

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

FACULTAD DE CIENCIAS



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

“Estudio funcional del motivo regulador de hemo en FurB (Zur) de *Anabaena*”

Trabajo de Fin de Grado para optar al título de Grado en Biotecnología

Sandra Sampériz López



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

MARÍA FRANCISCA FILLAT CASTEJÓN, Catedrática del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza, y VIOLETA CALVO SEIN-ECHALUCE, Personal Investigador del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Universidad de Zaragoza,

CERTIFICAN

Que el Proyecto Fin de Grado titulado "Estudio funcional del motivo regulador de hemo en FurB (Zur) de *Anabaena*", presentado por Sandra Sampérez López, ha sido realizado bajo su dirección en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular de la Facultad de Ciencias.

Para que así conste, se firma la presente en Zaragoza, a 20 de Junio de 2016

María F. Fillat Castejón

Violeta Calvo Sein-Echaluce

Índice

Abreviaturas	1
Resumen	3
1. Antecedentes	4
1.1. Las cianobacterias	4
1.1.1. Características generales.....	4
1.1.2. <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.....	4
1.2. Las proteínas Fur	5
1.2.1. Clasificación y características generales	5
1.2.2. Mecanismo de funcionamiento	5
1.2.3. Proteínas Fur en <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120	6
1.3. Interacción de las proteínas con el grupo hemo.....	7
2. Objetivos	8
3. Materiales y métodos	9
3.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	9
3.2. Mutagénesis dirigida del gen furB	9
3.2.1. Amplificación por Quick-Change PCR.....	9
3.2.2. Digestión del plásmido original	10
3.2.3. Preparación de células competentes y transformación por choque térmico.....	10
3.3. Sobreexpresión y purificación de la proteína	10
3.3.1. Inducción y sobreexpresión	11
3.3.2. Electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	11
3.3.3. Obtención de biomasa	11
3.3.4. Purificación mediante cromatografía de afinidad a metal.....	12
3.3.5. Concentración, diálisis y cuantificación	12
3.4. Caracterización bioquímica y actividad biológica	13
3.4.1. Ensayos de entrecruzamiento con glutaraldehído y reducción con DTT	13
3.4.2. Estudio de la presencia de zinc mediante tinción con PAR.....	13
3.4.3. Estudio de la interacción proteína-hemo mediante espectroscopía diferencial	14
3.4.4. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA).....	14
4. Resultados y discusión	16
4.1. Obtención del mutante C93A de la proteína FurB de <i>Anabaena</i> sp. PCC 7120.....	16
4.1.1. Mutagénesis dirigida	16
4.2. Sobreexpresión y purificación de la proteína	17

4.2.1.	Sobreexpresión de la proteína	17
4.2.2.	Purificación de la proteína	18
4.2.3.	Cuantificación por BCA.....	
4.3.	Caracterización bioquímica	21
4.3.1.	Ensayo de entrecruzamiento con glutaraldehído	21
4.3.2.	Ensayo de reducción con DTT	22
4.3.3.	Estudio de la presencia de zinc	23
4.3.4.	Estudio de la interacción con el grupo hemo.....	23
4.4.	Actividad biológica de la proteína	26
4.4.1.	Estudio de la interacción proteína-DNA.....	26
4.4.2.	Estudio de la interacción proteína-DNA en presencia de grupo hemo.....	27
5.	Conclusiones Generales.....	29
	Bibliografía.....	30

Abreviaturas

Abs	Absorbancia
Ac	Ácido acético
bp	<i>Base pairs</i> (pares de bases)
CPV	Cisteína-Prolina-Valina
D.O.	Densidad óptica
DNA	Deoxyribonucleic Acid (Ácido desoxirribonucleico)
DTT	<i>Dithiothreitol</i> (Ditiotreitól)
ER	Enzima de restricción
Fur	<i>Ferric uptake regulator</i> (Proteína reguladora de la captación de hierro)
g	Gramo
h	Hora
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
kb	Kilo base
kDa	kiloDalton
Km	Kanamicina
l	Litro
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
mA	Miliamperios
mg	Miligramo
min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Concentración milimolar
Mur	<i>Manganese uptake regulator</i> (Proteína reguladora de la captación de manganeso)
ng	Nanogramos
nM	Concentración nanomolar
Nur	<i>Nickel uptake regulator</i> (Proteína reguladora de la captación de níquel)
O/N	<i>Overnight</i> (toda la noche)
PAR	4-(2-Pyridylazo)resorcinol
PCC	<i>Pasteur culture collection</i> (Colección de cultivos del Instituto Pasteur)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PerP	<i>Peroxide stress response regulator</i> (Regulador de la respuesta a estrés oxidativo)
PSA	Persulfato amónico
PSI	<i>Photosystem I</i> (Fotosistema I)
PSII	<i>Photosystem II</i> (Fotosistema II)
p/v	Relación peso/volumen
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> (especies reactivas de oxígeno)
rpm	Revoluciones por minuto
SGS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (electroforesis en gel depoliacrilamida con dodecilsulfato sódico)
TBE	Tris-Borato-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetra-metil-etilendiamina

TRIS	Tris-hidroximetil-aminometano
T ^a	Temperatura
V	Voltio
v/v	Relación volumen/volumen
WT	<i>Wild type</i> (proteína silvestre)
Zur	<i>Zinc uptake regulator</i> (Proteína reguladora de la captación de zinc)
ε	Coefficiente de extinción molar
°C	Grado centígrado
μg	Microgramo
μl	Microlitros
μM	Concentración micromolar

Resumen

Las proteínas Fur (*ferric uptake regulator*) son una superfamilia de reguladores transcripcionales presentes en la mayoría de los organismos procariotas. Tienen un papel clave en la regulación del metabolismo del hierro y otros metales como zinc, manganeso y níquel. También intervienen en la regulación de otros procesos celulares clave, como la defensa frente al estrés oxidativo, metabolismo del nitrógeno, la diferenciación de heterocistos en cianobacterias o la virulencia en algunos microorganismos patógenos. La cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 contiene tres parálogos de la familia Fur: FurA, FurB y FurC. Este estudio se centra en la proteína FurB, que se ha descrito como el regulador Zur que controla la homeostasis del zinc y que también está implicada en la regulación de la respuesta a estrés oxidativo.

Estudios anteriores demuestran el papel regulador del grupo hemo en la unión de FurB al DNA. Por ello, el objetivo de este trabajo consistió en estudiar la interacción de la proteína FurB con el grupo hemo y analizar la posible implicación del motivo Cys-Pro-Val en dicha interacción. Para ello, se construyó y purificó un mutante de la proteína, C93A, en el que la cisteína 93 fue reemplazada por alanina y se efectuó la caracterización bioquímica de la proteína obtenida para comprobar cómo afectaba dicha mutación a su actividad de unión al DNA y otras características bioquímicas relevantes.

La mutación de la cisteína 93 alteró las características espectroscópicas del complejo proteína-hemo y disminuyó la afinidad de la proteína por el DNA. Por ello, la cisteína 93 parece estar implicada en la coordinación del grupo hemo o al menos localizada en una región próxima al sitio de coordinación.

Abstract

Fur (*Ferric Uptake Regulator*) proteins are a superfamily of transcriptional regulators, are present in most of prokaryotic organisms. They play a key role in the regulation of iron metabolism and other metals such zinc, manganese and nickel. Fur proteins also participate in the regulation of other key cellular processes, such as the defense against oxidative stress, nitrogen metabolism, the differentiation of heterocysts in cyanobacteria or the virulence of many microorganisms. The cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120 has three Fur paralogues: FurA, FurB and FurC. This work is focused on the FurB protein, which has been described as the Zur regulator that controls zinc homeostasis and is engaged in the regulation of the answer to the oxidative stress response.

Previous studies demonstrate the regulatory role of the heme group in the joining of FurB with the DNA. The goal of this research was the study of the interaction of the FurB protein with the heme group and the analysis of the potential involvement of the motive Cys-Pro-Val in this interaction. For this purpose, a mutant of the protein, C93A, was prepared, in which the 93 cysteine was replaced by alanine. In addition, a biochemical characterization of the obtained protein was performed in order to verify that this mutation does not affect to key biological functions of FurB.

The mutation of the 93 cysteine modified the spectroscopic characteristics of the heme-protein complex and diminished the protein affinity by the DNA. This is why the 93 cysteine seems to be engaged in the coordination of the heme group or at least to be placed in a region close to the coordination place.

1. Antecedentes

1.1. Las cianobacterias

1.1.1. Características generales

Las cianobacterias son organismos procariotas que se caracterizan por llevar a cabo la fotosíntesis oxigénica. Al ser responsables de la generación de la actual atmósfera oxigénica, las cianobacterias han tenido una enorme relevancia en la evolución de nuestro planeta y de la vida en él. En la actualidad presentan una amplia distribución ecológica, encontrándose en ambientes muy variados, tanto terrestres como marítimos, e incluso en entornos más extremos, como desiertos. Además de realizar la fotosíntesis oxigénica, algunas cianobacterias son también capaces de fijar el nitrógeno atmosférico, gracias a unas células especializadas denominadas heterocistos (apartado 1.1.2.) (Xiong et al., 2003).

Las cianobacterias tienen una morfología muy variada, pudiendo ser unicelulares o filamentosas. Pero, de manera general, todas ellas poseen una capa de peptidoglicano que envuelve a la membrana plasmática y es más gruesa que en la mayoría de las bacterias Gram negativas. Además poseen una cubierta externa (cubierta S) que protege a la célula de condiciones ambientales adversas (van de Meene et al., 2006). En su interior celular, las cianobacterias contienen Clorofila A y diversos tipos de ficobiliproteínas que les otorgan su coloración verde y azul respectivamente. Esos pigmentos son los responsables de que las cianobacterias se hayan denominado de forma clásica como “algas verde azuladas” (Rippka et al., 1978).

1.1.2. *Anabaena* sp. PCC 7120

Desde su punto de vista morfológico, *Anabaena* sp. PCC 7120 (de aquí en adelante, *Anabaena*) es una cianobacteria filamentosas (Figura 1). Una de sus características más relevantes es su capacidad de diferenciación celular, que le permite desarrollar hasta tres tipos de células especializadas a partir del tipo celular básico o célula vegetativa:

- **Hormogonios:** filamentos cortos de células, caracterizados por ser móviles y, por lo tanto, se cree que intervienen en la dispersión de la cianobacteria en medios terrestres y en el establecimiento de relaciones simbióticas (Campbell et al., 1989).
- **Acinetos:** células más grandes y con pared celular más gruesa que las células vegetativas. Son resistentes a condiciones adversas y surgen, por lo tanto, en condiciones desfavorables para la supervivencia (Carr et al., 1982).
- **Heterocistos:** células que se intercalan entre las vegetativas y que están especializadas en la fijación de nitrógeno. Se forman por diferenciación de las células vegetativas en condiciones de deficiencia de nitrógeno y reúnen las características necesarias para asegurar el funcionamiento óptimo de la enzima nitrogenasa (gruesa envoltura, elevada actividad del PSI y carencia del PSII). Todas

estas características hacen que la cantidad de oxígeno en su interior sea mínima. (Carr et al., 1982).

