



**Universidad**  
Zaragoza



**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular**

***“ESTRATEGIAS DE BÚSQUEDA DE NUEVOS  
ANTIMICROBIANOS”***

**Trabajo Fin de Máster para optar al título de Máster en Biología Molecular y Celular**

**Ángela Fernández Otal**

**Licenciada en Bioquímica**



## RESUMEN

Las infecciones bacterianas son cada vez más difíciles de tratar puesto que los microbios que las causan presentan resistencia a los antibióticos convencionales. El desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos pasa por la identificación de nuevas dianas antibacterianas. En este contexto, una forma de abordar el problema consiste en la búsqueda de compuestos que actúen sobre funciones genéticas del patógeno que sean esenciales para producir la enfermedad *in vivo*. Es el caso de los genes necesarios para causar virulencia o los implicados en la viabilidad del mismo. La disminución en la concentración de hierro, micronutriente esencial para la mayoría de los seres vivos por el que compiten hospedador y patógeno durante la infección, es una señal que desencadena la expresión de genes de virulencia en el patógeno. En el control de la expresión de muchos de ellos participan homólogos de la proteína Fur (Ferric uptake regulator). Este regulador transcripcional modula la homeostasis del hierro y es esencial para la virulencia de muchos patógenos, convirtiéndolo en un candidato muy interesante como diana terapéutica para la identificación de antibióticos alternativos a los actuales.

Los resultados que se presentan en este proyecto máster se enmarcan dentro de una línea de trabajo del grupo de investigación donde se ha desarrollado, encaminada a valorar la idoneidad de Fur como diana terapéutica frente a microorganismos patógenos. Se basa en la búsqueda de compuestos bioactivos que modifiquen la actividad de Fur de patógenos mediante cribado de librerías de compuestos químicos, análisis de la interacción Fur-DNA en presencia de compuestos seleccionados, *in vitro*, y confirmación de su eficacia *in vivo*.

En particular, el objetivo del trabajo que se desarrolla a continuación es la selección de moduladores de la actividad de Fur de entre un conjunto de compuestos derivados de ferroceno y estudio de su actividad antimicrobiana. Se han fijado como tareas el clonaje, sobreexpresión, purificación y caracterización bioquímica de las proteínas Fur de *Listeria monocytogenes* EGD-e y *Helicobacter pylori* 26695 y la identificación de derivados de ferroceno que modulan la actividad de ambas proteínas en ensayos de retardo de movilidad electroforética (EMSA), así como la evaluación de la acción antimicrobiana de los mismos *in vivo*.



<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>3</b>
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	<b>5</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>6</b>
<b>A. INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
I. PROBLEMÁTICA ACTUAL DE LA RESISTENCIA BACTERIANA	9
II. NUEVAS ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO DE ANTIMICROBIANOS	10
III. LA PROTEÍNA FUR	10
a. Estructura de Fur	11
b. Modo de acción de Fur	13
c. Genes regulados por Fur en patógenos	14
d. ¿Cómo se regula Fur?	15
IV. LOS FERROCENOS	16
<b>B. OBJETIVOS</b>	<b>17</b>
<b>C. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>18</b>
I. MICROORGANISMOS Y MEDIOS DE CULTIVO	18
II. CLONAJE DEL GEN <i>fur</i> EN EL PLÁSMIDO DE SOBREENPRESIÓN	19
a. Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>PCR</i> )	19
b. Extracción del plásmido de <i>E. coli</i> a pequeña escala ( <i>miniprep</i> ) y cuantificación del DNA	20
c. Digestión doble enzimática de DNA y ligación	20
d. Preparación de células termocompetentes	20
e. Transformación mediante choque térmico	21
f. Secuenciación	21
III. SOBREENPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS HOMÓLOGOS DE FUR	22
a. Sobreexpresión de las proteínas	22
b. Obtención del extracto crudo	23
c. Cromatografía de afinidad a metales ( <i>IMAC</i> )	23
d. Precipitación con ácido tricloroacético ( <i>TCA</i> )	24
e. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida ( <i>SDS-PAGE</i> )	24
f. Concentración y diálisis de las proteínas	25
g. Cuantificación de las proteínas por espectroscopía	25
IV. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS FUR	26
a. Estudio de la presencia de metal mediante electroforesis	26
b. Determinación del número de cisteínas libres	26
c. Detección de la actividad disulfuro reductasa	26
d. Estudio de la interacción proteína-DNA ( <i>EMSA</i> )	27
e. Estudio de la interacción con el grupo hemo	28
V. ENSAYOS <i>IN VIVO</i> DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA	29
a. Cálculo de la unidades formadoras de colonias (CFU/ml)	29
b. Test de difusión en disco: Método Kirby-Bauer	29
c. Test de dilución en caldo: Determinación de la C.I.M.	30

<b>D. RESULTADOS</b>	<b>31</b>
I. CLONAJE	31
II. SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS HOMÓLOGOS DE FUR	32
a. Sobreexpresión de las proteínas	32
b. Purificación de las proteínas	33
c. Cuantificación de las proteínas	34
III. ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE METAL MEDIANTE ELECTROFORESIS	35
IV. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CISTEÍNAS LIBRES	36
V. DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD DISULFURO REDUCTASA	38
VI. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN PROTEÍNA-DNA	39
a. Búsqueda de las condiciones óptimas de unión	39
b. Efecto de la presencia del quelante EDTA sobre la interacción	40
VII. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE LOS HOMÓLOGOS FUR CON EL GRUPO HEMO	41
a. Detección de los complejos mediante espectroscopía diferencial	42
b. Estudio del efecto de la presencia del grupo en la interacción proteína-DNA	44
VIII. EFECTO DE COMPUESTOS DERIVADOS DE FERROCENO SOBRE LA INTERACCIÓN PROTEÍNA-DNA <i>IN VITRO</i>	45
IX. EFECTO DE COMPUESTOS DERIVADOS DE FERROCENO <i>IN VIVO</i>	46
a. Test de difusión en disco Kirby-Bauer	47
b. Determinación de la C.I.M.	49
<b>E. DISCUSIÓN</b>	<b>51</b>
I. OBTENCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES LmFur Y HpFur	51
II. PRESENCIA DE METAL EN LOS HOMÓLOGOS PURIFICADOS	52
III. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DISULFURO REDUCTASA	54
IV. INTERACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS CON EL GRUPO HEMO	54
V. EFECTO DE LOS COMPUESTOS DERIVADOS DE FERROCENO <i>IN VITRO</i>	55
VI. EFECTO DE LOS COMPUESTOS DERIVADOS DE FERROCENO <i>IN VIVO</i>	56
<b>F. CONCLUSIONES</b>	<b>57</b>
<b>G. BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>58</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

### A. INTRODUCCIÓN

Figura 1.1. Dianas tradicionales de los actuales antibióticos.	9
Figura 1.2. Representación de la estructura cristalina del dímero Fur de <i>P. aeruginosa</i> .	11
Figura 1.3. Representación de la estructura cristalina del dímero Fur de <i>H. pylori</i> .	12
Figura 1.4. Mecanismo general de represión propuesto para Fur.	13
Figura 1.5. Representación esquemática de las secuencias consenso propuestas como “caja Fur”.	13
Figura 1.6. Actuación de Fur y RhyB en la regulación génica dependiente de hierro.	15
Figura 1.7. A. Estructura química del grupo hemo. B. Grupo ferroceno.	16

### B. MATERIALES Y MÉTODOS

Figura 3.1. Representación esquemática del sitio de clonaje múltiple del vector pET-28a(+).	19
Figura 3.2. Elementos de control en el sistema pET.	22
Figura 3.3. Esquema de la matriz de afinidad “ <i>Chelating Sepharose Fast Flow</i> ”.	23
Figura 3.4. Fórmula química del quelante TPEN.	26
Figura 3.5. Reacción producida durante el ensayo de Ellman.	26
Figura 3.6. Reacción entre el ditiotreitól y la insulina.	27
Figura 3.7. Compuestos derivados de ferroceno empleados en este trabajo.	29

### C. RESULTADOS

Figura 4.1. Verificación de la presencia del gen clonado <i>fur</i> en los plásmidos pET-28a: <i>fur</i> Lm y pET-28a: <i>fur</i> Hp.	31
Figura 4.2. Análisis de la sobreexpresión de las proteínas recombinantes mediante geles de SDS-PAGE al 15% (tampón de carga con agentes reductores).	32
Figura 4.3. Purificación de LmFur.	33
Figura 4.4. SDS-PAGE al 15% del proceso total de purificación (tampón de carga con agentes reductores).	33
Figura 4.5. Espectro de absorción de las proteínas recombinantes purificadas.	34

Figura 4.6. Análisis de la presencia de metal mediante <i>SDS-PAGE</i> al 15%.	35
Figura 4.7. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas LmFur y HpFur.	37
Figura 4.8. Determinación del número de cisteínas libres presentes en la solución de proteína.	37
Figura 4.9. Detección de la actividad disulfuro reductasa.	38
Figura 4.10. <i>EMSA</i> en gel de poliacrilamida al 6% para comprobar la actividad de las proteínas purificadas.	39
Figura 4.11. <i>EMSA</i> en gel de poliacrilamida al 6% para comprobar el efecto del Mn(II) en la actividad de las proteínas.	40
Figura 4.12. <i>EMSA</i> en gel de poliacrilamida al 6% para comprobar el efecto de la presencia del quelante EDTA en la actividad de las proteínas.	41
Figura 4.13. Estudio por espectroscopía diferencial de la unión del grupo hemo a los homólogos de la proteína Fur.	43
Figura 4.14. Estudio mediante <i>EMSA</i> del efecto del grupo hemo en la actividad de los homólogos de Fur <i>in vitro</i> .	44
Figura 4.15. <i>EMSA</i> en gel de poliacrilamida al 6% para comprobar el efecto del conjunto de compuestos derivados del ferroceno sobre la unión de la proteína LmFur al DNA.	45
Figura 4.16. <i>EMSA</i> en gel de poliacrilamida al 6% para comprobar el efecto del conjunto de compuestos derivados del ferroceno sobre la unión de la proteína HpFur al DNA.	46
Figura 4.17. Cálculo de las unidades formadoras de colonias (CFU/ml) de <i>S. aureus</i> ATCC 29213.	47
Figura 4.18. Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana mediante el test de difusión en disco Kirby-Bauer.	48
Figura 4.19. Determinación de la CIM del compuesto CLM-12 sobre <i>S. aureus</i> ATCC 29213.	49
Figura 4.20. Determinación de la CIM del antibiótico ampicilina sobre <i>S. aureus</i> ATCC 29213, realizado como control positivo.	50

#### D. DISCUSIÓN

Figura 5.1. Modelo propuesto para la especie monomérica y dimérica presentes en la solución de proteína recombinante HpFur.	53
Figura 5.2. Alineamiento de los motivos CXXC.	54



## ÍNDICE DE TABLAS

### B. MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla I. Microorganismos empleados.	18
Tabla II. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.	20
Tabla III. Composición de los tampones utilizados en la purificación.	24
Tabla IV. Composición del gel <i>SDS-PAGE</i> al 15%.	25
Tabla V. Composición del gel para <i>EMSA</i> al 6% (2 geles).	27

### C. RESULTADOS

Tabla VI. Cuantificación de las proteínas purificadas.	34
--	----

**ABREVIATURAS**

aa	aminoácido
A	Amperio
Abs	Absorbancia
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Colección de Cultivos Tipo Americano)
bp	<i>base pairs</i> (pares de bases de nucleótidos)
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> (Albúmina sérica bovina)
CFU	Unidades Formadoras de Colonias
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> (Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio)
cm	centímetros
CIM	Concentración Inhibitoria Mínima
DNA	Deoxyribunucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)
D.O.	Densidad óptica
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)
DTT	1,4-ditiotreitol
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i> (Ácido etilen-diamino-tetraacético)
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (ensayo de retardo en gel)
Fur	Ferric Uptake Regulator (Proteína Reguladora de Captación de Hierro)
g	gramos
h	horas
HpFur	Proteína Fur de <i>Helicobacter pylori</i>
IMAC	<i>Immobilized Metal ion Affinity Chromatography</i> (cromatografía de afinidad a iones metálicos)
IPTG	isopropyl- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
kDa	kiloDalton
l	litro
LB	medio de cultivo <i>Luria-Bertani</i>

LBK	medio de cultivo <i>Luria-Bertani</i> suplementado con kanamicina
LmFur	Proteína Fur de <i>Listeria monocytogenes</i>
M	Concentración molar
mg	miligramos
MH	medio de cultivo <i>Mueller-Hinton</i>
min	minutos
ml	mililitros
mm	milímetros
mM	Concentración milimolar
ng	nanogramos
nM	Concentración nanomolar
nm	nanómetros
PCC	<i>Pasteur Culture Collection</i> (Colección de cultivos del "Institut Pasteur")
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PSA	Persulfato Amónico
p/v	relación peso / volumen
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido ribonucleico)
rpm	revoluciones por minuto
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecil sulfato sódico)
SDS-PAGE	SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (electrophoresis en gel de poliacrilamida con SDS)
seg	segundos
sRNA	<i>small Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico pequeño)
TBE	Tris-Borato-EDTA
TCA	<i>Trichloroacetic Acid</i> (Ácido tricloroacético)
TEMED	N, N, N', N'-tetra-metil-etilendiamina
TPEN	N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano

UV-Vis	Luz UltraVioleta-Visible
V	Voltios
v/v	relación volumen / volumen
$\epsilon$	Coeficiente de extinción molar
$^{\circ}\text{C}$	grados centígrados
$\mu\text{g}$	microgramos
$\mu\text{l}$	microlitros
$\mu\text{M}$	Concentración micromolar

### BASES NITROGENADAS

A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina

### AMINOÁCIDOS

A	Ala	Alanina	M	Met	Metionina
C	Cys	Cisteína	N	Asn	Asparagina
D	Asp	Ácido aspártico	P	Pro	Prolina
E	Glu	Ácido glutámico	Q	Gln	Glutamina
F	Phe	Fenilalanina	R	Arg	Arginina
G	Gly	Glicina	S	Ser	Serina
H	His	Histidina	T	Thr	Treonina
I	Ile	Isoleucina	V	Val	Valina
K	Lys	Lisina	W	Trp	Triptófano
L	Leu	Leucina	Y	Tyr	Tirosina

## **A. INTRODUCCIÓN**

## I. PROBLEMÁTICA ACTUAL DE LA RESISTENCIA BACTERIANA

El desarrollo de nuevos agentes antimicrobianos se ha convertido en uno de los retos planteados a la salud pública mundial puesto que el número de infecciones producidas por cepas bacterianas resistentes a uno, y aún más alarmante, a múltiples fármacos antimicrobianos, está aumentando en todo el mundo (Quadri, 2007).

Los antibióticos tradicionales pueden ser bactericidas (matan las bacterias) o bacteriostáticos (inhiben su crecimiento). Su modo de acción se basa en el bloqueo de funciones esenciales para la bacteria como la síntesis de la pared celular, la replicación del DNA, la transcripción del RNA y la síntesis de proteínas y de folato (Figura 1.1) (Clatworthy *et al.*, 2007), promoviendo el desarrollo y expansión de resistencia por selección natural. Además, pueden afectar de manera negativa al conjunto de microorganismos que habitan de manera saprófita en el hospedador, normalmente asociados a tejidos sanos (piel, mucosas, etc.) y que en ocasiones desempeñan funciones específicas (Alanis, 2005).

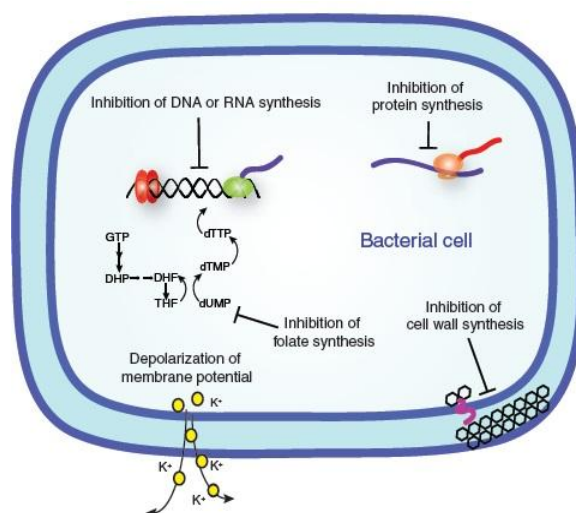


Figura 1.1. Dianas tradicionales de los actuales antibióticos (Clatworthy *et al.*, 2007).

En los últimos años, el desarrollo de nuevas drogas antibacterianas se ha limitado a la modificación de las estructuras químicas de los antibióticos convencionales o a la elaboración de fármacos con efecto sinérgico que aumentan la eficacia de los mismos. Pero este enfoque no soluciona el problema de la resistencia bacteriana, puesto que los microorganismos reconocen estos fármacos. Por tanto, en la búsqueda de nuevos antimicrobianos, es esencial, tanto identificar nuevas dianas terapéuticas contra las que dirigirlos, como probar sobre ellas nuevas drogas químicas (Alanis, 2005).

## II. NUEVAS ESTRATEGIAS PARA EL DESARROLLO DE ANTIMICROBIANOS

Las nuevas estrategias para el desarrollo de antimicrobianos plantean el “desarme” del patógeno mediante la inhibición de los mecanismos de virulencia que la bacteria emplea para causar la infección. De esta forma, se crearía un escenario similar a la vacunación con una cepa viva pero atenuada y no virulenta, incapaz de provocar daño en el hospedador. Este enfoque presenta numerosas ventajas como son la ampliación del número de nuevas dianas bacterianas, la preservación de la microbiota endógena del hospedador y una menor presión selectiva, lo que contribuiría a la disminución de la aparición de resistencias (Clatworthy *et al.*, 2007). Ejemplos de estas nuevas terapias “anti-virulencia” son la inhibición del efecto de toxinas o su liberación, el impedimento de la adhesión bacteriana o la actuación sobre los factores de transcripción que regulan la expresión de genes de virulencia. En este último caso, una forma de abordar el problema consiste en la búsqueda de nuevos compuestos que modifiquen la actividad de dichos factores transcripcionales. De esta manera es posible alterar las funciones genéticas del patógeno esenciales para producir la enfermedad *in vivo*, como es el caso de los genes necesarios para causar virulencia o los implicados en la viabilidad del mismo (Lynch & Wiener-Kronish, 2008).

Se ha demostrado que la disminución en la concentración de hierro, es una señal que desencadena la expresión de genes de virulencia en la bacteria. Diversos factores de virulencia como la toxina Shiga de *Shyghela dysenteriae* I, la toxina de la difteria de *Corynebacterium diphteriae* o la exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa* están regulados por la concentración de hierro (Litwin & Calderwood, 1993). En el control y expresión de todos estos genes participan homólogos de la proteína Fur (*Ferric Uptake Regulator*) (Carpenter *et al.*, 2009b).

## III. LA PROTEÍNA FUR

Fur (*Ferric Uptake Regulator*) pertenece a una superfamilia de proteínas que funcionan como reguladores transcripcionales metalodependientes. Se expresan en ambientes tanto aerobios como anaerobios y en procariotas de todo tipo, desde bacterias Gram-positivas, bacterias Gram-negativas, cianobacterias e incluso arqueobacterias. Dentro de esta familia se incluyen proteínas que responden a niveles de zinc (Zur, *Zinc Uptake Regulator*), manganeso (Mur, *Manganese Uptake Regulator*) o níquel (Nur, *Nikel Uptake Regulator*), además de proteínas que responden a estrés oxidativo como PerR (*Peroxide stress Response*) ((Lee & Helmann, 2007)).

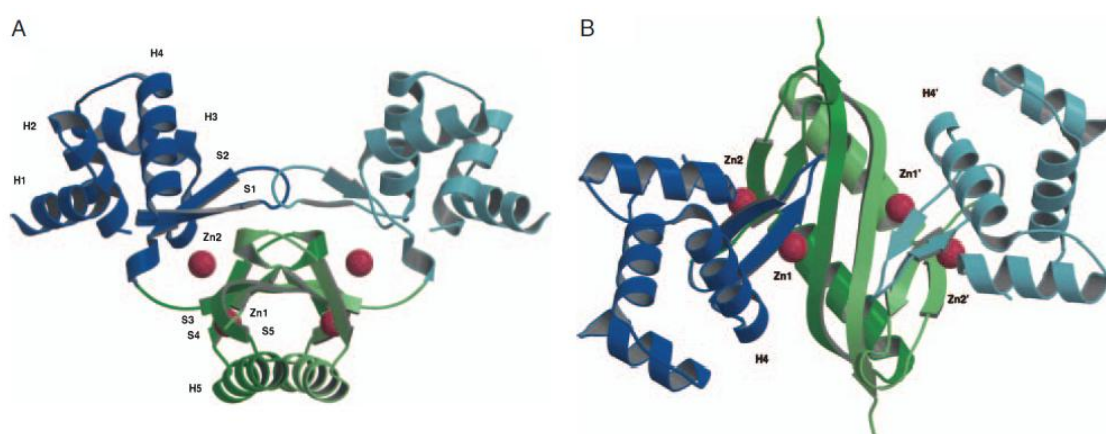
En concreto, Fur está implicada en la homeostasis del hierro, regulando genes de captación y almacenamiento del mismo. Por ejemplo en *Escherichia coli*, Fur regula el sistema de transporte de citrato férrico (*fecABCDE*) y en *Bacillus subtilis*, Fur regula genes que codifican un sistema de transporte de ferrihidroximato (*fhuDC*) (Bsat *et al.*, 1998). Además es esencial para la virulencia de muchos patógenos (Carpenter *et al.*, 2009b).

### a. Estructura de Fur

Las estructuras obtenidas por rayos X de homólogos de la familia Fur entre los que se encuentran una versión truncada de Fur de *E. coli* (Fur-(1-82)) (Pecqueur *et al.*, 2006), Fur de *Pseudomonas aeruginosa* (Pohl *et al.*, 2003), *Vibrio cholerae* (Sheikh & Taylor, 2009) y *Helicobacter pylori* (Dian *et al.*, 2011), Nur de *Streptomyces coelicolor* (An *et al.*, 2009), FurB/Zur de *Mycobacterium tuberculosis* (Lucarelli *et al.*, 2007) o PerR de *B. subtilis* (Jacquamet *et al.*, 2009), presentan características estructurales similares.

Estas proteínas, de unos 150 aminoácidos y pesos moleculares que varían entre 15 y 17 kDa, muestran un plegamiento básico con dos dominios bien definidos: un dominio amino terminal de reconocimiento y unión al DNA (~ 80 aa) y un dominio carboxilo terminal de dimerización (~ 70 aa), conectados ambos por una “bisagra”. Además, en la secuencia de aminoácidos destaca un motivo rico en histidinas HHXHX<sub>2</sub>CX<sub>2</sub>C altamente conservado, y otro motivo CX<sub>2</sub>C menos conservado en el extremo carboxilo de la proteína, que son potenciales sitios de unión a metal.

En Fur de *P. aeruginosa*, primera estructura cristalina obtenida para un homólogo de Fur, el dominio de unión a DNA está compuesto por cuatro hélices seguidas de una lámina  $\beta$  antiparalela de dos hebras, formando un motivo alado hélice-giro-hélice. El dominio de dimerización consiste en un dominio  $\alpha/\beta$  en el que tres hebras  $\beta$  antiparalelas cubren una larga hélice  $\alpha$ . Esta estructura presenta dos sitios de unión a metal: el **sitio 1** en el dominio de dimerización, responsable de la actividad de unión al DNA, donde el metal unido se conoce como **metal regulador**, y el **sitio 2** localizado en la “bisagra”, donde se une el **metal estructural** que es necesario para el correcto plegamiento de la proteína. En esta estructura, ambos sitios están ocupados por un átomo de Zn(II), aunque el sitio 1 también puede estar coordinado a un átomo de Fe(II) (Figura 1.2) (Pohl *et al.*, 2003).

