

1/9/2011

**TESINA
DE
GRADO**

**OBTENCIÓN DEL COMPLEJO FORMADO ENTRE EL
REGULADOR TRANSCRIPCIONAL MUR Y SU ADN
BLANCO PARA ENSAYOS DE CO-CRISTALIZACIÓN**

**Tutor: Federico Rosconi.
Mercedes Cabrera Carrasco_ 2011**

RESUMEN

Los rizobios son bacterias del suelo capaces de fijar nitrógeno atmosférico en simbiosis con leguminosas. En particular, *Sinorhizobium meliloti* es una α -Proteobacteria simbiote específico de plantas de alfalfa. Metales como el hierro y manganeso son esenciales para la sobrevivencia de estas bacterias en el suelo y/o en simbiosis. Debido a los cambios adaptativos necesarios para afrontar los diferentes nichos ecológicos, la homeostasis de estos dos metales está finamente regulada a nivel génico en estas bacterias. La proteína FUR (Ferric Uptake Regulator) reprime la expresión de genes involucrados en la adquisición de hierro en la mayoría de las Proteobacterias. Sin embargo, en *S. meliloti* se demostró que la proteína homóloga reprime los genes de adquisición de manganeso (*mntABCD*) y no los de hierro, por lo que se nombró como Mur (Manganese Uptake Regulator).

Previamente nuestro grupo demostró por ensayos de retardo de la movilidad electroforética en gel (EMSA) y de footprinting, que la proteína recombinante Mur de *S. meliloti* 1021 se une a una región de ADN (denominada caja Mur) la cual es similar a las secuencias (cajas Fur) reconocidas por otras proteínas Fur estudiadas. En presencia de Mn^{2+} , la proteína Mur se une a la caja Mur presente en la región operadora del operón *mntABCD* y en estas condiciones la expresión del sistema se reprime.

A partir de estos resultados nos propusimos caracterizar las bases moleculares de la unión establecida entre ambas macromoléculas en presencia de manganeso. Utilizando una sonda de ADN de 30 pb conteniendo la caja Mur, se intentó obtener cristales del complejo Mur- Mn^{2+} -ADN. Luego de una primera y exhaustiva selección de solventes para la cristalización se seleccionó uno para reproducir en mayor escala y optimizar su composición. Los cristales obtenidos fueron analizados mediante difracción de rayos X. Lamentablemente, la resolución obtenida fue muy baja (4 Å) impidiendo un correcto análisis estructural.

Con el fin de obtener cristales de mejor calidad se diseñó una nueva sonda de ADN agregándose tres pares de bases en ambos extremos de la sonda de 30 pb utilizada anteriormente

(5'GCCCTAGTTGCAAATGCTTCTCATTGACCC3'). Dicha modificación garantiza una mayor estabilidad térmica del oligo. Por ensayos de EMSA demostramos que Mur se une con alta afinidad a esta nueva sonda de 36 pb. Una vez purificado el complejo Mur-sonda de 36 pb en presencia de Mn^{2+} , se intentará obtener cristales empleando el mismo solvente utilizado en el ensayo anterior. En el caso de resolver la estructura cristalográfica del co-cristal, ésta será la primera estructura conocida formada entre un miembro de la superfamilia Fur de reguladores transcripcionales y su ADN blanco lo cual aportará información valiosa para comprender las bases moleculares y funcionales de esta familia de reguladores.

INDICE

Resumen	2
Índice	4
1_ Introducción	6
1.1_ Regulación génica en los procariontas	6
1.2_ Técnicas para el estudio de reguladores transcripcionales.	8
1.3_ Regulación de la homeostasis de metales en bacterias.	11
1.4_ Mur: El regulador del transporte de manganeso en Rizobios.	14
1.5_ Mur en <i>S. meliloti</i> .	16
Hipótesis de trabajo	20
Objetivo	20
2_ Materiales y Métodos	21
2.1_ Bacterias y Plásmidos	21
2.2_ Obtención de una cepa BL21 pETMur	21
2.3_ Expresión de Mur recombinante	22
2.4_ Purificación de 6xHis-Mur	23
2.5_ Digestión con Trombina	24
2.6_ Análisis por electroforesis y detección de proteínas	25
2.7_ Ensayos de retardo en gel	25
2.8_ Ensayos de co-cristalización	26
3_ Resultados	28

3.1_ Identificación del plásmido recombinante y obtención de una nueva cepa sobreproductora de Mur.	28
3.2_ Inducción de la expresión de 6xHis-MUR.	29
3.3_ Purificación de 6xHis-Mur.	30
3.4_ Digestión con Trombina.	31
3.5_ Sonda nueva vs Sonda vieja.	33
3.6_ Gel de retardo (EMSA).	35
3.7_ Cromatografía de exclusión molecular (FPLC).	37
3.8_ Cristalización manual.	39
4_ Discusión.	42
4.1_ Perspectivas.	43
5_ Anexo.	45
5.1_ Medios de cultivo utilizados.	45
5.2_ Composición de Buffers.	45
5.3_ Protocolos utilizados.	46
5.4_ Geles de Acrilamida.	47
5.5_ Método del ácido bicinónico (BCA)	48
5.6_ Modelo de acción para un transportador tipo ABC	49
Referencias bibliográficas.	50

1_ INTRODUCCIÓN

1.1_REGULACIÓN GÉNICA EN LOS PROCARIOTAS:

En los microorganismos, al igual que en otras células vivas, la expresión de genes es altamente regulada con el fin de ajustar la maquinaria enzimática de las células y los componentes estructurales a los cambios en el entorno nutricional y físico. De esta manera, una célula bacteriana sintetiza normalmente sólo las proteínas necesarias para la supervivencia en las condiciones en las que se encuentre en un momento dado.

La expresión génica tanto en procariotas como en eucariotas está regulada principalmente a nivel transcripcional, mediante la interacción entre la ARN polimerasa o secuencias particulares presentes en los promotores y proteínas activadoras o represoras. Con el fin de iniciar la transcripción, la ARN polimerasa debe estar asociada al factor σ , que reconoce el sitio de inicio de la transcripción. En las células bacterianas el factor σ más común es el factor σ_{70} que interactúa con la mayoría de los promotores procariontes. Las proteínas activadoras o represoras pueden unirse a sitios presentes en la región promotora cercanos al sitio de unión del factor σ , reconociendo secuencias definidas de la doble hélice de ADN, facilitando la unión de la RNA polimerasa o impidiendo su unión, respectivamente, y determinar así cuáles de los genes van a ser transcritos en la célula. A pesar de que cada una de estas proteínas tiene características únicas la mayoría se une al ADN como homodímero o heterodímero y generalmente reconocen al ADN por un pequeño número de motivos comunes que incluyen

hélice-vuela-hélice, los homeodominios, cremallera de leucina y dedos de zinc.

El mecanismo principal de acción de los represores consiste en unirse a la región promotora de un gen u operón, bloqueando la iniciación de la transcripción. Una o varias pequeñas moléculas señales (inductores), interactúan con el represor, controlando su actividad de unión al ADN y por lo tanto la tasa de transcripción apropiada para las necesidades de la célula.

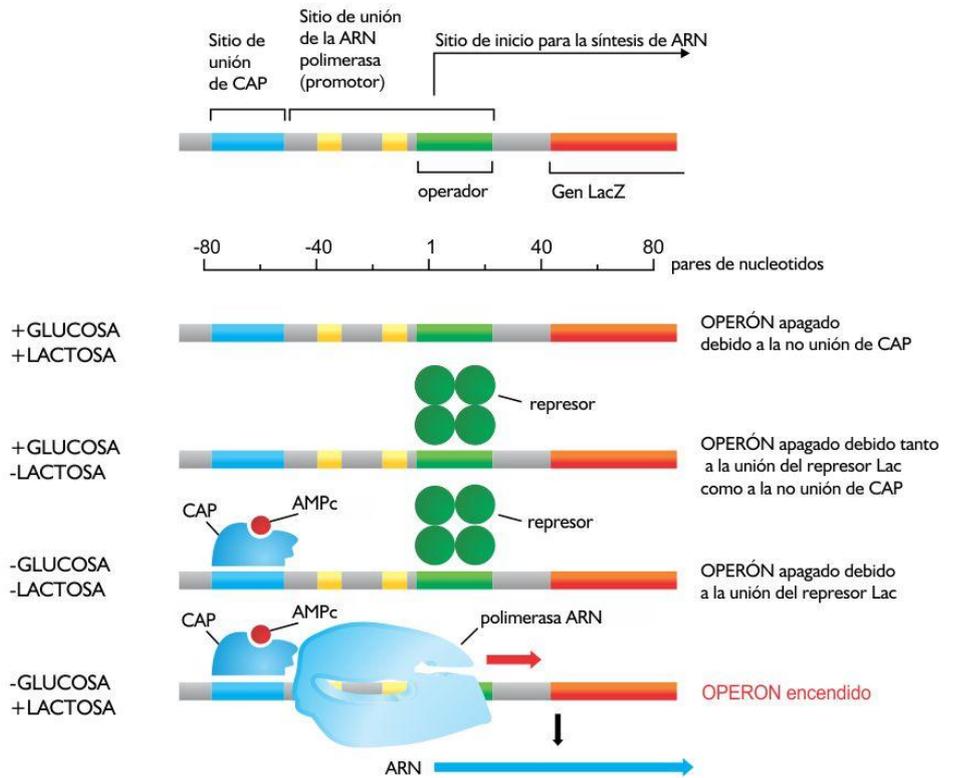
Los activadores estimulan la transcripción uniéndose a un promotor específico, mediante diferentes mecanismos (reclutamiento de ARN polimerasa, apertura de la doble hebra, curvamiento del ADN, etc.). La actividad de unión al ADN de un activador también se modula en respuesta a las necesidades celulares por la unión de inductores específicos (1).

El operón *lac* es requerido para el transporte y metabolismo de la lactosa en la bacteria *Escherichia coli*, así como en algunas otras bacterias entéricas. Presenta tres genes estructurales adyacentes, un promotor, un terminador y un operador. Este operón es regulado por represores y activadores que responden a la disponibilidad de glucosa y de lactosa. La regulación génica del operón fue el primer mecanismo regulatorio de la expresión genética en ser elucidado (2).

La proteína represora Lac I se expresa constitutivamente y permanece unida en forma de tetrámero a la zona operadora (ver Figura 1), impidiendo la transcripción de los genes estructurales. La lactosa es capaz de unirse a la proteína represora Lac I, generando un cambio conformacional que disminuye su afinidad por la región operadora. Sin embargo para que la ARN polimerasa puede transcribir libremente los genes estructurales necesita de la acción de la proteína activadora CAP. Esta proteína se puede unir al ADN

en presencia de AMPc. Las concentraciones de AMPc intracelulares varían según la disponibilidad de glucosa.

Figura 1_ El control dual del operón Lac.
 Los niveles de Glucosa y Lactosa controlan la iniciación de la transcripción del operón *Lac* por su efecto en CAP y de la proteína represora de *Lacl*, respectivamente.



