



**Universidad
Zaragoza**

FACULTAD DE CIENCIAS



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

**“Obtención y caracterización de
proteínas Fur de microorganismos de
interés biotecnológico y sanitario”**

Proyecto de Fin de Grado en Biotecnología dirigido por

María F. Fillat y Laura Botello-Morte

Álvaro Artiga Folch

Curso 2013/2014

Índice

| | |
|---|----|
| 1. Resumen/ Abstract | 1 |
| 2. Antecedentes | 2 |
| 2.1 Introducción a las proteínas Fur | 2 |
| 2.2 Fur de <i>Staphylococcus aureus</i> | 3 |
| 2.3 Fur de <i>Legionella pneumophila</i> | 4 |
| 3. Objetivos | 5 |
| 4. Materiales y métodos | 6 |
| 4.1 Cepas, plásmidos y medios de cultivo utilizados | 6 |
| 4.2 Clonaje de <i>fur</i> de <i>L. pneumophila</i> y <i>fur</i> de <i>S. aureus</i> | 6 |
| 4.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) | 6 |
| 4.2.2 Electroforesis de DNA | 6 |
| 4.2.3 Purificación y cuantificación de DNA | 7 |
| 4.2.4 Doble digestión y ligación | 7 |
| 4.2.5 Preparación de células quimiocompetentes | 8 |
| 4.2.6 Transformación de células quimiocompetentes | 8 |
| 4.3 Sobreexpresión de Fur de <i>S. aureus</i> y <i>L. pneumophila</i> en <i>E. coli</i> y obtención de biomasa | 8 |
| 4.3.1 Sobreexpresión de Fur | 8 |
| 4.3.2 Electroforesis de proteínas | 8 |
| 4.3.3 Obtención de biomasa de <i>E. coli</i> | 9 |
| 4.4 Purificación y caracterización parcial de Fur de <i>S. aureus</i> | 9 |
| 4.4.1 Empaquetamiento de la columna de afinidad a metales | 9 |
| 4.4.2 Obtención del extracto crudo | 9 |
| 4.4.3 Purificación por cromatografía de afinidad a metales | 9 |
| 4.4.4 Diálisis de la proteína y cuantificación | 10 |
| 4.4.5 Espectroscopia de absorción molecular y cuantificación | 10 |
| 4.4.6 Pruebas de renaturalización de la proteína | 10 |

| | |
|--|-----------|
| 4.4.7 Análisis de oligomerización: ensayo de entrecruzamiento y ensayo de reducción..... | 10 |
| 4.4.8 Ensayo de actividad de unión al DNA | 11 |
| 5. Resultados | 12 |
| 5.1 Clonaje de <i>fur</i> de <i>S. aureus</i> y <i>L. pneumophila</i> | 12 |
| 5.1.1 Obtención de plásmidos e insertos | 12 |
| 5.1.2 Doble digestión y ligación | 12 |
| 5.1.3 Transformación de células quimiocompetentes | 13 |
| 5.2 Sobreexpresión y obtención de biomasa | 14 |
| 5.3 Purificación de Fur de <i>S. aureus</i> | 14 |
| 5.4 Resuspensión de Fur de <i>S. aureus</i> | 16 |
| 5.5 Análisis de oligomerización | 17 |
| 5.6 Análisis de interacción con el DNA | 18 |
| 6. Discusión | 20 |
| 7. Conclusiones/ Conclusions | 23 |
| 8. Bibliografía | 24 |
| 9. Anexo | 26 |
| Tabla 9.1 Cepas y plásmidos utilizados | 26 |
| Tabla 9.2 Mezclas de reacción para PCR | 26 |
| Tabla 9.3 Cebadores utilizados para PCR | 27 |
| Tabla 9.4 Composición para dos geles SDS-PAGE al 15 % | 27 |
| Tabla 9.5 Composición para dos geles EMSA al 6 % | 28 |

Abreviaturas

| | |
|---------------------------|---|
| Abs | Absorbancia |
| Ac | Ácido acético |
| APS | <i>Ammonium persulfate</i> (persulfato amónico) |
| ATCC | <i>American Type Culture Collection</i> (Colección Americana de Cultivos Tipo) |
| BSA | <i>Bovine serum albumin</i> (albúmina sérica bovina) |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| dNTPs | Desoxirribonucleótidos trifostato |
| D.O.₆₀₀ | Densidad óptica a 600 nm |
| DTT | 1,4-ditiotreitol |
| EDC | Clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida |
| EDTA | Ácido etilen-diamino-tetraacético |
| EMSA | <i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (ensayo de retardo en gel) |
| EtOH | Etanol |
| Fur | <i>Ferric uptake regulator</i> (regulador de la adquisición del hierro) |
| Fur Lp | Fur de <i>Legionella pneumophila</i> |
| Fur Sa | Fur de <i>Staphylococcus aureus</i> |
| g | Gramo |
| GST | Glutación S-transferasa |
| h | Hora |
| HAc | Ácido acético |
| HTH | <i>Helix-turn-helix</i> (dominio hélice-giro-hélice) |
| ICP | Plasma de acoplamiento inductivo |
| IMAC | <i>Immobilized Metal ion Affinity Chromatography</i> (cromatografía de afinidad de iones metálicos inmovilizados) |
| IPTG | Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido |
| kb | Kilobase |
| kDa | Kilodalton |
| Km^r | Resistencia a kanamicina |
| l | Litro |
| LB | Medio de cultivo Luria-Bertani |
| M | Concentración molar |
| mA | Miliamperio |
| MBP | <i>Maltose Binding Protein</i> (proteína de unión a maltosa) |
| mg | Miligramo |
| min | Minuto |
| ml | Mililitro |

| | |
|-----------------------------------|---|
| mM | Concentración milimolar |
| ng | Nanogramo |
| NHS | N-hidroxisuccinimida |
| nm | Nanómetro |
| nM | Concentración nanomolar |
| O/N | <i>Overnight</i> (toda la noche) |
| <i>P_{alr0523}</i> | Promotor del gen <i>alr0523</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 |
| PCC | Colección de cultivos del <i>Institut Pasteur</i> |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa) |
| <i>P_{furA}</i> | Promotor del gen <i>furA</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 |
| PMSF | Fluoruro de fenilmetilsulfonilo |
| <i>P_{sir}</i> | Promotor del gen <i>sir</i> de <i>S. aureus</i> |
| p/p | Relación peso/peso |
| p/v | Relación peso/volumen |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| ROS | <i>Reactive Oxygen Species</i> (especies reactivas de oxígeno) |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| s | Segundo |
| SDS | <i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (dodecil sulfato sódico) |
| SDS-PAGE | <i>SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> (electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS) |
| TBE | Tris Borato EDTA |
| TEMED | N,N,N',N'-tetra-metiletilendiamina |
| U | Unidad de actividad enzimática |
| V | Voltio |
| v/v | Relación volumen/volumen |
| X-Gal | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido |
| ε | Coefficiente de extinción molar |
| °C | Grado centígrado |
| μg | Microgramo |
| μl | Microlitro |
| μm | Micrómetro |
| μM | Concentración micromolar |

1. Resumen

Fur (Ferric uptake regulator) es un regulador global responsable de mantener la homeostasis del hierro en la mayor parte de procariotas. En muchos patógenos, Fur es esencial para la expresión de factores de virulencia [1] y la colonización de los tejidos infectados, por lo que Fur se considera una prometedora futura diana en la búsqueda de nuevos fármacos. En este trabajo se ha llevado a cabo el clonaje de las proteínas Fur de *Legionella pneumophila* y *Staphylococcus aureus* en un vector de expresión, se han sobreexpresado en *Escherichia coli* y se ha llevado a cabo una purificación y una primera caracterización de la proteína Fur de *S. aureus*, consistente en conocer algunas características básicas de la proteína, así como comprobar que ha mantenido su actividad. Se han elegido estos dos microorganismos ya que ambos son importantes patógenos humanos y pertenecen a grupos distintos, puesto que *L. pneumophila* se trata de una bacteria Gram negativa, mientras que *S. aureus* es Gram positiva. Esta primera caracterización tiene como objetivo conseguir toda la información posible que permitirá diseñar una estrategia de búsqueda de potenciales inhibidores mediante cribado de una quimioteca. Por tanto este trabajo se enmarca dentro de un proyecto más amplio de búsqueda de potenciales antimicrobianos basados en la inhibición de la proteína Fur en diferentes microorganismos patógenos.

Abstract

Fur (Ferric uptake regulator) is a global regulator responsible for maintaining iron homeostasis in most prokaryotes. In some pathogens, Fur is essential for the expression of virulence factors and infected tissues colonization. For this case Fur is considered a promising target at the future searching of novel drugs. In this project, Fur proteins from *Legionella pneumophila* and *Staphylococcus aureus* have been cloned and overexpressed in *Escherichia coli*. Subsequently, the Fur protein from *S. aureus* has been purified and firstly characterized so the basic features are known and the activity is maintained. These microorganisms were chosen because both of them are important human pathogens and belong to different groups, as *L. pneumophila* is a Gram negative bacteria and *S. aureus* is a Gram positive bacteria. The purpose of this first characterization is to obtain as much information as possible so a new strategy for searching potential inhibitors can be designed by a chemical library sieve. Therefore this project is a part of a bigger project pointed to find potential antimicrobial agents based on the Fur protein inhibition in different pathogen microorganisms.

2. Antecedentes

2.1 Introducción a las proteínas Fur

A pesar de que el hierro es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre, su biodisponibilidad es muy baja en ambientes aerobios [2], lo que lo convierte en un micronutriente esencial para la mayoría de organismos procariontes. Está presente en diversos grupos prostéticos, como el grupo hemo y los grupos sulfoféricos, y cumple funciones estructurales o como catalizador en determinadas enzimas. Esta baja disponibilidad ha llevado a los microorganismos a almacenar el hierro en depósitos intracelulares como las proteínas ferritina o bacterioferritina [3]. También se han desarrollado diversos mecanismos para la obtención del hierro, como la acidificación del medio para aumentar la solubilidad del Fe^{3+} , la reducción de Fe^{3+} a Fe^{2+} (más soluble a pH fisiológico) y la quelación con sideróforos que unen Fe^{3+} , solubilizándolo [4]. Por otro lado, el exceso de hierro en el organismo puede ser altamente tóxico ya que mediante la llamada reacción de Fenton, el Fe^{2+} potencia el efecto tóxico de las especies reactivas de oxígeno (ROS) catalizando la descomposición del H_2O_2 para formar el $\text{OH}\cdot$. Por tanto, el control de todos estos procesos para mantener la homeostasis del hierro es muy importante y las proteínas Fur (ferric uptake regulator) son las principales responsables de este proceso. En muchos patógenos humanos también regulan importantes factores de virulencia [19]. Además, las proteínas Fur están englobadas en una superfamilia de metalorreguladores implicados en el estrés oxidativo y el metabolismo de otros metales: Zur (zinc uptake regulator), Mur (manganese uptake regulator), Nur (nickel uptake regulator), PerR (peroxide stress response regulator) y el regulador de la respuesta a hierro hemo-dependiente, Irr [11].