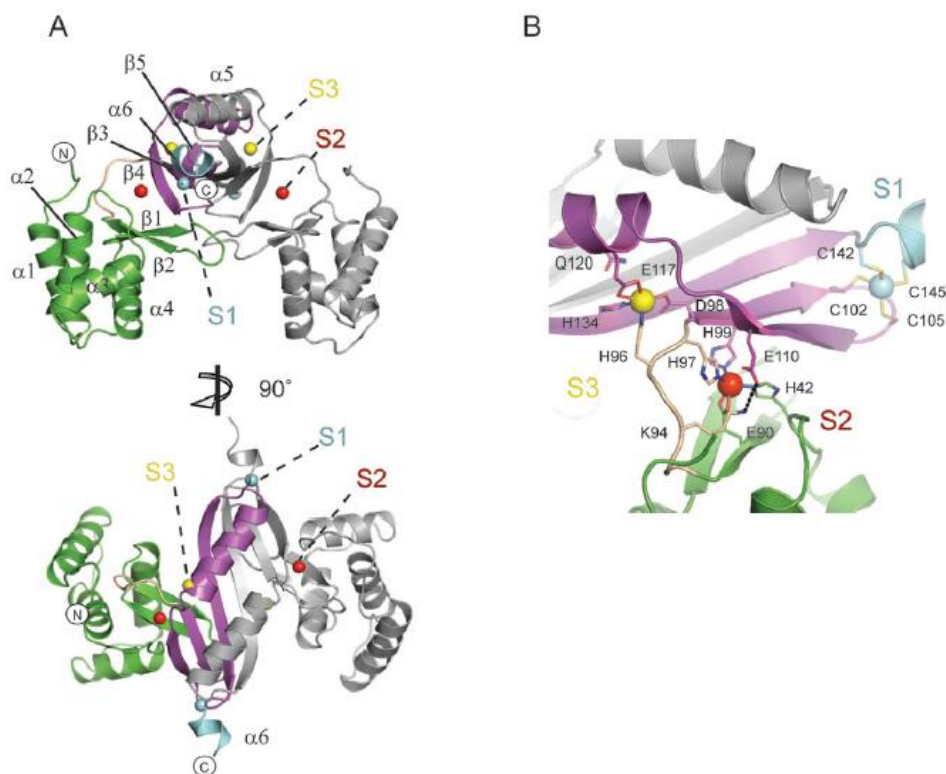


**Figura 1.2. Representación de la estructura cristalina del dímero Fur de *P. aeruginosa* (resolución 1.8 Å).** El dominio amino terminal de unión al DNA se presenta en azul, mientras que el dominio carboxilo terminal de dimerización se representa en verde. Los átomos de Zn(II) presentes en la estructura se representan como esferas rojas. **A.** Vista perpendicular del eje binario cristalográfico. **B.** Vista sobre el eje binario. (Adaptado de (Pohl *et al.*, 2003)).



Un modelo revisado basado en estudios de mutagénesis de varias proteínas Fur sugiere que realmente el sitio 2 descrito para Fur de *P. aeruginosa*, que es el localizado en la interfase entre ambos dominios, corresponde al metal regulador, donde se une un átomo de Fe(II). Su geometría suele conservarse en los distintos homólogos. Sin embargo, el sitio 1 podría ser un sitio de unión a metal de baja afinidad sin significado biológico (Lee & Helmann, 2007).

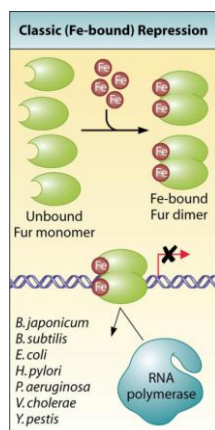
Se ha observado que existe variación entre los distintos homólogos sobre el metal que presentan y su coordinación con la proteína, participando residuos de His, Cys, Asp o Glu. En homólogos de la proteína como FurB/Zur de *M. tuberculosis* (Lucarelli *et al.*, 2007) y Fur de *H. pylori* (Dian *et al.*, 2011) se han descrito tres sitios de unión a Zn(II). En estas estructuras, así como en la de PerR de *B. subtilis* (Jacquamet *et al.*, 2009), el sitio de unión al metal estructural, localizado en el dominio de dimerización, presenta una geometría tetraédrica donde se encuentra coordinado a cuatro Cys implicadas en los dos motivos CXXC, no presentes en Fur de *P. aeruginosa* (Vitale *et al.*, 2009). Este sitio se designa como S1 en Fur de *H. pylori* y es esencial para su dimerización. Un segundo sitio conocido como S2 corresponde al sitio de unión al metal regulador, homólogo al sitio 2 de *P. aeruginosa*, y es esencial para la actividad de unión al DNA de la proteína. El tercer sitio, S3, se localiza en el dominio de dimerización, y en un principio no es esencial para la unión al DNA pero sí parece tener relación con la fuerza con la que Fur se une al DNA. Este sitio presenta homología con el sitio 1 descrito en *P. aeruginosa* (Figura 1.3).



**Figura 1.3. Representación de la estructura cristalina del dímero Fur de *H. pylori* (resolución 1.9 Å).** A. Dos vistas de la estructura dimérica de Fur, donde un monómero se representa en gris, y el otro monómero presenta el dominio de unión a DNA en verde, el dominio de dimerización en violeta, la bisagra que conecta ambos dominios en beige, y los átomos de Zn(II) se representan como esferas en azul (S1, sitio estructural), rojo (S2, sitio regulador) y amarillo (S3). B. Geometría de los tres sitios de unión a metal. (Adaptado de (Dian *et al.*, 2011)).

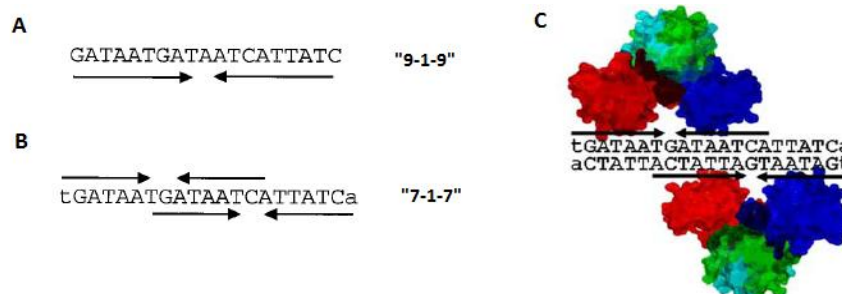
## b. Modo de acción de Fur

Generalmente, Fur regula los niveles intracelulares de hierro de forma que cuando éste es suficiente, un átomo de Fe(II) se coordina con un monómero de Fur y la proteína dimeriza. En estas condiciones, Fur se une al DNA en los promotores de los genes que regula impidiendo la unión de la RNA polimerasa, y por consiguiente, la transcripción del gen. A pesar de actuar como represor de manera clásica, también se ha descrito que puede ejercer su función como activador de la transcripción. Además, puede unirse al DNA en su forma apo, tal y como se ha descrito para un número relativamente pequeño de bacterias, como *H. pylori* (Carpenter *et al.*, 2009b) (Figura 1.4).



**Figura 1.4. Mecanismo general de represión propuesto para Fur.** Cuando los niveles de Fe(II) aumentan en la célula bacteriana, el Fe(II) actúa como cofactor y se coordina a un monómero de Fur, que dimeriza. El dímero Fe-Fur reprime la transcripción al unirse al promotor del gen que regula, impidiendo la unión de la RNA polimerasa. (Adaptado de (Carpenter *et al.*, 2009b)).

Se ha establecido una secuencia consenso de DNA a la que se une la proteína, conocida como “caja Fur”. Inicialmente se trató de una secuencia palindrómica de 19 pb rica en A y T, formada por dos motivos orientados de forma inversa, en la que Fur se une como un único dímero (Griggs & Konisky, 1989). Pero un modelo revisado propuesto por Baichoo *et al.* establece que la unión de Fur al DNA se apoya en dos motivos 7-1-7 solapantes para la proteína, donde dos dímeros de Fur se unen a dos motivos 7-1-7 en lados opuestos de la doble hélice de DNA (Figura 1.5) (Baichoo & Helmann, 2002).



**Figura 1.5. Representación esquemática de las secuencias consenso propuestas como “caja Fur”.** **A.** Secuencia de 19 pb propuesta inicialmente, donde Fur se une como un único dímero. **B.** La clásica “caja Fur” de 19 pb reconocida por dos dímeros de Fur interactuando cada uno con dos motivos 7-1-7 solapantes a lados opuestos de la doble hélice de DNA. **C.** Modelo de interacción de Fur de *P. aeruginosa* con el DNA basado en la caja Fur compuesta por dos motivos 7-17 solapantes. (Adaptado de (Baichoo & Helmann, 2002) y (Lee & Helmann, 2007)).

### c. Genes regulados por Fur en patógenos

Debido a la necesidad de hierro que presentan la mayoría de microorganismos, Fur desempeña un importante papel en los sistemas de captación y almacenamiento de hierro en patógenos, siendo por tanto esencial para la supervivencia del patógeno. Por ejemplo, en *P. aeruginosa*, Fur regula la producción del sideróforo pioverdina, que es una proteína de unión a hierro que la bacteria secreta para captarlo del ambiente (Prince *et al.*, 1993). En *Haemophilus ducreyi*, la regulación de *hgbA*, gen que codifica una proteína de unión a hemoglobina, también está mediada por Fur, de forma que la bacteria es capaz de captar hierro del grupo hemo (Carson *et al.*, 1996). En cuanto a los sistemas de almacenamiento de hierro, en *Listeria monocytogenes* y *H. pylori*, Fur regula los genes *fri* y *pfr* respectivamente. Ambos genes codifican una molécula procariótica tipo ferritina (Fiorini *et al.*, 2008) y (Delany *et al.*, 2001).

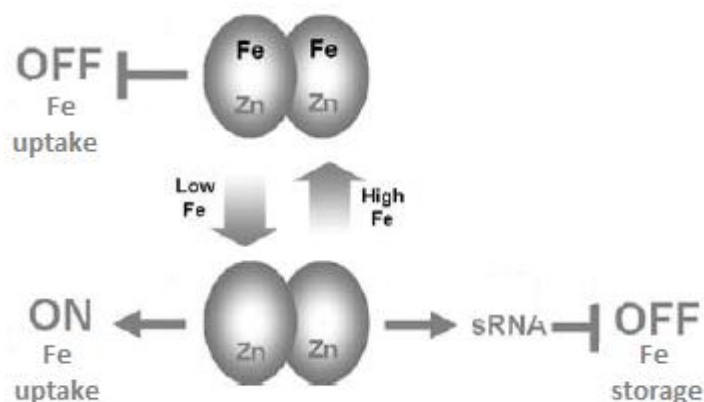
Además, Fur no sólo está relacionada con el metabolismo del hierro, sino que también juega un papel importante en la expresión de factores de virulencia en diversos patógenos. Por ejemplo, en *V. cholerae*, Fur regula de manera negativa la producción de hemolisina y la expresión de *irgA*, un determinante de virulencia de la membrana externa, mientras en *Neisseria gonorrhoeae*, Fur interacciona con los promotores de los genes que codifican las proteínas de la membrana externa que le ayudan a adherirse y a invadir a la célula hospedadora (Carpenter *et al.*, 2009b). A la vez, Fur interviene en la defensa contra el estrés oxidativo. Por ejemplo en *M. tuberculosis*, Fur regula la síntesis de catalasa, un enzima que ayuda a combatir los productos tóxicos derivados del oxígeno (Pym *et al.*, 2001). Del mismo modo, en *L. monocytogenes* Fur regula la síntesis de Dps, proteína que protege a la bacteria contra las especies reactivas de oxígeno y es esencial para la virulencia de este patógeno y necesaria para el crecimiento bacteriano en los primeros estadios de infección (Fiorini *et al.*, 2008). En *H. pylori*, Fur regula en su forma apo, el gen *sodB*, que codifica una superóxido dismutasa (Carpenter *et al.*, 2009a).

Otro aspecto importante a destacar en el papel que desempeña Fur en patógenos, es su relación con la colonización. Se ha demostrado que mutantes de *fur* de diversos patógenos muestran una reducida capacidad de colonizar modelos animales de infección. Por ejemplo, un mutante deficiente en *fur* de *H. pylori* mostró un defecto en la colonización del estómago en un modelo murino, a pesar de no ser un gen esencial para dicho patógeno (Bury-Mone *et al.*, 2004). Por otro lado, un mutante de *fur* de *L. monocytogenes*, presentó una significativa reducción en la virulencia de dicho patógeno (Rea *et al.*, 2004). Lo que no está claro es si el defecto en la virulencia de dichos mutantes se debe a una desregulación de los sistemas de captación de hierro, por ser un micronutriente esencial, o si se debe directamente a la regulación que ejerce Fur sobre genes implicados en su virulencia.

#### d. ¿Cómo se regula Fur?

La proteína Fur está regulada a distintos niveles del flujo de información genética:

- ✚ Nivel transcripcional. Se ha demostrado que Fur se une a su propio promotor en respuesta a hierro (Delany *et al.*, 2002).
- ✚ Nivel post-transcripcional. En la actualidad se acepta que la regulación positiva de Fur suele ser indirecta y se produce mediante la represión dependiente de Fur de un pequeño RNA antisentido regulador (*small RNA*). Este sRNA actúa a nivel post-transcripcional para reprimir la traducción de los genes diana ((Masse & Gottesman, 2002)). RhyB en *E. coli* es el sRNA regulado por Fur mejor caracterizado. Es un sRNA de 90 nucleótidos reprimido por Fur de manera dependiente de hierro (Masse *et al.*, 2005). Cuando hay limitación de hierro, la expresión de RhyB deja de estar reprimida provocando una disminución de la expresión de los genes diana, que codifican para proteínas que utilizan y almacenan hierro. Como consecuencia, *E. coli* usa de forma más eficiente el hierro disponible para sus funciones esenciales (respuesta a la escasez de hierro) (Figura 1.6).



**Figura 1.6. Actuación de Fur y RhyB en la regulación génica dependiente de hierro.** Cuando el hierro es bajo, aumenta la expresión de RhyB (sRNA). Como consecuencia se reprime la traducción de proteínas de almacenamiento de hierro y enzimas unidas a hierro no esenciales. Así se puede hacer un uso más eficiente del hierro disponible. (Adaptado de (Lee & Helmann, 2007)).

- ✚ Nivel post-traducciona. Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio indican que moléculas pequeñas son capaces de modular la actividad de Fur. En particular, se ha demostrado que FurA de *Anabaena* sp. PCC 7120 une hemo (Figura 1.7 A), en el rango de concentración micromolar, y que la presencia de este compuesto inhibe la unión de la proteína a promotores diana en función de la concentración del mismo (Hernandez *et al.*, 2004). Además, nuestros datos indican que la cisteína 141, perteneciente a un motivo cisteína-prolina (CP) que forma parte de un motivo regulador de hemo (*HRM, Heme Regulatory Motif*), es uno de los ligandos axiales del Fe(III) en la molécula de hemo (Pellicer *et al.*, 2012).

#### IV. FERROCENOS

Los reguladores transcripcionales, como es el caso de Fur, tienen separados un dominio de unión al DNA y un dominio de activación transcripcional. En principio, pequeñas moléculas, ya sean metabolitos naturales como el hemo, mencionado anteriormente, o diseñadas de forma sintética podrían unirse a cualquiera de los dos dominios, controlando de manera selectiva la transcripción de genes y pudiendo tener un efecto biológico o terapéutico.

Un tipo de moléculas orgánicas que han llamado la atención de los investigadores son los derivados de ferroceno. Spencer y *col.* han sintetizado un derivado del compuesto antitumoral SAHA con un grupo ferroceno en su estructura. SAHA actúa como inhibidor de histonas deacetilasas (HDAC<sub>s</sub>), y el derivado de ferroceno fue capaz de interactuar con las HDAC<sub>s</sub> mostrando un potencial efecto antitumoral (Spencer *et al.*, 2011).

El **ferroceno** es un compuesto organometálico tipo sándwich cuya fórmula es (C<sub>5</sub>H<sub>5</sub>)<sub>2</sub>Fe. Su estructura se basa en una disposición centrada del metal entre dos aniones ciclopentadienilos enfrentados entre sí, los cuales dan gran estabilidad al compuesto (Figura 1.7 B). Fue sintetizado por Pauson y Kealy en 1951 (Chavain & Biot, 2010) y desde entonces ha despertado gran interés en la química organometálica, ya que numerosos análogos sirven como "andamiaje molecular", cromóforo, marcador biológico, sitio redox activo, sitio catalítico, etc. La sustitución de grupos aromáticos por unidades de ferroceno, suele proporcionar al producto resultante una marcada actividad biológica carente en la molécula de partida (Damljanovic *et al.*, 2009).

Cabe destacar que ciertas moléculas químicas sintéticas que contienen un grupo ferroceno en su estructura presentan actividad antimicrobiana contra *M. tuberculosis* (Maguene *et al.*, 2011) y (Mahajan *et al.*, 2011), así como frente a diversos tipos de microorganismos (Damljanovic *et al.*, 2009).

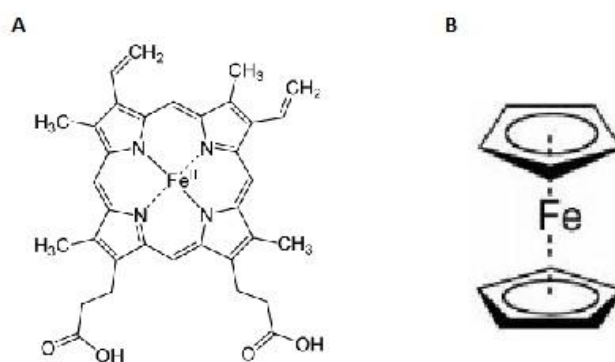


Figura 1.7. A. Estructura química del grupo hemo. B. Grupo ferroceno.

## **B. OBJETIVOS**

## **OBJETIVO GENERAL**

Selección de moduladores de la actividad de Fur de entre un conjunto de compuestos derivados de ferroceno y estudio de su actividad antimicrobiana.

## **OBJETIVOS PARCIALES**

- ✚ Clonar, sobreexpresar y purificar Fur de *Listeria monocytogenes* EGD-e y *Helicobacter pylori* 26695 como modelo de patógenos Gram-positivo y Gram-negativo, respectivamente.
- ✚ Realizar ensayos de caracterización bioquímica para evaluar su actividad biológica.
- ✚ Identificar moduladores de la actividad de ambas proteínas *in vitro* de entre un conjunto de compuestos derivados de ferroceno.
- ✚ Evaluar, *in vivo*, la acción antimicrobiana de los candidatos seleccionados.

## **C. MATERIALES Y MÉTODOS**



## I. MICROORGANISMOS Y MEDIOS DE CULTIVO

En este trabajo se han empleado los microorganismos que se recogen en la tabla I en la que se especifica la casa comercial y el uso que se les ha dado.

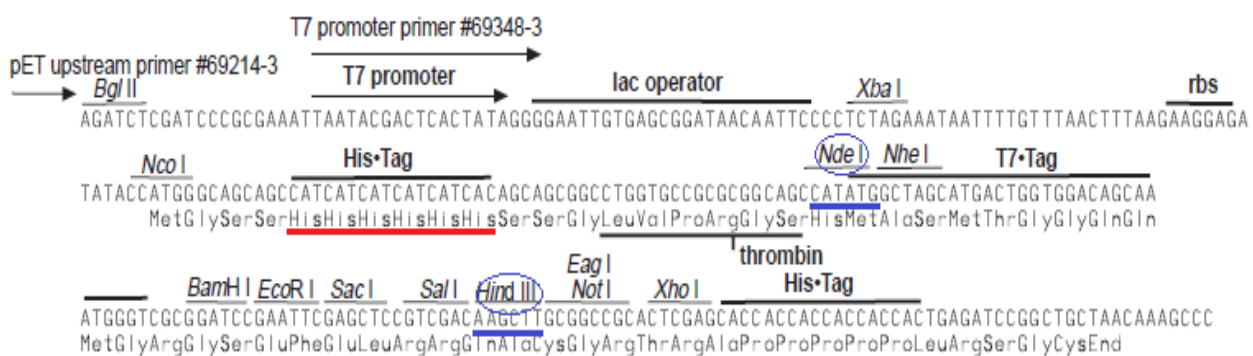
<b>Tabla I. Microorganismos empleados.</b>		
<b>CEPA</b>	<b>CASA COMERCIAL</b>	<b>EMPLEO</b>
<b><i>Escherichia coli</i> TG1</b>	STRATAGENE	Test de susceptibilidad antimicrobiana
<b><i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213</b>	ATCC	Test de susceptibilidad antimicrobiana
<b><i>Escherichia coli</i> DH5<math>\alpha</math></b>	INVITROGEN	Mantenimiento de plásmidos
<b><i>Escherichia coli</i> BL21 (DE3)</b>	NOVAGEN	Sobreexpresión de proteínas

Para el estudio de la sensibilidad antimicrobiana a un conjunto de compuestos derivados de ferroceno, se escogió *E. coli* TG1 como bacteria Gram-negativa y *S. aureus* ATCC29213 como bacteria Gram-positiva. Los cultivos en medio sólido se llevaron a cabo en *Mueller-Hinton agar* (MH) (Panreac) esterilizado, preparado según las especificaciones del fabricante. Las placas Petri de 90 mm de diámetro con una profundidad de 4 mm de medio sólido, se incubaron en estufa a 37 °C durante 14-18 h.

Para el resto de los experimentos llevados a cabo, los cultivos líquidos se realizaron en agitación a 37 °C en medio de cultivo *Luria-Bertani* (LB) esterilizado, cuya composición era 10 g/l NaCl, 10 g/l triptona y 5 g/l extracto de levadura. Esta solución se suplementó con agar al 1,5% para el medio LB sólido. La selección bacteriana, tanto en medio de cultivo LB sólido o líquido se realizó añadiendo el antibiótico kanamicina a una concentración final de 50  $\mu$ g/ml (LBK).

## II. CLONAJE DEL GEN *fur* EN EL PLÁSMIDO DE SOBREEXPRESIÓN

En este trabajo se generaron los plásmidos de expresión **pET-28a:*fur* Lm** y **pET-28a:*fur* Hp** que portaban en el sitio de clonaje múltiple el gen *fur*, bien de *L. monocytogenes* EGD-e (*Imo1956*), bien de *H. pylori* 26695 (*hp1027*). El inserto se introdujo entre los sitios de restricción *Nde*I y *Hind*III de forma que la proteína recombinante resultante se obtuvo con una cola de histidinas en el extremo amino terminal. En la figura 3.1 se muestra la zona de clonaje del vector resaltando los elementos citados anteriormente.



**Figura 3.1. Representación esquemática del sitio de clonaje múltiple del vector pET-28a(+) (Novagen).**

En rojo se resalta la cola de histidinas que se situará en el extremo amino de la proteína. En azul se señalan los sitios de restricción de las enzimas empleadas, *Nde*I y *Hind*III, donde se inserta el gen *fur*.

Para la obtención del plásmido, se llevaron a cabo los pasos descritos a continuación.

**a. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).** En la tabla II se detalla la secuencia de los oligonucleótidos empleados para amplificar los genes *fur* de *L. monocytogenes* EGD-e y *H. pylori* 26695, utilizando para ello el correspondiente DNA genómico. Se resaltan en negrita los sitios de corte de las enzimas *Nde*I y *Hind*III en los oligonucleótidos directo y reverso respectivamente. También se muestran los oligonucleótidos utilizados para amplificar los promotores específicos empleados en los ensayos de retardo en gel (*EMSA*) con ambos homólogos de la proteína Fur.