1.2 _TÉCNICAS PARA EL ESTUDIO DE REGULADORES TRANSCRIPCIONALES:

Existen muchas técnicas para identificar y aislar proteínas reguladoras, los genes que regulan y las secuencias de ADN que reconocen.

1.2_ a) Ensayo de retardo en gel:

Una de las técnicas más comúnmente usada para el estudio de la unión de una proteína al ADN es el ensayo de retardo de la movilidad electroforética o EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay). Básicamente consiste en determinar cómo la unión de la proteína en estudio a un oligonucleótido que contenga la secuencia

de reconocimiento específica, retarda la migración de dicha sonda en un gel de poliacrilamida (1).

1.2_ b) Cromatografía de afinidad al ADN:

Otro método es la cromatografía de afinidad al ADN. La doble hebra de oligonucleótidos es sintetizada por métodos químicos y es inmovilizada en una matriz de agarosa. La aplicación de un extracto celular en este tipo de columna, permite identificar las proteínas que se unan específicamente a esta sonda (1).

1.2_ c) ADN footprinting:

El ADN footprinting es una técnica que permite determinar en detalle la secuencia de ADN que es reconocida por una proteína reguladora. Luego de una reacción de unión del ADN con la proteína en cuestión, se somete a una digestión con ADNasas. De esta forma, la región específica reconocida por la proteína será protegida de la digestión que luego se visualiza en una corrida en gel (1).

1.2_ d) Cristalografía de rayos X:

La técnica que nos permite obtener la estructura tridimensional de las moléculas es la cristalografía de rayos X. La cristalización es el proceso mediante el cual las moléculas se ordenan de un modo natural formando un retículo repetitivo que denominamos cristal.

En el caso de las proteínas, el experimento de cristalización comienza con una solución de proteína relativamente concentrada (entre 2 y 50 mg/ml) a la que, se le añade lentamente un solvente, con la intención de reducir la solubilidad de la proteína y generar una precipitación controlada de la misma. Si posteriormente se fuerza un incremento paulatino de concentración y se controlan las condiciones normalmente se generan diminutos núcleos cristalinos cuyo ulterior crecimiento puede dar lugar a cristales de tamaño

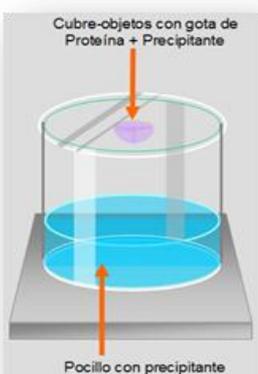


Figura 2_ Representación gráfica del método de la gota colgante.

adecuado para los experimentos de difracción (entre 0.1 y 0.5 mm) (3).

Para maximizar la posibilidad de éxito de un intento de cristalización, es necesario diseñar distintos experimentos, partiendo de diferentes concentraciones de proteína y precipitante.

El método más común para estos experimentos es el basado en la técnica de la gota colgante (Ver Figura 2).

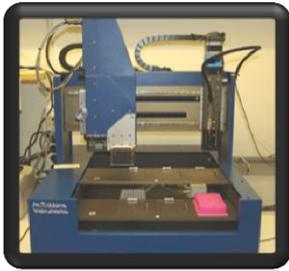


Figura 3_ Robot Art
Robbins Instruments
Crystal Phoenix

Se colocan unos pocos microlitros (1-2 μ l) de la solución de proteína en el centro de un cubre-objetos de vidrio y se le añaden 1-2 μ l de la solución del precipitante. El cubre-objetos que contiene a la gota de mezcla se invierte y con él se tapa el pocillo que contiene el agente precipitante. Este sistema cerrado evolucionará por equilibrio de vapor. Como la mezcla de proteína y precipitante en la gota está menos concentrada que la solución de precipitante en el pocillo, el agua de ésta se evaporará, uniéndose a la solución del pocillo. Como resultado de este proceso, las concentraciones de la proteína y del precipitante aumentarán lentamente en la gota, y si las condiciones son las adecuadas, se formarán cristales (4).

Los cristales crecen en la gota, según la proteína es la forma del cristal, como por ejemplo pueden tener formas romboides.

Para obtener las condiciones ideales de cristalización en tiempo reducido se han desarrollado robots de cristalización (Figura 3) que simplifican mucho el proceso manual, pudiéndose obtener 96 condiciones de cristalización diferentes en segundos.

Existen otras técnicas de cristalización de proteínas, tales como el de la gota sentada (similar al de la gota colgante), botones de diálisis, microbatch, difusión (3, 4).

La Figura 4 muestra la estructura cristalográfica de la proteína FurB reguladora del transporte de Zinc (Zinc Uptake Regulator) de *Mycobacterium tuberculosis*.

1.3 _ REGULACIÓN DE LA HOMEOSTASIS DE METALES DE TRANSICIÓN EN BACTERIAS:

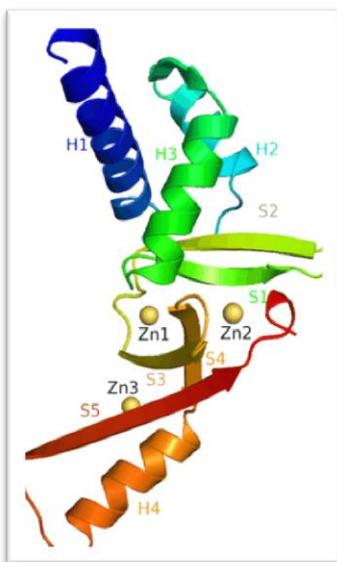


Figura 4_ Diagrama de cinta para un monómero de FurB de *M. tuberculosis* con elementos estructurales secundarios marcados.

En todos los seres vivos, los metales de transición como Fe, Mn, Zn, Co, Ni y Cu son esenciales para la vida de la célula. Son requeridos para importantes funciones, como cofactores estructurales y catalíticos de muchas y variadas enzimas. Pero de encontrarse en exceso suelen ser muy tóxicos para la célula, por lo que la concentración intracelular de los metales es finamente controlada.

La regulación de los sistemas de adquisición de metales se da a nivel de la transcripción por reguladores transcripcionales llamados metaloreguladores. Existen dos tipos principales de metaloreguladores, los que regulan la adquisición de metales (pertenecientes a las familias DtxR, Fur y NikR) y los que regulan sistemas de exportación y detoxificación de metales (pertenecientes a las familias de ArsR y MerR) (5).

En bacterias, muchos genes implicados en la adquisición de metales son reprimidos por metaloreguladores que utilizan al propio metal como co-represor. Este mecanismo le permite a la bacteria coordinar la disponibilidad del metal en cuestión según las necesidades. En altas concentraciones del metal, el represor impide la expresión de los genes de adquisición, manteniendo así la homeostasis del organismo (6).

El sistema mejor conocido de homeostasis de hierro en bacterias es el mediado por Fur (Ferric Uptake Regulator) un regulador transcripcional, que ha sido muy estudiado en diversos grupos taxonómicos como γ y β -Proteobacteria, bacilli, y cyanobacteria (7, 8). Fur fue la primera proteína de su grupo de reguladores en ser caracterizada tanto genética como bioquímicamente (9, 10). La superfamilia de proteínas Fur se compone de reguladores de metales, dentro de los cuales encontramos los que regulan el metabolismo de hierro (Fur), zinc (Zur), manganeso (Mur), níquel (Nur) o controlan la respuesta al estrés oxidativo (Per) o responden a la presencia de hemo (Irr). Como es de esperarse, en la mayoría de las bacterias encontramos varios de estos reguladores, ya que son indispensables para mantener la homeostasis celular. Por ejemplo en el genoma de *Bacillus subtilis* existen tres miembros de la familia Fur (Fur, Zur y Per) (9, 11).

Cuando la bacteria se encuentra en condiciones de riqueza de hierro, Fur interactúa con el ion ferroso, y el complejo se torna muy ávido por una secuencia conservada palindrómica de 19 pb que se conoce como caja FUR (12), y unido a ésta reprime la iniciación de la transcripción de los genes consecuentes. El análisis de expresión global en *E. coli* ha mostrado que Fur puede reprimir más de cien genes en medios ricos en hierro, muchos de ellos involucrados en la recaptación de hierro y otros en el metabolismo del mismo (13). Por otro lado, otros genes son positivamente regulados por Fur por medio de la represión de un ARN pequeño, por ejemplo bacterioferritina y de otras enzimas que contienen hierro, como fumarasa y superóxido dismutasa (13).

Se han hallado genes ortólogos a Fur en varias bacterias gram negativas y gram positivas con bajo contenido en GC (13). También se han encontrado cajas Fur delante de los genes implicados en la

adquisición de hierro en un amplio rango de bacterias, demostrando la gran dispersión que existe de este sistema (14, 15).

La interacción del complejo (Fur-Fe²⁺) con la caja Fur es un tema en estudio aún (16, 17). El primer modelo propuesto es de un dímero de Fur unido a la secuencia palindrómica de 19 pb, en el que cada monómero reconocería un lado del palíndromo.

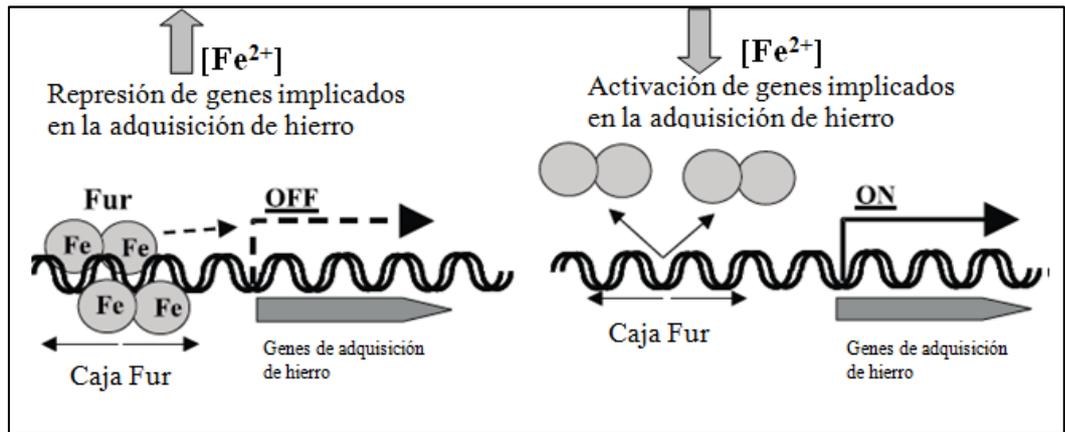


Figura 5_ Representación esquemática de la regulación mediada por Fur.