El mecanismo clásico aceptado para el funcionamiento de las proteínas Fur consiste en que la coordinación de Fe^{2+} [5] causa un cambio conformacional que provoca la unión a los promotores de sus genes diana en secuencias ricas en A/T [6] formando dímeros de forma general para reprimir la transcripción del DNA. Las proteínas Fur se componen de una región C-terminal de dimerización y de un dominio de unión a DNA del tipo WH (winged helix), situado en el extremo N-terminal. El dominio de unión a metales es responsable de la dimerización y contienen el motivo HHHXHXXCXXC al comienzo del dominio C-terminal [1]. En algunos miembros de la familia se ha encontrado zinc con función estructural estabilizando la forma dimérica [7] y se ha descrito que es necesario que las cisteínas de la proteína se encuentren en estado reducido para mantener a la proteína Fur de *E. coli* en estado dimérico [8]. Esta estructura es muy general y algunas proteínas de la familia no se ajustan a ella, como Fur de *Helicobacter pylori* [9]. La **caja Fur** de *E. coli*, secuencia consenso de DNA a la que se une Fur, consiste en dos motivos GATAAT separados por una base de un tercer hexámero similar en la orientación inversa [10]. Tradicionalmente se ha considerado que Fur interaccionaba con el DNA para actuar como represor como un dímero de Fur- Fe^{2+} , pero se están encontrando casos en los que Fur modula (activa o reprime) a sus genes diana como apoproteína o los activa en la forma Fur- Fe^{2+} [12], mediante posicionamiento directo de la

RNA polimerasa o de forma indirecta mediante el desplazamiento de una proteína que evite la unión de la RNA polimerasa. También se han descrito funciones de Fur a través de la represión de genes que codifican RNAs antisentido[13].

Las proteínas Fur parecen tener otras funciones, ya que algunas son capaces de interactuar con moléculas señalizadoras como el grupo hemo, el NO y el CO [14] y con otras proteínas que responden al estrés oxidativo, por lo que podrían participar en respuestas detoxificantes. Recientemente se ha descrito la capacidad de reducir puentes disulfuro de la proteína FurA de *Anabaena* [15]. También se ha descrito su participación en diversos procesos como la tolerancia a ácido, la captación de riboflavina, la formación de biofilms, la respuesta a estrés osmótico, la regulación del *quorum sensing*, la resistencia a cianuro, el control de la respiración y la diferenciación de los heterocistos en las cianobacterias [1].

La regulación de las proteínas Fur es muy compleja. La regulación principal suele producirse mediante unión de las mismas a sus propios promotores. En su regulación también intervienen reguladores transcripcionales de respuesta al nivel de hierro y otros que responden a ROS, a Mn^{2+} y a las reservas intracelulares de carbono y nitrógeno [1]. También se ha descrito regulación postranscripcional mediante RNAs antisentido [16] y mediante modificaciones postraduccionales que impiden su unión al DNA o el cambio en el estado redox de sus cisteínas [1].

2.2 Fur de *Staphylococcus aureus*

S. aureus es una bacteria anaerobia facultativa, Gram positiva, con forma de cocos de 0,5 a 1,5 μm de diámetro, catalasa y coagulasa positiva, no esporulada, ampliamente distribuida y productora de gran variedad de enzimas y toxinas. Puede producir una amplia gama de enfermedades, desde infecciones cutáneas hasta enfermedades de riesgo vital como meningitis, sepsis, endocarditis o neumonía y causa amplios problemas hospitalarios por la adquisición de resistencia a antibióticos [17].

La proteína Fur de *S. aureus* (Fur Sa en el resto del trabajo) detecta los cambios en la disponibilidad del hierro y modifica la expresión de una gran cantidad factores de virulencia. Estos cambios mediados por Fur protegen a *S. aureus* frente al ataque de los neutrófilos y se ha demostrado que Fur es necesaria para mantener la virulencia en modelo murino. Concretamente se ha observado que en mutantes de *S. aureus* con delección en el gen *fur* la expresión de proteínas inmunomoduladoras decrece [18]. También se ha descrito la importancia de Fur en la resistencia a estrés oxidativo, ya que las cepas con el gen *fur* inactivado presentan menor actividad catalasa [19].

El gen *fur* de *S. aureus* presenta un alto grado de homología con el gen *fur* de *Bacillus subtilis*. Se ha encontrado una caja Fur conservada en *S. aureus* en el promotor del operon *fhu*, un operon que se cree que regula la entrada de ferricromo (un sideróforo) [20]. Se ha descrito que la proteína Fur Sa, de 149 aminoácidos, presenta un dominio de unión a metales

conservado (HXHHH) en el extremo C-terminal (**figura 2.1**) y un dominio HTH (hélice-giro-hélice) de unión a DNA común a gran número de proteínas metalorreguladoras [20]. En cuanto a la purificación de Fur Sa, tan sólo se ha llevado a cabo una purificación basada en la adición de una cola de histidinas, por lo que la estrategia que nosotros llevaremos a cabo en este proyecto, basada en su secuencia interna rica en histidinas para purificarla, no se ha reportado nunca en *S. aureus*. Se ha demostrado *in vitro* que esta Fur Sa purificada es capaz de unirse específicamente a algunos promotores relacionados con la regulación de la homeostasis del hierro y que es capaz de protegerlos de la digestión con DNasas [20].

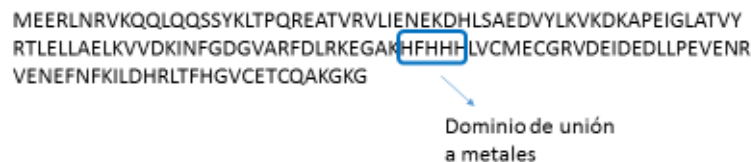


Figura 2.1. Secuencia primaria de la proteína Fur de *S. aureus* en la que se resalta la secuencia rica en histidinas.

2.3 Fur de *Legionella pneumophila*

L. pneumophila es una bacteria Gram negativa y flagelada, que actúa como un patógeno intracelular oportunista causando la Enfermedad del Legionario o Legionelosis, una forma grave de neumonía que causa fiebres altas, tos, dolores de cabeza y musculares. Esta enfermedad emerge a partir de la segunda mitad del siglo XX debido a la aparición de los aires acondicionados, torres de refrigeración de agua y otros lugares donde se forman aerosoles que ponen en contacto el patógeno con las mucosas humanas [21].

Se sabe muy poco acerca de Fur de *L. pneumophila* (Fur Lp en este trabajo). El gen *fur* de *L. pneumophila* se identificó mediante complementación de un mutante de *E. coli* del gen *fur* y se secuenció, comprobando que el gen *fur* se encuentra conservado entre distintas cepas de *L. pneumophila* y distintas especies de *Legionella*. La región del promotor de *fur* en *L. pneumophila* presenta secuencias homólogas a la caja Fur, lo que sugiere que *fur* se autorregula [22], como ya se había descrito anteriormente en otros microorganismos. No se ha descrito nunca su purificación ni la caracterización de la proteína. Se trata de una proteína de 136 aminoácidos que contiene también una secuencia interna rica en histidinas (**figura 2.2**), por lo que podría intentarse una estrategia de purificación sin colas de histidina utilizando dicha secuencia interna.

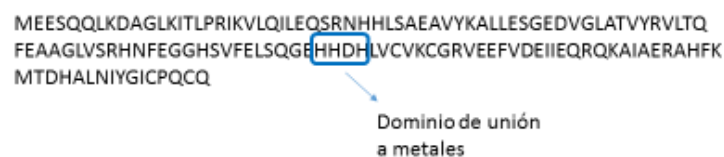


Figura 2.1. Secuencia primaria de la proteína Fur de *L. pneumophila* en la que se resalta la secuencia rica en histidinas.

3. Objetivos

Este trabajo se va a centrar en la obtención de las proteínas Fur de *S. aureus* y *L. pneumophila* en *E. coli*, dos importantes patógenos humanos, como base para la futura búsqueda de inhibidores de Fur frente a ambos patógenos. Por ello, se han marcado los siguientes objetivos específicos:

1. Clonaje de *fur* de *S. aureus* y *L. pneumophila* en el vector pET-28a.
2. Sobreexpresión de Fur de *S. aureus* y *L. pneumophila* como proteínas recombinantes en *E. coli*.
3. Purificación de Fur Sa mediante cromatografía de afinidad a metales.
4. Caracterización bioquímica parcial de Fur Sa mediante análisis de la capacidad de oligomerización y la capacidad de unión al promotor del operon *sir* en condiciones reductoras u oxidantes.

4. Materiales y métodos

4.1 Cepas, plásmidos y medios de cultivo utilizados

Para la realización de este trabajo se han empleado diferentes cepas de *E. coli* para los clonajes, la propagación de los plásmidos y la sobreexpresión de las proteínas deseadas, tal y como puede verse en el **anexo, tabla 9.1**.

En este trabajo se ha utilizado el plásmido pET-28a (Novagen). Este plásmido confiere resistencia a kanamicina (Km^R) y produce una gran cantidad de la proteína clonada, bajo el control de un promotor fuerte inducible por isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG).

El cultivo de *E. coli* en medio líquido se ha realizado a 37 °C, agitando a 200 rpm en medio Luria-Bertani (LB) esterilizado, compuesto por 10 g/l de NaCl, 10 g/l de triptona y 5 g/l de extracto de levadura y suplementado con kanamicina (Sigma) a una concentración de 50 μ g/ml en los cultivos en los que era necesario. Para la siembra en medio sólido los cultivos se crecieron toda la noche (O/N) en una estufa a 37 °C utilizando medio líquido suplementado con 1,5% de agar. Todo el trabajo con cultivos se ha realizado en condiciones de esterilidad.

4.2 Clonaje de *fur* de *L. pneumophila* y *fur* de *S. aureus*

4.2.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de la PCR se ha utilizado para amplificar los genes *fur* de *L. pneumophila* y *S. aureus* y comprobar que los vectores habían incorporado el inserto. El programa utilizado consistió en desnaturalizar el DNA a 95 °C durante 5 min, seguido de 32 ciclos de amplificación (desnaturalización de 30 s a 95 °C, hibridación de 45 s a 45-54 °C y extensión de 1-2 min/Kb) y una extensión final de 7 min a 72 °C, manteniendo las muestras a 4 °C posteriormente. Para las PCR que requerían alta fidelidad se ha utilizado la polimerasa *Pfu Ultra* (Stratagene), mientras que para las que no lo requerían se ha usado la enzima *Taq* (Biotools). Como DNA molde se ha utilizado DNA genómico de ambos patógenos o se ha llevado a cabo directamente la PCR sobre colonia según el caso. Las mezclas de reacción empleadas se encuentran en el **anexo, tabla 9.2**. El DNA genómico empleado pertenecía a *S. aureus* ATCC 29213 y *L. pneumophila* Philadelphia-1 y ha sido amablemente cedido por la Dra. Pilar Goñi de la Universidad de Zaragoza. Los oligonucleótidos utilizados en cada caso, así como las secuencias de restricción introducidos en los mismos, se recogen en el **anexo, tabla 9.3**.