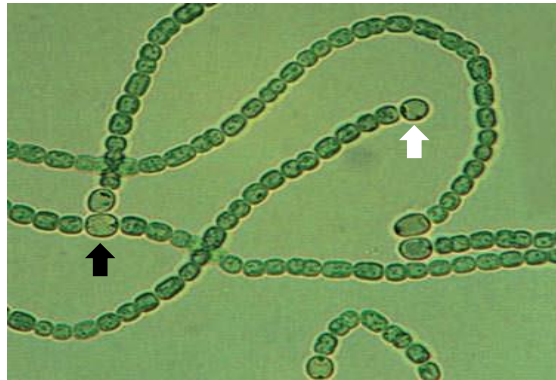


Figura 1. Estructura de *Anabaena* sp. PCC 7120. Flecha blanca mostrando un heterocisto terminal; flecha negra mostrando un heterocisto intercalado con células vegetativas. Fotografía tomada de Flores and Herrero, 2010.

1.2. Las proteínas FUR

1.2.1. Clasificación y características generales

Las proteínas FUR constituyen una familia de reguladores transcripcionales metalodependientes que presentan gran diversidad de funciones y que han sido descritas en numerosos organismos procariontes. La familia FUR engloba distintas subfamilias: Fur (*Ferric uptake regulator*), que ha dado nombre a la familia; 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. (Lee & Helmann, 2007).

De manera general, las proteínas FUR, tienen unos 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 y un dominio carboxilo terminal de dimerización. Además, en la estructura primaria de las proteínas Fur destaca un motivo rico en histidinas altamente conservado (HHXHX₂CX₂C), y otro motivo CX₂C menos conservado en el extremo carboxilo terminal de la proteína. Ambas secuencias constituyen potenciales sitios de unión a metal. Las proteínas FUR, por lo general, poseen un átomo de Zn denominado "estructural", con algunas excepciones como FurA de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Hernández et al., 2002).

1.2.2. Mecanismo de funcionamiento

En cuanto a su función como reguladores transcripcionales, las proteínas FUR actúan principalmente como represores clásicos. Reprime la transcripción de los genes de adquisición del metal correspondiente mediante interacción con el co-represor (metal) en situaciones de alta concentración de éste. La represión se lleva a cabo gracias a la unión del dímero de FUR al DNA, en los promotores de los genes a silenciar, de tal

manera que se impide el acceso de la RNA polimerasa. Por el contrario, en condiciones de baja concentración de metal, la proteína se encuentra en su forma apo (sin metal) y se separa del DNA, permitiendo la transcripción de los genes diana.

ELEVADA CONCENTRACIÓN DE METAL

Represión genes adquisición de metal

BAJA CONCENTRACIÓN DE METAL

Expresión genes adquisición de metal

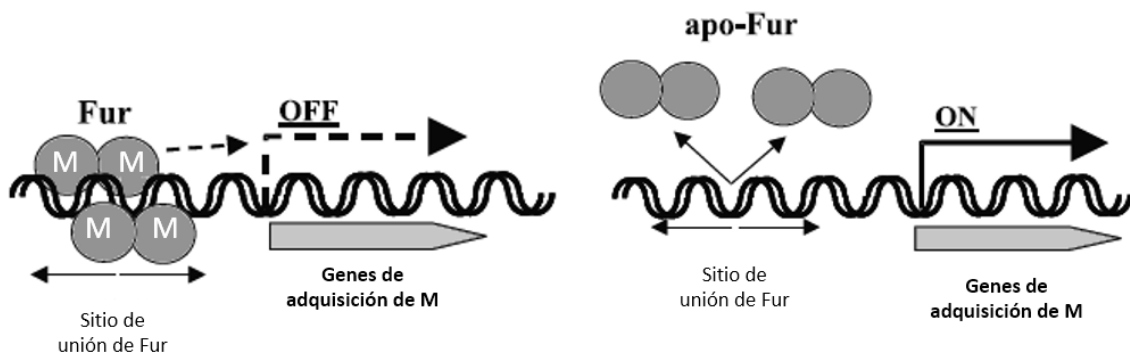


Figura 2. Regulación transcripcional directa por medio de Fur. A alta concentración de hierro, Fur se une al promotor e impide la transcripción de los genes implicados en su adquisición. A baja concentración de metal, Fur se separa del promotor y permite la transcripción de los genes (Andrews et al., 2003).

1.2.3. Proteínas Fur en *Anabaena* sp. PCC 7120

El análisis genómico de *Anabaena* en busca del motivo rico en histidinas permitió encontrar tres parálogos Fur en esta especie, que se denominaron: FurA (*all169*), FurB (*all2473*) y FurC (*alr0957*) (Hernández et al., 2004). A continuación se describen algunas características de estas proteínas, centrándonos especialmente la que es objeto de estudio en este trabajo, FurB:

- **FurA:** es el miembro de la familia Fur más abundante en *Anabaena* y parece ser esencial. Participa en el control de la homeostasis de hierro por medio de la regulación transcripcional de genes que codifican proteínas de captación y almacenamiento de hierro (López-Gomollón et al., 2007; González et al., 2012).
- **FurB:** modula la homeostasis del zinc en *Anabaena*, actuando como una proteína Zur (Napolitano et al., 2012). Esto significa que FurB/Zur se une al DNA de manera dependiente a la concentración de zinc en la célula y controla así la captación y almacenamiento de este metal en la cianobacteria. Además de regular transcripcionalmente genes del metabolismo del zinc, FurB también está implicada en la regulación de algunos genes de respuesta a estrés oxidativo (Sein-Echaluze et al., 2015).
- **FurC:** recientemente, se ha propuesto como el regulador PerR de *Anabaena*, implicado en la regulación de la respuesta a estrés oxidativo (Yingping et al., 2011).

1.3. Interacción de las proteínas FUR con el grupo hemo

El grupo hemo actúa como cofactor de proteínas implicadas en procesos celulares muy importantes, como la defensa a estrés oxidativo y la respiración en el caso de las catalasas y los citocromos. También interacciona de manera transitoria con otras proteínas y regula así su actividad. Un ejemplo de ello es la interacción del hemo con FurA de *Anabaena*. Esa interacción impide la unión de la proteína al DNA y, por lo tanto, su funcionamiento como represor transcripcional directo (Hernández et al., 2004). La interacción, permanente o transitoria, del grupo hemo con distintas proteínas es una forma de prevenir la toxicidad que tiene esta molécula cuando está libre en el interior celular.

FurB es capaz también de unirse al grupo hemo (López-Gomollón et al., 2009). Una hipótesis que sustenta este hecho es que FurB posee el motivo de unión Cys-Pro-Val, que ha sido descrito de forma clásica como “motivo de unión a hemo con carácter regulador” (Sein-Echaluze, PhD Thesis, 2016). También ha sido demostrado que la interacción de FurB con el grupo hemo afecta a su capacidad de interacción con el DNA (López-Gomollón et al., 2009).

Al igual que sucedía con FurA de *Anabaena*, la proteína FurB de esta cianobacteria también es capaz de unir hemo y ver afectada así su interacción con el DNA (López-Gomollón et al., 2009). La interacción podría estar teniendo lugar a través del motivo Cys-Pro-Val, localizado en la secuencia aminoacídica de FurB, y que se ha descrito de forma clásica como “motivo de unión a hemo con carácter regulador” (Girvan & Munro, 2013).

2. Objetivos

Este trabajo tiene como objetivo general estudiar la interacción de la proteína FurB de *Anabaena* sp. PCC 7120 con el grupo hemo y analizar la posible implicación del motivo Cys-Pro-Val (CPV) en dicha interacción.

Para lograr este objetivo general, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

1. Construcción del mutante simple C93A de FurB de *Anabaena* en el que la Cys93 del motivo Cys-Pro-Val se sustituye por Ala.
2. Expresión recombinante en *E. coli* y purificación de la proteína mutada.
3. Análisis de la interacción con el grupo hemo de la proteína mutada.
4. Caracterización bioquímica de la proteína mutada y estudio de la influencia del grupo hemo en su actividad.

3. Materiales y métodos

3.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas empleadas en este estudio se muestran en la tabla 1.

CEPA BACTERIANA	EMPLEO
<i>E. coli</i> DH5 α	Replicación y mantenimiento de plásmidos
<i>E. coli</i> BL21	Sobreexpresión de proteína

Tabla 1. Cepas bacterianas utilizadas en el estudio.

Para el cultivo de *E. coli* se empleó medio Luria Bertani (Anexo 1). Para obtener la forma sólida se suplementó el medio con un 1,5 % de agar. Todos los cultivos se incubaron a 37°C y con una agitación constante de 200 rpm en el caso de los cultivos líquidos. Además, a los medios usados para la selección bacteriana se añadió antibiótico Kanamicina (km) a una concentración final de 50 μ g/ml.

3.2. Mutagénesis dirigida del gen *furB*

La variante C93A de la proteína FurB de *Anabaena* se obtuvo por mutagénesis dirigida sobre un plásmido pET28a conteniendo el gen *furB* entre los sitios NdeI-HindIII (ver esquema en el Anexo 2). El inserto se introdujo de manera que la proteína recombinante contara con una cola de histidinas (*His-tag*) en su extremo amino terminal para facilitar su posterior purificación.

3.2.1. Amplificación por Quick-Change PCR

Para llevar a cabo la mutagénesis dirigida del gen *furB*, se utilizó la técnica de Quick-Change PCR. Se emplearon oligonucleótidos específicos, diseñados para incorporar la mutación Cys \rightarrow Ala en la cisteína 93 del motivo CPV de FurB de *Anabaena* (Tabla 2). Las características de esta PCR se explican más detalladamente en Anexo 3.

El programa de PCR empleado comenzaba con una etapa inicial de desnaturalización del DNA a 95°C durante 1 minuto, seguida por 25 ciclos compuestos cada uno por una fase de 95°C durante 30 segundos (desnaturalización), otra de 55°C de 1 minuto (hibridación de primers) y una última etapa de elongación a 72°C durante 12 minutos.