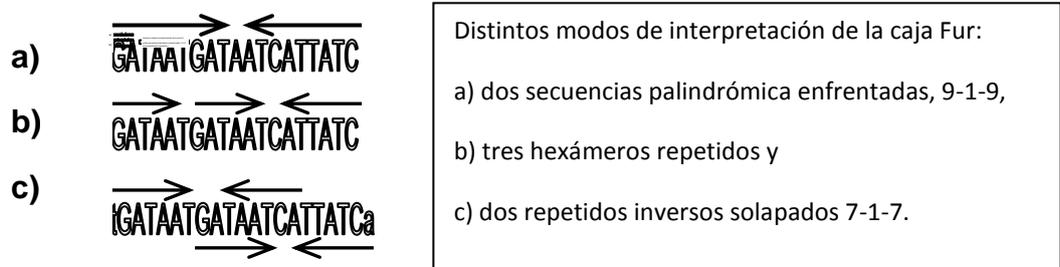


Figura 6_ Distintas interpretaciones de Fur con la caja Fur consenso.

Como se muestra en la Figura 5 y 6, aun no se ha llegado a revelar cómo es que realmente interacciona Fur con la caja Fur, y menos aún como interacciona Mur con la caja Mur.

Se han descrito las estructuras cristalográficas de Fur en *Pseudomonas aeruginosa*, y el dominio N-terminal de *E. coli* K 12,

sin embargo no se ha determinado estructuralmente como el complejo Fur-Fe²⁺ interacciona con la caja *fur* (5).

Dado el papel clave del hierro en procesos que van desde centros de reacción fotosintética en *Rhodobacter* y la fijación de N₂ en rizobios hasta los cristales de magnetita en *Magnetospirillum*, es sorprendente lo poco que se conoce sobre la regulación génica mediada por hierro en α -Proteobacterias.

En las α -Protobacterias *Rhizobium leguminosarum* y *Sinorhizobium meliloti* se ha identificado un homólogo a Fur sin embargo se ha encontrado que esta proteína no está involucrada en la regulación con la captación de hierro. En dichos rizobios, esta proteína homóloga a Fur, reprime en forma dependiente de manganeso el operón *sitABCD* que codifica para un sistema de transporte de Mn, y por eso fue llamada “Mur” (Manganeso Uptake Regulator) (18, 19). Sorprendentemente, en estudios previos realizados en *E. coli* K12 se había propuesto que el manganeso en exceso era capaz de funcionar como un co-represor de Fur, reprimiendo los genes necesarios para la adquisición del hierro (20).

1.4_ MUR: EL REGULADOR DEL TRANSPORTE DE MANGANESO EN RIZOBIOS:

Al igual que otros metales de transición, el manganeso también es esencial para la actividad de muchas enzimas. Por lo cual, tanto su transporte como regulación son críticos en la vida de los organismos. La mayoría de las bacterias expresan al menos uno de los sistemas principales para el transporte de Mn²⁺; el transportador de iones divalente MntH de tipo NRAMP o el transportador de Mn²⁺ MntABC de tipo ABC. Un número menor de

microorganismos utiliza un tercer sistema conocido como ATPasa tipo P para el transporte de este catión.

En bacterias los transportadores de tipo NRAMP caracterizados hasta ahora tienen afinidades mucho mayores por el Mn^{2+} que por otros metales divalentes por lo que fueron designados MntH (por *Mn transport, H⁺ dependent*) (21, 22, 23).

En base a homologías entre las proteínas de unión a metal, a las mediciones de transporte de iones marcados y al fenotipo de mutantes en estos sistemas, Claverys et al, (24), propusieron la existencia de una familia de transportadores de tipo ABC exclusivamente dedicada al transporte de manganeso y zinc.

Cada transportador está compuesto por una lipoproteína anclada a la cara extracelular de la membrana citoplásmica, proteínas de unión a ATP citoplásmicas y proteínas integrales de membrana que median el transporte del ión. En bacterias Gram-negativas la lipoproteína es remplazada por una proteína periplásmica de unión al catión (1) (Ver Anexo 5.6).

Como ya mencionamos se han renombrado las proteínas homologas a Fur presentes en *S. meliloti* (25), en *R. leguminosarum* y *Agrobacterium tumefaciens* (26, 27, 28) como Mur, porque regulan el operón *sitABCD* (también denominado como *mntABCD*), reprimiendo su transcripción en condiciones de suficiencia de manganeso. Sin embargo, cuando esta proteína se expresa en *E. coli* puede responder a la presencia de Fe. La observación de que Mur es una proteína que puede responder a Fe^{2+} en *E. coli* y a Mn^{2+} en *R. leguminosarum* resalta la importancia del medio intracelular en el control de la respuesta a metales de cada célula (29). En *Neisseria gonorrhoeae* se ha observado que un homólogo a Fur regula la expresión del transportador MntABCD en respuesta a Mn^{2+} . Aunque se ha nombrado PerR (Peroxide response regulator)

a esta proteína debido a que la mutante es más resistente a la muerte por H₂O₂ que la cepa salvaje y que otros miembros de esta familia, ningún gen implicado directamente en la respuesta a estrés oxidativo se ve afectado. El fenotipo de mayor resistencia al H₂O₂ podría deberse a que la mutante acumula mayores niveles intracelulares de Mn²⁺. Por lo tanto se ha sugerido que este regulador también debería ser llamado Mur (6).

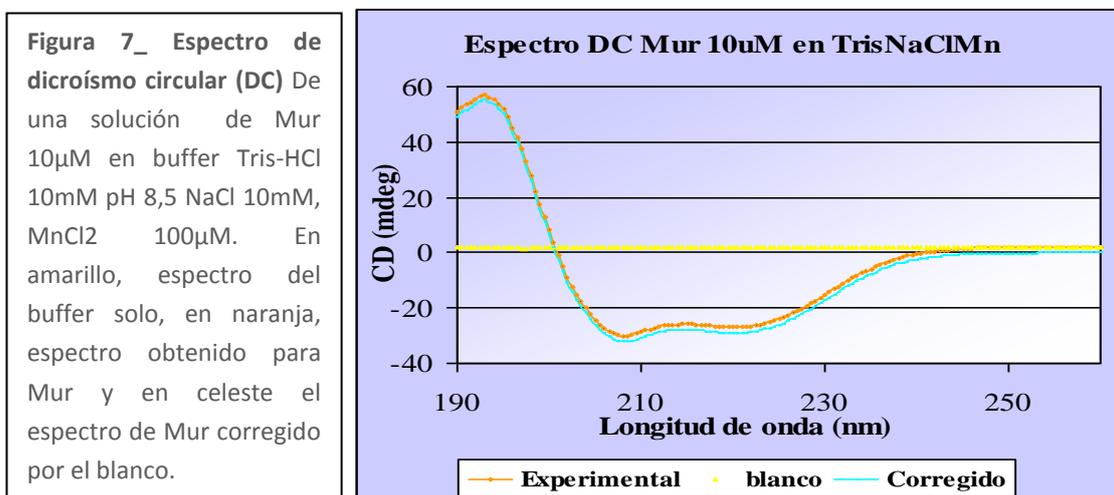
Algunos autores como Horsburgh et al 2002, postulan que las bacterias utilizan al Mn²⁺ en complejos con ligandos celulares como un mecanismo basal de defensa frente al estrés oxidativo. Este mecanismo permitiría a las bacterias hacer un uso más eficiente de sus recursos, minimizando el gasto energético que significa la síntesis de un regulón de defensa.

1.5_ MUR EN S. MELILOTI:

Mediante una mutagénesis con transposón se obtuvieron dos mutantes de *S. meliloti* 242 incapaces de crecer en un medio rico suplementado con el quelante EDDHA. Este fenotipo no pudo ser revertido por el agregado de distintas fuentes de hierro tales como compuestos hemínicos o sideróforos. Los genes interrumpidos fueron identificados como *sitB* y *sitD* los cuales forman parte de un operón que codifica para un transportador tipo ABC para metales en varias bacterias Gram-negativas. En este trabajo se compararon los fenotipos de estas mutantes con las de otras mutantes defectuosas en la adquisición de hierro mediada por sideróforos. Los resultados obtenidos muestran que en *S. meliloti* el operón *sitABCD* es importante para la adquisición de manganeso cuando este metal es escaso (30).

Platero et al 2004 (28), analizaron el fenotipo de una mutante *fur* de *S. meliloti*. Demostraron que la expresión de algunas funciones implicadas en el transporte de alta afinidad de hierro tales como la producción de sideróforos y de algunas proteínas de membrana externa, responden a hierro pero de forma independiente de Fur. También hallaron que en el mutante *fur*, el control por manganeso de la expresión del transportador MntABCD se pierde. Los datos que presentan muestran una nueva función para un miembro de la familia Fur en bacterias que es la de regular la expresión génica en respuesta a manganeso.

En trabajos posteriores se analizó la unión de Mur a la región promotora del gen *mntA* de *S. meliloti*. Se demostró que en presencia de manganeso, Mur se une con alta afinidad a esta región promotora. Los resultados indican que la estequiometría de unión es de dos monómeros o un dímero de proteína por molécula de ADN. La secuencia a la cual se une Mur fue identificada por ensayos de protección frente a la ADNasa (*DNasa I footprinting analysis*). Esta región cubre unos 30 pares de bases y contiene la secuencia palindrómica identificada previamente como una posible caja Fur. Sin embargo Mur reconoce con baja afinidad una caja Fur clásica. Los datos obtenidos indican que Mur es capaz de responder a concentraciones fisiológicas de manganeso (31).



Estudios estructurales de la proteína Mur de *S. meliloti* mediante dicroísmo circular demuestran que Mur tiene un alto contenido en alfa hélices (Figura 7). El contenido de alfa hélices teórico hallados, es similar al calculado para la proteína Fur_{PA} (Fur de *Pseudomonas aeruginosa*) de acuerdo a los datos cristalográficos (32). El contenido, tamaño y posición relativa de las hélices y hojas están conservados entre Mur y Fur_{PA} lo que les permitió construir un modelo tridimensional para la proteína Mur que abarca una región comprendida entre los aminoácidos 15 al 141 de los 142 aminoácidos que forman la proteína Mur.

En otros estudios se ha propuesto un modelo en el cual la formación de una alfa hélice en el extremo N-terminal de Fur_{EC} (Fur en *E. coli*), sería fundamental para su actividad (33). Según este modelo la unión del metal al sitio regulatorio provocaría cambios conformacionales que estabilizarían la formación de esta hélice, optimizando el reconocimiento e interacción de la proteína con el ADN. Los primeros 17 aminoácidos de la proteína Mur_{SM} (Mur en *S. meliloti*) podrían formar una hélice alfa, aunque de mayor tamaño que las hélices observadas en Fur_{PA} y Fur_{EC}. Estas diferencias podrían explicar la selectividad de las proteínas por el ADN. Adicionalmente entre estos 17 aminoácidos hay 4 que podrían tener la capacidad de interactuar con el ADN (R7, L11, L15 y R16), apoyando la hipótesis de que esta hélice alfa podría estar implicada en el reconocimiento del ADN.