4.2.2 Electroforesis de DNA

La electroforesis de DNA en gel de agarosa se ha utilizado para comprobar el adecuado tamaño y la presencia de los insertos, las digestiones, los vectores y los productos de PCR. El gel se ha preparado a una concentración de agarosa del 0,8-1,2 % en 50 ml de TBE 1X (90mM Tris/HCl pH 8, 90 mM H_3BO_3 , 2 mM EDTA) y añadiendo bromuro de etidio a 0,5 μ g/ml para la

detección del DNA bajo luz ultravioleta. Las electroforesis se han llevado a cabo a un voltaje de 120 V durante 20 minutos y el tampón de carga utilizado ha sido 6X Loading Dye Solution (Fermentas). Se han empleado como marcadores de tamaño Lambda DNA/*Hind*III Marker (Fermentas) para las muestras de mayor peso molecular y Φ X174/*Hae*III (Fementas) para las muestras más pequeñas. Los resultados se han visualizado en un sistema Gel Doc 2000 (Bio-Rad).

4.2.3 Purificación y cuantificación de DNA

La purificación de los productos de amplificación obtenidos por PCR y los insertos digeridos se ha llevado a cabo mediante el kit comercial de purificación “*illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit*” (GE Healthcare). La obtención de los plásmidos se ha llevado a cabo utilizando el kit comercial de purificación “*GenElute™ Plasmid Miniprep Kit*” (Sigma).

Para la purificación de los vectores y los insertos digeridos se ha utilizado un protocolo de precipitación de DNA basado en su baja solubilidad en etanol. Este protocolo ha consistido en añadir a cada muestra de 100 μ l 450 μ l de EtOH y 50 μ l de AcNa 3 M pH 5,2 e incubar O/N a -20 °C, centrifugar a 14000 rpm y 4 °C durante 30 minutos, desechar el sobrenadante y lavar los precipitados con 500 μ l de EtOH frío al 70 %, centrifugar las muestras a 14000 rpm y 4 °C durante 5 min, desechar el sobrenadante de nuevo y secar el precipitado al aire a temperatura ambiente durante 10 minutos. Finalmente se ha resuspendido el precipitado en 50 μ l de agua milliQ.

La concentración de DNA obtenido se ha determinado mediante espectroscopía de absorción molecular gracias al sistema Nano Value Plus (GE Healthcare).

4.2.4 Doble digestión y ligación

La digestión del plásmido pET-28a y del inserto del gen *fur* de *L. pneumophila* se ha llevado a cabo simultáneamente con las enzimas de restricción *Nco*I y *Hind*III (Fermentas), según las indicaciones del fabricante. Sin embargo, dado que hay un sitio de corte de *Nco*I en el gen *fur* de *S. aureus*, se ha llevado a cabo una estrategia con enzimas las enzimas compatibles *Pag*I (Fermentas) y *Nco*I. Para la digestión del inserto del gen *fur* de *S. aureus* se ha realizado una primera digestión con la enzima *Pag*I seguida de una purificación del inserto y completada con una segunda digestión con la enzima *Hind*III, ya que estas dos enzimas no funcionan correctamente juntas. Cabe destacar que las enzimas *Nco*I y *Pag*I dejan extremos cohesivos, permitiendo la ligación del inserto de *fur* de *S. aureus* y el plásmido pET-28a. Todas las digestiones se han realizado a 37 °C durante 2 h y se han comprobado mediante electroforesis de DNA en agarosa.

Tras la purificación del DNA digerido, se ha realizado la ligación del vector con cada inserto con la enzima T4 DNA ligasa (Promega) a 4 °C durante toda la noche siguiendo las instrucciones de la casa comercial. Se ha puesto un control negativo del plásmido digerido sin inserto para comprobar que no se produce recircularización.

4.2.5 Preparación de células quimiocompetentes

Un cultivo de células de *E. coli* no competentes incubado durante la noche anterior se ha refrescado mediante una dilución 1:100 en 100 ml y se ha mantenido a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (D.O.₆₀₀) de 0,35-0,45. Tras incubar 20 min en hielo para detener el crecimiento microbiano, se han centrifugado a 4000 rpm a 4 °C durante 15 min, desechando el sobrenadante y resuspendiendo los pellets bacterianos en un volumen total de 40 ml de Buffer 1 (14,7 g/l CaCl₂, 14,2 g/l MgCl₂ y 3,2 g/l NaAc). A continuación se ha vuelto a centrifugar a 4000 rpm a 4 °C durante 15 min, desechando el sobrenadante y resuspendiendo los pellets lentamente en 2 ml de Buffer 2 frío (14,7 g/l CaCl₂, 15 % (v/v) glicerol). Las resuspensiones se distribuyeron en alícuotas de 200 µl y se conservaron a -80 °C.

4.2.6 Transformación de células quimiocompetentes

Se han descongelado las bacterias quimiocompetentes en baño de hielo y se ha añadido 50-100 ng del DNA por alícuota (dejando una alícuota como control negativo), mezclando suavemente e incubando en hielo durante 5 minutos. A continuación se han sometido a un choque térmico a 42 °C durante 30 s y se han incubado en hielo durante 2 min. Se ha añadido 800 µl de medio LB, incubándolo a 37 °C y 200 rpm durante 45-60 min. Se han sembrado en césped 200 µl de cada cultivo en placas de LB agar con kanamicina y se incubaron las placas O/N.

4.3 Sobreexpresión de Fur de *S. aureus* y *L. pneumophila* en *E. coli* y obtención de biomasa

4.3.1 Sobreexpresión de Fur

A partir de transformantes de *E. coli* se han preparado cultivos O/N. Estos cultivos se han refrescado a una concentración 1:100 y se han incubado a 37 °C hasta alcanzar la fase exponencial de crecimiento. A continuación se han dividido las muestras en 2 alícuotas iguales, uno como control negativo sin inducir y al otro se le ha añadido IPTG 1 mM para inducir la sobreexpresión de la proteína recombinante. Se han dejado incubando las muestras inducidas y los controles otras 3 h en las mismas condiciones. Se ha tomado 1 ml de cada uno, se han centrifugado 2 min a 14000 rpm desechando el sobrenadante y se han resuspendido en 50 µl de agua milliQ para llevar a cabo una prueba de expresión mediante una electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE).

4.3.2 Electroforesis de proteínas

Se han preparado geles de poliacrilamida para la electroforesis como se recoge en el **anexo, tabla 9.4**. Las muestras se han mezclado con tampón de carga 6X (10 mM Tris/HCl pH 8.8, 1 mM EDTA, 2.5 % SDS, 5 % de β-mercaptoetanol, 10 % de glicerol y 0,02 % de azul de bromofenol), se han hervido a 95 °C durante 5 min, se han centrifugado a 14000 rpm durante 5 min y se han cargado 5 µl del sobrenadante. El marcador de peso utilizado fue la mezcla de

proteínas “LMW Protein Mixture” (Amersham Biosciences). El tampón de electroforesis utilizado contenía 25 mM Tris/HCl pH 8.8, 200 mM de glicina y 3,5 mM de SDS. Los geles se han corrido hasta que el colorante ha alcanzado el final del gel a 35 mA por gel. Después se han teñido durante 20 min en agitación a 100 rpm con un colorante compuesto por 0.05 % (p/v) de Coomassie Blue R-250, 6 % (v/v) de ácido acético, 45 % (v/v) de metanol y 49 % (v/v) de agua. Se han desteñido con una solución descolorante (10 % (v/v) de ácido acético, 25 % (v/v) de metanol y 65 % (v/v) de agua).

4.3.3 Obtención de biomasa de *E. coli*

Para la obtención de biomasa se ha preparado 5 l de cultivo en las mismas condiciones que se utilizaban para la sobreexpresión, se ha centrifugado 10 min a 7000 rpm a 4 °C, se ha desechado el sobrenadante, se ha lavado el pellet bacteriano con 0,15 M NaCl y la biomasa obtenida se ha conservado a -20 °C.

4.4 Purificación y caracterización parcial de Fur de *S. aureus*

4.4.1 Empaquetamiento de la columna de afinidad a metales

Para la purificación de la proteína se ha utilizado una matriz de sefarosa en la que se han inmovilizado iones de Cu²⁺ para realizar una cromatografía de afinidad a metales (IMAC). Esta columna se ha preparado empaquetando 5 ml de “Chelating Sepharose Fast Flow” (GE Healthcare), lavándola con 10 volúmenes de agua milliQ, añadiendo 3 volúmenes de una disolución CuSO₄ 0,25 M, retirando el exceso de metal con 5 volúmenes de agua milliQ y equilibrándola con 5 volúmenes de tampón de unión (50 mM Tris/HCl pH 8, 500 mM NaCl) [20]. Todos los tampones se han desgasificado y filtrado antes de usarlos.

4.4.2 Obtención del extracto crudo

Todo el proceso fue llevado a cabo a 4 °C para evitar que actuaran las proteasas. Se han homogeneizado 5 g de biomasa con 25 ml de tampón de unión con 2 mM fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), un inhibidor de proteasas. A continuación se ha procedido a la sonicación de las células en baño de hielo en 10 ciclos de 45 s con 30 s de pausa intercalados entre cada ciclo, con una amplitud del 80 % y un ciclo de 0,5. El extracto crudo se ha centrifugado 3 veces a 20000 rpm y 4 °C durante 20 min cada vez, tomando el sobrenadante y guardando los pellets para ser analizados posteriormente mediante electroforesis. Finalmente el sobrenadante se ha pasado por filtros de 0,80 y 0,22 µm (Millipore).

4.4.3 Purificación por cromatografía de afinidad a metales

El sobrenadante del extracto crudo se ha pasado por la columna de IMAC a una velocidad de 2 ml/min, se ha lavado con 5 volúmenes de tampón de unión con 0,5 M (NH₄)₂SO₄ para debilitar las interacciones inespecíficas y después con tampón de unión con 35 mM de glicina a 3ml/min hasta que la D.O._{280nm}<0,1. A continuación se ha eluido la proteína con un gradiente

0-1 M de imidazol en el tampón de unión a 2 ml/min mientras se recogían alícuotas de 1 ml que se han guardado a 4 °C. Las fracciones proteicas se han analizado mediante electroforesis desnaturante. La matriz se ha regenerado haciendo pasar 10 volúmenes de agua milliQ, 0,5 volúmenes tampón de lavado (0,2 M EDTA, 0,5 M NaCl), seguido de 5 volúmenes de NaCl 0,5 M y 5 volúmenes de agua milliQ, siguiendo las instrucciones del fabricante. La matriz regenerada se ha conservado a 4 °C en 20 % (v/v) EtOH.