NOMBRE	SECUENCIA	MUTACIÓN
pFurB_up	5' GTGTATCTATTCTATTTCATCAA GCC CCTGTTCACTAGACTAGGAAGAAC 3'	Ala-Pro-Val
pFurB_dw	5'GTTCTTCTAAGTTGTGAACAGGG GCT TGATGAATAGGAATAGATACAC 3'	Ala-Pro-Val

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados en el estudio y la mutación generada con los mismos.

3.2.2. Digestión del plásmido original

Para eliminar las copias del plásmido original (no mutado) se sometió a la mitad de la mezcla resultante de la PCR a una digestión con enzima DpnI durante 1 hora a 37°C. De esta manera se elimina el plásmido original, que está metilado, y se obtiene el plásmido mutado pET28a::C93A. Al ser un producto de PCR, el plásmido mutado no está metilado y no es digerido por la enzima DpnI.

3.2.3. Preparación de células competentes y transformación por choque térmico

Para obtener mayor cantidad del plásmido pET28a::C93A se requerían células competentes capaces de aceptar DNA exógeno. Para ello, se sometió un cultivo de células de *E. coli* DH5 α al siguiente tratamiento. A partir de un cultivo crecido durante 12-16 horas se hizo un inóculo del 1% en medio LB fresco y se incubó en agitación hasta una D.O. a 600 nm de 0.45-0.50. A continuación se incubó el cultivo en hielo durante 20 minutos para detener el crecimiento y posteriormente se centrifugó (4000 rpm a 4°C). El precipitado obtenido se resuspendió en 0 ml de tampón 1 (Anexo 1) preenfriado en hielo. Se volvieron a centrifugar las células en las mismas condiciones y se resuspendió el precipitado en tampón de conservación (Anexo 1). Por último las células competentes, que no iban a ser utilizadas de inmediato, se almacenaron en alícuotas de 200 μ l a -80°C hasta su utilización.

Una vez que se obtuvieron las células competentes se procedió a su transformación por choque térmico para introducir el plásmido generado. Para la transformación se añadieron 100 ng de DNA plasmídico sobre 200 μ l de células DH5 α competentes. La mezcla se incubó en hielo durante 20 minutos. A continuación se aplicó un choque térmico a 42°C durante 90 segundos seguido de 1 minuto de incubación en hielo. Posteriormente, se añadieron 800 μ l de medio LB estéril y se incubaron durante 1 hora a 37°C con agitación. Por último, las células transformadas se sembraron en una placa de LB/km y se incubaron a 37°C O/N.

A partir de los cultivos realizados, se aislaron los plásmidos mediante miniprep con el kit comercial "Gen Elute™ Plasmid Miniprep Kit" (SIGMA). Los plásmidos obtenidos se cuantificaron por medio del espectrofotómetro NanoVue Plus (GE Healthcare) y su secuencia se mediante secuenciación en el servicio de "Sistemas genómicos" (Valencia).

3.3. Sobreexpresión y purificación de la proteína

El vector pET28a::C93A obtenido permite sobreexpresar la proteína mutada fusionada a una cola de histidinas en el extremo N-terminal. La expresión está bajo el control del promotor lac, el cual es inducido por la presencia de isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG), (para una explicación más detallada, ver Anexo 4).

3.3.1. Inducción y sobreexpresión

En primer lugar, para sobreexpresar en *E. coli* la proteína mutada se transformaron células competentes de *E. coli* BL21 por choque térmico con el vector pET28a::C93A. La elaboración de células competentes y transformación se realizó siguiendo el protocolo explicado en el apartado 3.2.3. Se seleccionaron 4 colonias obtenidas tras la transformación y se realizaron cultivos en 10 ml de medio LB/km. Una vez alcanzada la fase de crecimiento exponencial (D.O. a 600 nm de 0.45-0.50) se indujeron 5 ml de cada cultivo con IPTG a una concentración final de 1 mM. Los cultivos se incubaron durante 3 horas y se analizó el nivel de expresión de la proteína mutada para seleccionar el cultivo con mayor sobreexpresión.

3.3.2. Electroforesis desnaturante en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Para analizar el nivel de expresión de la proteína mutada en cada uno de los cultivos se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 17% (composición en tabla 3). Las muestras se prepararon como se indica a continuación: se centrifugó un mililitro de cada cultivo a velocidad máxima y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendieron las células en 40 µl de agua MiliQ y se añadieron 40 µl de tampón de carga 2X (Anexo 1). La mezcla se sometió a hervido durante 5 minutos a 97°C para lisar las células y se centrifugó a velocidad máxima. Finalmente, se cargaron 10 µl del sobrenadante en el gel de poliacrilamida.

COMPOSICIÓN	Gel Concentrador 5%	Gel Separador 17%
Tris/HCl 1,5M pH 8,8	--	2,24 ml
Tris/HCl 0,5M pH 6,8	250 µl	--
Acrilamida/Bisacrilamida 30%	333 µl	3,4 ml
Dodecilsulfato sódico (SDS) 10%	10 µl	10 µl
Persulfato amónico (PSA) 10%	10 µl	20 µl
Tetrametiletilendiamida (TEMED)	10 µl	10 µl
H ₂ O MiliQ	1,4 ml	0,36 ml

Tabla 3. Composición de los geles SDS-PAGE.

Una vez cargadas las muestras, se aplicó un amperaje de 35 mA/gel durante 45 minutos en tampón de electroforesis (Anexo 1). Finalmente, los geles se tiñeron con la solución de tinción para geles SDS-PAGE (Anexo 1) durante 20-30 minutos con agitación y se destiñeron con la solución decolorante para geles SDS-PAGE (Anexo 1). La imagen del gel se tomó en un dispositivo GelDoc 2000 (Bio-Rad) y se procesó con el software Multi-Analyst®1.1.

3.3.3. Obtención de biomasa

Una vez seleccionado el cultivo con mayor sobreexpresión de la proteína, se procedió a obtener la cantidad de biomasa suficiente. Para ello, a partir de ese cultivo, se inocularon 10 erlenmeyers conteniendo 1 litro de LB/Km O/N y se incubaron a 37°C

y 180 rpm hasta alcanzar la fase exponencial del crecimiento. Una vez alcanzada la fase exponencial, se añadió IPTG a una concentración final de 1 mM y se incubaron los cultivos durante 3 horas más. Transcurrido ese tiempo se centrifugaron los cultivos (10000 rpm, 7 min, 4°C) para recoger las células. Las células se lavaron en 15 ml de NaCl 0,15 M, se volvió a centrifugar y la biomasa obtenida se conservó a -20°C.

3.3.4. Purificación mediante cromatografía de afinidad a metal

La biomasa obtenida se resuspendió en 50 ml de Buffer A (Anexo 1) y se añadió PMSF a una concentración final de 4 mM para prevenir la acción de proteasas. Posteriormente, las células se rompieron por sonicación durante 10 ciclos de 45 segundos con 30 segundos entre ciclos (amplitud 90%, ciclo 0,5), siempre en baño de hielo, y se centrifugaron 3 veces a 20.000 rpm durante 20 minutos a 4°C.

El sobrenadante (extracto crudo) se filtró a través de membranas de 0,8 µm en primer lugar y de 0,45 µm después. El lisado celular se pasó por la columna *Chelating Sepharose Fast Low* (Amersham) previamente empaquetada y equilibrada. El lecho de matriz se empaquetó primero por gravedad y posteriormente con una bomba peristáltica, aplicando agua MiliQ con un flujo de 3 ml/min. Para el equilibrado de la columna se aplicaron 3 volúmenes de ZnSO₄, 10 volúmenes de agua MiliQ y 10 volúmenes de buffer de equilibrado (Anexo 1).

Una vez cargado el extracto en la columna, se aplicaron 5 volúmenes de buffer de lavado 1 y después se aplicó buffer de lavado 2 hasta que la DO a 280 nm fue inferior a 0,1. La proteína se eluyó con gradiente creciente de imidazol hasta una concentración final de 1 M. Se recogieron aproximadamente 90 fracciones de 1 ml.

El análisis de las fracciones recogidas se realizó mediante precipitación con TCA y posterior análisis mediante electroforesis en gel de SDS-PAGE al 17%.

3.3.5. Concentración, diálisis y cuantificación

Tras realizar la electroforesis, se juntaron las alícuotas con mayor cantidad de proteína y se sometieron a concentración en un dispositivo Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices 10K (Milipore). Una vez concentrada, la proteína se sometió a cinco ciclos de diálisis en 3 litros de HAc/Ac pH 5,5 en la cámara fría.

Para la cuantificación de la proteína obtenida se utilizó el método del ácido bicinconínico, BCA (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. El ácido bicinconínico es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu¹⁺ en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ión cuproso producido en una reacción entre las proteínas con Cu²⁺ en medio alcalino. La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporcionan un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, muy sensible.

3.4. Caracterización bioquímica y actividad biológica

3.4.1. Ensayos de entrecruzamiento con glutaraldehído y reducción con DTT

Para el análisis de la oligomerización de FurB y del mutante C93A *in vitro* se realizaron ensayos de entrecruzamiento químico. Esta técnica permite la visualización de especies oligoméricas que pueden encontrarse en equilibrio con los monómeros e implica la formación de enlaces covalentes entre dos proteínas por medio de reactivos bifuncionales. En nuestro caso empleamos glutaraldehído, que reacciona con los grupos amino de proteínas adyacentes formando un enlace estable. La reacción sólo se produce cuando las moléculas están muy próximas en la disolución, de manera que una interacción positiva significa necesariamente que las proteínas se encuentran interaccionando. Para comprobar si la formación de esos dímeros podía deberse al establecimiento de puentes disulfuro intermoleculares, se trató la proteína con DTT, un agente reductor que rompería los puentes disulfuro en el caso de que existieran.

Para el ensayo con glutaraldehído, se añadió este reactivo a una concentración final del 0,5%, mientras que para la reducción con DTT se empleó una concentración final de agente reductor de 10 mM. Para ello se prepararon las muestras con las cantidades de reactivos indicadas en la Tabla 4. Las mezclas se incubaron en oscuridad durante 20 minutos y se añadieron los tampones de carga correspondientes. Finalmente, las muestras se calentaron a 95°C durante 5 min y se analizaron en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 17%.

Muestra	FurB				C93A			
	1	2	3	4	1	2	3	4
Proteína	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM	50 µM
Agua MiliQ	8,26 µl	7,26 µl	8,26 µl	7,26 µl	5,7 µl	4,7 µl	5,7 µl	4,7 µl
Glut. 5%	--	1 µl	--	--	--	1 µl	--	--
DTT 100 mM	--	--	--	1 µl	--	--	--	1 µl

+ 2 µl Buffer SB6x CON + 2 µl Buffer SB6x SIN + 2 µl Buffer SB6x CON + 2 µl Buffer SB6x SIN
β-mercaptoetanol β-mercaptoetanol β-mercaptoetanol β-mercaptoetanol

Tabla 4. Reactivos, cantidades y concentraciones necesarias para llevar a cabo el ensayo de entrecruzamiento con glutaraldehído y DTT con FurB WT y FurB C93A.