En la búsqueda de condiciones apropiadas para la cristalización, se estudió el efecto del agregado de metales divalentes y agentes reductores a la solución proteica (5). Mediante ensayos de DLS (dynamic light scattering) se determinó que tanto el agregado de Mn²⁺ como DTT estimulan la formación de una única especie molecular. El estado de oligomerización de la proteína en solución se analizó por cromatografía de exclusión molecular y SDS-PAGE,

encontrándose que en condiciones no reductoras, Mur se encuentra como monómero y como dímero; el agregado de β -mercaptoetanol a la muestra lleva a toda la proteína a su formación monomérica. Por ensayos de gel filtración y determinación del peso molecular encontraron que la especie mayoritaria en las condiciones del ensayo tiene un peso molecular de 50kDa, que corresponde a un trímero de Mur (5).

Los ensayos realizados por Platero (5) no permiten comprobar si la formación de puentes disulfuro ocurre *in vivo*, siendo éste un posible mecanismo para regular la actividad de Mur o si es un efecto de la oxidación espontánea de su única cisteína posterior a la purificación. Aunque en trabajos previos demuestran que en presencia de DTT y Mn^{2+} , la proteína Mur se une al ADN, por lo que no precisaría del dímero formado por puentes disulfuro para interactuar con él.

HIPÓTESIS DE TRABAJO: En éste trabajo se busca comprobar que nuestra proteína problema, Mur, tenga una buena afinidad por una nueva sonda (ADN blanco), con mayor termoestabilidad que la utilizada en trabajos previos (5). Y de ser de esa forma producir una concentración elevada de la proteína, que permita realizar ensayos de co-cristalización del complejo en cuestión.

EL OBJETIVO de este trabajo de investigación es poner a punto un método de producción y purificación de la proteína Mur, con el fin de realizar ensayos de cristalización del complejo Mur-ADN. La obtención de esta estructura cristalográfica aportará información valiosa para comprender las bases moleculares del mecanismo de acción de esta familia de reguladores.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1_BACTERIAS Y PLÁSMIDOS:

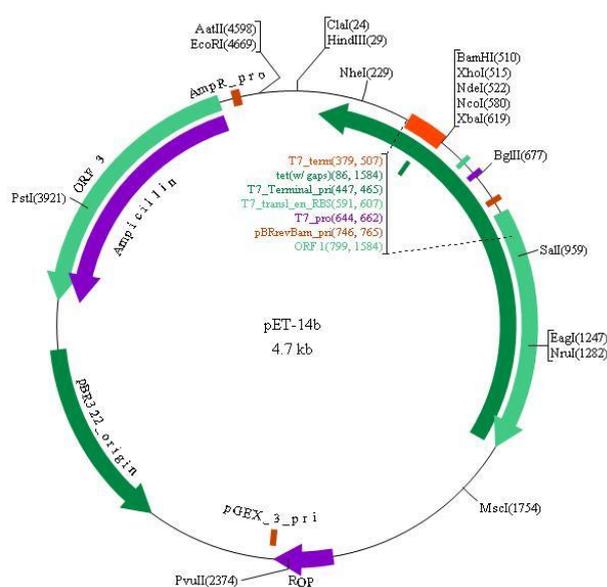


Figura 8_ Mapa del plásmido de expresión pET-14b.

La secuencia codificante de la proteína Mur de *S. meliloti* se clonó entre los cortes de las enzimas de restricción *NdeI* y *BamHI*.

En este trabajo se utilizó el plásmido pET-MUR que posee clonado en el vector de expresión pET14b una copia del gen *mur* de *S. meliloti* 1021 (Figura 8). La cepa *E. coli* DH5 α se utilizó como reservorio del plásmido y para técnicas de biología molecular generales. La cepa *E. coli* BL21 (DE3) (pLysS) conteniendo el pET-MUR se utilizó para la sobreexpresión de la proteína. Ambas cepas se crecieron en medio LB (Anexo 5.1) y se incubaron a 37°C durante 16 horas. El medio 2xYT (Anexo 5.1) se utilizó para los ensayos de expresión de proteína. Los antibióticos utilizados fueron ampicilina (Amp) 50 μ g/ml y cloramfenicol (Chm) 25 μ g/ml.

Ambas cepas fueron conservadas en glicerol 25% (v/v) a -80°C.

2.2_ OBTENCIÓN DE UNA CEPA DE BL21 pETMUR :

Células de *E. coli* DH5 α químicamente competentes se transformaron mediante shock térmico, con el plásmido pET-MUR proveniente de una solución stock disponible en el laboratorio conservada a -20°C. En el Anexo 5.3 se describe el protocolo para la preparación de células químicamente competentes y para la transformación de las mismas.

Dos colonias resistentes a ampicilina (resistencia otorgada por el plásmido) se repicaron a LB líquido e incubaron por 16 horas a 37°C. Una alícuota del cultivo fue guardada a -20°C en glicerol 25% (v/v) y el resto se utilizó para la purificación del plásmido pET-Mur mediante el método de lisis alcalina (34). Para confirmar la identidad del plásmido obtenido se realizó un perfil de digestión del mismo con las enzimas *PstI* y *SphI* (Promega).

Una vez confirmada la identidad de pETMUR, se usaron 50 ng del mismo para transformar células de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS quimio-competentes.

2.3_ EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA MUR RECOMBINANTE EN E. COLI:

Obtenida la cepa *E. coli* BL21 (DE3)(pLysS) pET-MUR, se repicó (a partir de una suspensión bacteriana almacenada a -20°C en glicerol 25%) en medio LB sólido (18 g/l de agar) con Amp 100 µg/ml y Chm 25 µg/ml. Se inocularon 5ml de LB Amp Chm a partir de una colonia y el cultivo se creció toda la noche (ON) a 37°C con agitación. Los 5 ml de cultivo se usaron para inocular 1L de 2x YT pre_entibiado a 37°C contenido en un frasco de 2L de capacidad con el agregado de 25µg/ml de Chm, 50µg/ml de Amp, 50µM de MnCl₂, 50µM de FeCl₃, 1µM de ZnCl₂.

El cultivo se creció a 37°C con agitación orbital a 200 rpm durante 2 a 3 hrs hasta alcanzar una DO (620nm) entre 0,5-0,7. Se colocó el matraz 15 min en hielo. Se agregaron 20 ml de etanol 95% por litro de cultivo y se indujo la expresión con IPTG 0,5 mM (concentración final) durante 4 hrs manteniendo el cultivo a 20°C con agitación. Las células se centrifugaron 15 min a 7500 rpm a 4°C, se lavaron

con tampón de unión (Anexo 5.2), descartando el sobrenadante y se guardaron a -80°C hasta la preparación del extracto.

2.4_ PURIFICACIÓN DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE 6xHis-MUR:

Las células guardadas a -80°C se resuspendieron en 15 ml de buffer de unión conteniendo 150 µl de PMSF 100 mM por cada cinco gramos de células y 150 µl de Triton X100 10%. Para romper las células, se pasaron dos veces por una prensa de French previamente enfriada a 4°C a una presión de 12000psi. El lisado celular obtenido (de aspecto traslúcido) se centrifugó 30 minutos a 12000xg a 4°C. El sobrenadante se traspasó a un tubo limpio, se volvió a centrifugar en las mismas condiciones y se guardó el sobrenadante obtenido (conteniendo la fracción soluble del lisado).

Se preparó la columna de purificación, colocando 4 ml de una suspensión al 50% de agarosa Ni-NTA (Qiagen) en una columna de 10 ml de capacidad con la salida cerrada. La columna se dejó escurrir y se lavó con 15 ml de tampón de unión.

El lisado fue depurado en filtros con membranas de poro de 45 µm, previamente a añadir 6 ml del mismo a la columna. Una vez agregado se incubó con agitación a 4°C durante 60 minutos. Se colocó la columna en un soporte, se dejó decantar el gel y se colectó la fracción no retenida en la resina (FT). Luego se lavó tres veces con 10 ml de tampón de lavado de concentración 20 mM de imidazol y posteriormente dos veces con 10 ml de tampón de lavado son 50 mM de imidazol. Se eluyó la proteína aplicando 15 ml de tampón de elución, el cual contiene 250 mM de imidazol. Estas fracciones se juntaron de a 1,5 ml, individualmente en tubos

ependorf, mantenidos en hielo. Para reciclar la columna se lavó con 10 ml de tampón conteniendo 500mM de imidazol.

2.5_ DIGESTIÓN CON TROMBINA:

La Trombina es una enzima que nos permite deshacernos de la colita de histidinas, antes usada para purificar la proteína en la columna, y de ahora en más requerimos la proteína nativa.

Para cambiar el buffer de la solución que contiene la proteína 6xHis-Mur, con una concentración elevada de imidazol, el cual puede inhibir la actividad de la enzima, se usaron columnas Vivaspin de 15 ml de 10000 Da de diámetro de poro. Centrifugando 45 min a 3000xg. Se lavaron 3 veces con buffer Tris-HCl 10 mM, pH 7. Luego de determinar la concentración de proteínas, se incubaron toda la noche a 4°C 10 mg de proteína con 250 µl de trombina-agarosa (Sigma), dentro de una columna de 10 ml. Se dejó decantar la agarosa en la columna y se eluyó la proteína digerida. Se ajustó la concentración de imidazol a 20 mM e incubó el eluido con 1 ml de resina Ni-NTA durante una hora a 4°C con agitación. Se juntó la fracción no unida así como los eluidos correspondientes a diez lavados con tampón de lavado 20 mM de imidazol o hasta que no saliera más proteína, juzgando por medidas de absorbancia a 277 nm. Se eluyó la fracción que queda adsorbida (colitas de histidina y proteína no digerida) usando tampón de elución con 250 mM de imidazol.

Las muestras con proteína se guardaron a -20°C o -80°C, en una concentración de 1 mg/ml en tampón Tris 10mM, pH 7, NaCl 10 mM, Glicerol 10%, en fracciones de 1ml.

2.6_ ANÁLISIS POR ELECTROFORESIS Y DETERMINACIÓN DE LA PUREZA DE LA PROTEÍNA:

La evaluación de la pureza de las diferentes fracciones proteicas fue realizada mediante electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida, al 8% el concentrador y al 15% el separador (SDS-PAGE) (ver Anexo 5.5).

La visualización de las bandas de proteínas se realizó mediante teñido con Azul Brillante de Coomassie (ABC) (Anexo 5.4).

La concentración proteica se determinó mediante BCA (sigma) utilizando sero albúmina bovina como proteína standard.

2.7_ ENSAYOS DE RETARDO EN GEL:

Las sondas utilizadas fueron la de 30 pb usada en estudios previos (Raúl Platero et al, 2007) y la nueva sonda que consta de 36 pb, ambas se pidieron sintetizadas como oligonucleótidos simple cadena en IDT (integrated DNA technologies). La sonda de 36 pb es la sonda de 30 pb con el agregado de 3 pares de bases en cada extremo.