4.4.4 Diálisis de la proteína

La proteína se dializó a 4 °C en tampón de diálisis (50 mM Tris/HCl pH 8, 100 mM de NaCl y 10 % (v/v) glicerol), cambiando el tampón cada 2-3 horas al menos 3 veces. Posteriormente se han centrifugado las muestras a 4000 rpm y 4 °C durante 15 min para desechar los posibles precipitados. Las alícuotas se han guardado a -20 °C.

4.4.5 Espectroscopia de absorción molecular y cuantificación

Se ha realizado un espectro de absorción de las muestras desde 250 a 700 nm con un equipo Specord® 250 Plus (Analytikjena). La cuantificación de la proteína purificada se ha llevado a cabo midiendo la absorbancia a 280 nm y aplicando la Ley de Beer-Lambert ($Abs = \epsilon \cdot c \cdot l$), utilizando como blanco el tampón de diálisis y usando el coeficiente de extinción teórico de la proteína suministrado por el servidor ProtParam de ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>) para la proteína oxidada ($\epsilon_{280nm} = 4720 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

4.4.6 Pruebas de renaturalización de la proteína

Dado que en los pellets del extracto crudo se detecta gran cantidad de Fur Sa precipitada, se ha decidido intentar renaturalizar y resolubilizar la proteína utilizando cloruro de guanidinio y urea, dos potentes agentes caotrópicos que ya han demostrado su eficacia como renaturalizantes proteicos [24]. Una alícuota de pellet del extracto crudo se ha incubado con tampón de unión con cloruro de guanidinio 2 M (GndCl) y otra con tampón de unión con urea 6 M. Después se han centrifugado ambas a 14000 rpm y 4 °C durante 20 minutos para separar los sobrenadantes de los pellets. Se ha realizado un espectro de absorción y se han sometido a electroforesis SDS-PAGE.

4.4.7 Análisis de oligomerización: ensayo de entrecruzamiento y ensayo de reducción

En el ensayo de entrecruzamiento se ha incubado Fur Sa (65 μM) durante 15 min en oscuridad con 2 mM Clorhidrato de 1-etil-3-[3-dimetilaminopropil]carbodiimida (EDC) y 2 mM N-hidroxisuccinimida (NHS) seguido de una electroforesis SDS-PAGE.

En el ensayo de reducción se ha incubando Fur Sa (65 μM) durante 10 min con 10 mM de 1,4-ditiotreitol (DTT) y se ha llevado a cabo una electroforesis SDS-PAGE no reductora utilizando tampón de carga sin β -mercaptoetanol.

4.4.8 Ensayo de actividad de unión al DNA

Los ensayos de actividad de unión al DNA (EMSA) se han realizado en condiciones nativas con geles de poliacrilamida al 6% cuya composición se detalla en el **anexo, tabla 9.5**. El tampón de electroforesis se ha preparado con una composición de 10 mM Tris, 100 μ M MnCl₂ y pH 7,5 ajustado con 1 M de ácido bórico [20]. Los geles se han precorrido 45-60 min a 4 °C y 60 V para equilibrar el sistema.

El tampón de unión utilizado para Fur Sa contenía 100 mM de MnCl₂, 1 mM de MgCl₂, 25 mM KCl, 10 mM Tris, ajustado a pH 7,5 con 1 M de ácido bórico [20] y el tampón de carga utilizado fue 40 % (p/v) de sacarosa, 0,1 % (p/v) de naranja de xilenol, 0,1 % (p/v) de azul de bromofenol en el tampón de unión empleado [20]. El tampón de unión utilizado para la proteína FurA de *Anabaena* sp. PCC 7120 (utilizada como control positivo del EMSA) contenía 10 mM Bis Tris pH 7,5, 40 mM KCl, 100 μ M de MnCl₂, 1 mM MgCl₂ y 5 % glicerol [15] y el tampón de carga empleado ha sido el mismo que para Fur Sa.

Cada muestra se ha preparado en un volumen final de 20 μ l, con 40 ng de DNA inespecífico de la región promotora del gen *alr0523* de *Anabaena* sp. PCC 7120 (*P_{alr0523}*), 40 ng de DNA específico (promotor del operon *sir* de *S. aureus* (*P_{sir}*) para Fur Sa [20] y promotor del gen *furA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 (*P_{furA}*) para el control positivo [15]) y 0,01 mg/ml de BSA en el tampón de unión adecuado. Los fragmentos de DNA se han obtenido mediante amplificación por PCR a partir de DNA genómico de *S. aureus* o *Anabaena* sp. PCC 7120. Se han utilizado concentraciones de proteína entre 500 nM y 1200 nM en presencia o ausencia de 1 mM DTT según la muestra. Las mezclas de reacción se han incubado durante 15 min a temperatura ambiente antes de añadirles 3 μ l del tampón de carga y cargarlas en el gel. Los geles se han corrido a 90 V y 4 °C durante 2 h. Para visualizar los resultados, se han teñido los geles con 50 ml de tampón de electroforesis a los que se les añadió 5 μ l de Vistra Green™ 10000X (Amersham Biosciences), durante 20 min, en agitación suave y oscuridad. Los resultados se visualizaron con un Gel Doc 2000 (Bio-Rad).

5. Resultados

5.1 Clonaje de *fur* de *S. aureus* y *L. pneumophila*

5.1.1 Obtención de plásmidos e insertos

El plásmido pET-28a se ha obtenido mediante miniprep a partir de células *E. coli* DH5 α que contenían el vector, se ha cuantificado y se ha comprobado mediante electroforesis (**figura 5.1 A**). El inserto del gen *fur* de *L. pneumophila* y del gen *fur* de *S. aureus* se ha obtenido mediante PCR a partir del DNA genómico de cada uno. A continuación se han comprobado la PCR por electroforesis (**figura 5.1 B y C**), se han purificado los insertos y se han cuantificado. Las electroforesis han permitido comprobar que las bandas amplificadas tienen el tamaño correcto y que la amplificación ha sido específica ya que no hay más fragmentos de DNA detectables.

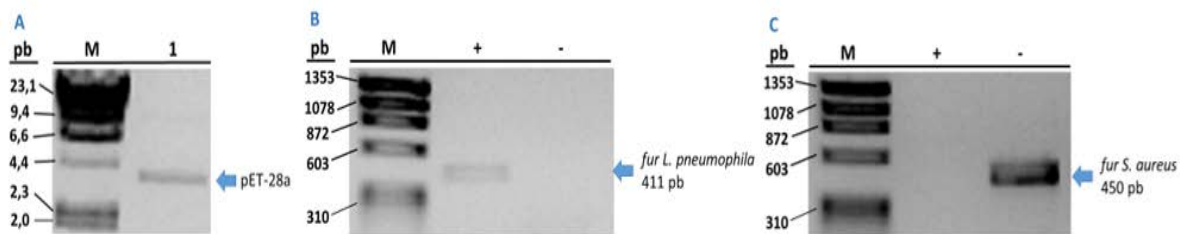


Figura 5.1. Amplificación de los insertos y purificación de pET-28a. Purificación de pET-28a (A): carril 1: plásmido purificado; carril M: marcador de peso molecular. Amplificación del gen *fur* de *L. pneumophila* (B) y de *S. aureus* (C): carril M: marcador de peso molecular; carril +: producto de PCR; carril -: control negativo de la PCR (sin DNA molde).

5.1.2 Doble digestión y ligación

Primero se ha realizado una digestión de vector pET-28a con las enzimas de restricción *Nco*I y *Hind*III simultáneamente, seguida de una electroforesis para comprobar que ha ido correctamente (**figura 5.2**), donde no se aprecia plásmido sin digerir.

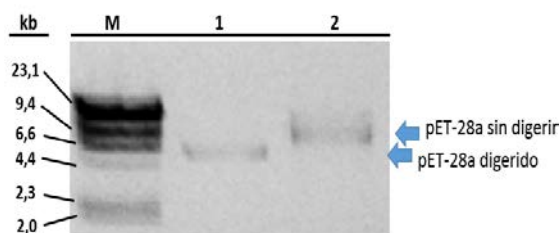


Figura 5.2. Doble digestión de pET-28a con *Nco*I y *Hind*III : carril M: marcador de peso molecular; carril 1: pET-28a digerido; carril 2: pET-28a control (sin digerir).

A continuación se ha efectuado la digestión con las enzimas *Nco*I y *Hind*III simultáneamente y en las mismas condiciones del inserto de *fur* de *L. pneumophila* (Lp). Se ha realizado una electroforesis como comprobación y se ha purificado y cuantificado. El inserto de *fur* de *S. aureus* (Sa) se ha digerido en primer lugar con *Pag*I, a continuación se ha purificado, se ha

digerido con *Hind*III, purificado y cuantificado. Posteriormente se ha llevado a cabo la ligación de cada uno de los insertos digeridos con el pET-28a digerido, obteniéndose los plásmidos de sobreexpresión **pET-28a:*fur* Sa** y **pET-28a:*fur* Lp**.

5.1.3 Transformación de células quimiocompetentes

Se han preparado células quimiocompetentes de las cepas DH5α y BL21 de *E. coli* y se han mantenido congeladas a -80 °C hasta su uso. A continuación se han transformado las células DH5α mediante choque térmico con las mezclas de ligación **pET-28a:*fur* Sa**, **pET-28a:*fur* Lp** y **pET-28a** digerido y ligado sin inserto como control negativo. Las células transformadas se han sembrado en placas de LB agar con kanamicina, viéndose un bajo número de colonias en el control negativo, indicativo de que la digestión ha sido correcta y no se ha producido recircularización en gran medida. De cada una de las dos placas transformadas con las ligaciones se han cogido 10 colonias con un palillo, se han replicado en otras dos placas con kanamicina y se ha llevado a cabo una PCR seguida de una electroforesis para comprobar que realmente portan los insertos deseados. En la **figura 5.3**, correspondiente a la PCR de colonias transformadas con **pET-28a:*fur* Lp**, se puede ver que 4 de las 10 colonias replicadas portan realmente el plásmido de interés; el resto posiblemente hayan incorporado el plásmido recircularizado o sin digerir a pesar de que no se detectaba plásmido sin digerir en las etapas anteriores (**figura 5.2**).