En cada caso se empleó un programa de PCR que comenzaba con una etapa inicial de desnaturalización del DNA de 5 min a 95 °C, seguida de 30 ciclos en los que cada ciclo constaba de una etapa de desnaturalización de 30 seg a 95 °C, una etapa de hibridación de 30 seg a la *T<sub>m</sub>* específica para cada par de oligonucleótidos (entre 50-55 °C) y una etapa de elongación de 45 seg a 72 °C. Por último se aplicó una etapa de elongación de 10 min a 72 °C para permitir que la DNA polimerasa terminase las hebras de DNA. La amplificación de cada fragmento se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en TBE (90 mM Tris-HCl pH 8, 90 mM Ácido Bórico, 2 mM EDTA), con 1 µg/ml de bromuro de etidio como revelador de ácido nucleícos. Se empleó un tampón de carga cuya composición era: 10 mM Tris/HCl pH 7,6, 0,03% azul de bromofenol, 0,03% xilenocianol FF, 60 mM EDTA y 60% glicerol, y los marcadores “TrackIt™ 1Kb Plus DNA Ladder” (Invitrogen) o “PhiX174 DNA/BsuRI (*Hae*III)” (Fermentas),

según procediera. Posteriormente, el producto de PCR deseado se purificó usando el kit “GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare).

Tabla II. Oligonucleótidos empleados en este trabajo.		
NOMBRE	SECUENCIA	FRAGMENTO AMPLIFICADO
Fur Lm_up	5' GGAGGAACCCATATGGAAGG 3'	Gen <i>fur</i> <i>L. monocytogenes</i> ( <i>Imo1956</i> )
Fur Lm_dw	5' GCAATTCAGTCAAGCTTTTGG 3'	
Fur Hp_up	5' GGGAATCCATATGAAAAGATTAGAAAC 3'	Gen <i>fur</i> <i>H. pylori</i> ( <i>hp1027</i> )
Fur Hp_dw	5' CCCAAGCTTTTAACATTCACTCTCTGGC 3'	
p <i>fhuC</i> _up	5' GCCATTGTATATGTACGCATC 3'	Promotor del gen <i>fhuC</i> de <i>L. monocytogenes</i> : p <i>fhuC</i>
p <i>fhuC</i> _dw	5' GTAAGTTATCTGTATGAAGGTCTTTC 3'	
p <i>feoB</i> _up	5' CCCCACTTTGATAAATTGCC 3'	Promotor del gen <i>feoB</i> de <i>H. pylori</i> : p <i>feoB</i>
p <i>feoB</i> _dw	5' GGGTTTGAATGCTCCGC 3'	

- b. Extracción de plásmido de *E. coli* a pequeña escala (miniprep) y cuantificación del DNA.** El plásmido pET-28a(+) se extrajo de células *E. coli* DH5α mediante *miniprep* utilizando el kit “GenElute™ Plasmid Miniprep Kit” (SIGMA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La concentración del plásmido extraído, así como la del fragmento amplificado por PCR, se determinó por espectroscopía de absorción UV, donde el DNA tiene un máximo de absorción a 260 nm como consecuencia de la presencia de bases nitrogenadas de su estructura. La absorbancia obtenida se relacionó con las referencias existentes para una concentración conocida de DNA de doble hebra, de acuerdo a la siguiente equivalencia:

$$1 \text{ unidad de Abs}_{260 \text{ nm}} (\text{dsDNA}) = 50 \text{ ng}/\mu\text{l}$$

- c. Digestión doble enzimática de DNA y ligación.** La digestión doble de DNA con enzimas de restricción se empleó tanto para cortar el fragmento que contenía el gen *fur* amplificado por PCR como el plásmido pET-28a(+). Ambos se digirieron con las enzimas *NdeI* y *HindIII* (Fermentas) haciendo la mezcla de reacción según las instrucciones del fabricante e incubando durante 3 h a 37 °C. De esta forma se crearon los mismos extremos cohesivos en el inserto y el vector. Después de purificar ambos, se realizó la ligación utilizando para ello la enzima T4-DNA Ligasa (Promega) e incubando la mezcla de ligación 3h a 37 °C.
- d. Preparación de células termocompetentes.** Para que una bacteria sea capaz de adquirir DNA exógeno, una forma es mediante un tratamiento previo con sales (CaCl<sub>2</sub>). Para ello, a partir de un cultivo crecido durante 14-18 h se hizo un inóculo al 1% en 200 ml de medio LB, y se incubó a 37 °C en agitación hasta alcanzar una D.O. a 600 nm de 0.35-0.45. A continuación se mantuvo el cultivo en hielo durante 20 min para detener el crecimiento. Posteriormente, se centrifugaron las células a 4000 rpm durante 15 min y 4 °C. El pellet se resuspendió en 40 ml de tampón de trituración estéril preenfriado en hielo, cuya composición era 14.7 g/l CaCl<sub>2</sub>, 14.23 g/l MgCl<sub>2</sub>, 3.28 g/l NaCl. Seguidamente se volvieron a centrifugar las células en frío y se resuspendieron en 4 ml de tampón de conservación, cuya

composición es 14.7 g/l CaCl<sub>2</sub>, 15% glicerol. Finalmente se repartieron las células en alícuotas de 200 µl que se congelaron a -80 °C para su conservación.

**e. Transformación mediante choque térmico.** La transformación mediante choque térmico se realizó para introducir los plásmidos pET-28a:*fur* Lm o pET-28a:*fur* Hp en el interior de las células competentes. Se transformaron células *E. coli* DH5α cuando el objetivo fue la obtención y conservación del plásmido, y la estirpe BL21 (DE3) cuando se necesitó la sobreexpresión del plásmido.

Para ello se descongeló una alícuota de 200 µl de células competentes y se incubó 20 min en hielo con 50-200 ng de DNA plasmídico. Otra alícuota de células competentes se incubó con agua estéril como control negativo. A continuación, se aplicó un choque térmico de 42 °C durante 90 seg, seguido de 2 min en hielo.

Posteriormente, se añadieron 800 µl de medio LB estéril y se incubó a 37 °C en agitación durante 45 min, para permitir la expresión de la resistencia al antibiótico kanamicina codificada en el plásmido. Por último, se sembraron 200 µl de células transformadas en una placa de LBK por diseminación, y se dejó en incubación durante 14-18 h a 37 °C.

Tras obtener colonias en la transformación, fue necesario identificar los transformantes que poseían el plásmido con el gen de interés, ya que en la pueden obtenerse productos no deseados, que dan lugar a falsos positivos. Para ello se realizó una PCR en colonia, que utiliza como molde el DNA contenido en la colonia a analizar.

**f. Secuenciación.** Los constructos pET-28a:*fur* Lm y pET-28a:*fur* Hp se secuenciaron en el Servicio de Análisis de Ácidos Nucleicos, perteneciente al Servicio General de Apoyo a la Investigación, de la Universidad de Zaragoza (<http://sai.unizar.es/nucleicos/>).

### III. SOBREEXPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS HOMÓLOGOS DE FUR

Para la sobreexpresión en *E. coli* de las dos proteínas recombinantes, **LmFur** y **HpFur**, se eligió el sistema pET (Novagen). El vector utilizado, pET-28a(+), contiene el promotor al que se une la T7-RNA polimerasa, cuyo gen está codificado en el DNA cromosómico de la cepa de sobreexpresión empleada, *E. coli* BL21 (DE3). Estos dos elementos permiten un elevado nivel de sobreexpresión de la proteína recombinante, cuando ésta se induce con isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG). El IPTG es un análogo de la galactosa, que se une a la proteína represora LacI, provocando un cambio conformacional en ésta y haciendo que pierda afinidad por la región operadora. De esta forma se podrá unir la RNA polimerasa y comenzar la transcripción. Así, este sistema posee un doble mecanismo de represión, de manera que en ausencia de IPTG, LacI impide la transcripción tanto de la T7-RNA polimerasa como del gen clonado en el vector, reduciendo los niveles de expresión basal de proteína cuando ésta no se ha inducido (Figura 3.2).

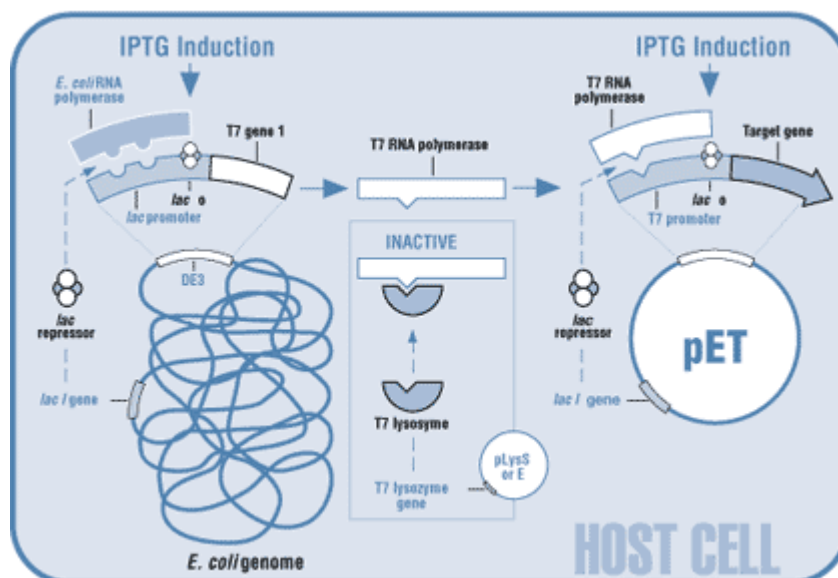


Figura 3.2. Elementos de control en el sistema pET (Novagen).

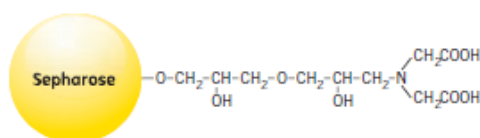
- a. **Sobreexpresión de las proteínas.** Primero se realizó una prueba de sobreexpresión a pequeña escala, analizando cuatro colonias de *E. coli* BL21 (DE3) recién transformadas con el constructo **pET-28a:fur Lm** o **pET-28a:fur Hp**. Para ello se inocularon las colonias a analizar en 10 ml de LBK y se incubaron durante 14-18 h. A partir de estos cultivos se hizo un inóculo al 1% en 10 ml de medio LBK y se incubó hasta alcanzar una D.O. a 600 nm de 0.5-0.6, momento en el que se indujo la expresión de la proteína recombinante LmFur o HpFur con IPTG (AppliChem) 1 mM durante 3 h a 37 °C. Posteriormente se analizó el nivel de sobreexpresión de los homólogos de Fur en las distintas colonias mediante electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes (*SDS-PAGE*).

Se eligió aquella colonia que mostraba un mayor nivel de expresión de Fur para cultivarse a gran escala en las mismas condiciones. Finalmente, la biomasa obtenida a partir de 10 l de cultivo se recogió por centrifugación del cultivo a 8000 rpm durante 10 min y 4 °C, lavándose el pellet con NaCl al 0,85%. Esta biomasa se congeló a -20 °C hasta su posterior utilización.

**b. Obtención del extracto crudo.** Para cada purificación se descongelaron unos 10 g de biomasa y se resuspendieron en 50 ml de tampón de lisis (Tabla III) que contiene 1 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonio) como inhibidor de proteasas. El homogeneizado se sometió a un proceso de rotura celular mediante sonicación en baño de hielo (10 ciclos de 45 seg con descansos de 30 seg entre ellos, a una amplitud del 90%). El extracto crudo se clarificó centrifugándolo 3 veces a 20000 rpm durante 20 min y 4 °C, y se mantuvo en hielo hasta ser cargado en la columna cromatográfica.

**c. Cromatografía de afinidad a metales (IMAC).** La cromatografía de afinidad a un ión metálico inmovilizado (*IMAC, Immobilized Metal ion Affinity Chromatography*) permite la separación de proteínas por interacción de algunos de sus grupos funcionales con el ión inmovilizado en la matriz. Contribuyen principalmente a esta interacción los residuos de His, y en menor medida Cys y Trp, por lo que está especialmente indicada para la purificación de proteínas recombinantes con cola de histidinas.

La matriz utilizada (*Chelating Sepharose Fast Flow*, GE healthcare) consiste en partículas esféricas de agarosa al 6% altamente entrecruzada a las que se le unen de forma estable los grupos quelantes del metal (ácido iminodiacético) mediante un brazo espaciador, lo que permite una distancia suficiente para que la proteína se una al ión metálico quelado a la matriz, sin impedimento estérico (Figura 3.3).



**Figura 3.3.** Esquema de la matriz de afinidad “*Chelating Sepharose Fast Flow*” (GE healthcare). Se observa como se ha unido a la matriz de agarosa un grupo de ácido iminodiacético con un brazo espaciador de 6 átomos de carbono.

La purificación de LmFur y HpFur se basó en la interacción entre el Níquel y la cola de histidinas de las proteínas recombinantes. Para ello se aplicaron a la matriz utilizada 5 volúmenes de una disolución 300 mM  $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ . Posteriormente se lavó la columna con 10 volúmenes de agua para eliminar el exceso de metal no fijado y se equilibró con 5 volúmenes de tampón A (Tabla III).

A continuación se pasó el extracto crudo por la columna a un flujo lento de 1 ml/min para permitir una buena interacción proteína-metal. Posteriormente se lavó la columna con el tampón de lavado (Tabla III) para arrastrar las proteínas unidas con baja afinidad al metal de la matriz, hasta que el eluido mostraba una absorbancia a 280 nm inferior a 0.1.

En el siguiente paso, se procedió a eluir la proteína fijada a la columna con un gradiente de imidazol (15 mM – 1 M) en tampón A. El imidazol al ser el grupo de la cadena lateral del aminoácido histidina,

compite con los residuos de His de la proteína recombinante por el metal quelado a la matriz, de manera que desplaza a las proteínas unidas específicamente a la columna. Se recogieron fracciones de 1 ml y las alícuotas se mantuvieron a 4 °C. Finalmente se lavó y regeneró la columna según las especificaciones del fabricante.

TAMPÓN	Fur Lm	Fur Hp
Tampón A	20 mM Tris-HCl pH 7.9 500 mM NaCl	25 mM Tris-HCl pH 7.8 500 mM NaCl
Tampón de lisis	Tampón A 5 mM Imidazol 1 mM PMSF	Tampón A 10 mM Imidazol 1 mM PMSF
Tampón de lavado	Tampón A 15 mM Imidazol	Tampón A 20 mM Imidazol
Tampón de elución	Tampón A 1 M Imidazol	Tampón A 1 M Imidazol
Tampón de diálisis	25 mM Tris-HCl pH 7.8 50 mM NaCl 10 mM MgCl <sub>2</sub> 0.1 mM DTT 5% Glicerol	50 mM Tris-HCl pH 7.8 100 mM NaCl 1 mM MgCl <sub>2</sub> 10% Glicerol

**d. Precipitación con ácido tricloroacético (TCA).** Para el análisis de las fracciones recogidas mediante SDS-PAGE fue necesario primero eliminar el imidazol, ya que aumenta mucho la fuerza iónica produciendo una distorsión de las bandas en el gel de poliacrilamida. Para ello a 15 µl de la fracción a analizar se añadió TCA a una concentración final del 5%, incubando la mezcla 15 min en hielo. A continuación se centrifugó la muestra a 14000 rpm durante 10 min y 4 °C para precipitar las proteínas. Tras eliminar el sobrenadante y lavar el precipitado con acetona, se resuspendió el pellet proteico en 10 µl de agua milliQ.

**e. Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).** Esta técnica utiliza el detergente dodecilsulfato sódico (SDS) como desnaturizante. La separación se hace en función únicamente del peso molecular, por lo que para la identificación de las proteínas se utilizó el marcador de pesos moleculares "Low Molecular Weight Calibration Kit For SDS Electrophoresis" (Ge Healthcare).

Se prepararon geles de poliacrilamida al 15% cuya composición se detalla en la tabla IV. Para la preparación de las muestras, se añadió tampón de carga cuya composición es 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 1% β-mercaptoetanol, 10% glicerol y 0.02% azul de bromofenol. A continuación se hirvieron las muestras 5 min antes de cargarlas en el gel para desnaturizar las proteínas. La electroforesis se llevó a cabo aplicando una corriente constante de 35 mA por gel durante 45 min aproximadamente, en un tampón compuesto por 25 mM Tris-HCl pH 8.8, 200 mM glicina y 3.5 mM SDS.

REACTIVO	GEL SEPARADOR 15%	GEL CONCENTRADOR 5%
H <sub>2</sub> O	0.71 ml	1.4 ml
Tris-HCl 1.5 M pH 8.8	2.24 ml	---
Tris-HCl 0.5 M pH 6.8	---	0.25 ml
Acrilamida : Bisacrilamida 30%	3 ml	0.33 ml
SDS 10%	30 $\mu$ l	10 $\mu$ l
PSA 10%	20 $\mu$ l	10 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l	10 $\mu$ l

Para visualizar las proteínas, se tiñó el gel de poliacrilamida durante 20 min con una disolución colorante compuesta por 10% ácido acético, 45% metanol, 45% agua y 0.25% (p/v) Coomassie Blue R-250. El colorante azul de Coomassie presenta una sensibilidad de 0.2-0.5  $\mu$ g de proteína y se une de forma no covalente a residuos básicos y aromáticos de la proteína. Para eliminar el exceso de colorante al gel, se realizaron varios lavados con una disolución decolorante cuya composición es 10% ácido acético, 25% metanol y 65% agua.

**f. Concentración y diálisis de las proteínas.** Las fracciones de proteína más puras se concentraron utilizando tubos "Amicon® Ultra" (Millipore) con un tamaño de poro de 10K. Este sistema impide que moléculas con un peso molecular superior a 10 kDa atraviesen la membrana del dispositivo, de forma que se concentran sobre la misma. Previo a su utilización, se equilibró la membrana con tampón A, centrifugándolo a 4000 rpm durante 10 min y 4 °C. Posteriormente se cargó la proteína y se fue concentrando con ciclos de centrifugación a 4000 rpm y 4 °C, hasta que el volumen inicial se redujo hasta 2 ml aproximadamente.

A continuación las soluciones proteicas se dializaron para retirar el imidazol de la disolución y dejarlas en las condiciones deseadas. La membrana de diálisis se introdujo en un recipiente con un volumen al menos 100 veces mayor de tampón de diálisis (Tabla III). Se mantuvo al menos 3 h a 4 °C y en agitación, y tras ello se renovó el tampón. Después de 3 cambios, se cuantificaron y alicuotearon las dos proteínas y se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

**g. Cuantificación de las proteínas por espectroscopía.** Todos los espectros realizados en este trabajo se registraron a 25 °C usando el espectrofotómetro *Cary 100 Bio*. Para conocer la concentración de proteína obtenida tras la purificación se cuantificó por espectroscopía de absorción molecular en el UV, aplicando la ley de Beer-Lambert:  $Abs = -\log(I/I_0) = \epsilon \cdot l \cdot C$ . Así se relaciona la concentración de una sustancia, C (M), con su absorción, donde  $\epsilon$  es el coeficiente de extinción molar ( $M^{-1} \cdot cm^{-1}$ ) y l representa el paso óptico (1 cm).

Las proteínas presentan un máximo de absorción a 280 nm debido a la absorción de los residuos aromáticos, especialmente triptófanos. La concentración se calculó conociendo el  $\epsilon$  teórico de las proteínas recombinantes purificadas, obtenido mediante el servidor **ExpPASy** (<http://au.expasy.org>). Los valores utilizados en este trabajo son  $\epsilon_{280\text{ nm}} = 10220 M^{-1} cm^{-1}$  para LmFur y  $\epsilon_{280\text{ nm}} = 11835 M^{-1} cm^{-1}$  para HpFur.



#### IV. TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS FUR

- a. **Estudio de la presencia de metal mediante electroforesis.** Se aplicó la técnica *SDS-PAGE* para analizar el efecto de la presencia de Zn(II) en la movilidad electroforética de las proteínas. Para ello se utilizó un quelante específico de Zn(II), N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine, **TPEN** (*SIGMA*) (Figura 3.4).

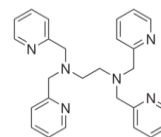


Figura 3.4. Fórmula química del quelante TPEN (*SIGMA*).

En un volumen final de reacción de 15  $\mu$ l, se trató una muestra 50  $\mu$ M de LmFur o 30  $\mu$ M HpFur con TPEN a una concentración final 5 mM, durante 20 min a temperatura ambiente. La finalidad era quitar todo el Zn(II) presente en la proteína. A continuación, estas alícuotas se incubaron durante 20 min con ZnCl<sub>2</sub> 1 mM, para conseguir revertir dicho efecto. Tras desnaturalizar las proteínas mediante hervido durante 5 min en tampón de carga, las muestras se analizaron por electroforesis al 15 % mediante el procedimiento habitual. Cuando fue necesario se usó el tampón de carga sin agentes reductores cuya composición era: 50 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol y 0.02% azul de bromofenol.

- b. **Determinación del número de cisteínas libres.** La determinación de los grupos tiol en estado reducido de una proteína, se puede realizar mediante el método espectrofotométrico desarrollado por (Ellman, 1959). El procedimiento está basado en la reacción que se produce entre los grupos tiol (-SH) presentes en las cisteínas reducidas, con el reactivo 5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid), **DTNB** (*SIGMA*) (Figura 3.5).

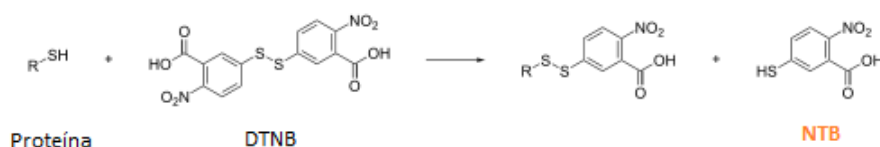


Figura 3.5. Reacción producida durante el ensayo de Ellman.

En la reacción se libera como subproducto NTB (5-tio-2-nitrobenzoato), cuya absorción a 412 nm se sigue con el tiempo por ser un producto coloreado. Dado que se conoce el coeficiente de extinción molar del compuesto generado ( $\epsilon_{412 \text{ nm}} = 13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), es posible establecer una relación molar entre el DTNB que ha reaccionado y la concentración de proteína empleada, ya que la estequiometría de la reacción es 1:1. Esta relación permite calcular el número promedio de tioles en estado reducido que presenta la proteína mediante la siguiente relación:

$$\Delta \text{Abs}_{412 \text{ nm}} = n_{\text{-SH}} \cdot [\text{Proteína}] \cdot 13600$$

Para el ensayo se incubaron, en un volumen final de 700  $\mu$ l, 10  $\mu$ l de LmFur o 50  $\mu$ L de HpFur en tampón fosfato de sodio 100 mM pH 7, con 7  $\mu$ l del reactivo DTNB recién preparado y en oscuridad a una concentración de 4 mg/ml en dicho tampón. El blanco se hizo antes de añadir la proteína, y tras su adición en la *cupeta de muestra*, se añadió el mismo volumen de tampón en la *cupeta de referencia*. La reacción se siguió por el incremento de absorbancia a 412 nm con el tiempo hasta alcanzar un máximo en la señal.

- c. **Detección de la actividad disulfuro-reductasa.** Para el estudio de la actividad disulfuro reductasa se llevó a cabo el experimento propuesto por (Holmgren, 1979). Cuando una proteína presenta dicha

actividad es capaz de catalizar la reacción entre el DTT y la insulina. La insulina está formada por dos cadenas,  $\alpha$  y  $\beta$ , unidas por un puente disulfuro. Al reducirse, la cadena  $\beta$  libre precipita, y la reacción se puede seguir por espectrofotometría a 650 nm ya que la precipitación provoca un aumento de la turbidez (Figura 3.6).