Se disolvieron los oligos en buffer STE (10 mM Tris pH 8.0, 50 mM NaCl, 1 mM EDTA) a una concentración final de 500 mM. Para obtener la sonda doble hebra se mezclaron los dos oligos complementarios a 5 mM cada uno. La mezcla de reacción se incubó en un termoblock a 94º C durante cuatro minutos y luego se dejó bajar muy lentamente la temperatura hasta los 40º C. En ese momento se mantuvo la mezcla a temperatura ambiente hasta ser

utilizada. La sonda se conservó a -20°C . Para corroborar la calidad de la sonda obtenida se corrió un gel de poliacrilamida no desnaturizante, con la sonda y los oligos.

La reacción de EMSA se realizó en un volumen final de $20\ \mu\text{l}$ conteniendo Tris-HCl $1\ \text{mM}$, pH 7.5, DTT $0.1\ \text{mM}$, NP-40 0.01% (v/v), KCl $4\ \text{mM}$, MgCl_2 $0.1\ \text{mM}$, MnCl_2 $1\ \text{mM}$, ADN $0.25\ \mu\text{M}$ y Mur $1\ \mu\text{M}$. Luego se incubó por 30 min a temperatura ambiente. También se hicieron reacciones control de la sonda sola y de la proteína sola. Pasados los 30 min de reacción se agregaron $4\ \mu\text{l}$ de buffer de carga 6X y se sembraron en un gel de espesor $1\ \text{mm}$ y $8\ \%$ de poliacrilamida en buffer Tris-Borato 0.5X, precorrido a 80 volts durante una hora.

Para observar el resultado de la corrida se utilizó tinción con plata: posterior a la corrida se sumergió el gel en solución fijadora (Etanol $9,5\%$, ácido acético $0,5\%$) por 5 min con agitación. Se removió el fijador y colocó la solución de plata (AgNO_3 $0,2\%$ en agua) por unos 30 min. Luego se reveló en NaOH 3% agregando en ese momento $250\ \mu\text{l}$ de formaldehído por cada $75\ \text{ml}$. Se agitó fuertemente por unos instantes para evitar que el exceso de plata remanente precipite sobre el gel, y luego se agitó moderadamente hasta observar las bandas. Se lavó con agua y se colocó nuevamente en fijador por 5 min.

2.8_ ENSAYOS DE CO-CRISTALIZACIÓN:

Para obtener los cristales se realizó una mezcla de reacción conteniendo: una concentración de $300\ \mu\text{M}$ de Mur, $150\ \mu\text{M}$ de la sonda de 36 pb, en buffer Tris-HCl $10\ \text{mM}$, pH 7,0, NaCl $10\ \text{mM}$,

MnCl₂ 1 mM (cantidad necesaria para 3ml de volumen final). Se incubó por 30 min a temperatura ambiente.

Dicha mezcla se aplicó a una columna de FPLC Superdex 75 16/60 (realizado en la Unidad de Cristalografía de proteínas del Instituto Pasteur de Montevideo). Se recolectaron las fracciones con picos de absorción a 280nm. Los picos obtenidos se concentraron en columnas de VIVASPIN de 10 kDa de corte. Luego se midió la concentración por absorción a 277nm en nanodrop. Se confirmó la presencia de Mur mediante espectrometría de masas MALDI-TOF.

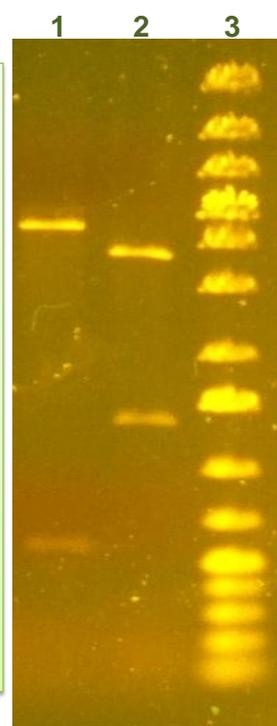
Una vez purificado el complejo Mur-sonda de 36 pb en presencia de Mn²⁺, se procedió a la búsqueda de las condiciones ideales para la obtención de cristales mediante un screening robótico usando el HoneyBee 963 (Genomic Solutions), por la técnica de difusión de vapor y el método de sitting-drop, con gotas de 0,2 µl de reservorio y 0,2 µl de proteína. Se utilizaron los kits comerciales de Qiagen JCSG Core Suite I, II, III y IV (384 condiciones diferentes). Los mejores cristales fueron obtenidos en C3 del JCSG IV (0.17M acetato de sodio; 0.085M Tris-HCl pH 8.5; 25.5% PEG 4000; 15% glicerol). Estas condiciones fueron optimizadas manualmente usando nuevamente la técnica de difusión de vapor y el método de hanging-drop, con gotas de 1,5 µl de reservorio y 1,5 µl de proteína en placa VDX. Los cristales obtenidos se caracterizaron en un generador de rayos X Micromax 007-HF.

3_RESULTADOS

3.1_IDENTIFICACIÓN DEL PLÁSMIDO RECOMBINANTE Y OBTENCIÓN DE UNA NUEVA CEPA SOBREPDUCTORA DE MUR:

Con el fin de verificar la presencia del inserto en el plásmido, se digirió el mismo con las enzimas de restricción *PstI* y *SphI* (Figura 9). El perfil de restricción realizado con la enzima *PstI* dio como resultado la obtención de un fragmento mayor de aproximadamente 3700 pb (correspondiente al plásmido) y uno menor de 1300 pb (correspondiente al inserto y parte del plásmido). Paralelamente la digestión con la enzima *SphI*, resultó en fragmentos de aproximadamente 585 (correspondiente al inserto) y 4420 pb (correspondiente al plásmido).

Figura 9_ Electroforesis en gel de agarosa 0.8%, donde se muestran los perfiles de restricción del plásmido pET-Mur con las enzimas *PstI* y *SphI* respectivamente. El orden de sembrado del gel fue el siguiente: carril 1: digestión con *PstI* ; carril 2: digestión con *SphI*; carril 3: marcador de peso molecular 1kbDNA ladder (Fermentas).



Una vez confirmada la presencia de la secuencia codificante de Mur en el plásmido se procedió a transformar con dicho plásmido células *E. coli* DH5 α competentes para utilizarlas como reservorio de la construcción. Las colonias transformantes fueron seleccionadas en un medio suplementado con ampicilina (50 μ g/ml) resistencia codificada en el plásmido. Se realizó la extracción de ADN plasmídico mediante el método de lisis alcalina (Anexo 5.3), y posteriormente se transformó la construcción pET-Mur en la cepa optimizada para la expresión de proteínas recombinantes *E. coli* BL21 (DE3) pLysS.

3.2_ INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE 6xHis-MUR:

Para sobreexpresar la proteína recombinante se seleccionaron dos colonias transformantes *E. coli* BL21 pET-Mur. Las mismas fueron crecidas en 5 ml de medio LB Amp 50 μ g/ml, Chm 25 μ g/ml. Pasadas 24 horas de incubación a 30 $^{\circ}$ C con agitación, se inocularon esos 5 ml en 1 l de medio 2xYT. Luego se centrifugó en 4 tubos estériles de 250 ml y se guardó el pellet seco de células a -80 $^{\circ}$ C, hasta ser utilizado.

Seguimiento de la inducción con IPTG:

Se procedió a la inducción de la expresión mediante el agregado de IPTG (concentración final 0,5 mM). Se tomaron alícuotas de 1 ml de cultivo al momento y 4 horas después del agregado de IPTG. Se centrifugaron y se descartó el sobrenadante. Luego se resuspendió el pellet en 50 μ l de agua y 50 μ l de buffer de muestra 2x. Seguidamente se procedió al análisis de proteínas totales mediante SDS-PAGE. Como se esperaba, no se observó sobreexpresión de la

proteína recombinante a tiempo cero de la inducción, mientras que para la toma realizada a las 4 horas se observó claramente la sobreexpresión de la proteína, evidenciada por la aparición de una banda de significativa intensidad correspondiente al peso molecular esperado.

3.3_ PURIFICACIÓN DE 6xHIS-MUR:

Con el fin de purificar la proteína recombinante se procedió a resuspender el pellet de células que se describe anteriormente (Raúl Platero et al, 2007). Se tomaron 6 ml de extracto celular previamente lisado, centrifugado y filtrado, y se aplicaron en una columna de Ni⁺²-NTA y se lavó por gradiente de imidazol 20 mM a 50 mM, y eluyó con imidazol 250 mM (ver Materiales y Métodos 2.4). Los resultados del SDS-PAGE de las fracciones obtenidas después de la expresión y purificación de la proteína Mur de *S. meliloti* 1021 son mostrados en la Figura 10. El análisis del perfil electroforético mostró una banda de aproximadamente 18 kDa, que concuerda con el peso molecular que tendría nuestra proteína junto con la colita de histidinas (Raúl Platero et al, 2007). El gel revela los buenos resultados de éste método de purificación, con una banda muy intensa y según se ve en el gel aparentemente pura. También se aprecia en la Figura 10b que al usar una columna reciclada se obtiene una purificación menos efectiva, al parecer la proteína se une menos fuertemente que en el gel fresco (ya que en los dos geles se utilizó el mismo extracto celular) obteniéndose bandas de menor intensidad. Quizás sea debido a pérdida de sitios activos del gel u obstrucción de los mismos por impurezas no eliminadas en el lavado del gel.

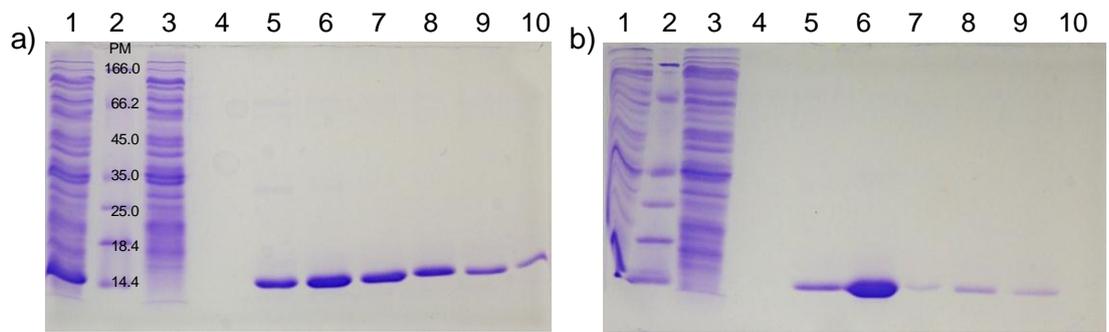


Figura 10_ Purificación de Mur-His por cromatografía en columna de Ni-NTA. Análisis mediante SDS-PAGE (gel de poliacrilamida al 15%).

Los dos geles fueron contruidos con fracciones de distintas columnas. Y fueron sembrados ambos de la siguiente manera: carril 1: Lavado uno; carril 2: marcador de peso molecular; carril 3: FT; carril4: lavado cinco; carril 5: primer eluido; carril 8: eluido cinco; carril 9: eluido 7; carril 10: eluido nueve. Los carriles 6 y 7 para la figura a contienen los eluidos tres y cuatro respectivamente. Y los carriles 6 y 7 de la figura b contienen los eluidos dos y tres respectivamente.