3.4.2. Estudio de la presencia de zinc mediante tinción con PAR

Para analizar la presencia de Zn²⁺ en la proteína de fusión, se aplicó la técnica de electroforesis SDS-PAGE utilizando una tinción específica con PAR (4-(2-Pyridylazo) resorcinol), un agente que reacciona de forma específica con los iones de zinc y forma un complejo de color naranja (Lee & Helmann, 2006a).

Para este ensayo, se efectuó una electroforesis en gel de SDS-PAGE de una muestra de proteína (FurB y C93A) y se tiñó el gel con un reactivo conteniendo PAR. Para la visualización de las bandas, se añadió H₂O₂ a una concentración final de 50 mM.

3.4.3. Estudio de la interacción proteína-hemo mediante espectroscopía diferencial

La interacción de ambas proteínas con el grupo hemo se analizó mediante espectroscopía diferencial. Primero se realizó la preparación de la muestra de hemo disolviendo una punta de espátula de hemina (SIGMA) en una disolución de NaOH 0,1 M y etanol absoluto en proporción 1:9 (v/v). Dicha disolución de hemo se mantuvo en un tubo de ensayo protegido de la luz y, después de agitar vigorosamente para conseguir la máxima disolución del hemo, se filtró con una membrana de 0,22 μm para eliminar posibles trazas de producto sin disolver. La concentración de la disolución se calculó por espectrofotometría haciendo diluciones 1:50 y 1:100 en NaOH 0,1 N y usando el coeficiente de extinción molar en NaOH del grupo hemo ($\epsilon_{385 \text{ nm}} = 58,44 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). A partir de esa disolución de concentración conocida se prepararon 10 ml de una disolución 2 μM de hemo en 50 mM Tris-HCl pH 8.

Se realizó un espectro diferencial desde 300 a 600 nm. Para ello, se añadieron 800 μl de la disolución de hemo 2 μM a dos cubetas de cuarzo y se realiza una línea base. Después se van añadiendo 2 μl de proteína (a partir de un stock de concentración 70 μM en nuestro caso) a la cubeta de muestra y 2 μl de tampón HAc/Ac 10 mM pH 5,5 a la cubeta de referencia. Se van realizando adiciones sucesivas de proteína/tampón hasta llegar a saturación. Esto es cuando la diferencia de Abs a 385 (máximo de absorbancia del hemo libre) y 420 nm (máximo de absorbancia del hemo coordinado) ya no varía.

3.4.4. Ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA)

La afinidad *in vitro* de las proteínas FurB y C93A por el DNA se analizó mediante ensayos de retardo en gel (Electrophoretic Mobility Shift Assay, EMSA). Esta técnica se basa en que, al producirse la interacción DNA-proteína, se forman complejos que tienen un mayor peso molecular que el DNA libre. Por lo tanto, esos complejos pueden diferenciarse del DNA libre porque tienen una menor movilidad electroforética. El ensayo se hizo en presencia tanto de DNA específico, en este caso el promotor del gen *all4725*, al que FurB se une con una gran afinidad (Napolitano et al., 2012); como de DNA inespecífico, en este caso el promotor del gen *nifJ* de *Anabaena* sp. PCC 7120. Ambos fragmentos de DNA se obtuvieron mediante amplificación por PCR estándar sobre DNA genómico de *Anabaena* y posterior purificación con el GFX PCR DNA and Gel band Purification kit (GE Healthcare).

Las mezclas de reacción, con un volumen final de 20 μl , contenían: 50 ng de cada uno de los promotores (inespecífico y promotor a analizar), proteína en el rango de nM, tampón de unión 10X (Anexo 1) y 0,5 mg/ml de BSA. De esta manera se simulaban las condiciones del interior celular. Además se añadieron a la mezcla de reacción: 1 mM DTT y 5 μM $\text{ZnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Las mezclas resultantes se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente y se les añadieron 3 μl de tampón de carga 6X (Anexo 1).

Finalmente, se cargaron 18 μ l de cada muestra en geles de poliacrilamida del 6% (Tabla 6), que es un entrecruzamiento lo suficientemente bajo como para permitir la migración de los complejos DNA-proteína.

Reactivos	Volúmenes
Acrilamina/Bisacrilamida 30%	2,06 ml
Running Buffer 5x	1,86 ml
Glicerol 50%	1,40 ml
Persulfato Amónico (PSA) 10%	50 μ l
Tetrametiletilendiamina (TEMED)	30 μ l
H₂O mQ	4,86 ml

Tabla 6. Composición del gel nativo al 6% para ensayo de retardo en gel (EMSA).

Antes de cargar las muestras, los geles de electroforesis se precorrieron durante 45 minutos a 60V y 4°C en un equipo Mini-Protean II (BioRad) conteniendo suficiente Running Buffer 1X. Esto se realiza para eliminar residuos que pudieran dificultar la movilidad de las muestras y equilibrar el gel con el tampón. Transcurrido ese tiempo, se cargaron las muestras y se corrieron durante aproximadamente 2 horas a 90V y 4°C. Los geles se tiñeron en cubetas conteniendo 50 ml de Running Buffer 1X y 5 μ l de SYBR®Safe 10000X (Invitrogen) y se visualizaron en un dispositivo GelDoc 2000 (BioRad).

Para analizar la influencia del hemo en la interacción de ambas proteínas con el DNA, se repitió el ensayo anterior en las mismas condiciones pero añadiendo en este caso a la mezcla de reacción el volumen correspondiente de una solución de hemo de concentración conocida. Concretamente se emplearon unas relaciones proteína:hemo de 1:1 y 1:2. La disolución de hemo se preparó de acuerdo a lo ya indicado en el apartado 3.4.3.

4. Resultados y discusión

4.1. Obtención del mutante C93A de la proteína FurB de *Anabaena* sp. PCC 7120

4.1.1. Mutagénesis dirigida

La introducción de la mutación Cys93 → Ala en el gen *furB* de *Anabaena* se consiguió mediante Quick-Change PCR sobre el plásmido pET28a::*furB* (obtenido previamente en el grupo de investigación). Se eliminaron las copias de plásmido original (metilado) mediante digestión con DpnI, que sólo corta el DNA metilado. Tras la incubación con la enzima, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% (Figura 3).

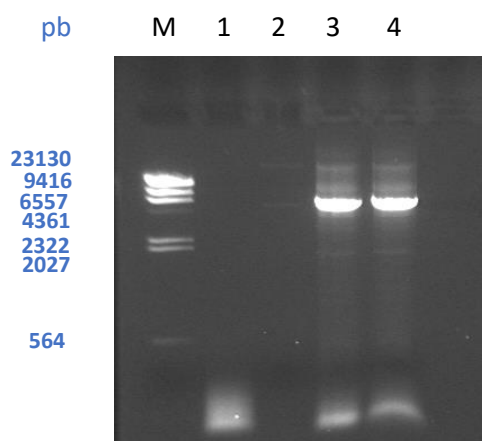


Figura 3. Amplificación del gen *furB* de *Anabaena* y digestión con la enzima de restricción *DpnI*. Gel de agarosa al 1%, carril 1: control negativo de PCR (5 μ l); carril 2: 2 μ l del plásmido original (150 ng); carriles 3: producto de PCR sin digerir (5 μ l); carril 4: producto de PCR digerido (5 μ l). Se empleó el marcador de pesos moleculares λ /HindIII (carril M).

El carril 1 muestra el resultado esperado ya que no se ve amplificación inespecífica de los oligonucleótidos y sólo se observa una banda difusa que corresponde a dNTPs y oligonucleótidos no consumidos en la reacción de PCR. Como era de esperar, el plásmido original (carril 2) coincide en tamaño con los resultantes de la reacción de PCR (carril 3). El rendimiento de la PCR fue adecuado porque se aprecia gran cantidad de plásmido tras la reacción (carril 3). Al cortar con la enzima de restricción (carril 4) no se ve diferencia en la movilidad electroforética con respecto al carril 3. Esto es normal porque la mayoría del plásmido tras la reacción de PCR es el mutado, que al no estar metilado no es digerido por la enzima DpnI.

Una vez obtenido el plásmido conteniendo la mutación, se transformaron células *E. coli* DH5 α competentes con los productos de PCR digeridos y sin digerir y se sembraron en placas de medio LB/km. Aunque en un principio esperaríamos menor crecimiento en la placa de células DH5 α transformadas con el producto digerido, se apreció un número de colonias similar en ambas placas. Esto podría deberse a que el producto de PCR contiene una cantidad despreciable de plásmido original con respecto al mutado.

A partir de la placa que contenía las colonias con el plásmido mutado, se seleccionaron 4 colonias al azar y se realizaron minipreps para aislar los plásmidos. Estos se enviaron a secuenciar, para comprobar que únicamente contenían la mutación deseada. Los resultados de la secuenciación mostraron que los cuatro plásmidos contenían la mutación deseada en el codón que codificaba para la Cys93, que fue reemplazado por un codón que codifica para Ala. Por lo tanto, el método de Quick-change PCR permitió obtener el plásmido pET28a::C93A de forma adecuada.

4.2. Sobreexpresión y purificación de la proteína

Una vez obtenido el plásmido conteniendo la mutación, se realizó un análisis para verificar el nivel de sobreexpresión de la proteína y proceder a su purificación.

4.2.1. Sobreexpresión de la proteína

Para la sobreexpresión de la proteína mutada (variante C93A) se introdujo el plásmido pET28a::C93A en células de *E. coli* BL21 competentes mediante choque térmico. Los transformantes se dejaron crecer hasta fase exponencial, momento en el cual se indujeron con IPTG 1 mM durante tres horas. El resultado se analizó mediante electroforesis desnaturalizante en gel de SDS-PAGE al 17% (Figura 4).