**Figura 3.6. Reacción entre el ditiotreititol y la insulina.** (Adaptado de (Holmgren, 1979)).

El ensayo se llevó a cabo en un volumen final de 700  $\mu$ l, donde la mezcla de reacción contenía 0.13 mM insulina (SIGMA), 0.33 mM ditiotreititol, DTT (SIGMA) y 10  $\mu$ M de la proteína de interés, todo en el tampón 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 100 mM NaCl y 2 mM EDTA. El blanco se hizo con el tampón, la insulina y la proteína, y a continuación, se añadió DTT a la *cupeta de muestra* y el mismo volumen de agua a la *cupeta de referencia*, comenzando la reacción. Se registró el cambio de absorbancia a 650 nm durante 80 min. Como controles positivos se utilizaron DsbA (10  $\mu$ M) y DsbC (5  $\mu$ M) de *E. coli*, y como control negativo, la reacción de la insulina con el DTT sin proteína que actúe como catalizador. En el cálculo de la actividad disulfuro reductasa, dada como  $\Delta DO_{650\text{ nm}} \cdot 10^{-3}/\text{min}^2$ , se tomó la variación de absorbancia en un minuto, dividiendo este valor por el minuto en que comienza a precipitar la insulina (Martinez-Galisteo *et al.*, 1993).

- d. Estudio de la interacción proteína-DNA: Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA).** Para estudiar la actividad de las proteínas recombinantes se hicieron ensayos de retardo en gel (EMSA). Esta técnica permite detectar si una proteína se une a un determinado DNA ya que el complejo que se forma provoca una disminución en la movilidad electroforética del DNA con respecto al DNA libre. El ensayo se hace en presencia de un DNA competidor, para asegurar que la interacción es específica.

Los fragmentos de DNA empleados en el ensayo se amplificaron por la técnica de la PCR (apartado C.II.a), con los oligonucleótidos descritos en la tabla II, y su cuantificación se hizo por espectroscopía de absorción UV (apartado C.II.b). Para LmFur se empleó como DNA específico el promotor del gen *fhuC* (*pfhuC*, 311 pb) y para HpFur, el promotor del gen *feoB* (*pfeoB*, 358 pb). En ambos casos se utilizó un fragmento de DNA inespecífico de *Anabaena* sp. PCC 7120 perteneciente al promotor del gen *nifJ* (*pnifJ*, 234 pb).

Tabla V. Composición del gel para EMSA al 6% (2 geles).	
REACTIVO	VOLUMEN
H <sub>2</sub> O milliQ	4.86 ml
Acrilamida : Bisacrilamida 30%	2.06 ml
Tampón de electroforesis 5x LmFur: 20 mM Tris-acetato pH 8, 0.1 mM DTT HpFur: 25 mM Tris-HCl pH 8, 190 mM Glicina	1.86 ml
Glicerol 50%	1.40 ml
PSA 10%	50 $\mu$ l
TEMED	30 $\mu$ l

En el ensayo se utilizaron geles de poliacrilamida en condiciones no desnaturizantes al 6% cuya composición se detalla en la tabla V. En cada ocasión, se prepararon en el momento y se precorrieron a

60 V y 4 °C durante 45 min para eliminar posibles trazas de poliacrilamida y PSA presentes en el pocillo que puedan desestabilizar el complejo proteína-DNA.

Las mezclas de reacción se prepararon en un volumen final de 20 µl. Las proteínas LmFur y HpFur se incubaron con 50-100 ng de DNA específico y 50-100 ng de DNA inespecífico, usando un tampón de unión específico para LmFur (20 mM Tris-Acetato pH 8, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 5% glicerol, 0.05 mg/ml BSA) y para HpFur (20 mM Tris-HCl pH 8, 75 mM KCl, 1 mM DTT, 5% glicerol, 0.05 mg/ml BSA). Con el tampón de unión se busca simular las condiciones que se producen en el interior celular: pH fisiológico, fuerza iónica moderada y elevada concentración proteica. Se probaron distintas condiciones, por lo que cuando fue necesario, se añadió a la mezcla de reacción:

- MnCl<sub>2</sub> 1 mM. El Mn(II) actúa como metal regulador estabilizando la unión proteína-DNA.
- EDTA 1 mM, quelante de iones divalentes.
- Grupo hemo preparado según el apartado C.IV.e, a distintas concentraciones (proteína/hemo 1:5, 1:8 y 1:14).
- Conjunto de compuestos ensayados. Los compuestos derivados de ferroceno se disolvieron en DMSO al 2%, y se probaron distintas concentraciones (proteína/compuesto 1:1, 1:5, 1:10 y 1:20) (Figura 3.7).

Las proteínas se añadieron siempre en último lugar, y la mezcla de reacción se incubó durante 20 min a temperatura ambiente. Por último, se añadieron 3 µl del tampón de carga compuesto por 20 mM Tris-HCl pH 8, 50 mM KCl, 50% glicerol, 0.0025% (p/v) azul de bromofenol. Tras aplicar las muestras, la electroforesis transcurrió durante 2h 30 min a 90 V y 4 °C en el tampón de electroforesis indicado en la tabla V. A continuación se tiñeron los geles durante 30 min a temperatura ambiente con una disolución compuesta por el revelador de ácidos nucleicos *Vistra Green*<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences) a una concentración de 1 µg/ml disuelto en el tampón de electroforesis.

**e. Estudio de la interacción con el grupo hemo.** Se preparó una disolución de hemo, en el momento del ensayo, usando como reactivo hemina (*SIGMA*). Para ello se disolvió una pequeña cantidad del mismo en 2 ml de una disolución 0.1 N NaOH : Etanol en proporción 9:1 (v/v), preparada en recipientes de cristal y protegida de la luz en todo momento. Después de agitar vigorosamente para conseguir la máxima disolución del reactivo, se filtró con una membrana de 0.20 µm para eliminar posibles trazas de producto sin disolver. La concentración de esta disolución de hemo se calculó por espectrofotometría diluyendo 50 µl de la misma en 950 µl de NaOH 0.1 N usando el coeficiente de extinción molar en medio básico del hemo ( $\epsilon_{385 \text{ nm}} = 58.44 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ). A partir de ésta se prepararon 50 ml de una disolución 2 µM de hemo en 50 mM Tris-HCl pH 8.

El ensayo se llevó a cabo partiendo de 800 µl de la disolución 2 µM de hemo, a la que se hicieron pequeñas adiciones de las soluciones proteicas LmFur y HpFur (de 2 a 40 µl), permitiendo así la formación del complejo proteína-hemo. Después de añadir el mismo volumen de tampón a la *cupeta de referencia*, y de proteína a la *cupeta de muestra*, se registró el espectro diferencial entre 300 y 600 nm, de forma que el máximo de absorción se desplazó de 385 nm (grupo hemo libre) a 414 nm (grupo hemo interaccionando con la proteína objeto de estudio). Una vez formado el complejo proteína-hemo en condiciones de saturación, se redujo añadiendo ditionito sódico (*SIGMA*) 5 mM disuelto en agua, y el mismo volumen de agua a la *cupeta de referencia*, volviendo a registrar el espectro diferencial. Los datos experimentales fueron ajustados a una ecuación teórica de estequiometría 1:1 usando el programa KaleidaGraph 2.1 de Albebeck.

## V. ENSAYOS *IN VIVO* DE SUSCEPTIBILIDAD ANTIMICROBIANA

- a. Cálculo de las unidades formadoras de colonias (CFU/ml).** A partir de un cultivo crecido durante 14-18 h, se hizo un inóculo al 1% en medio LB, y se incubó hasta alcanzar una D.O. a 600 nm de 0.6. A continuación, se hicieron diluciones seriadas del mismo, con PBS estéril. Por último, se sembraron 20  $\mu$ l de cada dilución en placas de LB, por triplicado, y se incubaron a 37 °C durante 16-24 horas. Para el cálculo de las CFU/ml se eligieron aquellas placas en las que había entre 10-20 colonias.
- b. Test de difusión en disco: Método Kirby-Bauer.** El test de difusión en disco se realizó de acuerdo al protocolo CLIS (*Clinical and Laboratory Standards Institute*). El objetivo fue determinar la sensibilidad o resistencia de diversas cepas frente a varios compuestos derivados de ferroceno (Figura 3.7), estudiando así la posible actividad antimicrobiana de dichos compuestos. Estos compuestos han sido proporcionados por la Dra. Concepción López Martínez, del Dpto. de Química Inorgánica (Universidad de Barcelona) y el Dr. Asensio González del Dpto. de Química Orgánica (Institut de Biomedicina, Barcelona).

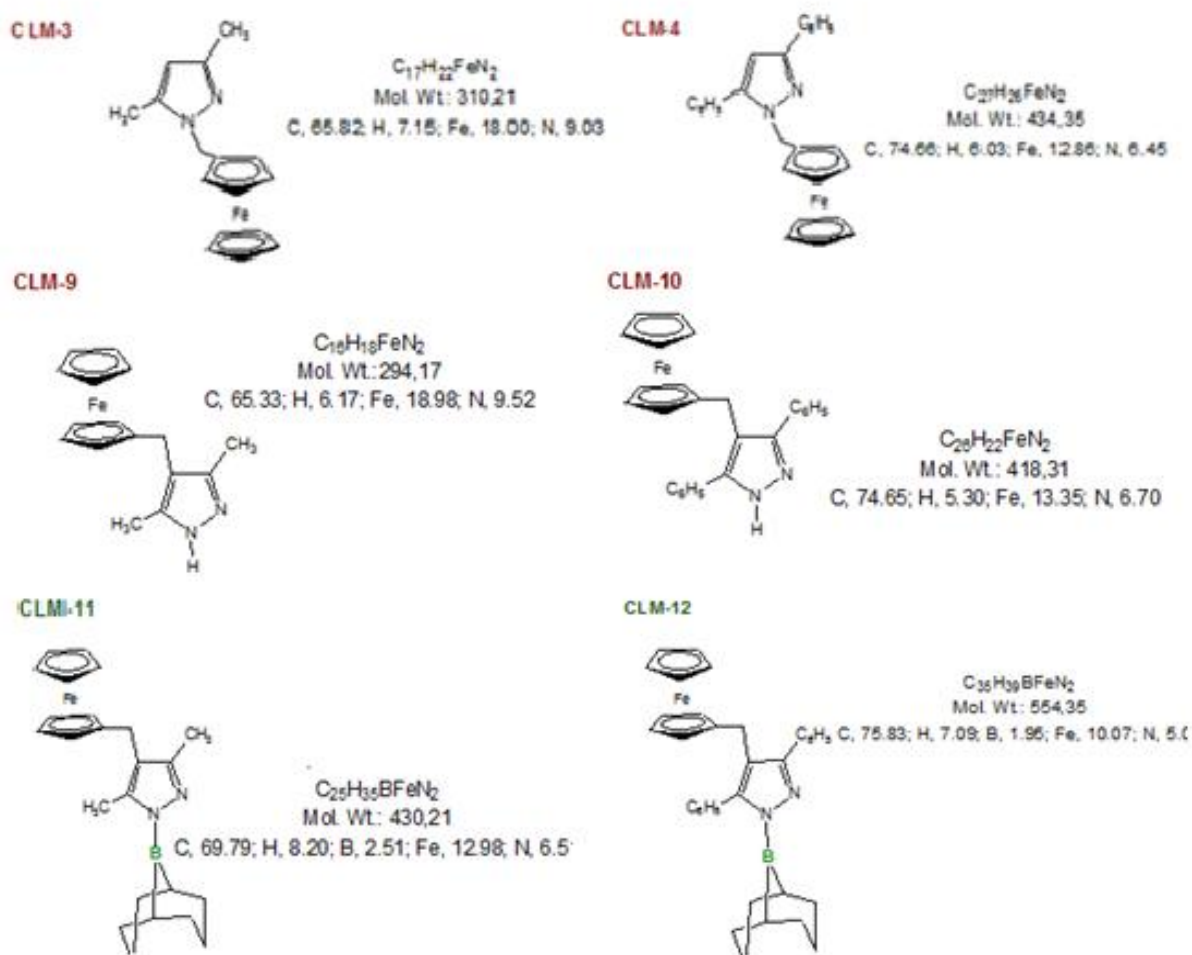


Figura 3.7. Compuestos derivados de ferroceno empleados en este trabajo.

Para ello, en placas de MH agar se sembraron en césped 200  $\mu$ l de cultivo en fase exponencial de *E. coli* TG1 a una concentración de  $3 \times 10^8$  CFU/ml y de *S. aureus* ATCC 29213 a  $2 \times 10^8$  CFU/ml. Sobre las placas se colocaron discos de papel de filtro (*Whatman*<sup>TM</sup>) estériles de 6 mm de diámetro. Los discos se impregnaron con 20  $\mu$ l de disoluciones de distinta concentración de los compuestos disueltos en DMSO, consiguiendo una concentración final de 20, 50, 100, 200 y 250  $\mu$ g/disco. Como control positivo se utilizó el antibiótico ampicilina a una concentración de 10  $\mu$ g/disco, y como control negativo se utilizó DMSO, por ser el solvente que se empleó para disolver los distintos compuestos. Las placas se incubaron 18-24 h a 37 °C, tras lo cual se observó el halo producido por la difusión del compuesto que inhibía el crecimiento de la bacteria.

- c. Test de dilución en caldo: Determinación de la C.I.M.** Para la determinación cuantitativa de la susceptibilidad a los compuestos ensayados, se calculó la concentración inhibitoria mínima (C.I.M.) mediante el test de dilución en caldo. El experimento se realizó únicamente para el compuesto derivado de ferroceno CLM-12 y con la cepa de *S. aureus* ATCC 29213.

Para ello, se preparó una disolución stock del compuesto CLM-12 en DMSO a una concentración de 500  $\mu$ g/ml. A partir de esta disolución stock, se hicieron diluciones seriadas del compuesto en medio LB líquido de 125  $\mu$ g/ml hasta 0.9  $\mu$ g/ml del compuesto, en un volumen final de medio de 2 ml. Los medios se prepararon en tubos falcon de 15 ml y en condiciones de esterilidad. Como control de crecimiento de la cepa ensayada, se preparó un tubo que no contenía compuesto CLM-12. Además, se preparó otro tubo en el que no se inocularon bacterias, para comprobar la esterilidad tanto de la solución del compuesto, como del medio LB. Una vez preparados los tubos, se inocularon con 100  $\mu$ l de un cultivo de *S. aureus* ATCC 29213 de D.O. a 600 nm de 0.6. A continuación, los tubos se incubaron a 37 °C durante 18-24 h con agitación suave.

Como control positivo se realizó el mismo experimento utilizando el antibiótico ampicilina. La solución stock de la que se partió para preparar las diluciones dobles seriadas fue de 1 mg/ml, y se probaron concentraciones de 50  $\mu$ g/ml a 0.78  $\mu$ g/ml de antibiótico. Se siguió el procedimiento descrito anteriormente.

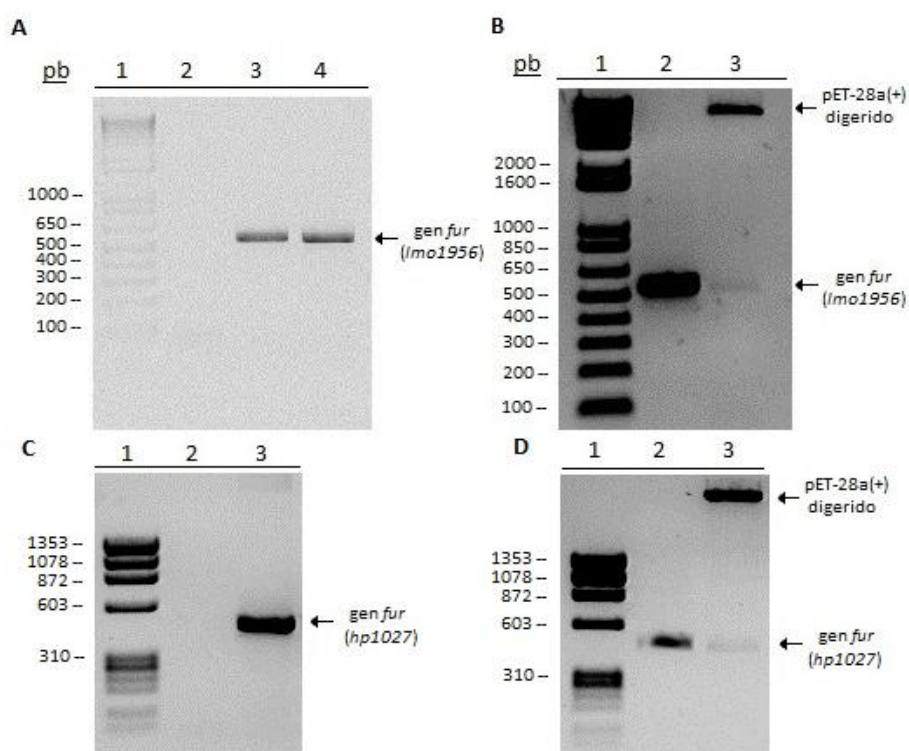
## **D.RESULTADOS**

## I. CLONAJE

Uno de los objetivos de este trabajo fue crear los plásmidos de sobreexpresión **pET-28a:fur Lm** y **pET-28a:fur Hp**, para obtener con una cola de histidinas en el amino terminal las proteínas recombinantes LmFur y HpFur respectivamente, y así purificarlas mediante una columna de afinidad a metal (IMAC).

Tras realizar el clonaje mediante los pasos descritos en el apartado de MATERIALES Y MÉTODOS, se procedió a verificar que los plásmidos contenían el gen de interés. Esto se comprobó mediante una digestión enzimática doble del plásmido, usando las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII* empleadas en el clonaje, y mediante una PCR utilizando como molde el plásmido generado.

En ambos plásmidos se demostró la presencia del gen de interés (Figura 4.1). Por último, se secuenciaron para comprobar que el gen clonado no presentaba ninguna mutación, dando como resultado la secuencia correcta correspondiente a cada gen *fur*.



**Figura 4.1. Verificación de la presencia del gen clonado *fur* en los plásmidos pET-28a:fur Lm y pET-28a:fur Hp.** **A.** Gel de agarosa al 1.5%, carril 1: marcadores de peso molecular, carril 2: control negativo de la PCR, carril 3: control positivo (PCR sobre DNA genómico, *Imo1953*), carril 4: producto de PCR utilizando el plásmido pET-28a:fur Lm como DNA molde. **B.** Gel de agarosa al 1.5%, carril 1: marcadores de peso molecular, carril 2: control positivo (PCR sobre DNA genómico, *Imo1953*), carril 3: plásmido pET-28a:fur Lm digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII* durante 2 h a 37 °C. **C.** Gel de agarosa al 1.2%, carril 1: marcadores de peso molecular, carril 2: control negativo de la PCR, carril 3: producto de PCR utilizando el plásmido pET-28a:fur Hp como DNA molde. **D.** Gel de agarosa al 1.2%, carril 1: marcadores de peso molecular, carril 2: control positivo (PCR sobre DNA genómico, *hp1027*), carril 3: plásmido pET-28a:fur Hp digerido con las enzimas de restricción *NdeI* y *HindIII* durante 2 h a 37 °C.

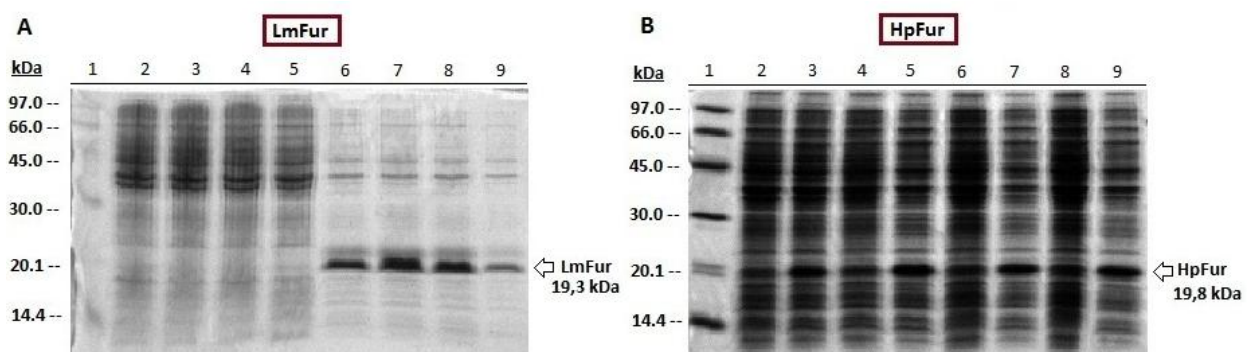
## II. SOBREENPRESIÓN Y PURIFICACIÓN DE LOS HOMÓLOGOS DE FUR

### a. Sobreexpresión de las proteínas

Para la sobreexpresión de LmFur y HpFur se siguieron los protocolos detallados en (Ledala *et al.*, 2007) y (Delany *et al.*, 2001), respectivamente. En ambos casos se adaptó la sobreexpresión de ambos homólogos de Fur, utilizando en este trabajo células de *E. coli* BL21(DE3) y los plásmidos **pET-28a:fur Lm** y **pET-28a:fur Hp**.

Se introdujeron los vectores en células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) mediante transformación por choque térmico. Los transformantes se crecieron hasta fase exponencial, momento en el que se indujeron con IPTG 1 mM durante 3 h a 37 °C. Tras ello se analizó la expresión proteica mediante *SDS-PAGE* al 15%. Las muestras se sometieron a lisis celular mediante hervido en tampón de carga en presencia de SDS. Se tomó una alícuota de cada cultivo sin inducir con IPTG como control. Ambas proteínas mostraron un nivel de sobreexpresión similar (Figura 4.2).

Una vez elegido el cultivo que mayor nivel de sobreexpresión de la proteína mostró, se procedió a su crecimiento a gran escala para la obtención de la biomasa. Para el caso de LmFur se empleó el cultivo analizado en el carril 7 y para HpFur, el cultivo analizado en el carril 5.



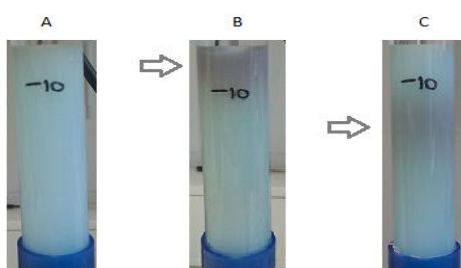
**Figura 4.2. Análisis de la sobreexpresión de las proteínas recombinantes mediante geles de *SDS-PAGE* al 15% (tampón de carga con agentes reductores).** **A.** Proteína LmFur. Se cargaron lisados celulares de cuatro colonias distintas, resultantes de la transformación de *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pET-28a:fur Lm. Carril 1: marcadores de peso molecular, carriles 2-5: cuatro colonias analizadas (control sin inducir), carriles 6-9: las mismas cuatro colonias inducidas con IPTG 1 mM 3 h a 37 °C. La banda gruesa que aparece en los carriles 6-9 corresponde a la proteína LmFur con cola de hisitidinas con un peso molecular de 19,3 kDa. **B.** Proteína HpFur. Se cargaron lisados celulares de cuatro colonias distintas, resultantes de la transformación de *E. coli* BL21(DE3) con el plásmido pET-28a:fur Hp. Carril 1: marcadores de peso molecular, carriles 2,4,6,8: cuatro colonias a analizar sin inducir, carriles 3,5,7,9: las mismas cuatro colonias inducidas con IPTG 1 mM 3 h a 37 °C. La banda gruesa que aparece en los carriles 3,5,7,9 corresponde a la proteína HpFur con cola de histidinas con un peso molecular de 19,8 kDa.



