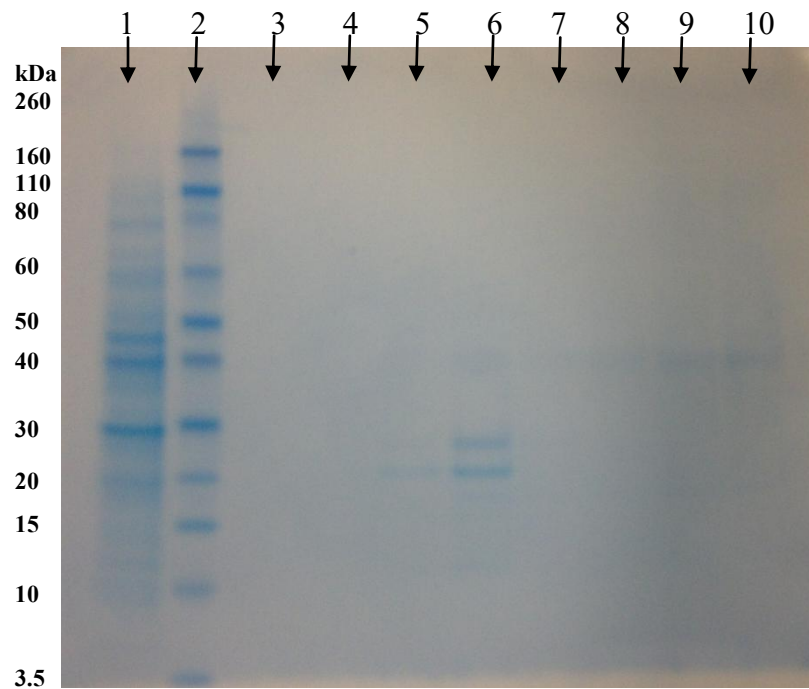


Figura 12. Purificación del producto de expresión del inserto del gen MAP3773c expresado en la clona 3 de *E. coli* BL21(DE3), aumentado el número de lavados de la columna y analizado por SDS-PAGE. Carril 1 Lisado celular emplado en la carga del producto, Carril 2 Marcador de Peso Molecular, carril 3 elución 8, carril 4 elución 7, carril 5 elución 6. Carril 6 elución 5, carril 7 elución 4, carril 8 elución 3, carril 9 elución 2 y carril 10 elución 1.

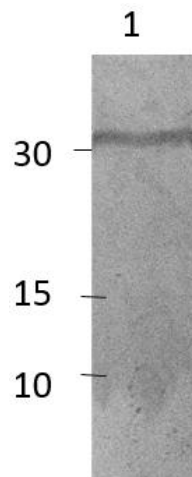


Figura 13. Western blot del producto de expresión del inserto del gen MAP3773c expresado en la clona 3 de *E. coli* BL21(DE3). Carril 1, producto eluido MAP3773c mediante purificación con cuentas de agarosa con níquel-NTA.

7. DISCUSIONES

Dada la necesidad de profundizar en el conocimiento del metabolismo del hierro, de corroborar su papel en la patogenicidad de MAP y mejorar el entendimiento de la función de este regulador de la expresión génica en particular y en general del metabolismo del microorganismo causante de la enfermedad de Jonhes, la obtención de esta proteína purificada y en cantidades abundantes, representa un paso crítico, clave en la búsqueda y en el diseño de estrategias de combate contra la paratuberculosis y el agente patógeno MAP. La proteína producto del gen MAP3773c cuya purificación fue posible en el desarrollo de este estudio, muestra una masa molecular ligeramente mayor a la esperada para las proteínas tipo FUR (entre 15 y 18 kDa) probablemente debido a la presencia de las secuencias inherentes a la expresión en el vector pRSET, es decir a la etiqueta-N, tal como lo menciona el manual del usuario del proveedor de este plásmido (véase manual del usuario de pRSET A, B y C de Invitrogen). El peso molecular estimado mediante el programa Ape-A plasmid editor, fue de 20569.69 Da, explica este aumento en el tamaño de la proteína según el resultado de análisis por SDS-PAGE. Sin embargo, el peso molecular aparente determinado por western blot muestra una sola banda de alrededor 30,000 daltones, lo que sugiere la posibilidad de que se este expresando un dímero de MAP3773c. Este dímero posiblemente ofrezca mejor respuesta inmunogénica y por esto predomine como una sola banda en el western blot.