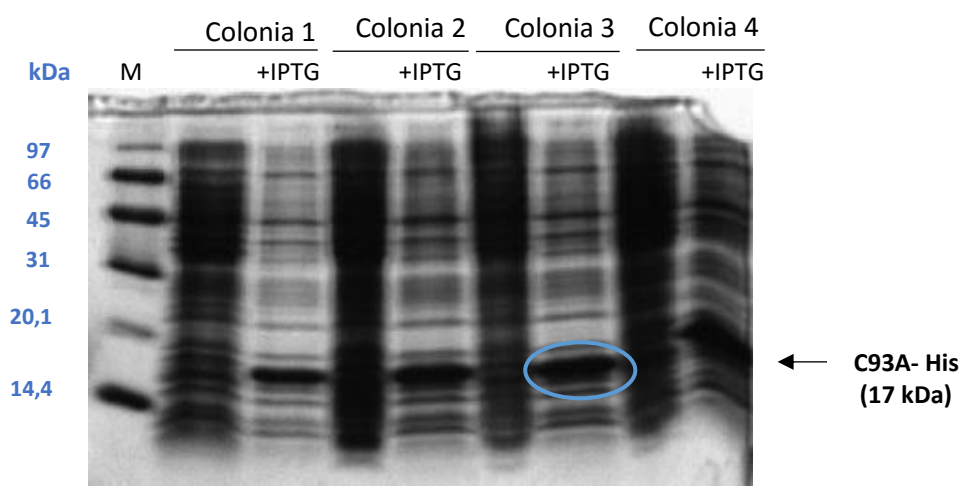


Figura 4. Sobreexpresión de C93A en *E. coli* BL21. Se muestra el gel de SDS-PAGE al 17% teñido con Azul de Coomassie. En cada carril se cargó el extracto proteico correspondiente a 1 ml de cada cultivo. La indicación "+IPTG" está sobre los carriles con cultivo inducido durante 3 horas con IPTG 1mM. El carril M contiene el marcador de peso molecular (Low Molecular Weight Calibration kit, GE Healthcare).

Como se aprecia en la figura 4, la prueba de sobreexpresión fue satisfactoria, observándose una banda más gruesa con un peso molecular aproximado de 17 kDa, que corresponde a la proteína C93A con cola de histidinas. Se observó que la colonia 3 era la que mayor nivel de sobreexpresión presentaba y se eligió para su cultivo a gran escala con el fin de obtener biomasa. Los resultados muestran que las condiciones de inducción empleadas (3 horas con IPTG 1mM) son adecuadas para conseguir una sobreexpresión proteica suficiente, ya que la banda correspondiente a C93A-His destaca claramente sobre las demás proteínas presentes en el extracto.

4.2.2. Purificación de la proteína

Una vez seleccionada la colonia que presentaba mayor expresión de la proteína, se obtuvieron 10 litros de cultivo en medio LB/Km y se recogió la biomasa para purificar la proteína. La purificación se realizó mediante el protocolo empleado para la obtención de la proteína FurB silvestre (Sein-Echaluze, PhD Thesis, 2016), utilizando una cromatografía de afinidad a metal (zinc) y con cloruro de guanidinio 2M como agente desnaturizante.

Finalizada la purificación, se realizó el análisis por SDS-PAGE al 17% de las fracciones recogidas a lo largo de todo el proceso para comprobar en cuales de ellas se encontraba proteína (Figuras 5 y 6).

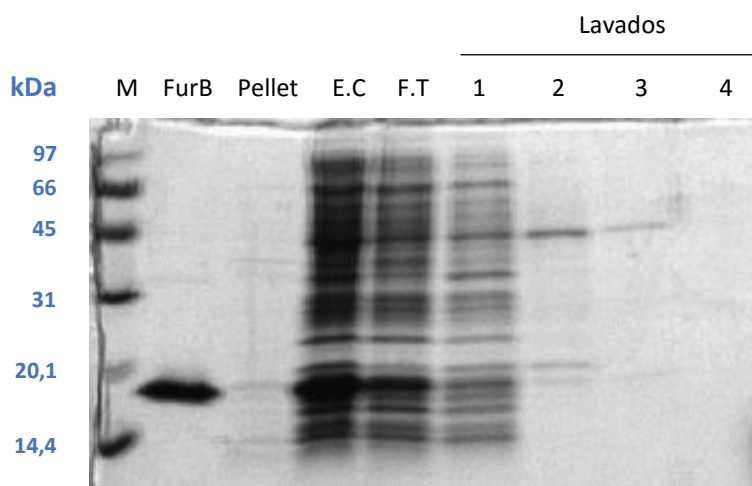


Figura 5. Seguimiento del proceso de purificación. Se muestra el gel SDS-PAGE al 17% teñido con Azul Coomassie. Las muestras se sometieron a electroforesis desnaturizante en condiciones reductoras. Carril M: marcador de meso molecular; carril FurB: FurB-His; carril Pellet: 2µl de biomasa; carril E.C: lisado celular tras sonicación y centrifugación; carril F.T: *Flow Through* (proteínas no fijadas al cargar el extracto crudo); carriles 1-4: lavados 1, 2, 3 y 4.

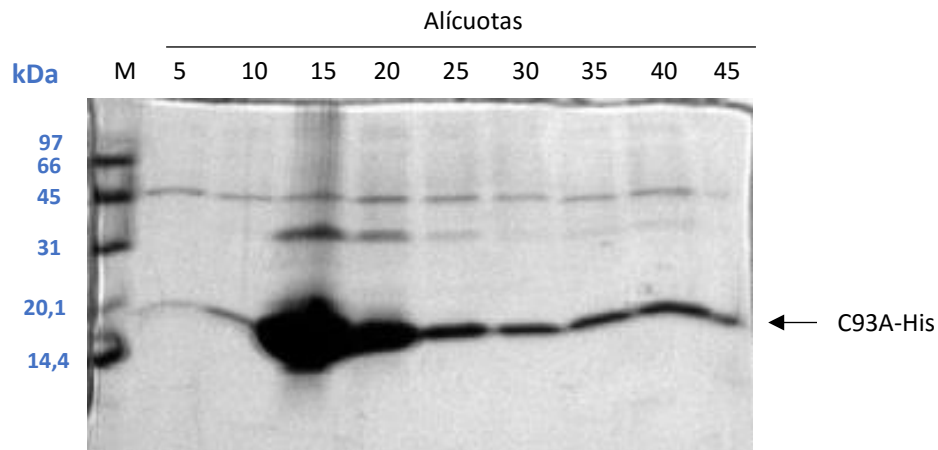


Figura 6. Alícuotas eluidas de la columna de afinidad. Se muestra el gel SDS-PAGE al 17% teñido con Azul Coomassie. Las muestras se sometieron a electroforesis desnaturalizante en condiciones reductoras. La alícuota a la que corresponden los distintos carriles se muestran sobre los mismos.

Como se observa en la Figura 5, la sobreexpresión de la proteína en la biomasa fue correcta (carril E.C). Tal y como suele suceder cuando hay una cantidad de proteína considerable, se perdió cantidad considerable de proteína en el *flow through*, al cargar el extracto sobre la columna de afinidad; que pudo deberse a una saturación de la columna por lo que, en próximas purificaciones se trabajará con columnas más grandes o con menos extracto crudo. Los lavados sí que hicieron su función, ya que se eluyeron la mayor parte de las proteínas del extracto y sólo una pequeña cantidad de C93A-His en el lavado 1. La proteína obtenida fue suficiente para abordar los objetivos del trabajo.

En la Figura 6 puede observarse la presencia de proteína en las fracciones eluidas, siendo ésta mayor a partir de la alícuota 10 (principalmente en las alícuotas 12 y 20). La proteína se encontró mayoritariamente en la forma monomérica, aunque pudo apreciarse una pequeña cantidad de dímeros en las alícuotas con mayor cantidad de proteína (alícuotas 15-20). Por otro lado, la cantidad de proteína observada en las distintas alícuotas es considerable, lo cual demuestra que el método de purificación utilizado es adecuado. El empleo de cloruro de guanidinio como agente desnaturalizante minimiza la formación de cuerpos de inclusión insolubles (frecuentes en la sobreexpresión de proteínas Fur), incrementando la cantidad de proteína soluble en el extracto. Además, el cloruro de guanidinio también podría debilitar las interacciones inespecíficas con la matriz de proteínas no deseadas, dando lugar a una elevada pureza de la proteína de interés. La utilidad del cloruro de guanidinio ha quedado demostrada también durante la purificación de otras proteínas Fur como FurA de *Anabaena* (Pellicer et al., 2010).

Las alícuotas con mayor cantidad de C93A-His (alícuotas 11-40) se juntaron y se procedió a su diálisis en 3 litros de solución HAC/Ac pH 5,5 en la cámara fría. La proteína precipitó en la primera etapa de diálisis, por lo que tuvo que someterse a 5 etapas de diálisis sucesivas para conseguir su resuspensión. Esto podría deberse a que durante la

diálisis se alcanzó un pH igual al punto isoeléctrico de la proteína produciéndose así su precipitación.

Una vez dializada, se concentró la proteína a la mitad de su volumen en un Amicon 10K. Tras la concentración y diálisis la proteína permaneció soluble, no apreciándose precipitación de la misma.

4.2.3. Cuantificación por BCA

De los distintos métodos para cuantificar proteínas, se eligió el método de BCA (ácido bicinonínico) por ser un método muy sensible. Previamente al análisis de las muestras, se elaboró la recta de calibrado del método a partir de un patrón de BSA de concentración conocida (Figura 7).

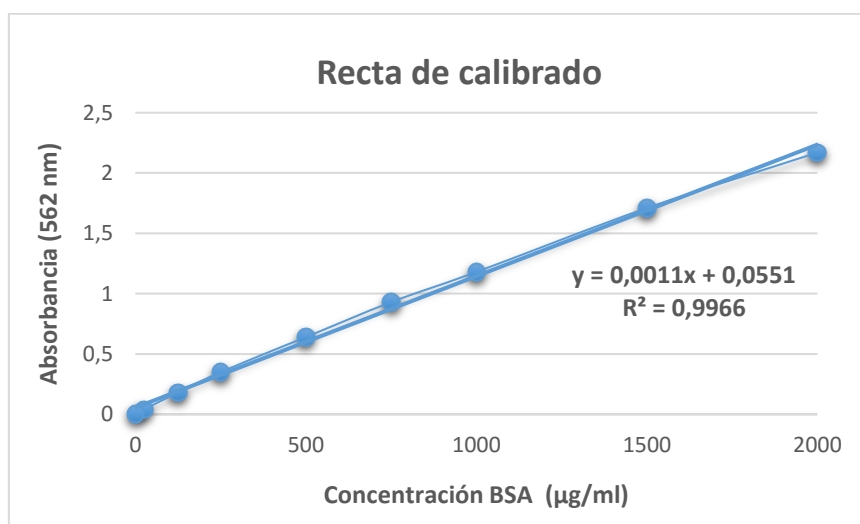


Figura 7. Recta de calibrado del método de cuantificación. Se muestra la representación de los valores de absorbancia a 562 nm frente a la concentración del patrón de BSA (expresada en µg/ml). Se incluye también la ecuación de la recta de calibrado con el correspondiente coeficiente de regresión.