## b. Purificación de las proteínas

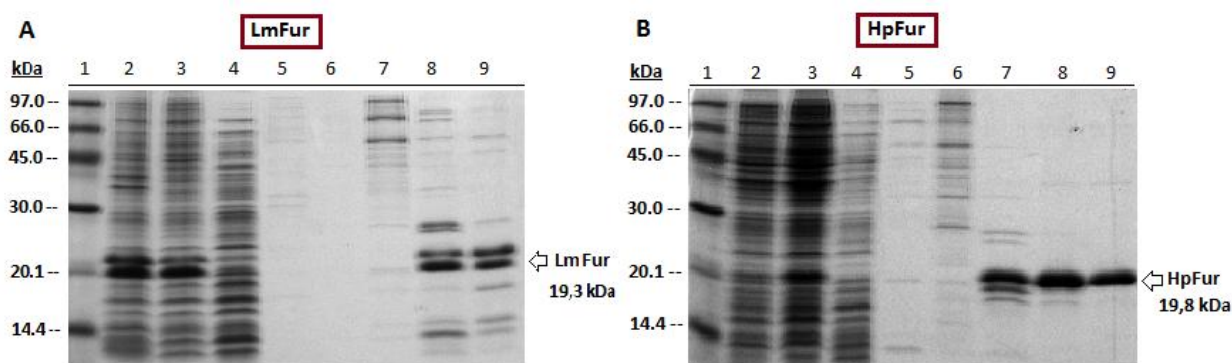
La purificación de ambas proteínas se basó en los protocolos descritos en (Fiorini *et al.*, 2008) y en (Delany *et al.*, 2001) para LmFur y HpFur, respectivamente. En ambos casos se utilizó una cromatografía de afinidad a metales (IMAC) aprovechando la interacción entre el Ni(II), coordinado a la matriz, y la cola de histidinas de las proteínas recombinantes.

En la purificación de las dos proteínas, se observó la presencia de una banda con color adherida a la matriz, una vez pasado el extracto crudo. Esta banda comenzó a desplazarse al eluir con gradiente de imidazol, indicando por tanto la presencia de la proteína (Figura 4.3). Las fracciones más ricas y puras de proteína presentaban un ligero color rojo/violeta, pero éste se perdió quedando la solución de proteína resultante totalmente incolora.



**Figura 4.3. Purificación de LmFur.** **A.** Columna cromatográfica IMAC con Ni(II). **B.** Columna tras haber cargado el extracto crudo, donde se observa la presencia de una banda con color en la parte superior, indicada con una flecha. **C.** Columna en el momento de la elución con gradiente de imidazol, donde se observa el desplazamiento de la banda coloreada. Lo mismo ocurrió con HpFur.

Las fracciones eluidas de la columna se sometieron a SDS-PAGE al 15% para comprobar en cuales de ellas se encontraba la proteína así como su pureza (Figura 4.4).



**Figura 4.4. SDS-PAGE al 15% del proceso total de purificación (tampón de carga con agentes reductores).** **A.** Proteína LmFur. Carril 1: marcadores de peso molecular, carril 2: lisado celular tras el proceso de sonicación, carril 3: extracto crudo, carril 4: material no fijado tras cargar el extracto crudo, carril 5-6: lavados, carril 7: fracción al comienzo de la elución con gradiente de imidazol, carril 8: fracción a mitad del gradiente de imidazol, carril 9: proteína LmFur tras la purificación. **B.** Proteína HpFur. Carril 1: marcadores de peso molecular, carril 2: lisado de células sin inducir, carril 3: lisado de células tras inducir con IPTG 1 mM, carril 4: material no fijado tras cargar el extracto crudo, carril 5: lavado, carril 6-8: fracciones alternas de la elución con gradiente de imidazol, carril 9: proteína HpFur obtenida tras la purificación.

En la purificación, no se detectó la presencia de la proteína de interés en las fracciones recogidas antes de la elución, indicando que el método empleado consigue mantener la proteína adherida a la matriz. Las dos proteínas mostraron un patrón de elución similar saliendo a mitad del gradiente de imidazol y repartidas en varias fracciones. Se observa mayor grado de pureza para HpFur que para LmFur, siendo aceptable en ambos casos.

Tras la purificación, se llevó a cabo la concentración de la proteína LmFur mediante el sistema "Amicon® Ultra" (Millipore), reduciendo el volumen hasta aproximadamente 2 ml. Ambas proteínas se dializaron una vez purificadas para conservarlas en las condiciones deseadas a -20 °C. En el proceso de diálisis, las dos proteínas recombinantes precipitaron parcialmente. Como material de trabajo se utilizó la proteína que estaba en solución tras la centrifugación.

### c. Cuantificación de las proteínas

Las proteínas se cuantificaron mediante espectrofotometría de absorción en el UV a 280 nm. Los espectros obtenidos de ambas proteínas tras la purificación fueron:

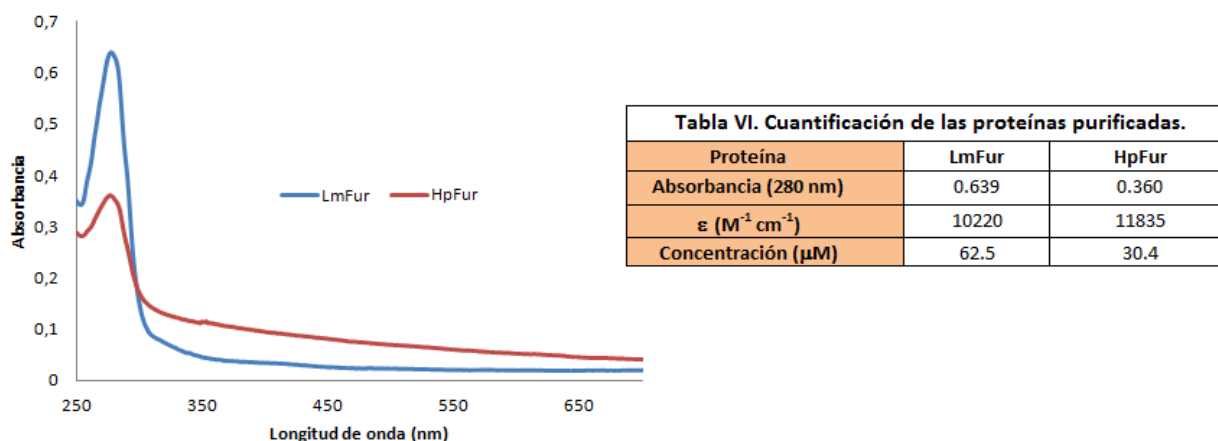


Figura 4.5. Espectro de absorción de las proteínas recombinantes purificadas.

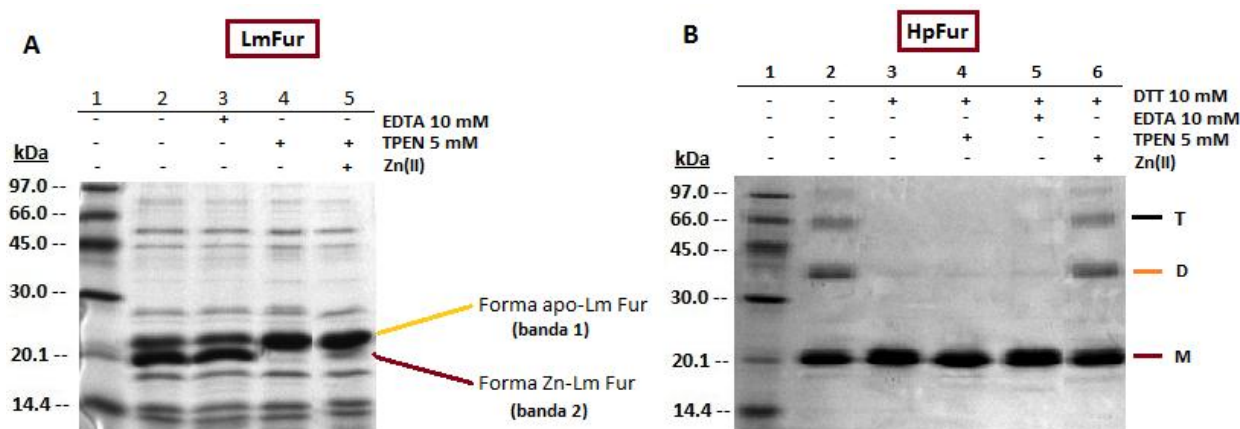
Los espectros mostraron un máximo de absorción en el UV cercano a 280 nm, valor con el que se determinó la concentración de las dos proteínas (Figura 4.5). Finalmente, se obtuvo una muestra proteica de concentración 62.5  $\mu M$  para LmFur y 30.4  $\mu M$  para HpFur (Tabla VI).

### III. ANÁLISIS DE LA PRESENCIA DE METAL MEDIANTE ELECTROFORESIS

Una característica común a muchas proteínas Fur es la presencia de metales en su estructura. De hecho, la mayoría de estructuras cristalinas descritas en la bibliografía, contenían dos sitios de unión a metal. Uno de los sitios está ocupado por el **metal regulador**, presente en el dominio de dimerización y responsable de la actividad de unión al DNA de la proteína. El otro sitio, ocupado por el **metal estructural**, se encuentra en la “bisagra” de unión entre el amino terminal y el carboxilo terminal, y se ha visto que es esencial para el correcto plegamiento de la proteína (Lee & Helmann, 2007).

En este trabajo, la proteína LmFur siempre mostró un patrón electroforético formado por dos bandas, tanto usando un tampón de carga con  $\beta$ -mercaptoetanol (agente reductor) como otro que no lo contenía. Por tanto se descartó que éstas dependieran del estado redox de la proteína. La hipótesis sugerida fue que las dos bandas correspondían a dos isoformas de la proteína cuya diferencia era su contenido en Zn(II) (apo-LmFur y Zn-LmFur).

Se analizaron mediante *SDS-PAGE* al 15% alícuotas 50  $\mu$ M de LmFur incubadas con TPEN 5 mM, quelante específico y fuerte para el Zn(II), o con EDTA 10 mM, un quelante general de metales divalentes. Las muestras tratadas con TPEN se incubaron a continuación con  $ZnCl_2$  1 mM, con el fin de reconstituir de nuevo la holoproteína (Figura 4.6 A).



**Figura 4.6. Análisis de la presencia de metal mediante *SDS-PAGE* al 15%. A.** LmFur 50  $\mu$ M (tampón de carga con agentes reductores). Carril 1: marcadores de peso molecular, carril 2: LmFur, carril 3: LmFur incubada con EDTA 10 mM, carril 4: LmFur incubada con TPEN 5 mM, carril 5: alícuota tratada con TPEN e incubada posteriormente con 1 mM  $ZnCl_2$ . **B.** HpFur 30  $\mu$ M (tampón de carga sin agentes reductores). Carril 1: marcadores de peso molecular, carril 2: HpFur, carril 3: HpFur incubada con DTT 10 mM (reductor), carril 4: HpFur incubada con DTT 10 mM y TPEN 5 mM, carril 5: HpFur incubada con DTT 10 mM y EDTA 10 mM, carril 6: HpFur incubada con DTT 10 mM y  $ZnCl_2$  1 mM. Se indica la presencia de monómeros (M), dímeros (D) y trímeros (T) en la solución.

Según se observa en la figura 4.6 A, el tratamiento de LmFur con TPEN hizo desaparecer prácticamente la banda 2, y se observó un enriquecimiento en la banda 1 (carril 4), lo que no ocurrió al tratar la proteína con EDTA (carril 3). Esto sugiere que la banda 1 correspondería a la forma apo-LmFur. La incubación con  $ZnCl_2$  1 mM de la muestra tratada con TPEN mostró la reaparición de la banda 2 (carril 5) que correspondería a la forma Zn-LmFur. Así se corrobora la hipótesis de que ambas bandas corresponden a dos formas de la proteína que se diferencian en la conformación que adoptan según el contenido en Zn(II). De ahí el hecho de que tengan distinta movilidad electroforética. Basado en este análisis, con el método de purificación utilizado en este trabajo para LmFur se obtiene una solución proteica heterogénea, en la que parte de la misma se encuentra unida a Zn(II) y la otra parte en forma apo.

La proteína HpFur mostró un comportamiento distinto a LmFur en electroforesis desnaturizante en condiciones reductoras, tal como se observa en la figura 4.6 B (carril 3), donde se observó únicamente una banda. Debido a la naturaleza dimerica de HpFur (Vitale *et al.*, 2009), se decidió analizar el efecto en la oligomerización, tanto del reductor DTT, como de la presencia de Zn(II), a través del tratamiento con  $ZnCl_2$  o con los quelantes TPEN y EDTA. Para ello, se analizaron alícuotas 30  $\mu$ M de proteína, usando un tampón de carga sin agentes reductores.

En la figura 4.6 B, se observa como la solución proteica de HpFur, está compuesta por una mezcla heterogénea ya que aparecen varias bandas, principalmente en torno a 20, 40 y 60 kDa (carril 2), sugiriendo la presencia de monómeros (M), dímeros (D), trímeros (T) e incluso oligómeros de mayor peso molecular. El tratamiento con el reductor DTT, hizo desaparecer las bandas superiores, predominando la forma monomérica de la proteína (carril 3). Este mismo efecto se observó al tratar la proteína con los quelantes EDTA y TPEN (carriles 4 y 5). En cambio el tratamiento de la muestra con DTT y Zn(II) hizo reaparecer el dímero (carril 6). Estos datos confirman que la solución de proteína HpFur obtenida tras la purificación es heterogénea, donde aproximadamente la mitad se encuentra como monómero y la otra mitad como especies oligoméricas. La transformación entre monómero y dímero depende tanto del estado redox de la proteína como del contenido en Zn(II) (Vitale *et al.*, 2009).

#### **IV. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CISTEÍNAS LIBRES**

Según la secuencia de aminoácidos que presentan las proteínas objeto de estudio (Figura 4.7), LmFur posee cuatro cisteínas formando dos motivos CXXC. HpFur tiene seis cisteínas, cuatro de ellas formando parte de sendos motivos CXXC. Estos motivos están implicados en la unión a metal en HpFur, como se ha visto en la estructura cristalina obtenida por (Dian *et al.*, 2011), y podrían estarlo tal como se ha descrito para LmFur (Fiorini *et al.*, 2008).

```

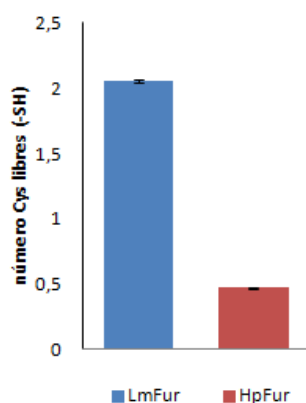
LmFur, 1  MEGRIGRIKAQLHDASYKLTQREATVVRVLENEKDHLSAEEVFLRVKDIAPDTGLATVY
HpFur, 7  LESILERLRMSIKKNGLNKSKQREEVSVLYRSGT-HLSPEEITHSIRQDKNTSISSVY
          *   *               *   *** *   **           *** **           *   **

LmFur, 61 RTLELLTELRVVDKINFGDGVSRYDLRQEGAKHFFHHHLVCLECGSVVEEIQEDLLEDVEKI
HpFur, 66  RILNFLEKENFICVLETSSKSGRRYEI--AAKEHHDHIIICLHC GKIIIEFADPEIENRQNE
          * * *               **           ** * *   * * * *   *   *

LmFur, 121 VESKWNFLVKDHRLTFQGICANCRQKSKKE
HpFur, 123 VVKKYQAKLISHDMKMFVWCKECQESEC
          * *               *   * *
    
```

**Figura 4.7. Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de las proteínas LmFur y HpFur.** El alineamiento se hizo a través del programa *SIM* del servidor *ExpPASy* (<http://web.expasy.org/sim/>). Se resalta en azul los dos motivos CXXC de ambas secuencias, y en verde los motivos ricos en histidinas. Además para la secuencia de HpFur aparecen en rojo las dos cisteínas no pertenecientes a motivos CXXC.

Mediante el tratamiento con el reactivo **DTNB** (Ellman, 1959) se puede estudiar el número de cisteínas libres (-SH) que presenta una proteína.



**Figura 4.8. Determinación del número de cisteínas libres presentes en la solución de proteína.** Los datos representan la media de dos experimentos y se muestra la desviación estándar en la figura.

La solución de proteína recombinante LmFur, mostró tras el ensayo  $2.05 \pm 0.01$  cisteínas libres (Figura 4.8). La forma apo-LmFur debería presentar cuatro cisteínas libres, mientras que la forma Zn-LmFur no debería presentar ninguna, ya que el metal estructural Zn(II) se encontraría coordinado por las cuatro cisteínas presentes en la proteína, según el modelo propuesto en (Fiorini *et al.*, 2008). Esta coordinación hace que dichos residuos de cisteínas no se encuentren disponibles para reaccionar con el reactivo DTNB. Esto sugiere que la mitad de la población de proteína estaría en forma apo y la otra mitad unida a Zn(II).

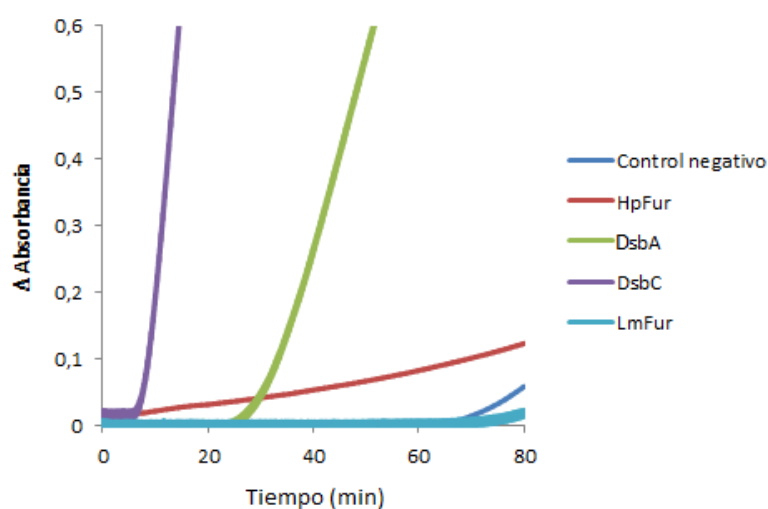
HpFur mostró un valor de  $0.47 \pm 0.02$  cisteínas libres (Figura 4.8). En las moléculas proteicas que están como dímero, de las seis cisteínas que presenta HpFur cuatro estarían coordinando un átomo de Zn(II) (motivos CXXC). De las otras dos, es posible que una estuviera libre y la otra formando un puente disulfuro intermolecular, ya que la dimerización depende del estado redox de la proteína tal y como se observa en la figura 4.6 B (carril 3). En la parte de solución proteica que está como monómero, cuatro de las cisteínas estarían coordinadas a un átomo de Zn(II), y es posible que las otras dos estuvieran formando un puente disulfuro intramolecular, por tanto no habría ninguna cisteína libre.

## V. DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD DISULFURO REDUCTASA

Las células poseen mecanismos que aseguran el correcto plegamiento de las proteínas, a menudo sustentado por la formación de puentes disulfuro. En uno de estos mecanismos intervienen proteínas con actividad disulfuro reductasa y disulfuro isomerasa. En *E. coli*, esta función la desempeñan DsbA/DsbB, que catalizan la formación de puentes disulfuro, y DsbC/DsbD que catalizan la isomerización de éstos (Denoncin & Collet, 2012). Es precisamente la presencia de motivos CXXC en la secuencia de aminoácidos de estas proteínas los que les confieren dicha actividad (Bessette *et al.*, 2001).

Estudios recientes realizados en el laboratorio con FurA de *Anabaena* sp. PCC 7120, sugieren que debido a la presencia de dos motivos CXXC en su secuencia, posee actividad disulfuro reductasa. Por tanto, se decidió estudiar si también poseen esta actividad los homólogos LmFur y HpFur, ya que ambos presentan dichos motivos.

Ninguno de los dos homólogos estudiados mostró actividad disulfuro reductasa (Figura 4.9), puesto que en ambos casos se obtuvo un valor similar al que presentó el control negativo. Por tanto se descarta que los homólogos Fur de los patógenos *L. monocytogenes* y *H. pylori* desarrollen esta actividad *in vitro*.



**Figura 4.9. Detección de la actividad disulfuro reductasa.** DsbC y DsbA se utilizan como controles positivos. El control negativo es la reacción del DTT con la insulina.

## VI. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN PROTEÍNA-DNA

La proteína Fur actúa como un represor clásico de la transcripción, de forma que se une al DNA en la región promotora de los genes que regula, impidiendo la unión de la RNA polimerasa. Por tanto, una buena forma de analizar la actividad de la proteína recombinante obtenida es mediante ensayos de retardo en gel (EMSA), donde se comprueba la unión de la proteína al DNA.

Para LmFur se empleó como DNA específico el promotor del gen *fhuC*, ya que Fur de *L. monocytogenes* regula la expresión de este gen que codifica para un sistema de captación de hidroximato férrico (McLaughlin *et al.*, 2010). Para HpFur se escogió el promotor del gen *feoB*, que codifica para una proteína de transporte de hierro (Waidner *et al.*, 2002). En ambos casos se utilizó un fragmento de DNA inespecífico de *Anabaena* sp. PCC 7120 perteneciente al promotor del gen *nifJ*.

### a. Búsqueda de las condiciones óptimas de unión en la interacción de los homólogos Fur con los promotores específicos

Para poder estudiar cómo afectan distintas condiciones a la interacción proteína-DNA, primero fue necesario buscar las condiciones óptimas de unión. Para ello se realizaron ensayos de retardo en gel variando la concentración de proteína y de Mn(II). El Mn(II) actúa como metal correpresor en lugar del Fe(II), ya que éste último se oxida a Fe(III) en contacto con el O<sub>2</sub> ambiental. De esta forma se mejora la actividad de la proteína, y se consigue acomplejar toda la cantidad de DNA con menor concentración de proteína.

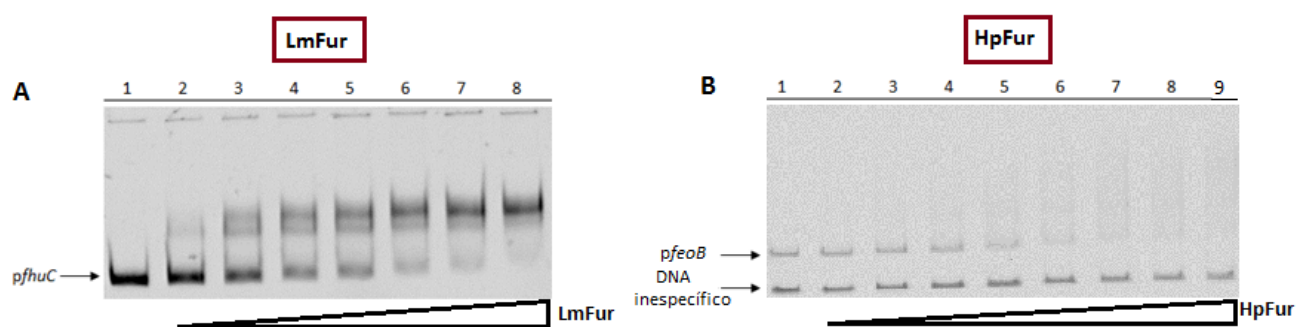
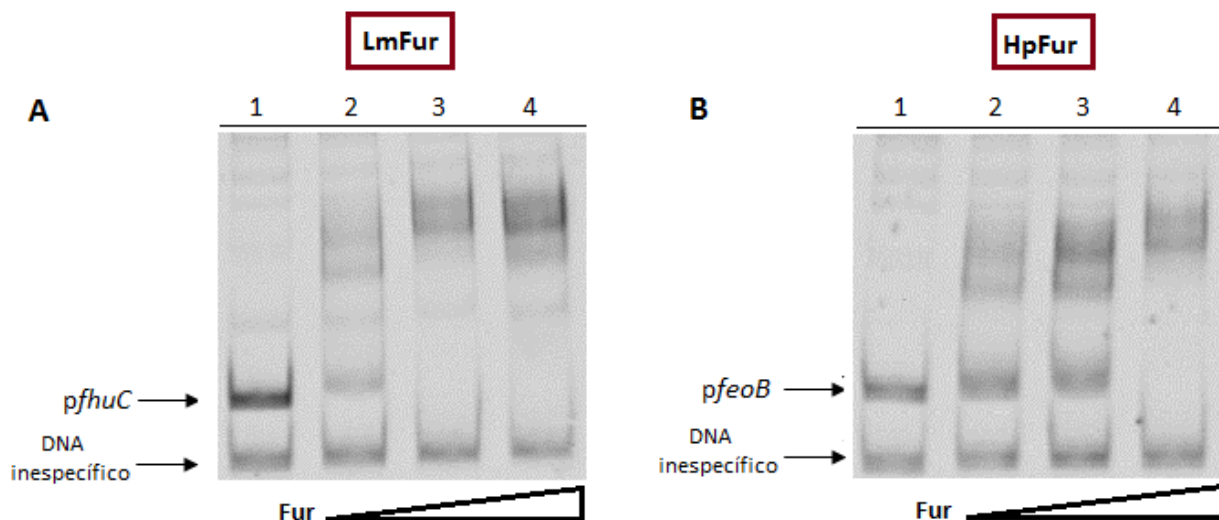


Figura 4.10. EMSA en gel de poliacrilamida al 6% para comprobar la actividad de las proteínas purificadas. A. Titulación de LmFur con 100 ng de DNA *pfhuC* y cantidades crecientes de proteína, de 0 a 700 nM (carriles del 1 al 8). B. Titulación de HpFur con 80 ng de DNA *pfeoB* y 80 ng de DNA inespecífico (*pnifJ*), y cantidades crecientes de proteína, de 0 a 1000 nM (carriles del 1 al 9).