Después de numerosos intentos de purificación en condiciones nativas, empleando diversas variantes del método convencional de purificación de proteínas con etiqueta de histidinas, y siempre confirmado por la ausencia de la proteína con el peso molecular esperado, nos condujo a la opción de purificación de la proteína producto del inserto de MAP3773c en condiciones desnaturalizantes, lo cual indica que esta proteína probablemente se encuentre en forma insoluble dentro del huésped *E. coli*, con el cual se logró su expresión, esto probablemente se deba a que la proteína sufre un plegamiento erróneo, posiblemente debido a que el nivel de expresión de la proteína MAP3773c sobrepase la capacidad de plegamiento del microorganismo huésped en este caso *E. coli*. La posibilidad de optar por opciones alternativas de expresión, por ejemplo empleando un

plásmido distinto o un huésped distinto puede ofrecer una alternativa viable, si se desea obtener la proteína purificada bajo condiciones nativas.

8. CONCLUSIONES

Se logró la purificación exitosa de la proteína producto del gen MAP3773c de MAP (posiblemente Fur), confirmando su presencia por secuenciación del inserto en la clona 3 de *E. coli* cepa BL21(DE3) y también por su presencia en la prueba de electroforesis conocida como SDS-PAGE, en cuyo resultado se observa una masa molecular estimada de aproximadamente 20,000 Da, lo cual coincide con el peso molecular esperado para la proteína FUR expresada en el vector pRSETA y esto también fue corroborado mediante el análisis por el software ApE-A plasmid Editor v2.0.47. No obstante de que una forma dimérica con una mayor respuesta inmunogénica domine como forma única en el western blot.

El presente trabajo de purificación de la proteína Fur, confirma la utilidad de la columna de cuentas de agarosa con níquel-NTA en los trabajos de purificación de proteínas, no solo en su estado nativo, sino que también en su forma desnaturalizada, ya que como lo mencionan varios autores citados en el presente trabajo, algunas de las proteínas recombinantes que alcanzan un nivel alto de expresión, no logran obtener el plegamiento correcto y por lo tanto se obtienen como cuerpos de inclusión, estas proteínas recombinantes requieren de un tratamiento especial para poder llevar a cabo su purificación tal y como se demuestra en este estudio. La ventaja del uso de agentes desnaturalizantes como la urea en la purificación de proteínas recombinantes, es que ofrece la posibilidad de la renaturalización de las mismas y así recuperar su función biológica; de esta manera se puede obtener grandes cantidades de proteína recombinante y a la vez realizar estudios de funcionalidad, una vez que las proteínas ya han sido renaturalizadas.

Mediante el uso de la tecnología de ADN recombinante, para la clonación y expresión de genes y sus productos o proteínas hipotéticas, como lo es el caso de Fur, se puede mejorar el entendimiento del funcionamiento de enfermedades tales como la paratuberculosis y el de su agente causal MAP. Asimismo, se pueden diseñar mejores estrategias de combate a la enfermedad de Jonhesh, incluso cuando se requiera de proteínas que representen un pequeño porcentaje del total del arsenal de proteínas expresadas por un

patógeno, tal como es el caso en MAP. El poder obtener cantidades abundantes de proteínas con un grado de pureza suficiente, como lo es el caso de la proteína obtenida en este estudio, permitirá lograr mejorar el entendimiento de la función, la conformación, secuencias reguladoras y otros aspectos de importancia clave para la erradicación del agente patógeno MAP.

9. BIBLIOGRAFÍA

Alahari A, Tripathi AK, Le Rudulier D. Cloning and Characterization of a fur Homologue from *Azospirillum brasilense* Sp7. *Current Microbiology*. 2006; 52: 123–127.

Arsenault RJ, Li Y, Bell K, Doig K, Potter A, Griebel PJ, Kusalik A, Napper S. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Inhibits Gamma Interferon-Induced Signaling in Bovine Monocytes: Insights into the Cellular Mechanisms of Johne's Disease. *Infection and Immunity*. 2012; 80(9): 3039–3048.

Baichoo N, Helmann JD. Recognition of DNA by Fur: a Reinterpretation of the Fur Box Consensus Sequence. *Journal of Bacteriology*. 2002; 184(21): 5826–5832.

Bassey EO, Collins MT. Study of T-Lymphocyte Subsets of Healthy and *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*-Infected Cattle. *Infection and Immunity*. 1997; 65(11): 4869–4872.

Bastida F, Juste RA. Paratuberculosis control: a review with a focus on vaccination. *Journal of Immune Based Therapies and Vaccines*. 2011; 9(8): 1-17.

Berh MA, Collins DM. Paratuberculosis: Organism, Disease, Control. CAB International. 2010.

Block H, Maertens B, Spriestersbach A, Brinker N, Kubicek J, Fabis R, Labahn J, Schäfer F. Immobilized-metal affinity chromatography (IMAC): a review. *Methods Enzymol*. 2009; 463: 439-473.

Bornhorst JA, Falke JJ. Purification of Proteins Using Polyhistidine Affinity Tags. *Methods Enzymol*. 2000; 326: 245–254.