3.4_ DIGESTIÓN CON TROMBINA:

Para eliminar la cola de histidinas de la proteína recombinante se utiliza la digestión con trombina, como ya mencionamos se debió eliminar el imidazol, ya que este puede inhibir la actividad de la trombina. En este paso pusimos a punto el protocolo para trabajar con las columnas de Vivaspín (un método de diálisis por centrifugación en columna con membrana de corte de 10 kDa). Este método nos ahorra tiempo, ya que la diálisis común sería realizada por toda la noche.

Luego de varios intentos se llegó a la aproximación de que cada centrifugado requería de 45 minutos aproximadamente a 10000rpm. Decimos aproximadamente debido a que con los sucesivos lavados notamos que las columnas de VIVASPÍN retenían más volumen que el anterior lavado, lo cual no nos permitió determinar un tiempo justo de uso de la columna nueva. Cuando se probó con columnas que habían sido previamente usadas, y conservadas en heladera, las mismas dejaban pasar toda la proteína por sus poros, por lo cual concluimos que membranas

previamente reusadas no podían reciclarse porque los poros pierden sus diámetros y la proteína queda en el percolado (FT).

Para obtener Mur en estado nativo, se digirió la proteína con trombina, con el propósito de quitarle la cola de histidinas que fue utilizada para la purificación. Para eliminar los 250 mM de imidazol del buffer de elución se realizaron lavados con buffer tris-HCl 10 mM, pH 7, NaCl 10 mM, Glicerol 10%, en columna de Vivaspin. Este lavado también nos sirvió para concentrar la proteína.

La concentración fue determinada por el método del ácido bicinconínico (BCA). En la Figura 11 se puede ver la curva de calibración obtenida con concentraciones crecientes de la proteína seroalbúmina (BSA).

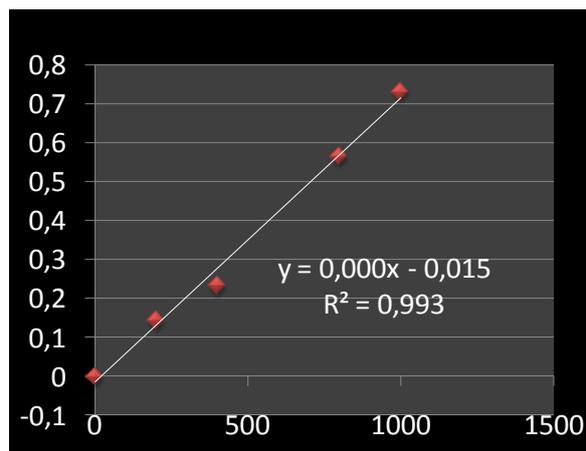


Figura 11_ Curva de calibración para conocer la concentración de Mur-His, mediante el método de BCA.

Se muestra la ecuación de la recta, de donde se interpola el valor de absorbancia obtenido para la muestra correspondiente a Mur (despejando así el valor de "x" que corresponde a la abscisa que representa la concentración), y de esta manera se conoce la concentración de la proteína.

La concentración de 6xHis-Mur fue de aproximadamente 7mg/ml. En purificaciones posteriores la concentración fue similar, no llegando al objetivo de obtener 10 mg/ml en ninguna de las ocasiones.

Una vez digerida Mur con Trombina se aplicó nuevamente en una columna de Ni-NTA, solo que en este caso se esperaba que la proteína saliera en los lavados, ya que luego de la digestión con trombina se eliminó la colita de histidinas que es el motivo por el cual Mur-His era retenida en la columna. Y la otra diferencia es que

en éste caso se usó una columna de Ni-NTA de un ml, por el mismo motivo de que no esperamos que la proteína sea retenida, no se requieren los mismos sitios activos en el gel.

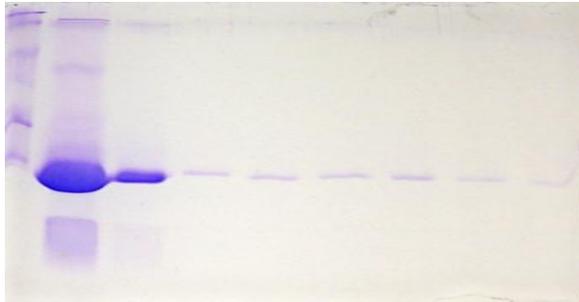


Figura 12_ Purificación de Mur por cromatografía en columna de Ni-NTA. Análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%.
Al remover la colita de Histidinas (por digestión con trombina) la proteína ya no se une a esta columna, por lo que se espera colectarla en las primeras fracciones de la columna.
El gel fue sembrado de la siguiente manera: carril 1: PM; carril 2: el FT; carril 3 al 10 fracciones de los eluidos correspondientes a los sucesivos lavados de número impar.

Viendo la Figura 12 se ve que la proteína digerida con trombina efectivamente no se retuvo en la columna, colectándose en el percolado (carril 2) y en los eluidos posteriores.

3.5_ SONDA NUEVA VS SONDA VIEJA:

Con el fin de obtener cristales de mejor calidad se diseñó una nueva sonda de ADN agregándose tres pares de bases en ambos extremos de la sonda de 30 pb utilizada en trabajos anteriores (5'CTAGTTGCAAATGCTTCTCATTGCATTGA3'). La estabilización térmica del oligo de ADN es necesaria para evitar factores que afecten la interacción represor-operador debidos a la longitud muy corta de la molécula de ADN. Las hebras cortas pueden generar: 1) un alto contenido de una sola hebra de ADN en equilibrio con el ADN de doble hebra; 2) "deshilachado" (fraying) de los extremos del ADN; 3) la pérdida de estructuras no-B reconocidas por el represor y específicas para la secuencia dada del operador. Estos factores afectan por igual la homogeneidad de la mezcla, y por lo tanto, la cristalización del ADN.

En la Figura 13 se muestra la región promotora del operón *sitABCD* de *S. meliloti* 1021 donde se marca la sonda del trabajo de Platero et al 2007.

Figura 13_ Pomotor del operón sit ABCD de *S. meliloti* 1021, señalado en gris y en rojo el codón de iniciación .

CACCTTTTGGAAATAGCTAGTTGCAAATGCTTCTCATTG
 CATTGACTTATGCAGACCATTTCGCCTACCCATATTATGGT
 TCGCAAAGAGGAGAGCCGGATGATCCATCCAACGAGGC
 GCATGATCGTGGCGGCAGCAGCGGCGATGGCTGCTCTA
 TCGCTCATGCCGGCG

En la Figura 14 se muestra el mapa realizado para observar la termoestabilidad de la región del genoma del promotor *sirABCD*. Dicho mapa muestra una clásica marca termodinámica (melting loop) de una secuencia de un promotor transcripcional, con dos límites termodinámicos fuertes que delimitan una secuencia de 75 pb inestable del promotor transcripcional. La sonda de 30 pb de ADN corresponde a la parte más inestable del melting loop.

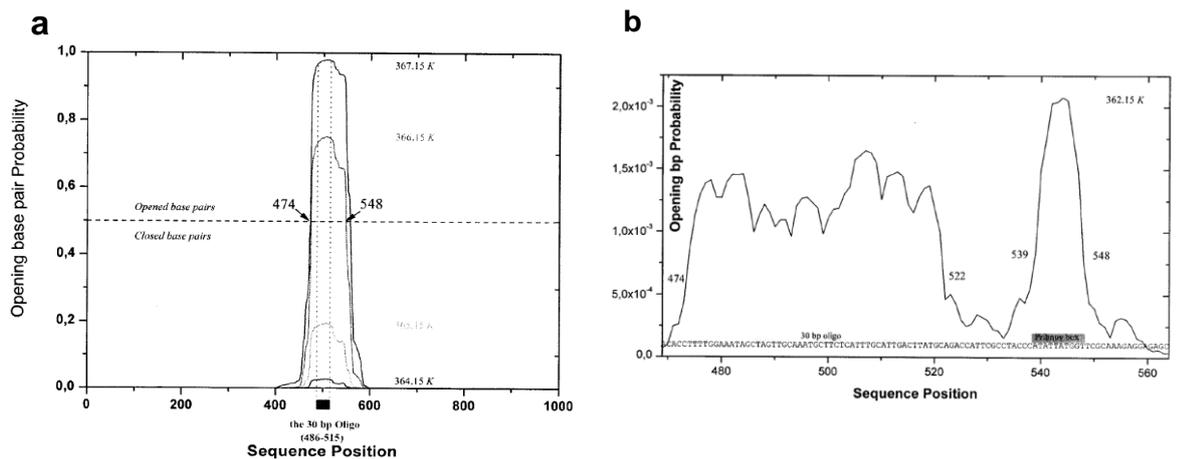


Figura 14_ Mapa de estabilidad térmica.

El mapa es realizado a diferentes temperaturas, se trabajó con una secuencia de 1000 pb. La figura a) muestra la probabilidad de apertura del par de base en función de la secuencia. La figura b) es la parte aumentada del pico, sección de la curva que nos compete.

En base a dichos análisis decidimos probar una nueva sonda agregando 3 pb en el extremo 5' (GCC) y 3 pb en el extremo 3' (CCC) a la sonda de 30 pb (Figura 15). Dicha modificación garantiza una mayor estabilidad térmica del oligo.

5'-GCCCTAGTTGCAAATGCTTCTCATTGACCC-3'
3'-CGGGATCAACGTTTACGAAGAGTAAACGTAACGGG-5'

Figura 15_ Secuencia de bases de la nueva sonda de 36 pb.

Aquí se muestra la sonda de 30 pb y en negrita se resaltan las grampas seleccionados para agregarle a la vieja sonda, formando así la de 36 pb y con ello logrando una mayor termo estabilidad del oligo. (Con un ΔT_m de 7.8°C).

3.6_GEL DE RETARDO (EMSA):

El ensayo de retardo en la corrida electroforética o EMSA por sus iniciales en inglés (Electrophoretic Mobility Shift Assay) es una técnica utilizada para investigar las interacciones entre las proteínas y el ADN o el ARN. La técnica se basa en una corrida electroforética de fragmentos de ADN o ARN marcados y la presencia de extractos celulares o proteínas purificadas. El ensayo básico para el ADN consiste en un carril solo con el fragmento de ADN de interés marcado, un segundo carril con el mismo fragmento de ADN más las proteínas con supuesta interacción con esa secuencia. Un fragmento de ADN interaccionando con proteínas tiende a tener menor movilidad electroforética, ya que hay un mayor impedimento estérico al estar las dos macromoléculas unidas, por lo tanto se debería ver retrasado en el gel.

Se sabe de antemano que Mur se une a la sonda de 30 pb. En este trabajo probamos la unión de Mur a la nueva sonda de 36 pb

(5'GCCCTAGTTGCAAATGCTTCTCATTTCATTGACCC3'). Si esta sonda funciona nos garantiza una mayor estabilidad del complejo para los futuros ensayos de cristalización.