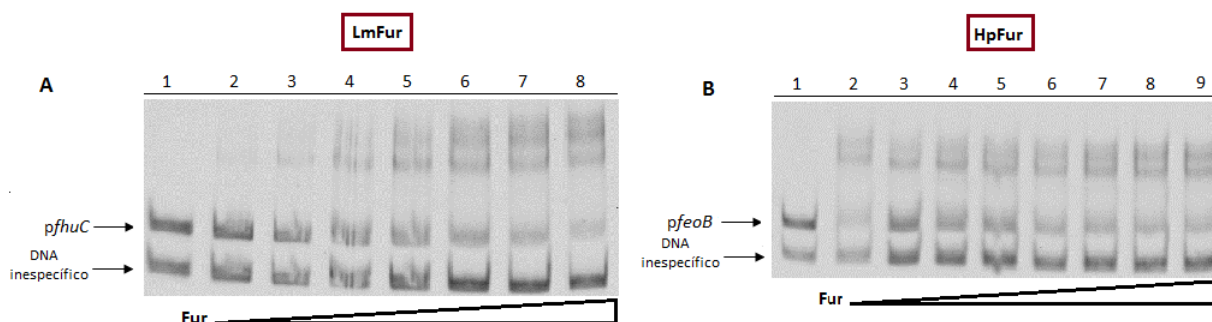
**Figura 4.11. EMSA en gel de poliacrilamida al 6% para comprobar el efecto del Mn(II) en la actividad de las proteínas. A.** Se incubaron distintas concentraciones de LmFur en el tampón de unión correspondiente con 100 ng de DNA *pfhuC* y 100 ng de DNA inespecífico (*pnifJ*), y con 1 mM MnCl<sub>2</sub>. Carril 1: control negativo sin proteína, carril 2: 250 nM de LmFur, carril 3: 500 nM de LmFur, carril 4: 700 nM de LmFur. **B.** Se incubaron distintas concentraciones de HpFur en el tampón de unión correspondiente con 80 ng de DNA *pfeoB* y 80 ng de DNA inespecífico (*pnifJ*), y 1 mM MnCl<sub>2</sub>. Carril 1: control negativo sin proteína, carril 2: 200 nM de HpFur, carril 3: 400 nM de HpFur, carril 4: 500 nM de HpFur.

Tal como se muestra en la figura 4.10 ambas proteínas mostraron actividad de unión al DNA. La titulación para LmFur mostró que a una concentración de proteína 700 nM se consigue acomplejar todo el DNA (Figura 4.10 A. carril 8). En cambio para HpFur, esto sucedió con una concentración 600 nM de proteína (Figura 4.10 B. carril 7). En la figura 4.11 se muestra como la adición de Mn(II) a la mezcla de reacción, mejoró en ambos casos la interacción proteína-DNA. Para LmFur, las mejores condiciones para la interacción proteína-DNA son 500 nM de LmFur y 1 mM de MnCl<sub>2</sub> (Figura 4.11 A. carril 3). Para HpFur las mejores condiciones de unión se consiguen también con 500 nM de HpFur y 1 mM de MnCl<sub>2</sub> (Figura 4.11 B. carril 4).

### b. Efecto de la presencia del quelante EDTA en la interacción proteína-DNA

Tal y como se hace referencia en (Lee & Helmann, 2007), las proteínas LmFur y HpFur necesitan el metal correpresor para su actividad *in vivo*. Pero para ambas se ha descrito que *in vitro*, son capaces de unirse a promotores específicos, aún sin haber metal en el medio (Ledala *et al.*, 2007). Para eliminar posibles trazas de metal presentes en la mezcla de reacción, se añadió EDTA 1 mM, que es un quelante de metales divalentes.





**Figura 4.12. EMSA en gel de poliacrilamida al 6% para comprobar el efecto de la presencia del quelante EDTA en la actividad de las proteínas. A.** Se incubó LmFur en el tampón de unión correspondiente que contenía 1 mM EDTA con 100 ng de DNA *pfhuC* y 100 ng de DNA inespecífico (*pnifj*). Carril 1: control negativo sin proteína, carriles 2-8: cantidades crecientes de proteína LmFur (100, 200, 300, 400, 500, 600 y 700 nM) **B.** Se incubó HpFur en el tampón de unión correspondiente que contenía 1 mM EDTA con 80 ng de DNA *pfeoB* y 80 ng de DNA inespecífico (*pnifj*). Carril 1: control negativo sin proteína, carriles 2-8: cantidades crecientes de proteína HpFur (100, 200, 300, 400, 500, 600, 700 y 1000 nM).

Según se observa en la figura 4.12, el efecto del EDTA no inhibe por completo la actividad de las proteínas, observándose la formación del complejo proteína-DNA, a concentraciones superiores a 200 nM para LmFur (Figura 4.12 A. carril 3) y 100 nM para HpFur (Figura 4.12 B. carril 2). Estas proteínas necesitan la presencia del metal correpresor *in vivo*, pero no es estrictamente necesario para su actividad *in vitro*, aunque en presencia de él sí se mejora su actividad.

## VII. ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN DE LOS HOMÓLOGOS FUR CON EL GRUPO HEMO

En nuestro grupo se ha demostrado que la proteína FurA de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 es capaz de unirse fuertemente al grupo hemo, lo cual afecta a su capacidad de interacción con el DNA (Hernandez *et al.*, 2004).

En este trabajo se ha analizado si las dos proteínas Fur de los patógenos *L. monocytogenes* y *H. pylori* son capaces de unirse al grupo hemo y cómo afecta a la actividad de la proteína la presencia de este compuesto.

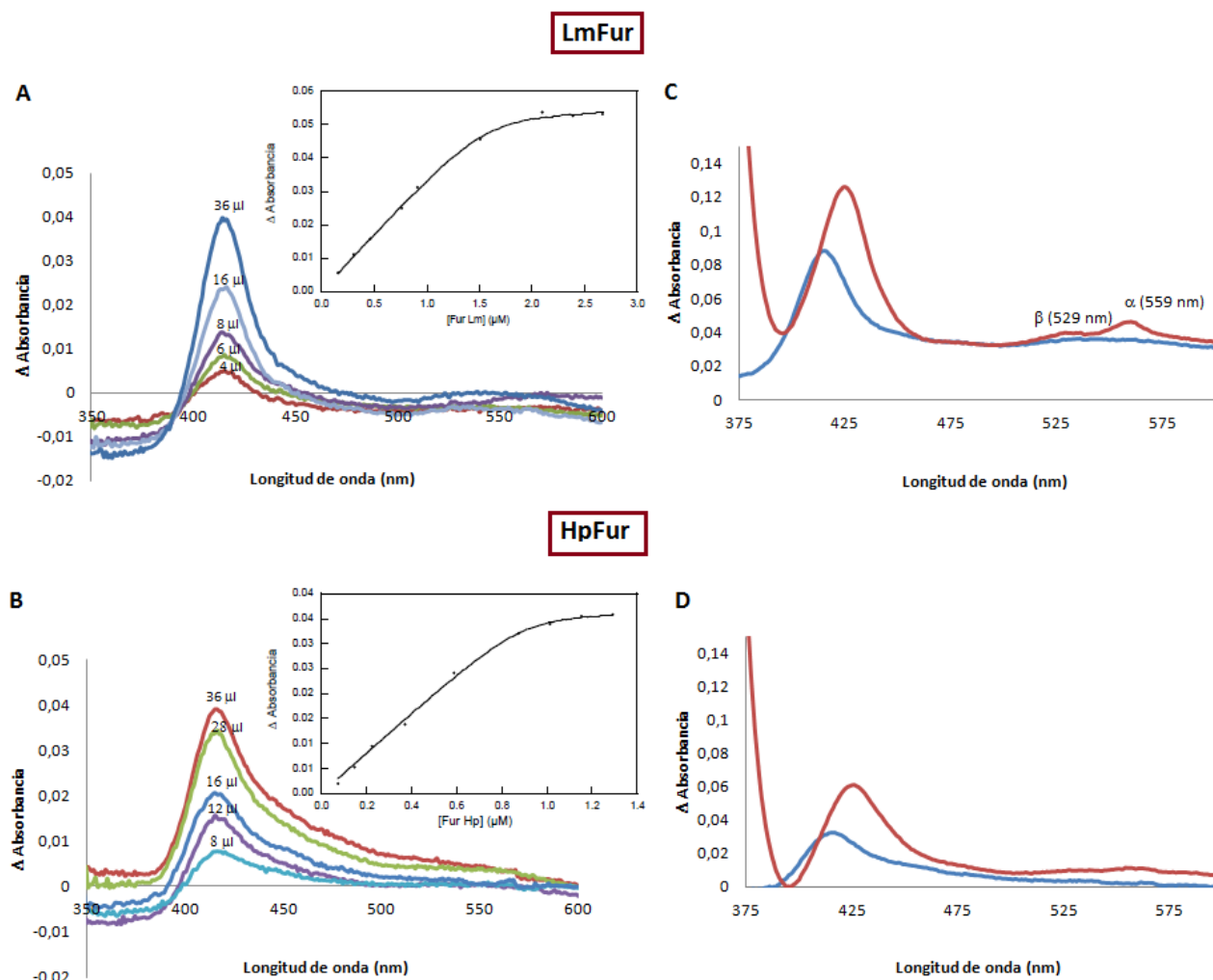
### a. Detección de los complejos mediante espectroscopía diferencial

El espectro del grupo hemo libre presenta un máximo de absorción a 385 nm. Cuando el grupo hemo se encuentra interaccionando con una proteína, su espectro cambia y el máximo de absorción se desplaza a 414 nm. De esta forma, se puede seguir por espectroscopía diferencial el cambio que se produce en el espectro de absorción en el UV-Visible del grupo hemo, al ir añadiendo cantidades crecientes de proteína a una solución de este compuesto.

Para estudiar si las proteínas formaban un complejo con el grupo hemo, se realizó una titulación de proteína (de 2 a 40  $\mu$ l) sobre una disolución 2  $\mu$ M de hemo en Tris-HCl 50 mM pH 8. Al registrar los espectros diferenciales, se observó la aparición de un pico a 414 nm (máximo del grupo hemo interaccionando con una proteína), lo que fue indicativo de la formación del complejo proteína-hemo (Figura 4.13 A y B).

La titulación se realizó hasta alcanzar la condición de saturación. Así se pudo estudiar la cantidad de grupo hemo capaz de interaccionar con las proteínas LmFur o HpFur, y por tanto la constante de disociación ( $K_d$ ) del complejo formado Fur-hemo para ambas proteínas. Para ello, se dibujó la curva de saturación representando la variación de absorbancia producida como consecuencia de la formación de dicho complejo ( $Abs_{414 \text{ nm}} - Abs_{385 \text{ nm}}$ ) frente a la concentración de proteína añadida. Los datos se ajustaron a una ecuación teórica utilizando el programa KaleidaGraph 2.1 de Albebeck, asumiendo una estequiometría 1:1 para ambas proteínas (Recuadro figura 4.13 A y B). La formación del complejo para ambas proteínas quedó demostrada, pero a pesar de realizar el experimento por triplicado, no se pudo obtener un valor numérico para la  $K_d$  fiable como consecuencia de la naturaleza de las proteínas. Aún así la constante de disociación mostró un valor en el rango de concentración  $\mu$ M.

La reducción con ditionito sódico 5 mM del complejo proteína-hemo provocó un cambio en el espectro. El máximo de absorción se desplazó de 414 nm (espectro del hemo interaccionando con la proteína) a 426 nm y aparecieron dos nuevas bandas,  $\alpha$  (558 nm) y  $\beta$  (529 nm), características del complejo reducido. Esto indicó que realmente existe una interacción entre el grupo hemo y la proteína objeto de estudio, ya que el espectro del hemo cambia cuando cambia su entorno, como cuando se encuentra unido a una proteína (Figura 4.13 C y D).

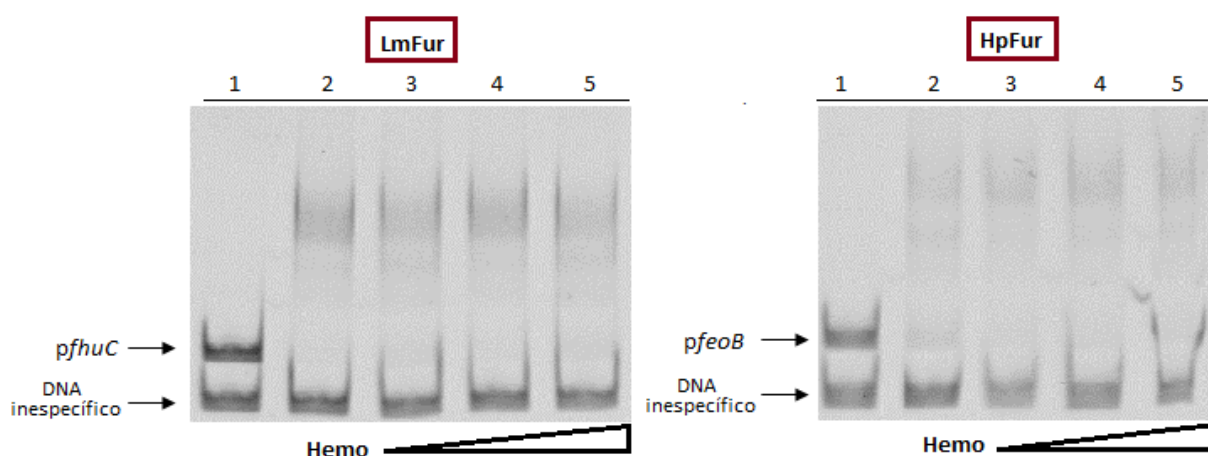


**Figura 4.13. Estudio por espectroscopía diferencial de la unión del grupo hemo a los homólogos de la proteína Fur.** **A.** Espectro diferencial de la formación del complejo LmFur-hemo por adición de cantidades crecientes de LmFur a una disolución de hemo 2  $\mu$ M en Tris-HCl 50 mM pH 8. Recuadro: Curva de saturación del grupo hemo con LmFur, que corresponde a un complejo de estequiometría 1:1. **B.** Espectro diferencial de la formación del complejo HpFur-hemo por adición de cantidades crecientes de HpFur a una disolución de hemo 2  $\mu$ M en Tris-HCl 50 mM pH 8. Recuadro: Curva de saturación del grupo hemo con HpFur, que corresponde a un complejo de estequiometría 1:1. **C.** Reducción del complejo LmFur-hemo. Línea azul: espectro diferencial del complejo LmFur-hemo en condiciones de saturación, línea roja: espectro diferencial tras reducir el complejo al añadir ditionito sódico 5 mM. **D.** Reducción del complejo HpFur-hemo. Línea azul: espectro diferencial del complejo HpFur-hemo en condiciones de saturación, línea roja: espectro diferencial tras reducir el complejo al añadir ditionito sódico 5 mM.

## b. Estudio del efecto de la presencia de hemo en la actividad de las proteínas

En base al complejo que se forma entre las proteínas objeto de estudio y el grupo hemo, se quiso estudiar el efecto de esta unión en la actividad de la proteína *in vitro*. Para ello se realizó un ensayo de retardo en gel (EMSA) en el que se incubaron las proteínas LmFur o HpFur con cantidades crecientes de hemo.

El estudio se realizó en las mejores condiciones para la actividad de ambas proteínas, siendo 500 nM de proteína y 1 mM MnCl<sub>2</sub>.



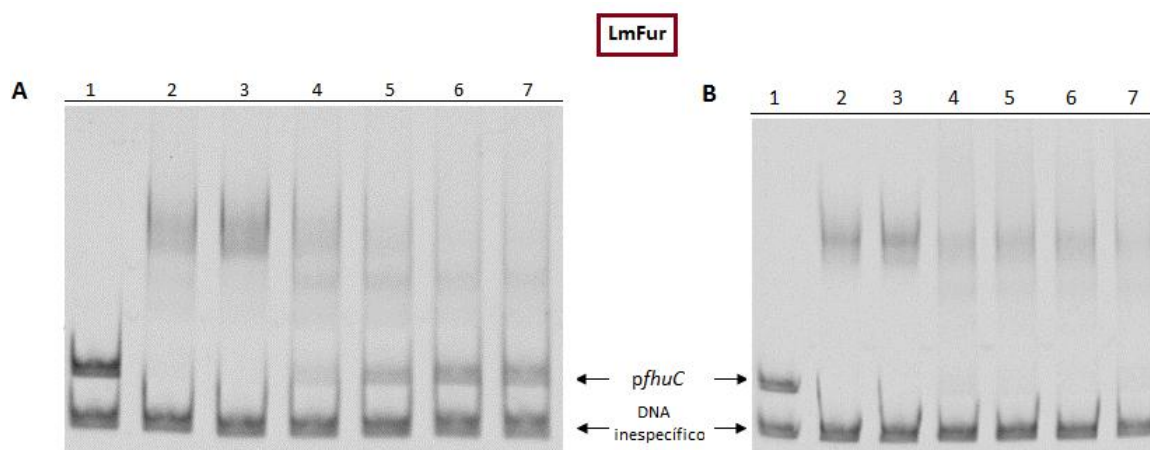
**Figura 4.14. Estudio mediante EMSA del efecto del grupo hemo en la actividad de los homólogos de Fur *in vitro*.** A. EMSA en gel de poliacrilamida al 6% para LmFur. Se incubaron 500 nM de LmFur con 100 ng de DNA *pfluC* y 100 ng de DNA inespecífico (*pnifJ*) en el tampón de unión correspondiente en presencia de 1 mM MnCl<sub>2</sub>. B. EMSA en gel de poliacrilamida al 6% para HpFur. Se incubaron 500 nM de HpFur con 100 ng de DNA *pfeoB* y 100 ng de DNA inespecífico (*pnifJ*) en el tampón de unión correspondiente en presencia de MnCl<sub>2</sub> 1 mM. En ambos casos: carril 1: DNA sin proteína (control negativo), carril 2: mezcla de reacción sin hemo (control positivo), carril 3-5: mezcla de reacción incubada con cantidades crecientes de hemo (a una relación proteína:hemo de 1:5, 1:8 y 1:14, respectivamente).

En la figura 4.14 se observa que el grupo hemo no interfiere en la unión, y la proteína mantiene su actividad incluso con una concentración 14 veces mayor de este compuesto.

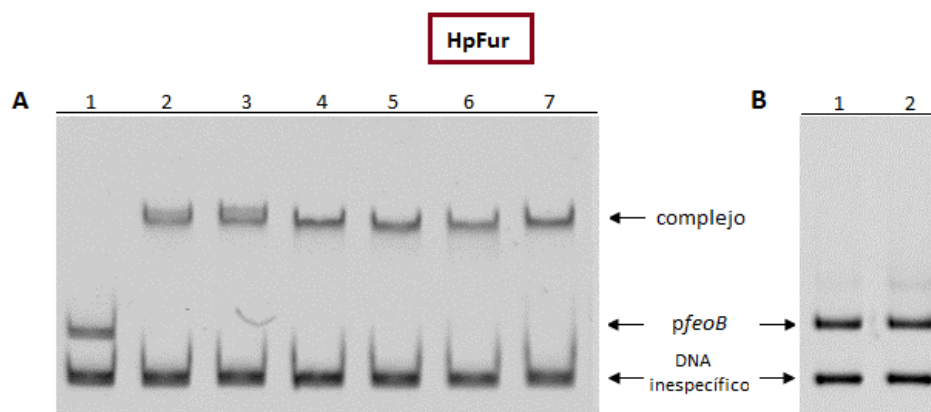
## VIII. EFECTO DE COMPUESTOS DERIVADOS DE FERROCENO SOBRE LA INTERACCIÓN PROTEÍNA-DNA *IN VITRO*

Tal como se describe en (Spencer *et al.*, 2011), compuestos derivados de ferroceno tienen la capacidad de interactuar con una proteína de unión al DNA. Por este motivo, y una vez fijadas las condiciones óptimas para la interacción proteína-DNA, se estudió el efecto de un conjunto de compuestos derivados de ferroceno (Figura 3.7) sobre la actividad *in vitro* de las proteínas recombinantes obtenidas.

Como se muestra en la figura 4.15 A, el compuesto CLM-12 impide la unión de la proteína LmFur al DNA. Esto se observa a partir de una concentración equimolar de compuesto y proteína (carril 4). Fue necesario poner a punto el ensayo, puesto que la concentración de DMSO en la que estaban disueltos los compuestos (al 100%) afectaba a la estabilidad de la proteína. Para ello se redujo el DMSO hasta un 2% observando que a esta concentración la interacción proteína-DNA no se veía afectada (carril 3). El mismo efecto se obtuvo para el compuesto CLM-9. En la figura 4.15 B, se muestra cómo el resto de compuestos ensayados (CLM-3, CLM-4, CLM-10 Y CLM-11), no impedían la formación del complejo aún con una concentración proteína/compuesto 20 veces mayor. En la figura 4.16 B se muestra también como los compuestos CLM-12 y CLM-9 impiden la unión del DNA a la proteína HpFur (Figura 4.16 B), mientras el resto, no afectan a la formación del complejo (Figura 4.16 A).



**Figura 4.15. EMSA en gel de poliacrilamida al 6% para comprobar el efecto del conjunto de compuestos derivados del ferroceno sobre la unión de la proteína LmFur al DNA.** Se incubó 500 nM de LmFur con  $MnCl_2$  1 mM en el tampón de unión correspondiente con 100 ng de DNA *pfhuC* y 100 ng de DNA inespecífico (*pnifJ*). **A.** Titulación del compuesto CLM-12. Carril 1: control negativo sin proteína, carril 2: control positivo (mejores condiciones de unión para la proteína), carril 3: mezcla de reacción incubada con DMSO al 2%, carril 4-7: mezcla de reacción incubada con cantidades crecientes del compuesto CLM-12 disuelto en DMSO al 2% (a una relación proteína:CLM-12 de 1:1, 1:5, 1:10 y 1:20, respectivamente). **B.** Tratamiento de la proteína LmFur con los compuestos CLM-3, CLM-4, CLM-10 Y CLM-11. Carril 1: control negativo sin proteína, carril 2: control positivo (mejores condiciones de unión para la proteína), carril 3: mezcla de reacción incubada con DMSO al 2%, carril 4-7: mezcla de reacción incubada con los compuestos CLM-3, CLM-4, CLM-10 Y CLM-11, respectivamente (a una concentración proteína/compuesto de 1:20).