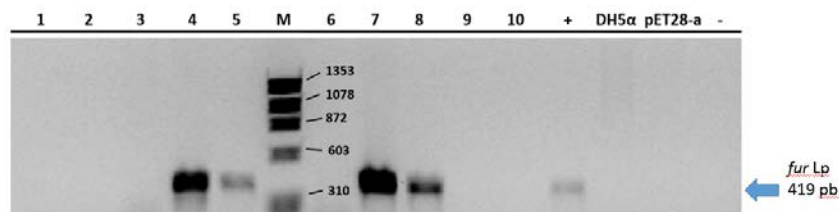


Figura 5.3 PCR de colonias transformadas con pET-28a:*fur* Lp. Carril M: marcador de peso molecular (medido en pb); carriles 1-10: distintas colonias; carril +: DNA genómico de *L. pneumophila* (control positivo de la PCR); carril DH5α: *E. coli* DH5α sin transformar (control negativo); carril pET-28a: pET-28a sin inserto (control negativo); carril -: control negativo de la PCR.

A continuación se han seleccionado las colonias 7 y 8 de la figura, se han cultivado en medio LB líquido con kanamicina y se han purificado los plásmidos mediante miniprep para enviarlos al servicio de secuenciación de la Universidad de Zaragoza. Este mismo procedimiento se ha llevado a cabo con **pET-28a:*fur* Sa** obteniéndose resultados semejantes. Se ha comprobado que las secuencias de los genes *fur* amplificadas de ambos patógenos no portan mutaciones y se han transformado células *E. coli* BL21 quimiocompetentes mediante choque térmico con los plásmidos **pET-28a:*fur* Sa** y **pET-28a:*fur* Lp** correctamente secuenciados y se han sembrado en placas de LB agar con kanamicina, obteniéndose ya las cepas que se utilizarán para la sobreexpresión.

5.2 Sobreexpresión y obtención de biomasa

Se ha realizado una prueba de sobreexpresión de la proteína a partir de 4 colonias *E. coli* BL21 portadoras de **pET-28a:*fur* Sa** o **pET-28a:*fur* Lp** mediante ensayo de inducción con IPTG seguida de una electroforesis de proteínas SDS-PAGE (**figura 5.4**). La sobreexpresión de ambas proteínas sólo se produce al inducir con IPTG, que genera una elevada concentración de la proteína de interés.

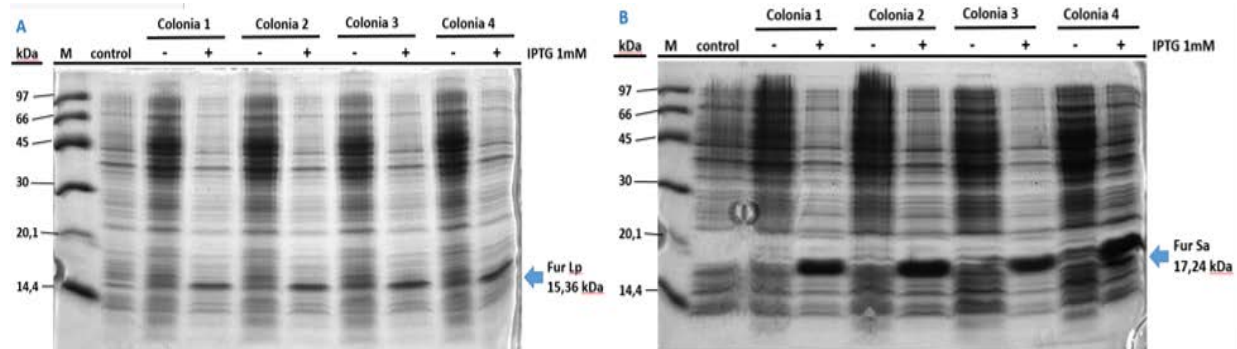


Figura 5.4. Sobreexpresión de Fur de *L. pneumophila* (A) y *S. aureus* (B). Carril M: marcador de peso molecular; carril control: BL21 con pET-28a sin inserto e inducido con IPTG (control negativo); las muestras del 1-4 representan distintas colonias, siendo las muestras - las que se han crecido sin inducir con IPTG y las muestras + aquellas a las que se les ha inducido con IPTG.

Se ha seleccionado la muestra 3 de la sobreexpresión *L. pneumophila* y la 2 de *S. aureus* para llevar a cabo un cultivo de 5 l de cada uno, induciéndolos con IPTG y recogiendo la biomasa mediante centrifugación. Esta biomasa se ha congelado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su posterior uso. Se han obtenido 10,54 g de células *E. coli* BL21 que sobreexpresan Fur Sa y 10,04 g de las que sobreexpresan Fur Lp.

5.3 Purificación de Fur de *S. aureus*

Para la purificación de Fur de *S. aureus* se ha decidido llevar a cabo una purificación sin cola de histidinas mediante cromatografía de afinidad a metales ya que la proteína Fur Sa presenta una región rica en histidinas con secuencia HFHHH (**figura 2.1**), que debería ser suficiente para interactuar con el metal fijado en la columna y retener la proteína.

Se ha purificado Fur Sa guardando una alícuota de cada uno de los pasos y se ha llevado a cabo una electroforesis SDS-PAGE. En esta electroforesis (**figura 5.5**) se ve que gran parte de la proteína Fur aparece en el pellet de las células indicando que se encuentra formando cuerpos de inclusión o unida a la membrana. La aparición en forma de cuerpos de inclusión también se ha descrito en otras proteínas Fur, como la de *Mycobacterium tuberculosis* [25]. Sin embargo también se ha detectado una banda que parece corresponder a Fur Sa en algunas de las alícuotas eluidas con un gradiente de imidazol. Se ha detectado que las alícuotas en las que podría encontrarse la proteína Fur Sa presentaban un tono ligeramente amarillento

(figura 5.6). Finalmente se han tomado las muestras 11, 12 y 13 de la elución, donde más proteína Fur Sa podría haber y se han juntado para dializarlas.

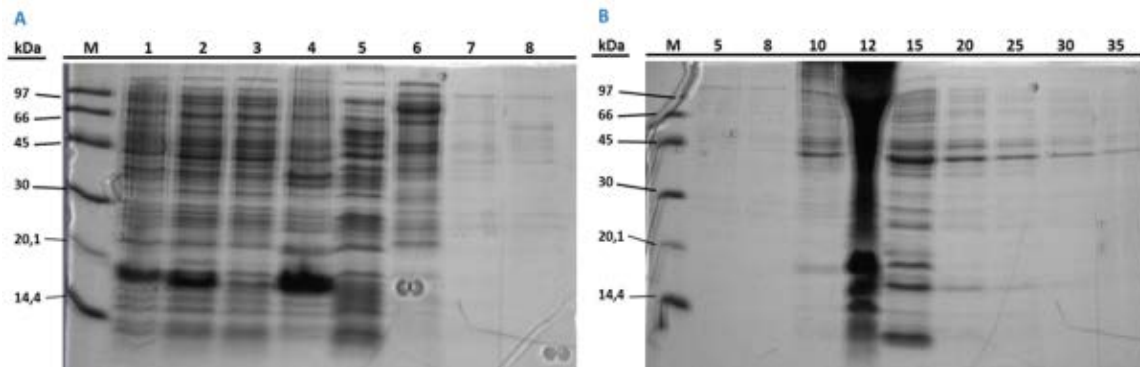


Figura 5.5. Electroforesis SDS-PAGE al 15% de la purificación de Fur Sa. Etapas previas a la elución (A): carril M: marcador de peso molecular; carril 1: extracto crudo antes de sonicar; carril 2: extracto crudo después de sonicar; carril 3: sobrenadante del extracto crudo tras centrifugar; carril 4: pellet del extracto crudo tras centrifugar; carril 5: proteínas que han atravesado la columna sin unirse; carril 6: primer lavado de la columna; carril 7: segundo lavado de la columna; carril 8: tercer lavado de la columna. Muestras recogidas durante la elución (B): carril M: marcador de peso molecular; resto de carriles: distintas alícuotas recogidas durante la elución con gradiente de imidazol de 0 a 1M.

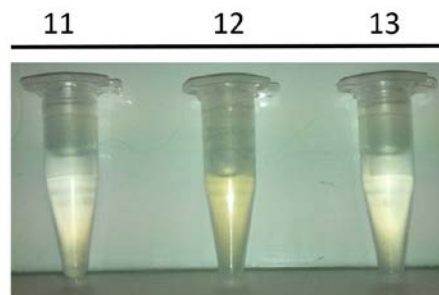


Figura 5.6. Imagen de las alícuotas 11, 12 y 13 del eluido donde se aprecia el ligero tono amarillento de las muestras que podrían contener la proteína Fur Sa.

Una vez dializada la proteína se ha centrifugado para eliminar el posible pellet formado. Durante la diálisis se ha obtenido un gran precipitado a pesar de que el tampón de diálisis contenía glicerol y NaCl para evitar la precipitación de Fur Sa. Se ha realizado otra electroforesis del sobrenadante y del pellet formado (figura 5.7), donde se puede ver la banda característica a 17 kDa de Fur Sa como la proteína mayoritaria de la muestra del sobrenadante. La purificación no ha sido completa, sino de una pureza estimada del 50 % ya que se pueden apreciar bandas correspondientes a otras proteínas (figura 5.7). Como se ve en la figura 5.7, la diálisis ha permitido separar por precipitación una gran cantidad de proteínas no deseadas y enriquecer el sobrenadante en Fur Sa ya que en el pellet de la diálisis sólo aparece una pequeña cantidad de la proteína Fur Sa. Se ha realizado un espectro de absorción de la muestra del sobrenadante (figura 5.8) detectándose un pico en torno a 410 nm indicativo de la presencia de un grupo prostético (posiblemente hemo [26]) y se ha medido la absorbancia a 280 nm para estimar la concentración de la muestra a partir del coeficiente de extinción teórico, de la que se han obtenido 8 ml a una concentración de 1,32 mM de la proteína Fur de

S. aureus. Sin embargo, esta concentración está sobreestimada, ya que la proteína Fur Sa no se halla pura y el resto de proteínas presentes en la muestra influyen en la medida de la absorbancia al no utilizarse el coeficiente de extinción experimental.

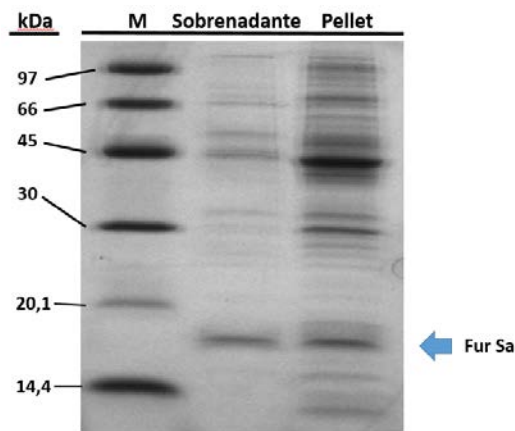


Figura 5.7 Electroforesis de la diálisis de Fur. Carril M: marcador de peso molecular; carril Sobrenadante: muestra dializada de Fur; carril Pellet: precipitado formado durante la diálisis.