Bull TJ, McMinn EJ, Sidi-Boumedine K, Skull A, Durkin D, Neild P, Rhodes G, Pickup R, Hermon-Taylor J. Detection and Verification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Fresh Ileocolonic Mucosal Biopsy Specimens from Individuals with and without Crohn's Disease. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003; 41(7): 2915-2923.

Burgess RR, Deutscher MP. Guide to protein purification. Academic Press. 2009. Segunda edición.

Castellanos E, Aranaz A, Gould KA, Linedale R, Stevenson K, Alvarez J, Dominguez L, De Juan L, Hinds J, Bull TJ. Discovery of Stable and Variable Differences in the *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* Type I, II, and III Genomes by Pan-Genome Microarray Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009; 75(3): 676–686.

Clarke, C.J. The Pathology and Pathogenesis of Paratuberculosis in Ruminants and Other Species. *J. Comp. Path.* 1997; 116: 217-261.

Cocito C, Gilot P, Coene M, De Kesel M, Poupart P, Vannuffel P. Paratuberculosis. *Clinical Microbiology Reviews*. 1994; 7(3): 328-345.

Dhand NK, Toribio JA, Whittington RJ. Adsorption of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to Soil Particles. *Appl. Environ. Microbiol.* 2009; 75(17): 5581–5585.

Dobson B, Liggett S, O'Brien R, Griffin JF. Innate immune markers that distinguish red deer (*Cervus elaphus*) selected for resistant or susceptible genotypes for Johne's disease. *Veterinary Research*. 2013; 44: 5.

Dubrac S, Touati D. Fur-mediated transcriptional and posttranscriptional regulation of FeSOD expression in *Escherichia coli*. *Microbiology*. 2002; 148: 147–156.

Englund S, Bolske G, Johansson KE. An IS900-like sequence found in a *Mycobacterium* sp. other than *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*. *FEMS Microbiology Letters*. 2002; 209: 267-271.

Fang Z, Sampson SL, Warren RM, Van Pittius NC, Newton-Foot M. Iron acquisition strategies in mycobacteria. *Tuberculosis*. En prensa. 2015; 1-8.

Gomes-Pereira S, Rodrigues PN, Appelberg R, Gomes MS. Increased Susceptibility to *Mycobacterium avium* in Hemochromatosis Protein HFE-Deficient Mice. *Infect. Immun.* 2008; 76(10): 4713–4719.

Grant, IR. Zoonotic potential of *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis*: the current position. *Journal of Applied Microbiology*. 2005; 98: 1282–1293.

Greig A, Stevenson K, Henderson D, Perez V, Hughes V, Pavlik I, Hines II ME, McKendrick, Sharp M. Epidemiological Study of Paratuberculosis in Wild Rabbits in Scotland. *Journal of Clinical Microbiology*. 1999; 37(6): 1746–1751.

Hantke K. Members of the Fur Protein Family Regulate Iron and Zinc Transport in *E. coli* and Characteristics of the Fur-Regulated FhuF Protein. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 2002; 4(3): 217–222.

Harris, NB, Barletta RG. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in Veterinary Medicine. *Clinical Microbiology Reviews*. 2001; 14(3): 489–512.

Hermon-Taylor, J. *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*, Crohn's disease and the Doomsday Scenario. *Gut Pathogens*. 2009; 1:15.

Janagama HK, Senthilkumar, Bannantine JP, Kugadas A, Jagtap P, Higgins L, Witthuhn BA, Sreevatsan S. Iron-sparing Response of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* is strain dependent. *BMC Microbiology* 2010; 10:268.

Johnson EJ, Wessling-Resnick M. Iron metabolism and the innate immune response to infection. *Microbes Infect.* 2012; 14(3): 207–216.

Lamont EA, Bannantine JP, Armien A, Ariyakumar DS, Sreevatsan S. Identification and Characterization of a Spore-Like Morphotype in Chronically Starved *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* cultures. PLoS ONE. 2012; 7(1): e30648.

Lavrrar JL, McIntosh MA. Architecture of a Fur Binding Site: a Comparative Analysis. Journal of Bacteriology. 2003; 185(7): 2194–2202.

Li L, Bannantine JP, Zhang Q, Amonsin A, May BJ, Alt D, Banerji N, Kanjilal S, Kapur K. The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis*. PNAS. 2005; 102(35): 12344–12349.

Litwin CM, Calderwood SB. Role of Iron in Regulation of Virulence Genes. Clinical Microbiology reviews. 1993; 6(2): 137-149.

Lombard JE, Garry FB, McCluskey BJ, Wagner BA. Risk of removal and effects on milk production associated with paratuberculosis status in dairy cows. J. Am. Vet. Med. Assoc. 2005; 227(12): 1975-1981.

Lombard JE, Wagner BA, Smith RL, McCluskey BJ, Harris BN, Payeur JB, Garry JB, Salman MD. Evaluation of Environmental Sampling and Culture to Determine *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* Distribution and Herd Infection Status on US Dairy Operations. J. Dairy Sci. 2006; 89:4163–4171.