Tal y como se aprecia en la figura 7, el coeficiente de regresión es cercano a la unidad y la recta de calibrado es válida para la cuantificación de la proteína. Interpolando los valores de absorbancia de la muestra se pudo calcular que la concentración de la proteína era de 2 mg/ml (116 µM). Por lo tanto, tras la purificación, diálisis y concentración de la proteína, se ha obtenido una cantidad suficiente para efectuar los estudios posteriores de caracterización.

4.3. Caracterización bioquímica

En este apartado se incluyen los distintos ensayos realizados para la caracterización bioquímica de la proteína recombinante obtenida. En todos ellos se incluye como control la proteína FurB-His, purificada previamente en el grupo de investigación por un procedimiento análogo al empleado en este trabajo.

4.3.1. Ensayo de entrecruzamiento con glutaraldehído

Para el análisis de la oligomerización proteica *in vitro* se realizaron ensayos de entrecruzamiento químico con glutaraldehído. Esta técnica permite la visualización de especies oligoméricas que pueden encontrarse en equilibrio con los monómeros e implica la formación de enlaces covalentes entre dos proteínas por medio de reactivos bifuncionales, en este caso glutaraldehído.

Se trató una muestra de proteína con el agente entrecruzante y se sometió a electroforesis desnaturizante reductora en gel de SDS-PAGE al 17% (Figura 8).

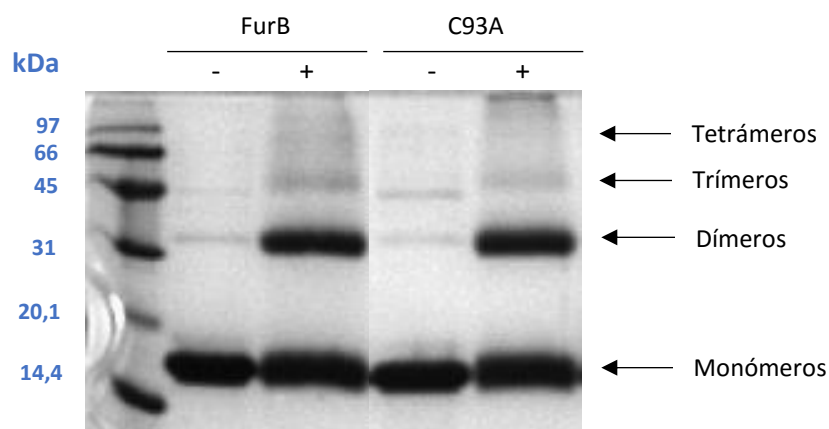


Figura 8. Análisis de oligomerización de FurB y C93A con glutaraldehído. Se muestra el gel de SDS-PAGE al 17% teñido con Azul Coomassie. Las muestras se aplicaron en el gel empleando tampón de carga con β -mercaptoetanol y contienen una concentración final de 50 μ M de proteína. Las muestras (-) no fueron tratadas con glutaraldehído. Las muestras (+) fueron tratadas con glutaraldehído al 0,5% durante 30 minutos en oscuridad.

Tanto para FurB como para C93A, en presencia de reductor (β -mercaptoetanol) y ausencia de agente entrecruzante los monómeros fueron las principales especies encontradas *in vitro*. Al realizarse el tratamiento con glutaraldehído se apreció la presencia de especies oligoméricas, principalmente dímeros, en ambas proteínas. Estos resultados podrían tener sentido biológico, ya que cuando FurB actúa como regulador transcripcional lo hace en forma de dímero. El hecho de que el mutante C93A muestre la misma capacidad de dimerización que FurB silvestre podría significar que la Cys93 no estaría implicada en la formación de los dímeros.

4.3.2. Ensayo de reducción con DTT

Para comprobar si la formación de los dímeros podría deberse al establecimiento de puentes disulfuro intermoleculares, se trataron ambas proteínas con DTT, un agente reductor que rompería los puentes disulfuro en caso de que existieran (Figura 9).

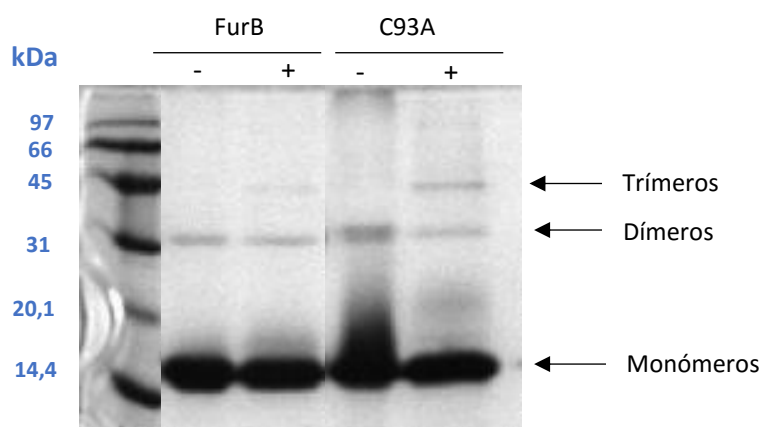


Figura 9. Análisis de reducción de FurB y C93A con DTT. Se muestra el gel de SDS-PAGE al 17% teñido con Azul Coomassie. Las muestras se aplicaron en el gel empleando tampón de carga sin β -mercapoetanol, para que el único agente reductor en el ensayo fuera el DTT. Todas ellas contienen una concentración final de proteína de 50 μ M. Las muestras (-) no se trataron con DTT. Las muestras (+) se trataron con DTT a una concentración final de 10 mM durante 30 minutos.

En este ensayo apreciamos que ambas proteínas se encontraban casi en su totalidad en forma monomérica en condiciones no reductoras (ausencia de DTT). La adición de DTT a la muestra de FurB no hizo desaparecer la escasa población de dímeros, lo cual nos indica que los dímeros observados mediante el entrecruzamiento no son debidos a la formación de puentes disulfuro intermoleculares, sino a interacciones no covalentes entre los monómeros. Además, en el caso de que la interacción entre monómeros fuera debida a puentes disulfuro, muy probablemente se observaría una mayor proporción de dímeros en las proteínas sin tratar, que no contienen ningún agente reductor en el medio que amortigüe la oxidación por el oxígeno atmosférico.

Sin embargo, al añadir DTT sobre la muestra de C93A se apreció una ligera disminución en la cantidad de dímeros. Esto podría deberse a que tal vez parte de esos dímeros están formados por puentes disulfuro intermoleculares. Puesto que este mutante carece de la Cys93, esos puentes disulfuro tendrían que estar formados a través de algunos de los residuos de cisteína restantes (Cys81, Cys84, Cys121 o Cys124).

Por otra parte se observa una mayor presencia de trímeros en condiciones reductoras en ambas proteínas, trabajos previos del grupo (Sein-Echaluce, PhD Thesis, 2016) demuestran que estos trímeros están estabilizados por fuerzas electroestáticas,

por lo que la reducción de la proteína con DTT podría provocar ligeras modificaciones estructurales que favorecieran estas interacciones.

4.3.3. Estudio de la presencia de zinc

Para verificar la presencia de zinc de la proteína C93A se realizó un tratamiento de la misma con 4-(2-Piridilazo)-resorcinol o PAR, un agente que reacciona de forma específica con los iones de zinc. La proteína se sometió a una electroforesis desnaturalizante y el gel fue teñido con una solución de PAR, que al reaccionar con los iones zinc forma un complejo de color naranja que puede distinguirse en el gel (Figura 10).

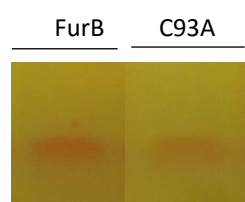


Figura 10. Detección de zinc con PAR. Se muestra una sección del gel SDS-PAGE al 17% teñido con una solución de 20 mM TRIS-HCl pH8, 100 mM NaCl, 5% glicerol y 500 μ M PAR durante 5 minutos. El revelado se realizó añadiendo 50 mM H_2O_2 . Las muestras se aplicaron en el gel empleando tampón de carga sin β -mercaptoetanol.

En la tinción se apreció que tanto la proteína FurB silvestre como el mutante C93A contenían zinc. Es muy probable que el zinc detectado corresponda al denominado “zinc estructural” de la proteína. Este zinc suele estar coordinado a través de 4 residuos de cisteína altamente conservados entre las distintas proteínas Fur y que en el caso de FurB corresponden a las cisteínas 81, 84, 121 y 124. Dicho zinc estructural es necesario para el mantenimiento de la conformación proteica adecuada (Fillat, 2014). Al no estar implicada la Cys93 en la coordinación de ese átomo de zinc, el mutante podría mantener inalterada su capacidad de coordinar el zinc estructural, y de ahí que también se observe la banda anaranjada característica del ensayo con PAR.

4.3.4. Estudio de la interacción con el grupo hemo

A continuación, se quiso analizar la capacidad de interacción del mutante C93A con el grupo hemo. Estudios previos en el laboratorio habían demostrado la capacidad FurB silvestre de interactuar con el grupo hemo (López-Gomollón et al, 2009). Esa interacción podría estar teniendo lugar a través del motivo Cys-Pro-Val, que se ha descrito de manera clásica como “motivo de unión a hemo con carácter regulador” (Girvan and Munro, 2013). Puesto que la cisteína incluida en este motivo es precisamente la Cys93, se analizó la interacción con el grupo hemo tanto de la proteína FurB como de la proteína mutante C93A mediante espectroscopía diferencial.

Para obtener los espectros diferenciales, que se muestran en la figura 11, se realizaron adiciones sucesivas de proteína (FurB/C93A) sobre una disolución de hemo de concentración 2 μ M.