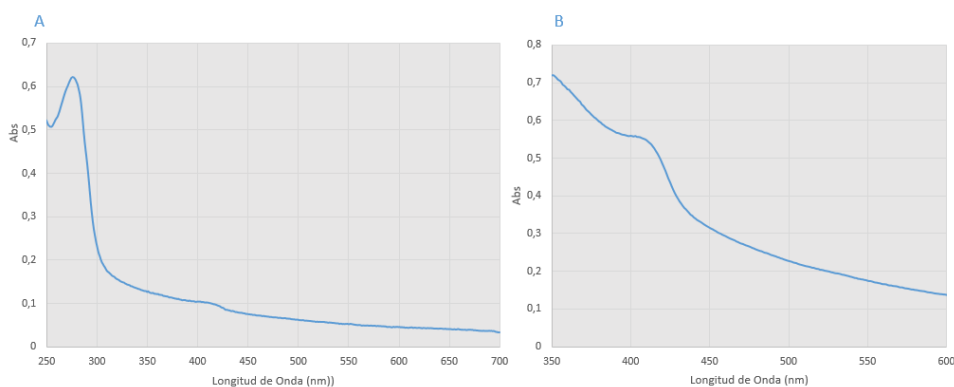


Figura 5.8. Espectros de absorción de Fur Sa. Espectro de absorción de Fur Sa purificada a 132 μM (A); Ampliación del pico entorno a 410 nm de otra muestra de Fur Sa purificada a 670 μM (B).

5.4 Resuspensión de Fur de *S. aureus*

Como gran parte de la proteína Fur se encontraba en el precipitado de la centrifugación del extracto crudo, se ha intentado realizar un ensayo de resuspensión y renaturalización de la proteína precipitada con cloruro de guanidinio y con urea, dos potentes agentes caotrópicos ampliamente utilizados para la renaturalización proteica [24]. A continuación se ha realizado una electroforesis SDS-PAGE (figura 5.9) para evaluar la prueba de renaturalización, en la que se puede ver que tanto el cloruro de guanidinio como la urea han permitido resuspender buena parte de la proteína, que aparece en gran cantidad tanto en el sobrenadante como en el pellet. Además aparece una banda en torno a 34 kDa que parece ser Fur Sa en forma dimérica. El espectro de absorbancia de la muestra renaturalizada es similar a la de la proteína purificada y mantiene el pico en torno a 410 nm (figura 5.10).

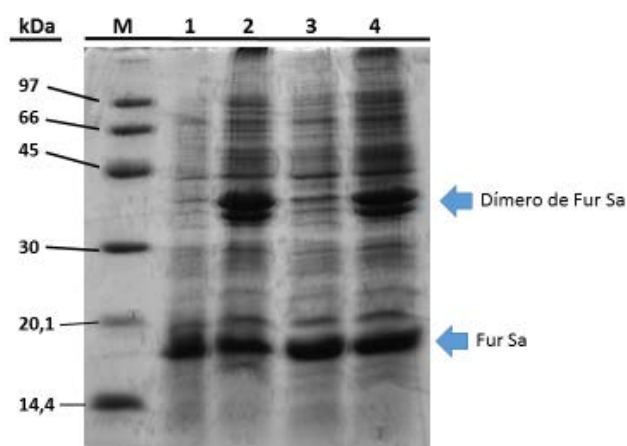


Figura 5.9. Electroforesis de la renaturalización. Carril M: marcador de peso molecular; carril 1: sobrenadante de la resuspensión con 2 M cloruro de guanidinio; carril 2: pellet de la resuspensión con 2 M cloruro de guanidinio; carril 3: sobrenadante de la resuspensión con 6 M urea; carril 4: pellet de la resuspensión con 6 M urea.

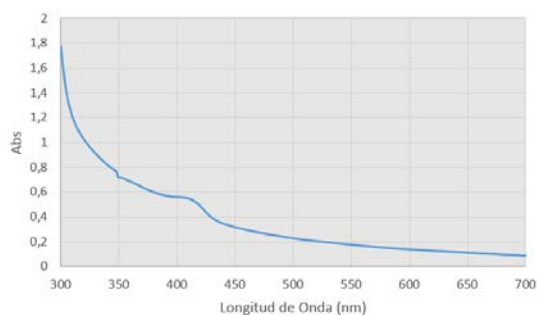


Figura 5.10. Espectro de absorción de Fur Sa renaturalizada 2 M cloruro de guanidinio.

5.5 Análisis de oligomerización

La proteína Fur Sa presenta 4 cisteínas (**figura 2.1**), por lo que podría formar puentes disulfuro tanto intra- como intermoleculares. En otros microorganismos se ha visto que la proteína Fur tiende a dimerizar a través de estos enlaces [8], por lo que se ha realizado un ensayo de reducción y un análisis de entrecruzamiento. La prueba de reducción se ha realizado añadiendo DTT, un agente reductor que rompe los enlaces disulfuro, lo que se traduciría en la rotura de los complejos multiméricos estabilizados mediante esta unión. Es importante que el tampón de carga no contenga β -mercaptoetanol, ya que también es un agente reductor que actuaría de la misma manera que el DTT en el control negativo. Los resultados se han analizado mediante electroforesis SDS-PAGE (**figura 5.11 A**), donde se puede ver en la muestra sin reductor un patrón de bandas completamente distinto al habitual, debido a los enlaces disulfuro presentes en las proteínas no deseadas que mantienen sus estructuras nativas. No se detectan dímeros de Fur Sa, pero se aprecia que la banda correspondiente a Fur Sa se desdobra en dos bandas en la muestra sin DTT, que seguramente se corresponden con distintas conformaciones de los puentes disulfuro intramoleculares. En la muestra que

contiene DTT, la proteína aparece como monómero en forma de una banda única, indicando que los enlaces disulfuro intramoleculares se han reducido.

El ensayo de entrecruzamiento consiste en la formación de enlaces covalentes entre proteínas cercanas en solución a través de agentes entrecruzantes, para este ensayo se ha utilizado EDC y NHS. El EDC activa los grupos carboxilo de una proteína para que reaccionen con grupos amino primarios de la otra proteína. El NHS aumenta la eficiencia de la activación del grupo carboxilo por el EDC. Los resultados se han analizado mediante electroforesis SDS-PAGE utilizando tampón de carga con agente reductor (**figura 5.11 B**). Dado que la proteína se purifica como monómero en ausencia de DTT, no se han visto diferencias entre la muestra con EDC y la muestra control, confirmando el resultado anterior obtenido en el ensayo de reducción.

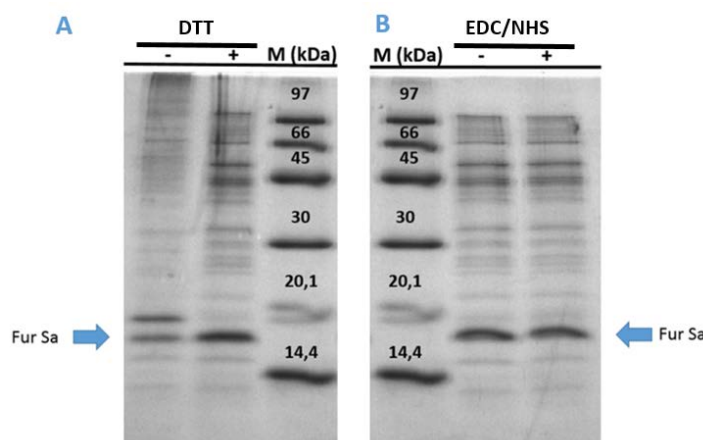


Figura 5.11. Análisis de oligomerización de Fur Sa. Ensayo de reducción (A): Carril -: control negativo de Fur Sa sin tratar con 10 mM DTT; carril +: Fur Sa tratada con 10 mM DTT; carril M: marcador de peso molecular. Ensayo de entrecruzamiento (B): carril -: Fur Sa sin 2 mM EDC ni 2 mM NHS; carril +: muestra con 2 mM EDC y 2 mM NHS; carril M: marcador de peso molecular.

5.6 Análisis de interacción con el DNA

Se ha descrito que Fur Sa regula el promotor de varios genes relacionados con el metabolismo del hierro en *S. aureus* [20]. Para comprobar si la proteína purificada es activa y mantiene la capacidad de unión al DNA *in vitro* se ha utilizado el ensayo de retardo en gel (EMSA), que consiste en la disminución de la movilidad electroforética del DNA debido a la formación del complejo proteína-DNA. Además, se ha añadido un DNA competidor al que la proteína no debería unirse, para comprobar que no se producen interacciones inespecíficas entre el DNA y la proteína.

Para este ensayo se ha utilizado el promotor del operon *sir* de *S. aureus*. Se ha propuesto que el operon *sir* constituye un sistema de transporte de sideróforos en *S. aureus* [20], por lo que es de esperar que Fur se encuentre implicada en su regulación.

Los ensayos de unión a DNA se realizaron a diferentes concentraciones de proteína entre 500 nM y 1200 nM en presencia de Mn^{2+} , ya que se ha descrito que Fur Sa requiere la interacción con un metal para unirse de forma óptima al DNA *in vitro* [20]. Además se ha evaluado la influencia de 1 mM DTT, que actúa como un potente reductor, dado que otras Fur requieren ambiente reductor para su unión al DNA [8]. Se ha utilizado la proteína Fur de *Anabaena* sp. PCC 7120 como control positivo para comprobar que el ensayo ha funcionado correctamente. En la **figura 5.13** se observa que Fur Sa requiere DTT para unirse al DNA ya que al aumentar la concentración de Fur Sa se incrementa la banda correspondiente al complejo Fur-DNA, lo cual no se percibe en ausencia de agente reductor. Por tanto, aunque las condiciones probadas en este ensayo no parecen ser las óptimas para la unión de Fur Sa, sí se puede comprobar que la proteína obtenida mediante este método de purificación sin cola de histidinas es activa.

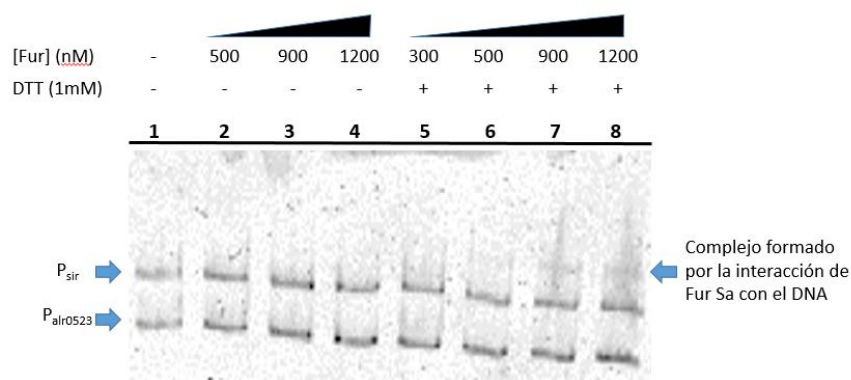


Figura 5.13. Ensayo EMSA con gel PAGE al 6 % con 40 ng de DNA. Carril 1: control negativo de Fur Sa; carriles 2-8: Fur Sa.