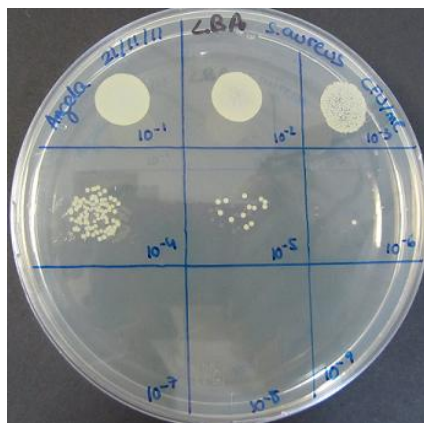
**Figura 4.16. EMSA en gel de poliacrilamida al 6% para comprobar el efecto del conjunto de compuestos derivados del ferroceno sobre la unión de la proteína HpFur al DNA.** Se incubó 500 nM de HpFur con  $\text{MnCl}_2$  1 mM en el tampón de unión correspondiente con 100 ng de DNA *pfeoB* y 100 ng de DNA inespecífico (*pnifJ*), y con los compuestos ensayados a una concentración proteína/compuesto de 1:20. **A.** Carril 1: control negativo sin proteína, carril 2: control positivo (mejores condiciones de unión para la proteína), carril 3: mezcla de reacción incubada con DMSO al 2%, carril 4-7: mezcla de reacción incubada con los compuestos CLM-3, CLM-4, CLM-10, CLM-11. **B.** Carril 1-2: mezcla de reacción incubada con los compuestos CLM-9 y CLM-12, respectivamente.

## IX. EFECTO DE COMPUESTOS DERIVADOS DE FERROCENO *IN VIVO*

En base al resultado obtenido en el ensayo de retardo en gel (*EMSA*) donde el compuesto CLM-9 y CLM-12 impedían la unión entre el DNA y la proteína Fur, a continuación se estudió si ambos compuestos presentaban actividad antimicrobiana. Además, se analizó la posible actividad antimicrobiana de todo el conjunto de compuestos, a pesar de no impedir la formación del complejo proteína-DNA.

Para los ensayos de susceptibilidad antimicrobiana, primero fue necesario calcular el número de unidades formadoras de colonias por ml (CFU/ml), para adecuar la concentración de células al ensayo. Según el estándar NCCLS (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*), dichos ensayos requieren una concentración de células que corresponde al estándar 0.5 McFarland, lo que equivale a una suspensión bacteriana que contiene entre  $1 \cdot 10^8$  y  $3 \cdot 10^8$  CFU/ml de *E. coli*.

El cálculo de las CFU/ml dio como resultado un valor para *E. coli* TG1 de  $3 \cdot 10^8$  CFU/ml, y para *S. aureus* ATCC 29213 de  $2 \cdot 10^8$  CFU/ml (Figura 4.17).

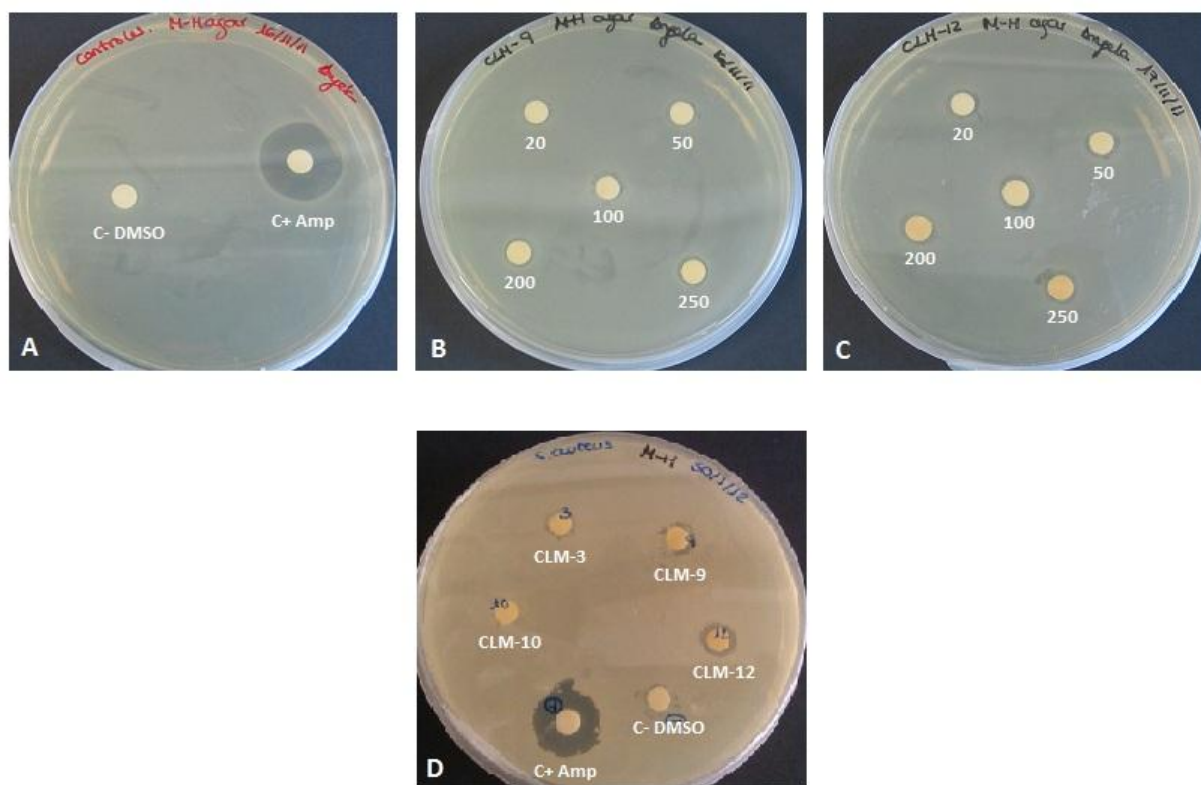


**Figura 4.17. Cálculo de las unidades formadoras de colonias (CFU/ml) de *S. aureus* ATCC 29213.** Se hicieron diluciones seriadas de un cultivo de *S. aureus* ATCC 29213 de D.O. a 600 nm de 0.6, sembrándose 20  $\mu$ l de cada dilución en LB. Tras incubar las placas a 37 °C durante 14-18 h, se produjo el conteo de las colonias en aquellas diluciones donde aparecieron entre 10 y 20 unidades. Se repitió el mismo procedimiento para *E. coli* TG1.

#### a. Test de difusión en disco Kirby-Bauer:

Para estudiar la posible actividad antimicrobiana *in vivo* de los compuestos ensayados, se llevó a cabo el test de difusión en disco Kirby-Bauer, según el CLSI (*Clinical Laboratory Institute Standards*). La presencia o ausencia de crecimiento microbiano alrededor del disco impregnado con una solución del compuesto a ensayar, es una medida indirecta de la habilidad de dicho compuesto para inhibir al microorganismo.

En el experimento, se estudió la susceptibilidad de *S. aureus* ATCC 29213 y *E. coli* TG1 a los derivados de ferroceno ensayados, usando como control positivo el antibiótico ampicilina. El solvente utilizado para disolver los compuestos fue DMSO, por lo que también se evaluó el efecto de éste sobre el crecimiento de las bacterias. Se probaron distintas concentraciones, utilizando como máxima la concentración de 250  $\mu$ g/disco, que era 25 veces mayor que la concentración del control positivo (ampicilina 10  $\mu$ g/disco). Según "*Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests*" del año 2006 del CLSI, una cepa de *S. aureus* es sensible a ampicilina cuando produce un halo de inhibición  $\geq$  20 mm, y para *E. coli* cuando el halo de inhibición es  $\geq$  17 mm.



**Figura 4.18. Ensayo de susceptibilidad antimicrobiana mediante el test de difusión en disco Kirby-Bauer.** Se sembraron en césped en placas de MH, 200  $\mu$ l de un cultivo de *E. coli* TG1 de  $3 \cdot 10^8$  CFU/ml o *S. aureus* ATCC 29213 de  $2 \cdot 10^8$  CFU/ml. Tras dejar secar los cultivos, se colocaron discos estériles de papel *Whatman*<sup>TM</sup> impregnados con disoluciones estériles de los compuestos a ensayar, y las placas se incubaron a 37 °C durante 14-18 h. **A.** Placa de *E. coli* TG1 con DMSO al 100% como control negativo (C-) y antibiótico ampicilina a una concentración de 10  $\mu$ g/disco como control positivo (C+). **B y C.** Placa de *E. coli* TG1 con 20, 50, 100, 200 y 250  $\mu$ g/disco del compuesto CLM-9 y CLM-12 respectivamente, disueltos en DMSO al 100%. **D.** Placa de *S. aureus* ATCC 29213 con los compuestos CLM-3, CLM-9, CLM-10 y CLM-12 a una concentración de 250  $\mu$ g/disco, disueltos en DMSO al 100%, antibiótico ampicilina a una concentración de 10  $\mu$ g/disco (C+) y DMSO al 100% (C-).

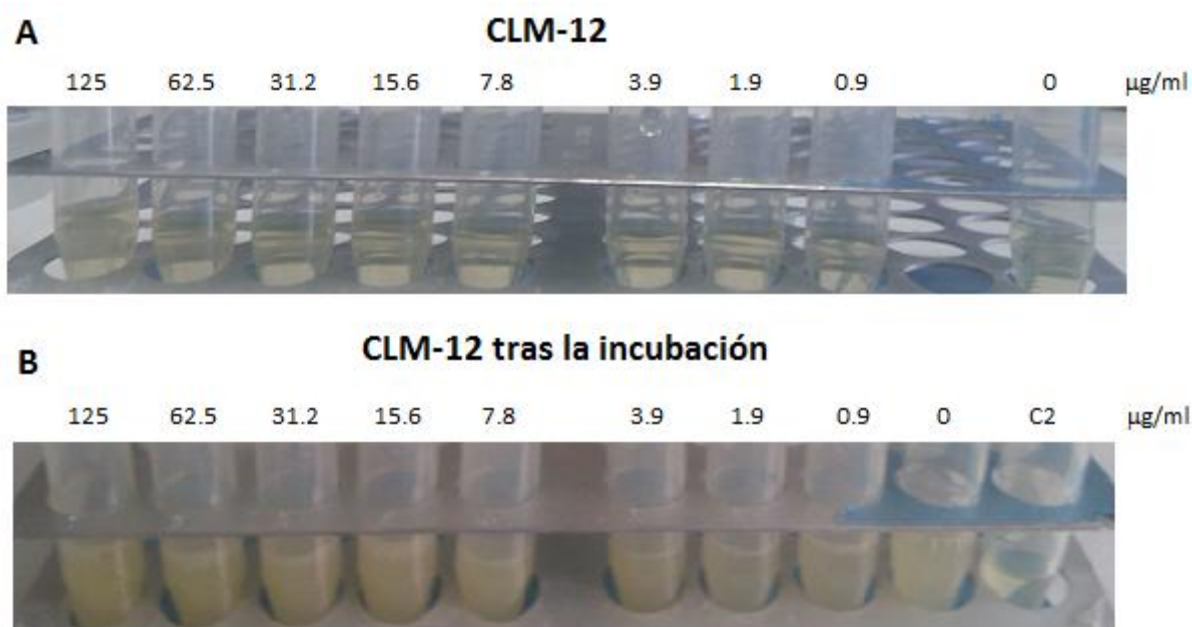
El ensayo realizado (Figura 4.18) mostró que los compuestos CLM-9 y CLM-12 presentaban una ligera actividad antimicrobiana, descartada por el efecto del DMSO, tal como y como se demostró con el control negativo. Se observó mayor efecto de inhibición del crecimiento con la mayor concentración probada (250  $\mu$ g/disco). Esto se observó tanto para *E. coli* TG1 como para *S. aureus* ATCC 29213. También cabe destacar que el compuesto CLM-3 mostró un ligero halo de inhibición en *S. aureus* ATCC 29213, y ninguno en *E. coli* TG1. El antibiótico ampicilina, utilizado como control positivo, produjo un halo de inhibición en ambas cepas de 25 mm de diámetro, demostrando la sensibilidad de las cepas al antibiótico.



### b. Determinación de la C.I.M. (Concentración Inhibitoria Mínima)

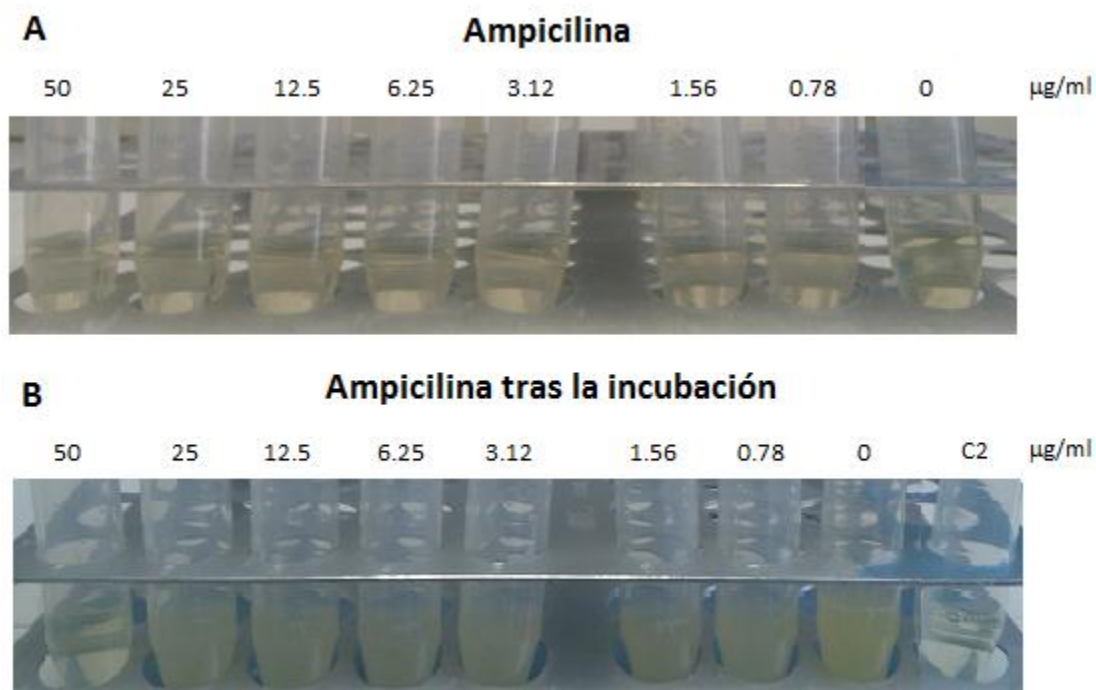
Una vez realizado el test de difusión en disco, se determinó cuantitativamente la CIM del compuesto CLM-12 sobre *S. aureus* ATCC 29213, por ser uno de los compuestos que mejor resultado había dado en el test Kirby-Bauer. La CIM es la concentración más baja de un antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de su incubación.

Para ello, se inoculó *S. aureus* ATCC 29213 en diluciones dobles seriadas del compuesto objeto de estudio preparadas en medio LB. A continuación, se incubaron a 37 °C durante 18-24 h. Finalmente se observó si se produjo o no crecimiento del microorganismo por aumento de la turbidez del medio.



**Figura 4.19. Determinación de la CIM del compuesto CLM-12 sobre *S. aureus* ATCC 29213.** Se inoculó 100 µl de un cultivo de *S. aureus* ATCC 29213 de D.O. a 600 nm de 0.6, en 2 ml de medio LB con diluciones dobles seriadas del compuesto CLM-12 (125 a 0.9 µg/ml). Los tubos se incubaron a 37 °C durante 18-24 h. El tubo "0" se empleó como control de crecimiento de la cepa, y el tubo "C2" se utilizó como control de esterilidad del medio LB con el compuesto a la mayor concentración empleada. **A.** Vista de los tubos antes de la incubación. **B.** Vista de los tubos tras la incubación.

Tal como se muestra en la figura 4.19, se observó crecimiento a todas las concentraciones probadas (de 125 µg/ml a 0.9 µg/ml) del compuesto CLM-12, por lo que la CIM > 125 µg/ml. No se probó una concentración mayor del compuesto ya que 125 µg/ml se consideró una concentración suficientemente elevada según los estándares propuestos por el CLSI.



**Figura 4.20. Determinación de la CIM del antibiótico ampicilina sobre *S. aureus* ATCC 29213, realizado como control positivo.** Se inoculó 100 µl de un cultivo de *S. aureus* ATCC 29213 de D.O. a 600 nm de 0.6, en 2 ml de medio LB con diluciones dobles seriadas del antibiótico ampicilina (50 a 0.78 µg/ml). Los tubos se incubaron a 37 °C durante 18-24 h. El tubo "0" se empleó como control de crecimiento de la cepa, y el tubo "C2" se utilizó como control de esterilidad del medio LB con el antibiótico a la mayor concentración empleada. **A.** Vista de los tubos antes de la incubación. **B.** Vista de los tubos tras la incubación.

El ensayo realizado con ampicilina (Figura 4.20) como compuesto control capaz de inhibir el crecimiento de la cepa utilizada, mostró una CIM  $\leq 50$  µg/ml, dato que concuerda según los estándares para cepas de *S. aureus*.

## **E. DISCUSIÓN**

## I. OBTENCIÓN DE LAS PROTEÍNAS RECOMBINANTES LmFur Y HpFur

El método de sobreexpresión utilizado para las proteínas LmFur y HpFur es una adaptación de los protocolos propuestos por (Ledala *et al.*, 2007) y (Delany *et al.*, 2001), respectivamente. Para ello se generaron los plásmidos **pET-28a:fur Lm** y **pET-28a:fur Hp** y se usaron las células de *E. coli* BL21 (DE3) disponibles en el grupo, obteniéndose un buen nivel de sobreexpresión para ambas proteínas recombinantes (Figura 4.2).

La purificación de las dos proteínas se basó en los protocolos descritos en (Fiorini *et al.*, 2008) para LmFur, y en (Delany *et al.*, 2001) para HpFur. La elución con gradiente de imidazol permitió purificar las proteínas de interés, obteniéndose para HpFur una preparación sin apenas impurezas. Para LmFur los resultados obtenidos discreparon de los descritos en la bibliografía. En el protocolo de (Fiorini *et al.*, 2008) consiguieron obtener la proteína prácticamente pura introduciendo un segundo paso de purificación mediante una cromatografía de intercambio iónico. Esto no fue posible en este trabajo puesto que la proteína precipitó sistemáticamente tras la diálisis en los dos intentos de purificación llevados a cabo. Una posible alternativa para obtener mayor grado de pureza sería hacer el gradiente de imidazol más extenso, recogiendo fracciones de menor volumen y utilizando un flujo de elución más lento. Otra posibilidad, sería acoplar al primer paso de purificación una cromatografía de exclusión molecular puesto que las impurezas presentes poseen un peso molecular con suficiente margen de diferencia respecto del de LmFur (Figura 4.4 A).

Durante la purificación, las proteínas eluidas se obtuvieron con un ligero color rojo/violeta, siendo más intenso en aquellas fracciones más ricas y puras de proteína. De esta coloración se tenía constancia en el laboratorio puesto que aparece en algunas ocasiones al purificar la proteína FurA de *Anabaena* sp. PCC 7120. Teniendo en cuenta que Fur une hemo (Hernandez *et al.*, 2004), se hizo un espectro de absorción de la fracción que presentaba mayor coloración para comprobar si la presencia de color se debía a este cofactor. Sin embargo, las características espectrales observadas no eran compatibles con la presencia de hemo. Este color desapareció al poco tiempo, y el espectro de cuantificación mostró un único pico a 280 nm, indicando que las proteínas recombinantes no poseen ningún grupo funcional que absorba en el visible (Figura 4.5).

Tras la purificación, las fracciones de LmFur se concentraron utilizando el sistema “Amicon® Ultra” (Millipore) para reducir el volumen hasta 2 ml, aproximadamente. Este procedimiento no se llevó a cabo con la proteína HpFur puesto que el volumen de las fracciones más puras fue menor. A continuación, ambas proteínas se dializaron en el correspondiente tampón de diálisis (Tabla III) para eliminar el imidazol. En este proceso, los dos homólogos precipitaron en el primer cambio de tampón, indicando que el imidazol ayudaba a mantenerlos en solución. A pesar de la precipitación, se pudo recuperar del sobrenadante proteína en solución no agregada. Esta solución proteica se centrifugó para eliminar restos sólidos y se cuantificó. Como consecuencia de este comportamiento, el rendimiento obtenido fue bajo pero suficiente para llevar a cabo los estudios de caracterización realizados.

Las proteínas obtenidas mostraron actividad de unión a DNA *in vitro* en ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA). Como ya se ha mencionado, estas proteínas son represores transcripcionales metalodependientes. La puesta a punto de este ensayo para ambos homólogos de Fur reveló que el Mn(II), utilizado en sustitución del Fe(II) como metal correpresor, mejora la actividad de la proteína *in vitro*. Sin embargo, al igual que en el trabajo descrito por (Ledala *et al.*, 2007), su presencia no es estrictamente necesaria, puesto que ambos homólogos son activos aún sin haber Mn(II) en el medio.

Un método alternativo para conseguir la purificación de estos homólogos con un rendimiento más alto que el obtenido en este trabajo, sería el puesto a punto en nuestro grupo para la proteína FurA de *Anabaena* sp. PCC 7120, que también sufría procesos de agregación (Hernandez *et al.*, 2002). Este método utiliza una cromatografía de afinidad a metales (Zn) en presencia de cloruro de guanidinio 2 M durante todo el proceso de purificación. El cloruro de guanidinio es una molécula capaz de asociarse con la mayoría de cadenas laterales de aminoácidos (tanto hidrofóbicos como hidrofílicos), así como con el enlace peptídico. Por este motivo, su presencia minimiza todas las interacciones débiles que dan lugar al fenómeno de la agregación, tanto las interacciones de tipo electrostático (puentes de hidrógeno e interacciones iónicas) como las de tipo hidrofóbico (Singh & Panda, 2005). A la concentración empleada (2 M), la población de FurA desnaturalizada es despreciable (Hernandez *et al.*, 2005). De esta forma se consiguió un buen rendimiento de proteína purificada (4.5 mg de proteína por 10 g de biomasa) (Pellicer *et al.*, 2010).

En caso de aplicar este método a los homólogos LmFur y HpFur, sería necesario un estudio previo de estabilidad conformacional en presencia de distintas concentraciones de cloruro de guanidinio, hasta llegar a la concentración adecuada en la que la población de proteína desnaturalizada fuese despreciable. Además, tras purificar las proteínas se debería analizar si su plegamiento, estabilidad y capacidad de interacción con el DNA son comparables a los obtenidos en las especies purificadas en ausencia de cloruro de guanidinio.

## **II. PRESENCIA DE METAL EN LOS HOMÓLOGOS PURIFICADOS**

La proteína LmFur purificada presentaba en un gel de electroforesis desnaturalizante (tanto en presencia como en ausencia de agentes reductores) dos bandas que migraban próximas y cuyo peso molecular estaba en torno a 19 kDa. Datos bibliográficos acerca del homólogo PerR de *B. subtilis*, sugieren que la presencia de bandas de tamaño similar al esperado corresponden a distintas especies moleculares de proteína que contienen o carecen de Zn(II) estructural (Lee & Helmann, 2007).

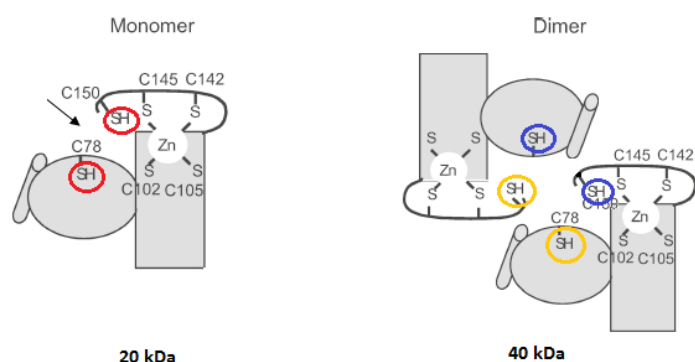
A partir de los datos obtenidos en el análisis por electroforesis de la presencia de metal realizado en este trabajo sobre LmFur, se comprobó que ésta es la situación para la preparación obtenida de este homólogo (Figura 4.6 A). Por tanto, el método de purificación descrito en este trabajo proporciona una mezcla heterogénea de proteína (forma apo-LmFur y forma Zn-LmFur).