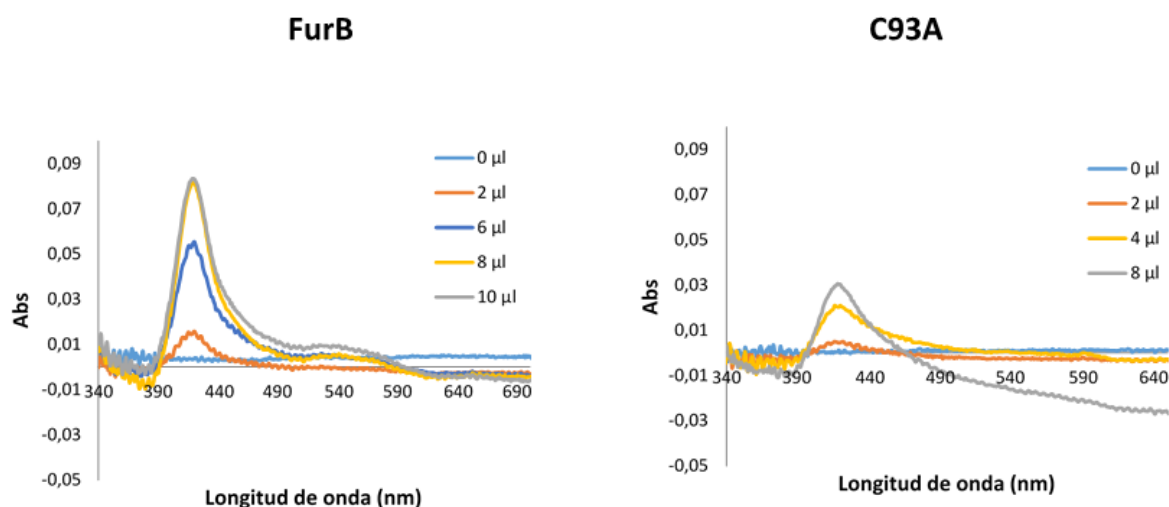


Figura 11. Superposición de los espectros diferenciales de FurB y C93A con hemo. Se muestra el cambio en el espectro de absorción provocado por la adición de concentraciones crecientes de proteína (FurB/C93A) sobre una disolución 2 μ M de hemo. El volumen de proteína añadido en cada caso se muestra en la leyenda de cada gráfica. En ambos casos se muestra el espectro del blanco (0 μ l de proteína añadidos), de adiciones intermedias y de la adición que dio lugar a una mayor Δ Abs₄₂₀₋₃₈₅. El ensayo se realizó a 25°C en Tris/HCl 50 mM pH 8.

Aunque aparentemente en distinta medida, tanto la proteína silvestre como el mutante C93A fueron capaces de interactuar con el grupo hemo en las condiciones empleadas, ya que en ambos casos se produjo una disminución de la absorbancia a 385 nm, que corresponde al hemo libre, y un incremento en la absorbancia a 420 nm, que corresponde al hemo coordinado. El valor máximo Δ Abs₄₂₀₋₃₈₅ en el mutante C93A fue menor que en la proteína silvestre, lo que sugiere una menor afinidad por el grupo hemo de este mutante.

Además, los espectros diferenciales obtenidos con la proteína silvestre se asemejaban más al aspecto característico de un espectro de este tipo y que presentan las proteínas de unión a hemo (Laakso et al., 2015).

Para comprobar la fortaleza de la interacción con el hemo, los valores de Δ Abs₄₂₀₋₃₈₅ obtenidos tras cada una de las adiciones se representaron frente a la concentración de proteína (Figura 12).

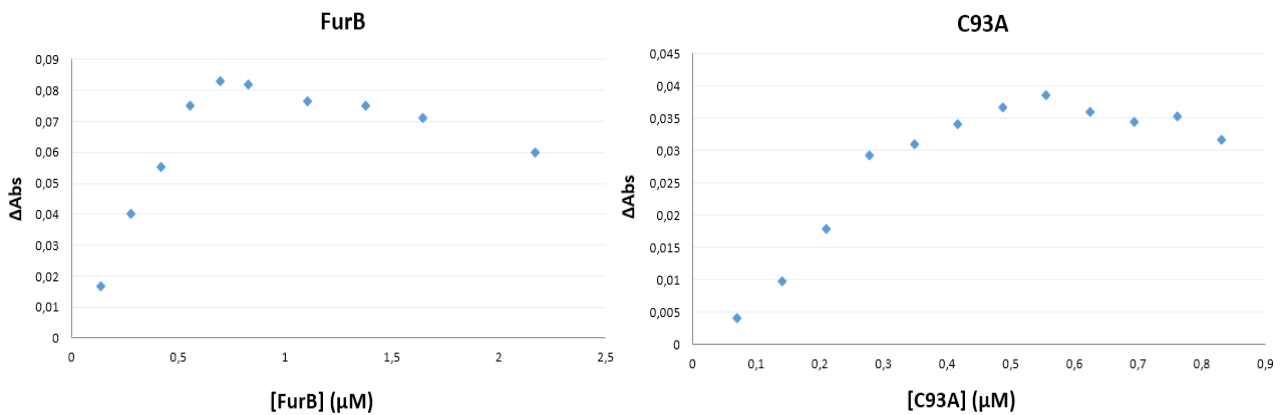


Figura 12. Representación de la variación de absorbancia frente a la concentración de FurB y C93A . Se muestra el cambio de absorción provocado por la adición de concentraciones crecientes de proteína (FurB/C93A).

Los valores representados trataron de ajustarse a la curva de saturación de un complejo proteína:hemo con estequiometría 1:1, de acuerdo a la siguiente fórmula y empleando el programa KaleidaGraph:

$$\Delta Abs = \frac{\epsilon l \cdot (F + L + K_d)}{2} - \frac{\epsilon l \cdot \sqrt{(F + L + K_d)^2 - 4 \cdot F \cdot L}}{2}$$

En donde: ϵ es el coeficiente de extinción molar del grupo hemo, K_d es la constante de disociación, l es la longitud de la cubeta, F es la concentración de proteína (FurB/C93A) en cada momento y L representa la concentración de grupo hemo en cada momento.

Sin embargo, en ninguno de los casos pudo obtenerse un ajuste adecuado. El único ajuste que pudo realizarse fue con la proteína silvestre, pero los parámetros de ajuste distaban de los deseados (Tabla 7).

Parámetro	Valor	Error
ϵ	0,16799	0,058892
$[hemo]_0$	0,24525	0,063749
K_d	0,039644	0,044339
χ^2	$2,5803 \cdot 10^{-5}$	-
R	0,9816	-

Tabla 7. Parámetros de ajuste. Se muestran los parámetros obtenidos tras realizar un ajuste mediante mínimos cuadrados aplicado con el programa informático KaleidaGraph.

Con la finalidad de obtener un mejor ajuste de los datos experimentales se permite al programa variar la concentración inicial de hemo ($[hemo]_0$), a pesar de que es un parámetro fijo y conocido ($2 \mu\text{M}$). Esto hace posible comprobar la bondad del ajuste realizado. En nuestro caso, se obtiene una concentración de hemo de $0,24 \mu\text{M}$, que es un orden de magnitud menor que la real.

Los parámetros estadísticos χ^2 y R, que estiman la validez de un ajuste, deben tender a 0 y 1 respectivamente. Como se aprecia en la Tabla 7, los valores obtenidos en el ajuste presentan esa tendencia. Sin embargo, el error asociado a los demás parámetros (ϵ , $[hemo]_0$ y K_d) es demasiado grande porque debería ser un orden de magnitud inferior al valor dado. Esto, junto con el valor obtenido para la concentración de hemo inicial, nos permite verificar que el ajuste obtenido no es adecuado y por lo tanto, la constante de disociación para la interacción proteína-hemo no se ha podido calcular mediante esta técnica.

No obstante, como se ha comentado anteriormente, el espectro diferencial sugiere la implicación de la Cys93 en la coordinación de este grupo o al menos su localización en una región próxima al sitio de unión.

Puesto que en este caso la espectroscopía diferencial no ha resultado útil para determinar la constante de la interacción proteína-hemo, podría tratar de calcularse esa constante a través de la medida de otras propiedades físicoquímicas como el calor de reacción, mediante la técnica de ITC (calorimetría de titulación isoterma).

4.4. Actividad biológica *in vitro* de la proteína

4.4.1. Estudio de la interacción proteína-DNA

Para analizar la actividad biológica, capacidad de unión al DNA, tanto de FurB como de la proteína mutante C93A, se realizaron ensayos de retardo de la movilidad electroforética (EMSA) (Figura 13). Concretamente se analizó la interacción con el promotor del gen *all4725*, con el cual FurB interacciona con una elevada afinidad (Napolitano et al., 2012).

Una característica general de las proteínas Fur es que requieren de la presencia de metal y agente reductor para su unión al DNA (Hernández et al., 2006). En nuestro caso concreto se ha demostrado que la unión óptima de la proteína FurB al DNA necesita la presencia de zinc (concentración final $5 \mu\text{M}$) y DTT (1mM) (Sein-Echaluze et al., 2015). Por ello, en todos los ensayos realizados se añadieron estos agentes.

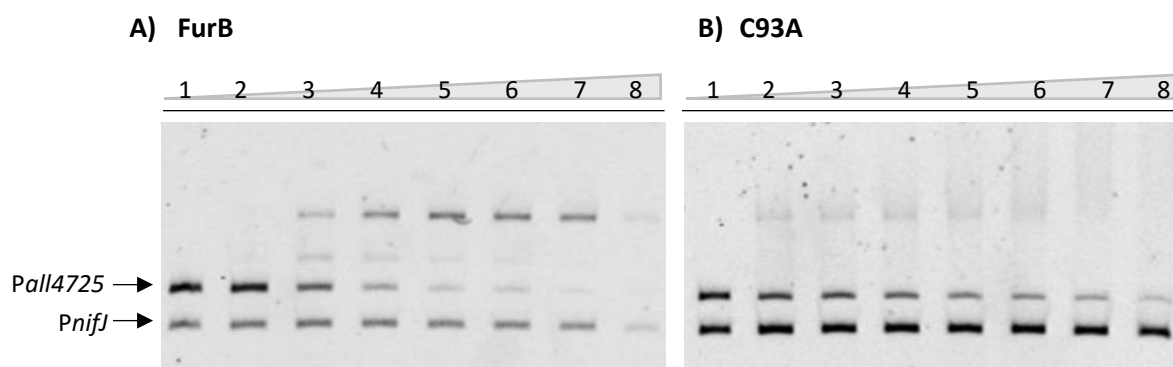


Figura 13. Interacción de FurB y el mutante C93A con el DNA. Ensayos de tipo EMSA. A) Actividad de FurB. B) Actividad del mutante C93A. Tanto en A como en B, el carril 1 corresponde al control negativo, que contiene los promotores de los genes *all4725* y *nifJ*. Los carriles 2-7 contienen proteína (FurB/C93A) a una concentración final de 100, 200, 300, 400, 500, 600 y 700 nM. En todos los casos se emplearon las condiciones óptimas de unión. 5 μ M ZnSO₄ v 1mM DTT.