6. Discusión

El objetivo de este trabajo ha sido la obtención de las proteínas Fur de *S. aureus* y *L. pneumophila* en *E. coli*, dos importantes patógenos humanos, como base para la futura búsqueda de inhibidores de Fur frente a ambos patógenos. Durante los clonajes de *fur* de *L. pneumophila* y *fur* de *S. aureus* se han ido realizando pruebas y controles después de cada una de las etapas para comprobar que todo el proceso se iba realizando correctamente. A pesar de esto, sólo algunas de las colonias posibles transformantes que crecían en medio con kanamicina como agente de selección portaban el gen de interés, lo que probablemente indicaba que no todo el plásmido se ha digerido correctamente a pesar de que no se detectaba plásmido sin digerir en las electroforesis. Otra posible explicación sería que se estuviera produciendo algún fenómeno de recircularización de los plásmidos, pero parece poco probable debido al empleo de dos enzimas de restricción diferentes. Hay que destacar que la estrategia empleada para la ligación de *fur* de *S. aureus* con el vector empleando enzimas compatibles que dejan extremos cohesivos ha sido todo un éxito.

Durante las etapas en las que se han llevado a cabo las sobrexpresiones de ambas Fur se ha observado que el crecimiento de las bacterias que portan *fur* de *S. aureus* es considerablemente más lento que el de las que portan *fur* de *L. pneumophila*, siendo necesarios tiempos de crecimiento hasta fase exponencial de 3 horas y media frente a las 2 horas en el caso de *fur* de *L. pneumophila* para alcanzar densidades ópticas similares. Esto podría deberse a que se produce mayor cantidad de proteína Fur Sa que de Fur Lp como sugieren las electroforesis realizadas durante los ensayos de sobreexpresión, por tanto sería lógico que interfiriese más en el metabolismo de *E. coli* al ser un sistema de expresión heterólogo, haciéndola crecer más lentamente. Una posible causa se trataría de la diferente frecuencia de uso de codones en Gram positivos y Gram negativos. Otra explicación menos probable sería que Fur Sa a elevadas concentraciones provocara mayor toxicidad celular que Fur Lp debido a que *L. pneumophila* y *E. coli* se tratan de bacterias Gram negativas, mientras que *S. aureus* es una bacteria Gram positiva.

Para la purificación de Fur Sa se ha elegido emplear una estrategia sin colas de histidinas con el objetivo de obtener la proteína lo más nativa posible, lo que interesa para los futuros ensayos de inhibición. En cuanto a la elección del metal para la IMAC, el níquel une colas de histidina de forma muy específica, por lo que se ha preferido utilizar cobre como metal de unión ya que necesita menor número de histidinas para unirse y es más probable que se una a la proteína deseada. Aunque el zinc también podría haberse empleado, se ha decidido no usarlo porque une las proteínas con uniones más débiles y podría no haberse unido la proteína. El uso de cobre nos ha permitido obtener Fur Sa sin colas de histidina pero no nos ha permitido más que obtener la proteína con un 50 % de pureza estimada, mientras que en los trabajos en los que se ha empleado níquel para purificar Fur Sa unida a colas de histidina se ha conseguido grados de pureza mucho mayores y mayor actividad [20]. Por tanto se podría valorar la posibilidad de probar a purificar Fur Sa sin colas de histidina y utilizando níquel para

aumentar la pureza obtenido, aunque se correría el riesgo de que el níquel no se uniese a Fur Sa al tener una región rica en histidinas considerablemente más corta que las colas de histidina habitualmente empleadas.

La mayor parte de la proteína Fur Sa ha precipitado durante las centrifugaciones del extracto crudo, seguramente debido a que se forman cuerpos de inclusión o a que se encuentra en la membrana. En Fur de muchos otros microorganismos también se ha detectado la formación de cuerpos de inclusión al sobreexpresar en *E. coli*, como la de *Mycobacterium tuberculosis* [25]. A pesar de que se ha comprobado que es posible la renaturalización de la proteína mediante cloruro de guanidinio o urea, para futuros trabajos se debería afinar el protocolo de preparación del extracto crudo para la purificación para evitar esta gran pérdida de proteína por precipitación. Posibles soluciones a este problema serían disminuir la velocidad y la duración de las centrifugaciones, así como emplear un tampón de unión con mayor carga iónica. Sería interesante realizar una prueba de inducción a distintas temperaturas, ya que en nuestro grupo se ha visto que disminuyendo la temperatura de la inducción a 16-20 °C muchas proteínas que aparecen precipitadas se pueden obtener en el sobrenadante ya que el metabolismo es más lento y se da más tiempo para que el plegamiento sea el correcto. Hay que destacar que tras las grandes cantidades de proteína Fur Sa perdida en el pellet del extracto crudo, la concentración de Fur Sa en el sobrenadante era mucho menor que en el extracto crudo original. Sin embargo, la cromatografía de afinidad a Cu²⁺ nos ha permitido separarla de una gran cantidad de proteínas no deseadas y volver a aumentar la cantidad relativa de Fur Sa. Además la diálisis ha permitido separar por precipitación muchas de las proteínas restantes y enriquecer en Fur Sa mucho la muestra ya que en el pellet de la diálisis sólo aparece una pequeña cantidad de la proteína Fur Sa. Gracias a esto, se ha obtenido una muestra enriquecida en Fur Sa que aunque no sea pura, es la proteína mayoritaria. La presencia de otras proteínas ha provocado que la medida de absorbancia sea mayor, ocasionando que la cuantificación de la proteína esté sobreestimada.

La caracterización de la proteína Fur Sa ha aportado varios resultados novedosos. El pico de absorbancia en torno a 410 nm detectado en el espectro de absorción podría tratarse de un grupo hemo u otro grupo que contenga hierro. Por tanto sería interesante realizar una tinción de grupos hemo (ya que se ha descrito que otras Fur unen grupos hemo, como en *Anabaena* [8]) para comprobarlo o una prueba de plasma de acoplamiento inductivo (ICP) para detectar el contenido en metales de la proteína purificada. Este pico de absorbancia en Fur Sa no se había descrito hasta ahora en la literatura [20].

En cuanto a la presencia de color en la proteína Fur de *S. aureus*, se ha detectado color en las proteínas Fur de microorganismos Gram positivos estudiadas en nuestro grupo (*Listeria monocytogenes*, *Clostridium difficile* y *S. aureus*) pero no en Fur de Gram negativos (*Erwinia amylovora*, *H.pylori* y *Anabaena*) (dato no publicado).

A diferencia de otras proteínas Fur, Fur Sa se obtiene mayoritariamente como monómero mediante la purificación empleada. Recientemente se ha descrito que FurA de *Anabaena* se

encuentra como monómero en el citosol [15] y que la interacción con el DNA comienza con la unión de un monómero al DNA y luego se forma el dímero [23]. Aunque esto podría explicar la obtención de Fur Sa como monómero, los resultados obtenidos gracias a los ensayos EMSA ofrecen otra posible explicación. Estos ensayos han permitido comprobar *in vitro* que la proteína purificada mantiene su capacidad de unión al DNA, si bien la actividad observada es considerablemente menor que en el caso de otras proteínas Fur estudiadas en nuestro grupo de investigación. La unión a la matriz por el motivo de histidinas puede estar modificando la conformación de la proteína impidiendo la formación de dímeros, lo que explicaría el bajo contenido en dímeros de la solución de proteína obtenida mediante purificación con IMAC y la baja capacidad de unión al DNA detectada, al ser necesaria la formación del dímero para la unión al DNA. Además hay cisteínas cerca del motivo de histidinas, por lo que la unión al motivo de histidinas podría afectar a los posibles puentes disulfuro. Por lo tanto, sería interesante ensayar algún otro método de purificación que evitara la interacción directa del motivo de histidinas del regulador con la matriz, tales como el empleo de proteínas de fusión como glutatión S-transferasa (GST) o la proteína de unión a maltosa (MBP), y verificar de nuevo la potencial formación de dímeros y la capacidad del regulador para interaccionar con el DNA. Los ensayos de EMSA también han permitido comprobar que la capacidad de unión al promotor del operon *sir* sólo se produce en la presencia de un agente reductor, en este caso DTT, lo que apunta a que Fur Sa necesita que sus cisteínas se encuentren en un estado reducido para la unión al DNA como ya se ha descrito en otras proteínas Fur, como Fur de *E. coli* [8]. Aunque el método de purificación empleado produce una proteína con baja actividad, los ensayos realizados reproducen *in vitro* la actividad biológica propuesta para esta proteína y abre la puerta a la realización de ensayos de inhibición de la proteína para la búsqueda de nuevos antimicrobianos.

7. Conclusiones

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se extraen las siguientes conclusiones:

- 1_ Es posible el clonaje y la sobreexpresión de las proteínas recombinantes Fur de *S. aureus* y Fur de *L. pneumophila* en células de *E. coli* BL21.
- 2_ La cromatografía de afinidad a Cu^{2+} permite la purificación parcial de Fur Sa sin la adición de colas de histidina y eluirlo con un gradiente de imidazol.
- 3_ Aunque parte de Fur Sa se obtiene como precipitado tras centrifugar el extracto crudo, es posible su solubilización parcial mediante el empleo de cloruro de guanidinio o urea.
- 4_ La proteína Fur Sa se purifica mayoritariamente como monómero y presenta un pico de absorbancia en torno a 410 nm, que indica la presencia de algún grupo prostético, posiblemente hemo.
- 5_ La proteína Fur Sa obtenida en este trabajo mantiene *in vitro* la capacidad de unión específica al promotor del operon *sir* en las condiciones probadas.

Conclusions

With the results obtained in this project it can be concluded that:

- 1_ The cloning and overexpression of Fur proteins from *S. aureus* and *L. pneumophila* in *E. coli* BL21 cells is possible.
- 2_ Fur Sa can be partially purified by Cu^{2+} -affinity chromatography to Cu^{2+} without adding histidine tails and extracted with an imidazol gradient.
- 3_ In spite of being mainly obtained in the precipitate of the crude extract, Fur Sa can be partially renatured by using guanidinium chloride or urea.
- 4_ Recombinant Fur Sa protein is mainly purified as a monomer and shows an absorbance maximum around 410 nm, which suggests the presence of any prosthetic group, likely hemo.
- 5_ The Fur Sa protein obtained in this project maintains *in vitro* the ability to bind specific DNA in the tested conditions.