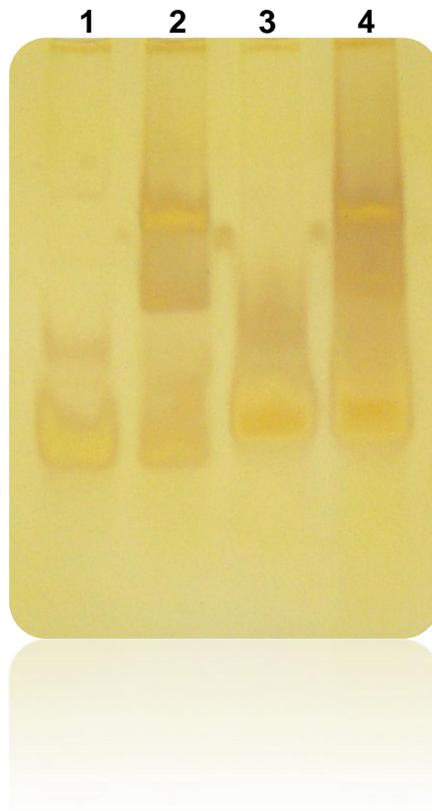


Figura 16: Retardo en gel de acrilamida al 8% preparado en tampón Tris-Borato pH 7.0 (TB 1X).

Con la finalidad de saber si Mur tenía afinidad por la nueva sonda de 36 pb, se sembraron los 2 primeros carriles con la sonda de 30 pb (“vieja”), sin y con proteína respectivamente. En los siguientes carriles, el 3 y 4, a la nueva sonda sin y con proteína respectivamente. No solo se deduce que la proteína tiene muy buena afinidad por la nueva sonda, sino también se observa que el frente de corrida (Rf) es menor en este caso, tanto para la sonda libre como para el complejo, como era de esperarse por las bases agregadas a la secuencia.

En la Figura 16 se muestra un EMSA, donde se observa el retardo producido por la proteína, tanto en la nueva sonda, como en la anterior (de 30 pb, de la cual se conocía la especificidad de la proteína por ella). Esto demuestra que los tres pares de bases agregados a cada lado de la sonda vieja (que da como resultado la nueva sonda de 36 pb) no afectan la afinidad de la proteína por el promotor. Comprobado esto en las sucesivas purificaciones, se procedió a intentar obtener los cristales utilizando esta nueva sonda.

3.7_ CROMATOGRAFÍA DE EXCLUSIÓN MOLECULAR (FPLC):

Este tipo de cromatografía, Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC), se hace uso de bombas de alta presión (100-400 bares) y columnas con materiales que soportan altas presiones, en este sistema se reduce notablemente los tiempos de purificación y se utilizan fases estacionarias con mayor poder de retención, lo que incrementa los porcentajes y rendimiento de las purificaciones.

Es utilizada para separar o purificar macromoléculas en una mezcla compleja, donde la velocidad de bombeo del solvente es controlada para garantizar el flujo constante de disolventes.

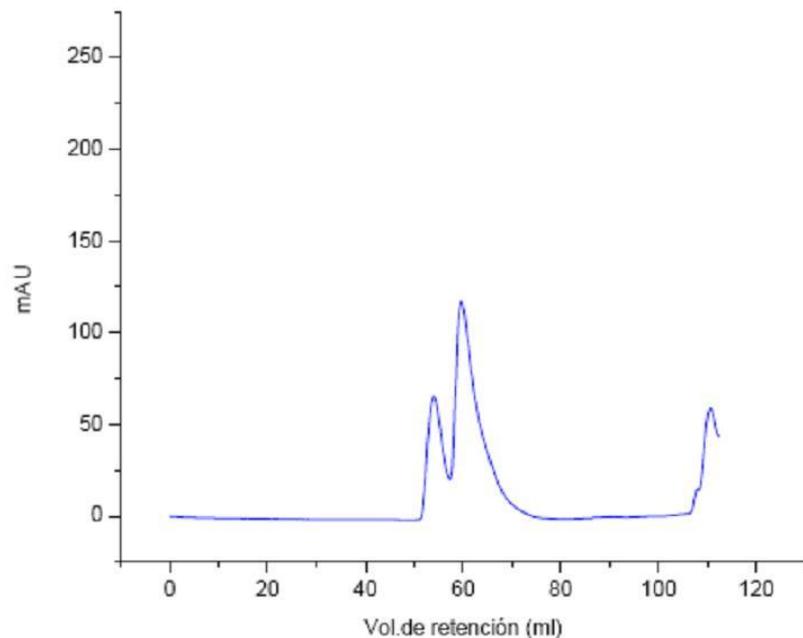


Figura 17_ Curva de absorción obtenida del FPLC realizado a la muestra de reacción.

Por medio de esta curva se evidencia en que fracciones de la columna se obtiene el complejo, por lo que se esperaba un solo pico que correspondiera al mismo. No siendo así se procede a analizar en cual de ellos se encuentra el complejo.

Se aplicó a una columna de FPLC la mezcla de Mur, sonda de 36 pb y Mn^{2+} (realizado en la Unidad de Cristalografía de proteínas del Instituto Pasteur de Montevideo). Se obtuvieron dos picos de elución (Figura 17). La concentración final de las fracciones correspondientes a los picos luego de concentradas, fueron medidas en Nanodrop, Figuras 18a y 18b (Abs280 nm: 0.276 para 1 mg/ml de proteína).

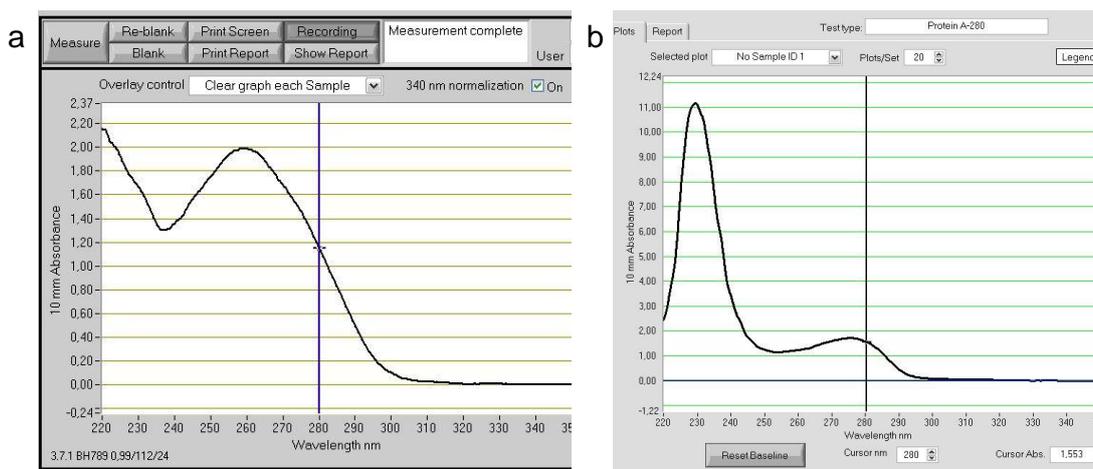


Figura 18_ Absorbancia medida en nanodrop de los picos 1 y 2 obtenidos por FPLC.

La Figura a) corresponde al primer pico observado el gráfico de absorbancia anterior, y la Figura b) al segundo.

La muestra correspondiente al pico uno (del que se obtuvieron 150 μ l), dio una concentración de 4.17 mg/ml, y el pico dos (del que se colectaron 304 μ l) una concentración de 5.69 mg/ml. El análisis por MALDI-TOF demostró que Mur está presente en ambos picos (Figura 19).

Conociendo las concentraciones de las muestras se procedió a la búsqueda de los cristales.

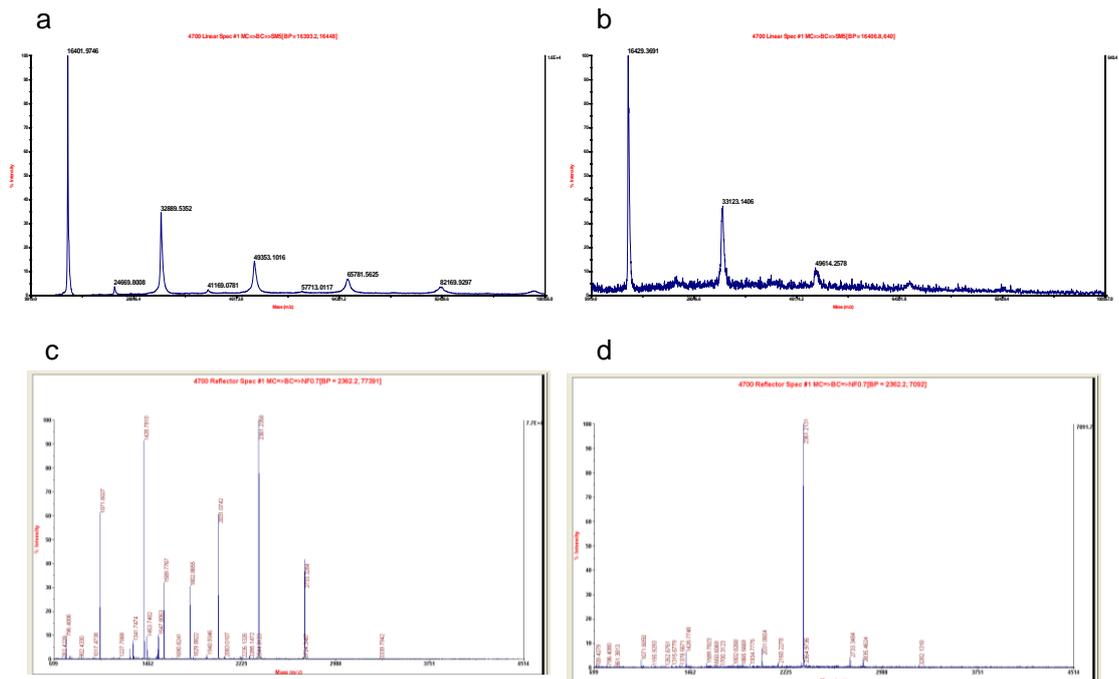


Figura 19_ Espectro de masa obtenido en modo lineal positivo (a) y (b); y en modo reflector positivo (c) y (d), para los Picos 1 y 2.
 Se analizaron las muestras Mur. Pico 1 (a) y Mur. Pico 2 (b) en forma directa, sin digerir, utilizando el espectrómetro de masa 4800 MALDI TOF/TOF; la muestra fue analizada en el modo lineal positivo y utilizando ácido sinapínico como matriz.
 Se identificó a Mur de *S. meliloti* de manera estadísticamente significativa, por mapeo peptídico tanto para el pico 1 (c) como para el pico 2 (d).

3.8_CRYSTALOGÉNESIS MANUAL:

Se intentó producir cristales en la misma condición identificada para el batch de proteína purificada anteriormente (5) donde el oligonucleótido usado fue la sonda de 30 pb. El método empleado fue el de difusión de vapor en gota colgante en placas VDX.