La secuencia de aminoácidos de LmFur presenta cuatro cisteínas que forman parte de sendos motivos CXXC (Figura 4.7). Para este homólogo todavía no se dispone de estructura cristalina, sin embargo, un

modelo propuesto por (Fiorini *et al.*, 2008), basado en la estructura de PerR de *B. subtilis* (Jacquamet *et al.*, 2009), sugiere que los dos motivos CXXC crean un sitio de unión a Zn con coordinación ZnCys<sub>4</sub>. Los resultados en la determinación del número de cisteínas libres presentes en la solución de proteína de LmFur, indican que este número está en torno a dos. Por tanto, teniendo en cuenta este valor, y sabiendo que se tiene una solución de proteína heterogénea, se sugiere que aproximadamente la mitad de proteína purificada se encuentra como forma apo (cuatro cisteínas libres), y la otra mitad como forma holo (ninguna cisteína libre). Este resultado confirmaría los datos obtenidos por (Ledala *et al.*, 2007) quienes detectaron alrededor de 0.5 moles de Zn(II) por mol de proteína en el análisis que realizaron mediante ICP-MS, sugiriendo que la solución de proteína está compuesta por una mezcla en la que la mitad de la proteína presentaba Zn en su estructura, y la otra mitad se encontraba en forma apo.

La proteína recombinante HpFur purificada mostró una única banda en electroforesis desnaturalizante en condiciones reductoras, que correspondía a un peso molecular en torno a 20 kDa (Figura 4.4 B). Cuando este ensayo se realizó en ausencia de agente reductor aparecieron bandas correspondientes a especies de peso molecular mayor (40 y 60 kDa) (Figura 4.6 B). En consecuencia, la solución de proteína purificada es una mezcla heterogénea de especies de diferente peso molecular donde la oligomerización es consecuencia de la formación de puentes disulfuro intermoleculares. Además del estado redox en la oligomerización influye la presencia de Zn, puesto que cuando la electroforesis desnaturalizante se desarrolla en presencia de agente reductor y Zn, aparecen de nuevo especies oligoméricas (Figura 4.6 B). Estos datos concuerdan con los descritos por (Vitale *et al.*, 2009).

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que en la solución de HpFur hay 0.5 cisteínas libres. Este homólogo tiene seis cisteínas, cuatro de ellas implicadas en la unión a un zinc estructural de acuerdo con la estructura descrita por Dian *y col.* Según los datos presentados en este trabajo, la dimerización depende entre otros factores del estado redox de las cisteínas, por lo que se propone que el monómero pueda formar un puente disulfuro intramolecular, utilizando las dos cisteínas que le quedan libres, y que el dímero forme uno intermolecular de acuerdo con el esquema que se presenta en la figura 5.1. Este modelo, que sirve para explicar los resultados obtenidos en este trabajo diferiría ligeramente del propuesto por Dian *y col.* que se basa en la estructura de rayos X obtenida sobre el mutante HpFur2M; C78S-C150S, donde únicamente es la presencia de Zn la responsable de la formación del dímero (Dian *et al.*, 2011).



**Figura 5.1. Modelo propuesto para las especies monomérica y dimérica presentes en la solución de proteína recombinante HpFur. A. Monómero, donde es posible que se forme un puente disulfuro entre la C78 y la C150. B. Dímero, donde además de ser esencial el Zn para la dimerización, también debe establecerse un puente disulfuro entre alguna de las otras dos cisteínas. En color se redondean las cisteínas posibles formadoras de puentes disulfuro.**

### III. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DISULFURO REDUCTASA

Estudios realizados en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto que uno de los pares CXXC de la proteína FurA de *Anabaena* sp PCC 7120 le confiere actividad disulfuro reductasa (Botello-Morte y col. en preparación). Los homólogos LmFur y HpFur poseen también dos motivos CXXC al igual que FurA de *Anabaena* sp. PCC 7120. Sin embargo, para estos homólogos no se detecta actividad disulfuro reductasa.

Proteínas con actividad disulfuro reductasa relevante en el metabolismo, tienen bien caracterizada la secuencia del motivo CXXC (Figura 5.2). Así por ejemplo para DsbA de *E. coli*, proteína periplasmática que cataliza la formación de puentes disulfuro donando el suyo a proteínas que acaban de ser translocadas, el puente disulfuro del centro activo lo forman el par de cisteínas que pertenecen a la secuencia CPHC. En el caso de tioredoxina de *E. coli*, proteína que actúa como reductasa de puentes disulfuro en el citoplasma, esta secuencia es CGPC.

En un estudio de 2007, se analizó la influencia de los aminoácidos que se encuentran en las posiciones intermedias del motivo  $CX_aX_bC$ , en el valor del potencial redox de una tioredoxina. Si la posición  $X_a$  está ocupada por una prolina y la posición  $X_b$  por un aminoácido básico, el potencial redox aumenta hasta convertirla en una proteína muy oxidante (Quan S *et al.*, 2007).

Ambos motivos tienen en común la presencia de una prolina junto a una de las cisteínas. Esta situación se da en FurA de *Anabaena* sp. PCC 7120, pero no en las secuencias de los homólogos LmFur o HpFur (Figura 5.2). Se sugiere que ésta pueda ser la causa de la ausencia de actividad reductasa observada *in vitro* para estos homólogos.

DsbA <i>E. coli</i> K12:	CPHC
Thioredoxin-2 <i>E. coli</i> K12:	CGPC
FurA <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120:	CPKC
Fur <i>L. monocytogenes</i> EGD-e:	CANC
Fur <i>H. pylori</i> 26695:	CKEC

Figura 5.2. Alineamiento de los motivos CXXC.

### IV. INTERACCIÓN DE LAS PROTEÍNAS CON EL GRUPO HEMO

El grupo hemo (Figura 1.7 A) es un importante cofactor de muchas proteínas que intervienen en procesos fisiológicos tan importantes como la respiración celular. Sin embargo, debido a su toxicidad en condiciones fisiológicas suele encontrarse asociado a proteínas en el interior celular, bien sea de manera transitoria o bien permanente, a través de uniones de tipo covalente. En nuestro grupo de trabajo se ha demostrado, mediante espectroscopía diferencial, que la proteína FurA de *Anabaena* sp. PCC 7120 es capaz de interactuar con el grupo hemo en el rango de concentración  $\mu\text{M}$  y que esta

unión inhibe la capacidad de la proteína para interactuar con el DNA (Hernandez *et al.*, 2004). La caracterización del sitio de unión del grupo hemo en la proteína FurA sugiere que esta proteína pueda funcionar como un sensor de hemo en la célula (Pellicer *et al.*, 2012).

En este trabajo se ha analizado la capacidad de los homólogos LmFur y HpFur de interactuar con el grupo hemo, siguiendo la metodología descrita por (Hernandez *et al.*, 2004). Los resultados que se obtienen confirman la interacción específica de ambas proteínas recombinantes con la molécula de hemo, como sugiere la curva de saturación obtenida en la titulación para ambas proteínas. Aunque no se ha podido obtener un valor numérico fiable para la constante de disociación, los datos sugieren que la interacción es ligeramente más fuerte que en el caso del homólogo FurA de *Anabaena* sp. PCC 7120 ( $K_d = 0.4 \mu\text{M}$ ) (Hernandez *et al.*, 2004).

La presencia de hemo en solución no afecta a la capacidad de ambos homólogos de unirse al DNA. Este resultado es opuesto al observado para FurA de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Hernandez *et al.*, 2004). Se propone que posiblemente esta diferencia en el comportamiento se deba a que el sitio de unión a hemo se localiza en una posición distinta en el caso de FurA respecto a los homólogos purificados en este trabajo. Para FurA se ha determinado que la cisteína de un motivo CP presente en su secuencia, es uno de los ligandos axiales del Fe(III) del grupo hemo (Pellicer *et al.*, 2012) y que las características físico-químicas de la unión de hemo a FurA son las típicas de un sensor de hemo (Shimizu, 2011). Los homólogos LmFur y HpFur carecen de este motivo, sin embargo, poseen varios residuos de histidina que posiblemente sean los implicados en la unión del grupo hemo, como se propuso para el homólogo Fur de *E. coli* (Smith *et al.*, 1996).

Es posible que las diferencias observadas estén relacionadas con la naturaleza de los microorganismos, puesto que *Anabaena* sp. PCC 7120 es una cianobacteria fotosintética diazotrófica, y tanto *L. monocytogenes* como *H. pylori* son organismos heterótrofos.

## **V. EFECTO DE LOS COMPUESTOS DERIVADOS DE FERROCENO *IN VITRO***

Como se ha mencionado en la introducción, la identificación de moduladores que afecten a la actividad de reguladores transcripcionales implicados, por ejemplo en la síntesis de factores de virulencia, se perfila como una estrategia en la búsqueda de nuevos antimicrobianos. Ciertos derivados de ferroceno poseen capacidad antimicrobiana, como lo demuestra el gran número de artículos recogidos en la bibliografía. Además, pueden interactuar con proteínas de unión a DNA modulando su actividad (Spencer *et al.*, 2011).

A través de una colaboración entre la Dra. M<sup>a</sup> Luisa Peleato, perteneciente al grupo donde se ha llevado a cabo este trabajo, y los Drs. Concepción López Martínez, del Dpto. de Química Inorgánica (Universidad de Barcelona) y Asensio González del Dpto. de Química Orgánica (Institut de Biomedicina, Barcelona), se disponía de una serie de compuestos derivados de ferroceno con un anillo de pirazol y diversos sustituyentes (Figura 3.7). Mediante ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA), se ha comprobado que dos de ellos inhiben la unión de ambas proteínas al DNA, por lo que se perfilan como



moduladores de su actividad. Es posible que estos derivados de ferroceno interaccionen con algún aminoácido esencial de la proteína implicado en la unión al DNA, o bien que impidan que la proteína adquiera la conformación activa, perdiendo por tanto su capacidad de represor transcripcional. Sin embargo, teniendo en cuenta que ambas proteínas tienen solo un 20% de homología de secuencia (Figura 4.7), es posible que el compuesto reconozca determinada conformación y no un aminoácido en particular.

## **VI. EFECTO DE LOS COMPUESTOS DERIVADOS DE FERROCENO *IN VIVO***

El hecho de que dos de los compuestos analizados afectaran a la actividad de los homólogos *in vitro*, llevó a probar su posible actividad antimicrobiana *in vivo*.

En el estudio se analizaron todos los compuestos disponibles, y se comprobó que aunque ninguno de ellos impedía el crecimiento, como cabría esperar con un antibiótico convencional, los dos compuestos que afectaban a la actividad de Fur en ensayos de EMSA eran los que ligeramente inhibían el crecimiento bacteriano. Teniendo en cuenta que para considerar que un compuesto posee actividad antimicrobiana debe inhibir el crecimiento de la bacteria en el rango de concentración en que lo hacen los actuales antibióticos, y que ambos compuestos producían su efecto a una concentración 25 veces superior al control positivo, no parecen buenos candidatos. Ahora bien, su estructura y comportamiento químico indican que son moléculas hidrofóbicas, característica que puede dificultar su acceso al interior de la célula. Una posible actuación para potenciar su actividad antimicrobiana, sería introducir algún sustituyente polar, como es el caso de grupos amino en su estructura, puesto que derivados de ferroceno similares que poseen dichos grupos muestran una marcada actividad antimicrobiana (Damljanovic *et al.*, 2009). En cualquier caso, un ensayo de susceptibilidad como el realizado en este trabajo, no permitiría vincular la acción antimicrobiana a Fur.

## **F. CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos a partir del trabajo expuesto en esta memoria demuestran que:

- ✚ Es posible sobreexpresar en *E. coli* las proteínas recombinantes LmFur y HpFur, y purificarlas mediante una cromatografía de afinidad a Ni (IMAC), consiguiendo un grado de pureza que permite su caracterización bioquímica.
- ✚ Las proteínas recombinantes obtenidas son activas en ensayos de unión al DNA *in vitro*. Aunque el Mn(II) no es necesario para su actividad, su presencia mejora la interacción.
- ✚ Ambos homólogos se obtienen como una mezcla heterogénea de proteína. Para LmFur se obtiene únicamente el monómero tanto en forma apo- como holoproteína (Zn-LmFur). Para HpFur se obtiene una mezcla de monómero junto con diversas especies oligoméricas.
- ✚ Las proteínas recombinantes LmFur y HpFur no posean actividad disulfuro reductasa *in vitro*.
- ✚ Las proteínas se unen a hemo en el rango de concentración  $\mu\text{M}$ , y su interacción no impide la unión de la proteína al DNA.
- ✚ Del conjunto de derivados de ferroceno analizados en este estudio, dos de ellos, CLM-9 y CLM-12, impiden la unión de ambas proteínas Fur al DNA presentando ambos una ligera actividad antimicrobiana.

## **G. BIBLIOGRAFÍA**

- Alanis, A. J. (2005).** Resistance to antibiotics: are we in the post-antibiotic era? *Arch Med Res* **36**, 697-705.
- An, Y. J., Ahn, B. E., Han, A. R., Kim, H. M., Chung, K. M., Shin, J. H., Cho, Y. B., Roe, J. H. & Cha, S. S. (2009).** Structural basis for the specialization of Nur, a nickel-specific Fur homolog, in metal sensing and DNA recognition. *Nucleic Acids Res* **37**, 3442-3451.
- Baichoo, N. & Helmann, J. D. (2002).** Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J Bacteriol* **184**, 5826-5832.
- Bessette, P. H., Qiu, J., Bardwell, J. C., Swartz, J. R. & Georgiou, G. (2001).** Effect of sequences of the active-site dipeptides of DsbA and DsbC on in vivo folding of multidisulfide proteins in Escherichia coli. *J Bacteriol* **183**, 980-988.
- Bsat, N., Herbig, A., Casillas-Martinez, L., Setlow, P. & Helmann, J. D. (1998).** Bacillus subtilis contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Mol Microbiol* **29**, 189-198.
- Bury-Mone, S., Thiberge, J. M., Contreras, M., Maitournam, A., Labigne, A. & De Reuse, H. (2004).** Responsiveness to acidity via metal ion regulators mediates virulence in the gastric pathogen Helicobacter pylori. *Mol Microbiol* **53**, 623-638.
- Carpenter, B. M., Gancz, H., Gonzalez-Nieves, R. P., West, A. L., Whitmire, J. M., Michel, S. L. & Merrell, D. S. (2009a).** A single nucleotide change affects fur-dependent regulation of sodB in H. pylori. *PLoS One* **4**, e5369.
- Carpenter, B. M., Whitmire, J. M. & Merrell, D. S. (2009b).** This is not your mother's repressor: the complex role of fur in pathogenesis. *Infect Immun* **77**, 2590-2601.
- Carson, S. D., Thomas, C. E. & Elkins, C. (1996).** Cloning and sequencing of a Haemophilus ducreyi fur homolog. *Gene* **176**, 125-129.
- Clatworthy, A. E., Pierson, E. & Hung, D. T. (2007).** Targeting virulence: a new paradigm for antimicrobial therapy. *Nat Chem Biol* **3**, 541-548.
- Chavain, N. & Biot, C. (2010).** Organometallic complexes: new tools for chemotherapy. *Curr Med Chem* **17**, 2729-2745.
- Damljanovic, I., Vukicevic, M., Radulovic, N., Palic, R., Ellmerer, E., Ratkovic, Z., Joksovic, M. D. & Vukicevic, R. D. (2009).** Synthesis and antimicrobial activity of some new pyrazole derivatives containing a ferrocene unit. *Bioorg Med Chem Lett* **19**, 1093-1096.
- Delany, I., Spohn, G., Rappuoli, R. & Scarlato, V. (2001).** The Fur repressor controls transcription of iron-activated and -repressed genes in Helicobacter pylori. *Mol Microbiol* **42**, 1297-1309.
- Delany, I., Spohn, G., Pacheco, A. B., Ieva, R., Alaimo, C., Rappuoli, R. & Scarlato, V. (2002).** Autoregulation of Helicobacter pylori Fur revealed by functional analysis of the iron-binding site. *Mol Microbiol* **46**, 1107-1122.

**Denoncin, K. & Collet, J. F. (2012).** Disulfide bond formation in the bacterial periplasm: major achievements and challenges ahead. *Antioxid Redox Signal*.

**Dian, C., Vitale, S., Leonard, G. A. & other authors (2011).** The structure of the *Helicobacter pylori* ferric uptake regulator Fur reveals three functional metal binding sites. *Mol Microbiol* **79**, 1260-1275.

**Ellman, G. L. (1959).** Tissue sulfhydryl groups. *Arch Biochem Biophys* **82**, 70-77.

**Fiorini, F., Stefanini, S., Valenti, P., Chiancone, E. & De Biase, D. (2008).** Transcription of the *Listeria monocytogenes* *fri* gene is growth-phase dependent and is repressed directly by Fur, the ferric uptake regulator. *Gene* **410**, 113-121.

**Griggs, D. W. & Konisky, J. (1989).** Mechanism for iron-regulated transcription of the *Escherichia coli* *cir* gene: metal-dependent binding of fur protein to the promoters. *J Bacteriol* **171**, 1048-1054.

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

**Hernandez, J. A., Peleato, M. L., Fillat, M. F. & Bes, M. T. (2004).** Heme binds to and inhibits the DNA-binding activity of the global regulator FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEBS Lett* **577**, 35-41.

**Hernandez, J. A., Meier, J., Barrera, F. N. & other authors (2005).** The conformational stability and thermodynamics of Fur A (ferric uptake regulator) from *Anabaena* sp. PCC 7119. *Biophys J* **89**, 4188-4200.

**Holmgren, A. (1979).** Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J Biol Chem* **254**, 9627-9632.

**Jacquamet, L., Traore, D. A., Ferrer, J. L. & other authors (2009).** Structural characterization of the active form of PerR: insights into the metal-induced activation of PerR and Fur proteins for DNA binding. *Mol Microbiol* **73**, 20-31.

**Ledala, N., Pearson, S. L., Wilkinson, B. J. & Jayaswal, R. K. (2007).** Molecular characterization of the Fur protein of *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* **153**, 1103-1111.

**Lee, J. W. & Helmann, J. D. (2007).** Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals* **20**, 485-499.

**Litwin, C. M. & Calderwood, S. B. (1993).** Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin Microbiol Rev* **6**, 137-149.

**Lucarelli, D., Russo, S., Garman, E., Milano, A., Meyer-Klaucke, W. & Pohl, E. (2007).** Crystal structure and function of the zinc uptake regulator FurB from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **282**, 9914-9922.

**Lynch, S. V. & Wiener-Kronish, J. P. (2008).** Novel strategies to combat bacterial virulence. *Curr Opin Crit Care* **14**, 593-599.

**Maguene, G. M., Jakhlal, J., Ladyman, M., Vallin, A., Ralambomanana, D. A., Bousquet, T., Maugein, J., Lebibi, J. & Pelinski, L. (2011).** Synthesis and antimycobacterial activity of a series of ferrocenyl derivatives. *Eur J Med Chem* **46**, 31-38.

- Mahajan, A., Kremer, L., Louw, S., Guerardel, Y., Chibale, K. & Biot, C. (2011).** Synthesis and in vitro antitubercular activity of ferrocene-based hydrazones. *Bioorg Med Chem Lett* **21**, 2866-2868.
- Martinez-Galisteo, E., Padilla, C. A., Garcia-Alfonso, C., Lopez-Barea, J. & Barcena, J. A. (1993).** Purification and properties of bovine thioredoxin system. *Biochimie* **75**, 803-809.
- Masse, E. & Gottesman, S. (2002).** A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 4620-4625.
- Masse, E., Vanderpool, C. K. & Gottesman, S. (2005).** Effect of RyhB small RNA on global iron use in Escherichia coli. *J Bacteriol* **187**, 6962-6971.
- McLaughlin, H. P., Hill, C. & Gahan, C. G. (2010).** The impact of iron on Listeria monocytogenes; inside and outside the host. *Curr Opin Biotechnol* **22**, 194-199.
- Pecqueur, L., D'Autreaux, B., Dupuy, J., Nicolet, Y., Jacquamet, L., Brutscher, B., Michaud-Soret, I. & Bersch, B. (2006).** Structural changes of Escherichia coli ferric uptake regulator during metal-dependent dimerization and activation explored by NMR and X-ray crystallography. *J Biol Chem* **281**, 21286-21295.
- Pellicer, S., Bes, M., González, A., Neira, J., Peleato, M. & Fillat, M. (2010).** High-recovery one-step purification of the DNA-binding protein Fur by mild guanidinium chloride treatment. *Process Biochemistry* Vol. **45**, 292-296
- Pellicer, S., Gonzalez, A., Peleato, M. L., Martinez, J. I., Fillat, M. F. & Bes, M. T. (2012).** Site-directed mutagenesis and spectral studies suggest a putative role of FurA from Anabaena sp. PCC 7120 as a heme sensor protein. *Febs J* **279**, 2231-2246.
- Pohl, E., Haller, J. C., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., Garman, E. & Vasil, M. L. (2003).** Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol* **47**, 903-915.
- Prince, R. W., Cox, C. D. & Vasil, M. L. (1993).** Coordinate regulation of siderophore and exotoxin A production: molecular cloning and sequencing of the Pseudomonas aeruginosa fur gene. *J Bacteriol* **175**, 2589-2598.
- Pym, A. S., Domenech, P., Honore, N., Song, J., Deretic, V. & Cole, S. T. (2001).** Regulation of catalase-peroxidase (KatG) expression, isoniazid sensitivity and virulence by furA of Mycobacterium tuberculosis. *Mol Microbiol* **40**, 879-889.
- Quadri, L. E. (2007).** Strategic paradigm shifts in the antimicrobial drug discovery process of the 21st century. *Infect Disord Drug Targets* **7**, 230-237.
- Quan S, Schneider I, Pan J, Von Hacht A & JC., B. (2007).** The CXXC motif is more than a redox rheostat. *J Biol Chem* **282(39)**, 28823-28833.
- Rea, R. B., Gahan, C. G. & Hill, C. (2004).** Disruption of putative regulatory loci in Listeria monocytogenes demonstrates a significant role for Fur and PerR in virulence. *Infect Immun* **72**, 717-727.
- Sheikh, M. A. & Taylor, G. L. (2009).** Crystal structure of the Vibrio cholerae ferric uptake regulator (Fur) reveals insights into metal co-ordination. *Mol Microbiol* **72**, 1208-1220.

**Shimizu, T. (2011).** Binding of cysteine thiolate to the Fe(III) heme complex is critical for the function of heme sensor proteins. *J Inorg Biochem* **108**, 171-177.

**Singh, S. M. & Panda, A. K. (2005).** Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. *J Biosci Bioeng* **99**, 303-310.

**Smith, A., Hooper, N. I., Shipulina, N. & Morgan, W. T. (1996).** Heme binding by a bacterial repressor protein, the gene product of the ferric uptake regulation (fur) gene of *Escherichia coli*. *J Protein Chem* **15**, 575-583.

**Spencer, J., Amin, J., Wang, M. & other authors (2011).** Synthesis and Biological Evaluation of JAHA: Ferrocene-Based Histone Deacetylase Inhibitors. *ACS Med Chem Lett* **2**, 358-362.

**Vitale, S., Fauquant, C., Lascoux, D., Schauer, K., Saint-Pierre, C. & Michaud-Soret, I. (2009).** A ZnS(4) structural zinc site in the *Helicobacter pylori* ferric uptake regulator. *Biochemistry* **48**, 5582-5591.

**Waidner, B., Greiner, S., Odenbreit, S. & other authors (2002).** Essential role of ferritin Pfr in *Helicobacter pylori* iron metabolism and gastric colonization. *Infect Immun* **70**, 3923-3929.