En la Figura 13 puede apreciarse que tanto la proteína FurB como la variante C93A fueron activas en los ensayos EMSA. En el caso de la proteína silvestre se observó la formación de complejos DNA-proteína bien definidos al incrementar la concentración de FurB. En el caso de la proteína mutante, los complejos formados no estaban tan definidos pero se observó un claro retardo del promotor *Pall4725*. Esto indica que, aunque su interacción con el DNA es más débil, el mutante mantiene su actividad biológica y, por lo tanto, el método de purificación empleado es válido también en este caso. La Cys93 parece contribuir a la estabilidad del complejo de FurB con el DNA, ya que se observa una interacción significativamente más débil del mutante C93A con el DNA.

No obstante, el hecho de que el mutante mantenga su actividad biológica, sugiere que el mutante no presenta alteraciones significativas de su plegamiento con respecto al de la proteína silvestre.

4.4.2. Estudio de la interacción proteína-DNA en presencia de grupo hemo

Una vez comprobado que el mutante C93A tenía actividad biológica, se realizaron ensayos EMSA adicionales para determinar la influencia del grupo hemo en la interacción proteína-DNA.

Al igual que en el apartado anterior, los ensayos se realizaron en las condiciones óptimas de unión (5 μ M de zinc y 1 mM de DTT) y en este caso se añadió hemo hasta conseguir una proporción proteína:hemo de 1:5 y 1:10 (Figura 14).

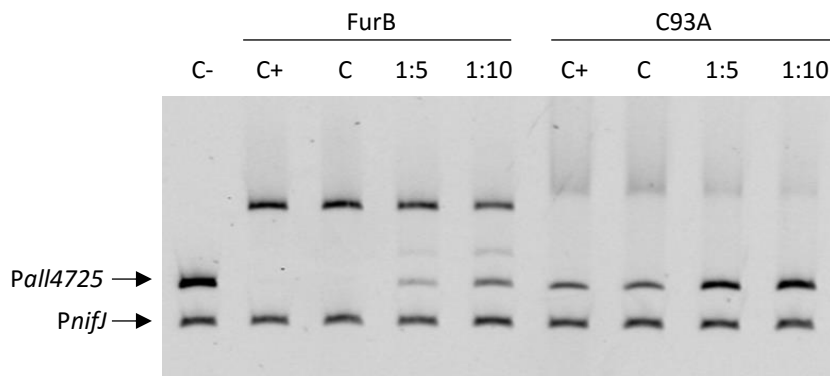


Figura 14. Influencia del grupo hemo en la unión al DNA de FurB y C93A. Ensayos de tipo EMSA. El carril C- corresponde al control negativo (promotores *Pall4725* y *PnifJ*). El carril C+ es el control positivo. El carril C corresponde a un control adicional en el cual se ha añadido sobre la proteína el tampón en el que está disuelto el grupo hemo (TRIS/HCl 20 mM pH 8). Los carriles 1:5 y 1:10 contienen esa proporción de proteína:hemo. En todos los casos se emplearon las condiciones óptimas de unión (5 μ M ZnSO₄ y 1 mM DTT) y una concentración final de proteína (FurB/C93A) de 500 nM.

La adición de hemo redujo la unión al DNA tanto de FurB como de C93A, indicando de nuevo que ambas proteínas interactuaban con el grupo hemo. La reducción de la actividad no se debía a un efecto del tampón en el cual estaba disuelto el hemo, pues en los controles que contenían dicho tampón se apreció la misma actividad proteica que en los correspondientes controles positivos. De esta manera, la menor actividad se debía necesariamente a la interacción de FurB y C93A con el grupo hemo.

Considerando conjuntamente los ensayos EMSA y los espectros diferenciales, los resultados sugieren que la Cys93 podría estar implicada en la coordinación del hemo o al menos localizada en una región próxima al sitio de unión. La implicación de residuos de cisteína pertenecientes a motivos CPV o CP en la coordinación del hemo se ha sugerido también en otras proteínas Fur. Este es el caso de FurA de *Anabaena*, para la que se ha propuesto que la cisteína 141 (perteneciente a un motivo CP) es uno de los ligandos axiales del grupo hemo (Pellicer et al., 2012).

5. Conclusiones Generales

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

1. Se ha introducido correctamente la mutación C93A en FurB mediante Quick-change PCR y se ha conseguido la correcta sobreexpresión de la proteína mutante en *E.coli*.
2. La purificación mediante cromatografía de afinidad a zinc con cloruro de guanidinio permite obtener la proteína C93A activa en cantidad suficiente para su caracterización.
3. La proteína C93A se encuentra en forma monomérica y es capaz de formar dímeros.
4. La proteína C93A contiene zinc.
5. La comparación de los espectros diferenciales de la proteína silvestre y la variante C93A sugiere que la cisteína 93 podría estar implicada en la coordinación del grupo hemo.
6. La proteína C93A presenta capacidad para interactuar con las secuencias diana del DNA y esta se ve disminuida en presencia de hemo.

General Conclusions

From the results obtained in this work, we can draw the following conclusions:

1. The mutation C93A was successfully introduced in FurB by Quick-change PCR and the overexpression of the mutant protein in *E. coli* was correctly got.
2. The purification by zinc affinity chromatography with guanidinium chloride allows sufficient active C93A protein for its characterization.
3. The C93A protein is in monomeric form and is able to form dimers.
4. The C93A protein contains zinc.
5. The comparison of the C93A spectra and the wild type spectra suggests that the cysteine 93 may be involved in the coordination of heme group.
6. The C93A protein has ability to interact with the DNA target sequences and this interaction is decreased in presence of heme group.

Bibliografía

1. Andrews, S. C. et al., (2003). "Bacterial iron homeostasis." *FEMS Microbiology Reviews*, 2003. 27(2-3): 215-237.
2. Campbell, E. L. and J. C. Meeks, (1989). "Characteristics of Hormogonia Formation by Symbiotic *Nostoc* spp. in Response to the Presence of *Anthoceros punctatus* or Its Extracellular Products." *Appl Environ Microbiol*, 1989. 55(1): 125-31.
3. Carpenter, B. M. et al., (2013). "Identification and Characterization of Novel *Helicobacter pylori* apo-Fur-Regulated Target Genes." *American Society for Microbiology*, 2013. 195(24): 55265539.
4. Carr, N. G. et al., (1982). "The biology of cyanobacteria." *Botanical monographs*. Vol. 19. 1982: University of California Press, 1982. 19: 677.
5. Fillat, M. F. (2014). "The FUR (ferric uptake regulator) superfamily: Diversity and versatility of key transcriptional regulators." *Arch Biochem Biophys*, 2014 Mar 15. 546: 41-52.
6. Flores, E. and A. Herrero (2010). "Compartmentalized function through cell differentiation in filamentous cyanobacteria." *Nature Reviews Microbiology*, 2010. 8(1): 39-50.
7. Girvan, H. M. and A. W. Munro (2013). "Heme sensor proteins." *Journal of Biological Chemistry*, 2013. 288(19): 13194-13203.
8. González, A. et al., (2012). "FurA is the master regulator of iron homeostasis and modulates the expression of tetrapyrrole biosynthesis genes in *Anabaena* sp. PCC 7120." *Environmental Microbiology*, 2012. 14(12): 3175-3187.
9. He, X. et al., (1999). "Selective and sensitive spectrophotometric determination of total vanadium with hydrogen peroxide and 4-(2-pyridylazo)-resorcinol." *Analytica Chimica Acta*, 1999. 389: 275-280.
10. Hernández, J. A. (2004). "Three fur homologues from *Anabaena* sp. PCC7120: exploring reciprocal protein-promoter recognition." *FEMS Microbiology Letters*, 2004. 236(2): 275-282.
11. Hernández, J. A. (2006). "Interaction of FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120 with DNA: a reducing environment and the presence of Mn(2+) are positive effectors in the binding to *isiB* and *furA* promoters." *BioMetals*, 2006. 19: 259-268.

12. Hernández, J. A. et al., (2010). "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. 167(6): 430-7.
13. Hernandez, J.A. et al., (2014). "Three *fur* homologues from *Anabaena* sp. PCC7120: exploring reciprocal protein-promoter recognition." *FEMS Microbiol Lett*, 2014. 236(2): 275-82.
14. Igarashi, J. et al., (2011). "Emerging roles of heme as a signal and a gas-sensing site: heme sensing and gas-sensing proteins." In *Handbook of Porphyrin Science*, 2011. 15: 399-461.
15. Kaneko, T. et al., (2001). "Complete Genomic Sequence of the Filamentous Nitrogen-fixing Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PCC 7120." *DNA Research*, 2001. 8: 205–213
16. Laakso, H. A. et al., (2015). "A heme-responsive regulator controls synthesis of staphyloferrin B in *Staphylococcus aureus*." *Journal of Biological Chemistry*, 2015. 291(1): 29-40.
17. Lee, J. W. and J. D. Helmann (2006). "Biochemical characterization of the structural Zn²⁺ site in the *Bacillus subtilis* peroxide sensor PerR." *Journal of Biological Chemistry*, 2006. 281(33): 2356723578.
18. Lee, J.W. and J. D. Helmann (2007). "Functional specialization within the Fur family of metalloregulators." *BioMetals*, 2007. 20(3-4): 485-499.
19. López-Gomollón, S. et al., (2009). "New insights into the role of Fur proteins: FurB (All2473) from *Anabaena* protects DNA and increases cell survival under oxidative stress." *Biochemical Journal*, 2009. 418(1): 201-207.
20. Masayuki, H. et al., (2001). "Characterization of genes encoding multi-domain proteins in the genome of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120." *DNA Research*, 2001. 8: 271-284.
21. Napolitano, M. et al., (2012). "Characterization of the response to zinc deficiency in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120." *Journal of Bacteriology*, 2012. 194(10): 24262436.
22. Pellicer, S. et al., (2010). "High-recovery one-step purification of the DNA-binding protein Fur by mild guanidinium chloride treatment." *Process Biochemistry*, 2010. 45(2): 292-296.
23. Rippka, R. et al., (1978). "Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria." *Journal of General Microbiology*, 1978. 111: 1-61.

24. Sein-Echaluce et al., (2015) "Zur (FurB) is a key factor in the control of the oxidative stress response in *Anabaena* sp. PCC 7120." *Environmental Microbiology*, 2015. 17(6): 2006–2017.
25. van de Meene, A. et al., (2006). "The three-dimensional structure of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803." *Archives of Microbiology*, 2006. 184: 259-270.
26. Xiong, J. and C.E. Bauer (2002) "Complex evolution of photosynthesis." *Annual Review of Plant Biology*, 2002. 53: 503-521.
27. Yingping, F. et al., (2014). "Unravelling the cross-talk between iron starvation and oxidative stress responses highlights the key role of PerR (alr0957) in peroxide signalling in the cyanobacterium *Nostoc* PCC 7120." *Environmental Microbiology Reports*, 2014.