Lucarelli D, Vasil ML, Meyer-Klaucke M, Pohl E. The Metal-Dependent Regulators FurA and FurB from *Mycobacterium Tuberculosis*. Int. J. Mol. Sci. 2008; 9: 1548-1560.

Magombedze G, Ngonghala CN, Lanzas C. Evaluation of the “Iceberg Phenomenon” in Johne’s Disease through Mathematical Modelling. PLoS ONE. 2013; 8(10): e76636.

Manning EJB, Collins MT. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*: pathogen, pathogenesis and diagnosis. Rev. Sci. tech. Off. Int. Epiz, 2001; 20(1): 133-150.

Milano A, Forti F, Sala C, Riccardi G, Ghisotti D. Transcriptional Regulation of furA and katG upon Oxidative Stress in *Mycobacterium smegmatis*. Journal of Bacteriology. 2001; 183(23): 6801-6806.

Olsen I, Sigurðardóttir ÓG, Dønne B. Paratuberculosis with special reference to cattle A Review. Veterinary Quarterly. 2002; 24(1): 12-28.

Otta SL, Wells SJ, Wagner B.A. Herd-level economic losses associated with Johne's disease on US dairy operations. Preventive Veterinary Medicine. 1999; 40: 179-192.

Poupart, P., Coene M, Van Heuverswyn H., Cocito C. Preparation of a Specific RNA Probe for Detection of *Mycobacterium paratuberculosis* and Diagnosis of Johne's Disease. Journal of Clinical Microbiology. 1993; 31(6): 1601-1605.

ProBond™ Purification System. For purification of polyhistidine-containing recombinant proteins. User Guide. Lifetechnologies Corporation. 2012.

pRSET A, B, and C For high-level expression of recombinant proteins in *E. coli*. User Manual. Life Technologies Corporation. 2010.

Rodriguez MG. Control of iron metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*. TRENDS in Microbiology. 2006; 14(7): 320-327.

Rodriguez MG, Voskuil MI, Gold B, Schoolnik GK, Smith I. ideR, an Essential Gene in *Mycobacterium tuberculosis*: Role of IdeR in Iron-Dependent Gene Expression, Iron Metabolism, and Oxidative Stress Response. Infect. Immun. 2002. 70(7): 3371–3381.

Rowe MT, Grant IR. *Mycobacterium avium* ssp. *paratuberculosis* and its potential survival tactics. Letters in Applied Microbiology. 2006; 42: 305–311.

Sala C, Forti F, Di Florio E, Canneva F, Milano A, Riccardi G, Ghisotti D. *Mycobacterium tuberculosis* FurA Autoregulates Its Own Expression. Journal of Bacteriology. 2003; 185(18): 5357–5362.

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Tercera edición. 2001.

Santillan MF. Tuberculosis y Paratuberculosis. 1 er. Simposium de Salud y Producción de Bovinos de Carne en la Zona Norte-Centro de México. 2010.1-21.

Shankar H, Singh SV, Singh PK, Singh AV, Sohal JS, Greenstein RJ. Presence, characterization, and genotype profiles of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* from unpasteurized individual and pooled milk, commercial pasteurized milk, and milk products in India by culture, PCR, and PCR-REA methods. International Journal of Infectious Diseases. 2010; 14: e121—e126

Singh AV, Singh SV, Singh PK, Sohal JS, Singh MK. High prevalence of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* ('Indian bison type') in animal attendants suffering from gastrointestinal complaints who work with goat herds endemic for Johne's disease in India/ International Journal of Infectious Diseases. 2011; 15: e677–e683.

Singh VS, Singh AV, Kumar A, Singh PK, Deb R, Verma AK, Kumar A, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K. Survival mechanisms of *Mycobacterium avium* subspecies *paratuberculosis* within host species and in the environment—A review. Natural Science. 2013; 710-723.

The QIAexpressionist™. A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. QIAGEN. 2003. Quinta Edición.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 76(9):4350-4.

Whan LB, Grant IR, Ball HJ, Scott R, Rowe MT. Bactericidal effect of chlorine on *Mycobacterium paratuberculosis* in drinking water. *Letters in Applied Microbiology* 2001; 33: 227-231.

Whittington RJ, Marshall DJ, Nicholls PJ, Marsh IB, Reddacliff RA. Survival and Dormancy of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in the Environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70(5) 2989–3004,

Wong DK, Lee BY, Horwitz MA, Gibson BW. Identification of Fur, Aconitase, and Other Proteins Expressed by *Mycobacterium tuberculosis* under Conditions of Low and High Concentrations of Iron by Combined Two-Dimensional Gel Electrophoresis and Mass Spectrometry. *Infect. Immun.* 1999; 67(1): 327–336.