8. Bibliografía

1. Fillat MF. The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators. *Arch Biochem Biophys*. 2014 Mar 15;546:41-52.
2. Singh AK, McIntyre LM, Sherman LA. Microarray analysis of the genome-wide response to iron deficiency and iron reconstitution in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Physiol*. 2003 Aug;132(4):1825-39.
3. Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez-Quiñones F. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev*. 2003 Jun;27(2-3):215-37.
4. Guerinot ML, Yi Y. Iron: Nutritious, Noxious, and Not Readily Available. *Plant Physiol*. 1994 Mar;104(3):815-820.
5. Pohl E, Haller JC, Mijovilovich A, Meyer-Klaucke W, Garman E, Vasil ML. Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol Microbiol*. 2003 Feb;47(4):903-15.
- 6 Bagg A, Neilands JB. Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 1987 Aug 25;26 (17):5471-7.
7. D'Autréaux B, Pecqueur L, Gonzalez de Peredo A, Diederix RE, Caux-Thang C, Tabet L, Bersch B, Forest E, Michaud-Soret I. Reversible redox- and zinc-dependent dimerization of the *Escherichia coli* fur protein. *Biochemistry*. 2007 Feb 6;46(5):1329-42.
8. Hernández JA, Peleato ML, Fillat MF, Bes MT. Heme binds to and inhibits the DNA-binding activity of the global regulator FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120. *FEBS Lett*. 2004 Nov 5;577(1-2):35-41.
9. Dian C, Vitale S, Leonard GA, Bahlawane C, Fauquant C, Leduc D, Muller C, de Reuse H, Michaud-Soret I, Terradot L. The structure of the *Helicobacter pylori* ferric uptake regulator Fur reveals three functional metal binding sites. *Mol Microbiol*. 2011 Mar;79(5):1260-75.
10. Lavrrar JL, McIntosh MA. Architecture of a Fur binding site: a comparative analysis. *J Bacteriol*. 2003 Apr;185(7):2194-202.
11. Lee JW, Helmann JD. Functional specialization within the Fur family of metalloregulators. *Biometals*. 2007 Jun;20(3-4):485-99.
- 12 Alamuri P, Mehta N, Burk A, Maier RJ. Regulation of the *Helicobacter pylori* Fe-S Cluster Synthesis Protein NifS by Iron, Oxidative Stress Conditions, and Fur. *J Bacteriol*. Jul 2006; 188(14): 5325–5330.
13. Nandal A, Huggins CC, Woodhall MR, McHugh J, Rodríguez-Quiñones F, Quail MA, Guest JR, Andrews SC. Induction of the ferritin gene (ftnA) of *Escherichia coli* by Fe(2+)-Fur is mediated by reversal of H-NS silencing and is RyhB independent. *Mol Microbiol*. 2010 Feb;75(3):637-57.
14. Igarashi J, Kitanishi K, Shimizu T. Emerging roles of heme as a signal and a gas-sensing site: heme sensing and gas-sensing proteins. In *Handbook of Porphyrin Science*, vol. 15, 2011, pp. 399–461.

15. Botello-Morte L, Bes MT, Heras B, Fernández-Otal Á, Peleato ML, Fillat MF. Unraveling the redox properties of the global regulator FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120: disulfide reductase activity based on its CXXC motifs. *Antioxid Redox Signal*. 2014 Mar 20;20(9):1396-406.
16. Hernández JA, Alonso I, Pellicer S, Luisa Peleato M, Cases R, Strasser RJ, Barja F, Fillat MF. Mutants of *Anabaena* sp. PCC 7120 lacking alr1690 and alpha-furA antisense RNA show a pleiotropic phenotype and altered photosynthetic machinery. *J Plant Physiol*. 2010 Apr 15;167(6):430-7.
17. Saunderson RB, Gouliouris T, Cartwright EJ, Nickerson EJ, Aliyu SH, O'Donnell DR, Kelsall W, Limmathurotsakul D, Peacock SJ, Török ME. Impact of infectious diseases consultation on the management of *Staphylococcus aureus* bacteraemia in children. *BMJ Open*. 2014 Jul 1;4(7):e004659.
18. Torres VJ, Attia AS, Mason WJ, Hood MI, Corbin BD, Beasley FC, Anderson KL, Stauff DL, McDonald WH, Zimmerman LJ, Friedman DB, Heinrichs DE, Dunman PM, Skaar EP. *Staphylococcus aureus* fur regulates the expression of virulence factors that contribute to the pathogenesis of pneumonia. *Infect Immun*. 2010 Apr;78(4):1618-28.
19. Horsburgh MJ, Ingham E, Foster SJ. In *Staphylococcus aureus*, fur is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis. *J Bacteriol*. 2001 Jan;183(2):468-75.
20. Xiong A, Singh VK, Cabrera G, Jayaswal RK. Molecular characterization of the ferric-uptake regulator, fur, from *Staphylococcus aureus*. *Microbiology*. 2000 Mar;146 (Pt 3):659-68.
21. Xu L, Luo ZQ. Cell biology of infection by *Legionella pneumophila*. *Microbes Infect*. Feb 2013; 15(2): 157–167.
22. Hickey EK, Cianciotto NP. Cloning and sequencing of the *Legionella pneumophila* fur gene. *Gene*. 1994 May 27;143(1):117-21.
23. Pallarés MC, Marcuello C, Botello-Morte L, González A, Fillat MF, Lostao A. Sequential binding of FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120 to iron boxes: exploring regulation at the nanoscale. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Mar;1844(3):623-31.
24. Winter J, Lilie H, Rudolph R. Renaturation of human proinsulin--a study on refolding and conversion to insulin. *Anal Biochem*. 2002 Nov 15;310(2):148-55.
25. Jiang H, Gao X, Li Y, Xu ZK, Wang LM, Bai XF, Yue Y. Prokaryotic expression and monoclonal antibody preparation of *Mycobacterium tuberculosis* ferric uptake regulator B. *APMIS*. 2008 May;116(5):372-81.
26. Pellicer S, González A, Peleato ML, Martínez JI, Fillat MF, Bes MT. Site-directed mutagenesis and spectral studies suggest a putative role of FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120 as a heme sensor protein. *FEBS J*. 2012 Jun;279(12):2231-46.

9. Anexo

Tabla 9.1 Cepas utilizadas

| CEPA | GENOTIPO | CASA COMERCIAL | USO |
|-----------------------------|--|----------------|---|
| <i>E. coli</i> DH5 α | <i>U169</i> (Φ 80 Δ lacZ Δ M15), <i>supE44, gyrA96,</i> <i>deoR, recA1, relA1,</i> <i>endA1 thi-1,</i> <i>hsdR17(r\bar{k}, m\bar{k}⁺),</i> Δ (lacZYA-argF) | INVITROGEN | Clonajes y propagación de los plásmidos |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3) | <i>F, ompT, hsdS_B, (r\bar{B}⁻,</i> <i>m_B⁺), dcm, gal,</i> λ (DE3) | NOVAGEN | Sobreexpresión de las proteínas |

Tabla 9.2 Mezclas de reacción para PCR para las dos polimerasas empleadas

| REACTIVO | VOLUMEN (μ l) | VOLUMEN (μ l) |
|------------------------------------|--------------------|--------------------|
| Agua milliQ | 36 | 39 |
| Buffer 10X | 5 | 5 |
| dNTPs 10 mM | 1 | 1 |
| Oligonucleótido directo 10 μ M | 2,5 | 1,5 |
| Oligonucleótido reverso 10 μ M | 2,5 | 1,5 |
| DNA | 1 | 1 |
| Pfu Ultra (2,5 U/ μ l) | - | 1 |
| MgCl ₂ 50 mM | 1,5 | - |
| Taq Biotools (5 U/ μ l) | 1 | - |

Tabla 9.3 Cebadores utilizados para PCR

| OLIGONUCLEÓTIDO | SECUENCIA | GEN AMPLIFICADO |
|-----------------|--|---|
| LpFur-Fw | 5'-CAT GCCATGGA AAGAGAGTCAACAG-3' | Gen <i>fur</i> de <i>L. pneumophila</i> |
| LpFur-Rv | 5'-CCCA AAGCTT CATTGACACTGCGGAC-3' | |
| SaFur-Fw | 5'-CATT CATGAA AGAACGATTAATCGCG-3' | Gen <i>fur</i> de <i>S. aureus</i> |
| SaFur-Rv | 5'-CCCA AAGCTT CTATCCTTTACCTTTAGCTTGGC-3' | |
| Prom-SasirA-F | 5'-CCATGTTCAATGATGTACTTGG-3' | Promotor del operon <i>sir</i> de <i>S. aureus</i> [20] |
| Prom-SasirA-R | 5'-GCATTTTAATTACTTTATTCATTGAC-3' | |
| Alr0523-F | 5'-GTCTGTATGGATTAACACTATC-3' | Promotor del gen <i>alr0523</i> de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 |
| Alr0523-R | 5'-CTGCCTGTTCAACTACTTTGG-3' | |
| ProN | 5'-CTCGCCTAGCAATTTAACAAC-3' | Promotor de <i>furA</i> (<i>PfurA</i>) <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120 |
| ProC | 5'-GCCTTGAGCGAAGTATTTGTG-3' | |

Las secuencias en negrita marcan el sitio de corte de las enzimas de restricción *Nco*I (LpFur-Fw), *Hind*III (LpFur-Rv y SaFur-Rv) y *Pag*I (SaFur-Fw).

Tabla 9.4 Composición para dos geles SDS-PAGE al 15 %

| REACTIVO | Gel Separador 15 % | Gel Concentrador 5 % |
|---------------------------------|--------------------|----------------------|
| Acrilamida : Bisacrilamida 30 % | 4,5 ml | 0,66 ml |
| Tris/HCl 1,5 M pH 8,8 | 3,36 ml | - |
| Tris/HCl 0,5 M pH 6,8 | - | 0,5 ml |
| H ₂ O milliQ | 1,06 ml | 2,80 ml |
| SDS al 10% (p/v) | 45 µl | 20 µl |
| APS al 10 % (p/v) | 30 µl | 20 µl |
| TEMED | 15 µl | 20 µl |

Tabla 9.5 Composición para dos geles nativos de PAGE al 6 % para EMSA

| REACTIVO | VOLUMEN AÑADIDO |
|--------------------------------------|------------------------|
| Acilamida : Bisacilamida 30 % | 4,12 ml |
| Tampón de electroforesis 5X | 3,72 ml |
| Glicerol al 50 % | 2,80 ml |
| H₂O milliQ | 9,72 ml |
| APS al 10 % | 100 µl |
| TEMED | 60 µl |