Para el pico uno se pudieron obtener cristales, mientras que para el pico dos no se obtuvieron cristales.

La Figura 20 muestra los cristales de la muestra “pico uno”, son barritas de aproximadamente 150umx10umx10um (bastante pequeños e irregulares). La condición utilizada fue 0.17 M acetato de sodio, 0.085 M Tris pH 8.5, 25.5% PEG 4000, 15 % Glicerol.



Figura 20_ Fotografía de cristales del complejo Mur-Mn²⁺-ADN.

Foto obtenida mediante una lupa, de la formación de los cristales. Estas estructuras irregulares podrían deberse a que Mur tiene sitios de unión a Mn²⁺ y forma dímeros, trímeros, etc. A eso se puede deber las estructuras en forma de agujas de distintos largos que se visualizan.

Estos cristales se testaron en difracción de rayos X, para corroborar su naturaleza macromolecular. Y efectivamente podemos asegurar que se trata de proteína y/o ADN. Sin embargo, lamentablemente la resolución es muy pobre (>9 Å, Figura 21) como para que se procediera a coleccionar datos.

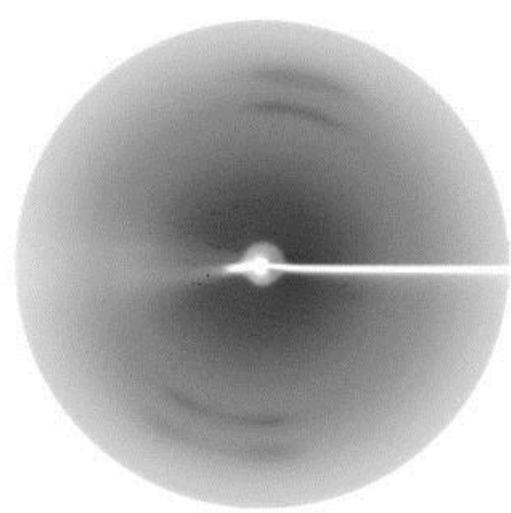


Figura 21_ Difracción de rayos X.

Fotografía de la difracción correspondiente a los cristales obtenidos del primer pico del FPLC (del segundo pico no se obtuvieron cristales). Esta figura muestra que el cristal es de baja calidad, desintegrándose al ser atravesado por el haz de luz.

Simultáneamente, se testeó también la difracción de cristales obtenidos con la proteína producida previamente (5) generados en

mayo 2009, los cuales habían crecido muy lentamente. Su aspecto y tamaño eran muy prometedores, se muestra en la Figura 22. Las condiciones utilizadas fueron 0.17 M acetato de sodio, 0.085 M Tris pH 8.5, 24% PEG 4000, 15 % Glicerol. Esta forma cristalina (se testearon varios cristales similares) mostró una difracción de muy baja resolución ($>8 \text{ \AA}$), con lo que nuevamente fue imposible continuar con su procesamiento.

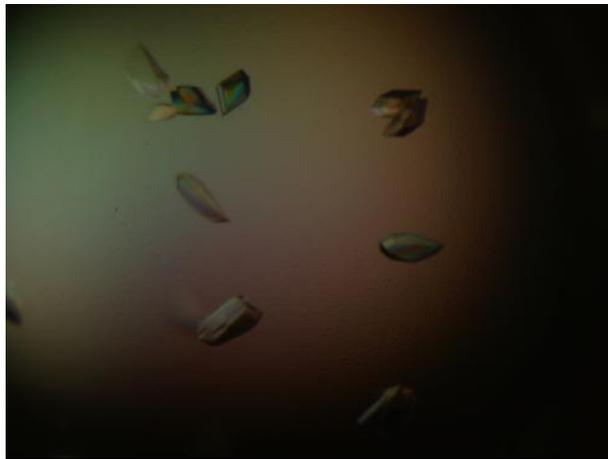


Figura 22_ Fotografía de los prometedores cristales de las muestras del 2009. Cristales de crecimiento lento son aparente buena forma.

4- DISCUSIÓN

La proteína FUR (Ferric Uptake Regulator) reprime la expresión de genes involucrados en la adquisición de hierro en la mayoría de las Proteobacterias. Sin embargo, en *S. meliloti* y otras α -Proteobacterias, se demostró que la proteína homóloga reprime los genes de adquisición de manganeso (*mntABCD*) y no los de hierro, por lo que se nombró como Mur (Manganese Uptake Regulator).

En este estudio se realizó la producción en masa de este regulador transcripcional con el fin de ir en busca de la estructura cristalográfica del complejo Mur-ADN, ya que son escasas las estructuras halladas hasta el día de hoy de la familia Fur, y aun no se ha podido estudiar en detalle cómo interacciona la misma con su ADN blanco.

Si bien se logró obtener una buena concentración de Mur, y a la hora de los ensayos de retardo en gel la proteína se une perfectamente a la nueva sonda, es decir se encuentra funcional, en este trabajo no se logró obtener la estructura cristalográfica del complejo, habiéndose intentado dos veces el objetivo.

Aunque la proteína permanece funcional hay algo que falla a la hora de buscar los cristales, por lo que, comparando con otros trabajos de cristalografía (5), podemos suponer que se debe a las condiciones de cristalización. Las macromoléculas son muy exquisitas y son ávidas por formar sus estructuras en entornos totalmente distintos.

Se probaron tres veces en las mismas condiciones la formación de la estructura del complejo por manipuladores distintos, obteniéndose resultados negativos (cristales irregulares de baja resolución). Una recomendación para próximos trabajos sería la de realizar más pruebas robóticas, que den más margen de

condiciones en las que se podrían lograr los cristales. Igualmente podríamos decir que Mur-ADN es un complejo incapaz de formar cristales de buena calidad para estudios estructurales.

4.1_PERSPECTIVAS

Con respecto a los cristales, nos proponemos insistir en la optimización de estos cristales buscando mejorar la resolución (apuntando a $<3.5\text{angs}$). Esto se puede realizar incrementando la concentración de la proteína, puede ser utilizando medios de cultivo de 2L (en éste trabajo se utilizaron medios de de 1L). Cuidando minuciosamente los detalles en los cambios en la temperatura a la hora de realizar la inducción de la producción de Mur. O tal vez proponiendo otra forma de interacción del complejo porque al realizar los EMSA, se calculó para la siembra una relación de 2:1 para la proteína y su ADN blanco, siendo éste último el que se ve como exceso en los geles. Por lo que tal vez sería bueno intentar con otras concentraciones de la proteína, tal vez apoyando la teoría de que Mur se podría unir como tetrámero al promotor.

Otra opción sería cuidar más aun la calidad de la proteína en su purificación, con esto queremos decir maximizar los cuidados a la hora de colocar la proteína en la columna, de colectarla, de conservarla, cuidar cada detalle para perder la menor cantidad de proteína posible.

También sería importante, luego de obtener a Mur purificada y de las pruebas pertinentes, como el EMSA para saber que la misma está activa y que se une a su ADN blanco, realizar más pruebas robóticas. De las cuales se puedan obtener otras condiciones que sean más favorables para la formación de los cristales del complejo,

ya que a las proteínas les gustan distintas soluciones para cristalizar, y tratándose de que se quiere obtener el cristal del complejo, lo cual es aún más difícil por tratarse de dos macromoléculas interactuando, deberían realizarse varias pruebas. Y no seguir probando con las ya utilizadas, debido a que por tercera vez no se pudieron obtener cristales de buena resolución.

Algo que nos quedó pendiente fue probar realizar gotas, sin pasar el complejo por la columna de FPLC, como se supone que la proteína y el ADN están “puros”, y lo que se realiza es una reacción de unión en mesada, se podría utilizar de esa misma mezcla para realizar algunas gotas; tal vez de esta forma se logren buenos cristales. Y quizás en esas condiciones le guste al complejo permanecer unido, o también puede que con las sales presentes en la mezcla se equilibren las cargas, dando un buen ambiente para éste complejo.

5_ ANEXO

5.1_ Medios de cultivo utilizados:

2x YT (1 litro):

16 g de triptona; 10 g de extracto de levadura; 5 g de NaCl; pH 7.

LB (1 litro):

10 g de triptona; 5 g de extracto de levadura; 10 g NaCl.

5.2_ Composición de Buffers:

Buffer His Tag 2X: 100 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$; 600 mM NaCl; 20% glycerol.

Buffer De Unión: 5 mM imidazol; 300 mM NaCl, 10% Glicerol; 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$.

Buffer De lavado (20 o 50 mM): 20 o 50 mM imidazol, 300mM NaCl; 10% Glicerol; 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$.

Buffer De eluido: 250 mM imidazol, 300 mM NaCl; 10% Glicerol; 50 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4\text{-Na}_2\text{HPO}_4$.

Buffer Tris-Borato 0,5X: 0,54 g de Tris base; 0,275 g de ácido bórico.

Loading Buffer 2X: 0,5 M Tris pH 6,8 (120 mM); Glicerol al 20%; 4% de SDS al 20%; 0,1% de azul de Bromofenol.

Buffer STE: Tris 10 mM; NaCl 50 mM; EDTA 1 mM.

Buffer EB 10X: Tris-HCl 100 mM; DTT 10 mM; NP-40 1% v/v; KCl 400 mM; MgCl_2 10 mM.

5.3_ Protocolos utilizados

PREPARACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES:

1. Crecer ON a 30°C, la cepa a hacer competente (a partir de una placa fresca) en LB sin antibiótico.
2. Repicar una dilución 1/100 a LB y crecer hasta unas 10⁷ células/ml (DO 0,2-0,3).
3. Recuperar las células centrifugando a 4000-5000 rpm durante 5 min a 4°C en tubos estériles previamente enfriados en hielo.
4. Resuspender el pellet en 10 ml de CaCl₂ 0,1M frío por cada 25 ml de cultivo original.
5. Dejar en hielo 20 min.
6. Recuperar las células igual que el paso 3.
7. Descartar el sobrenadante y resuspender las células con 250 µl de cultivo frío por cada 50 ml de cultivo original.
8. Guardar en heladera y en hielo y usar recién al otro día.

TRANSFORMACIÓN:

1. Colocar en un eppendorf 100 µl de células competentes.
2. Agregar el ADN (5 µl) y dejar en hielo 10 min.
3. Dar un golpe de calor colocando los tubos en un baño a 42°C durante 90 segundos o a 37°C durante 5 min.
4. Colocar rápidamente en hielo 2 min.
5. Agregar 1 ml de LB a cada tubo e incubar 1 hr a 37°C con agitación, para permitir a las células recuperar el ADN y expresar la resistencia al antibiótico.
6. Plaquear fracciones de 100 µl en placas de LB con el antibiótico.
7. Incubar a 37°C ON.

MINIPREPARACIÓN DE ADN PLASMÍDICO

1. Colocar 1.5 ml de cultivo primario en eppendorf.
2. Centrifugar a 12000 g por 30 segundos a 4°C.
3. Remover el medio por aspiración dejando el pellet lo más seco posible.
4. Resuspender el pellet en 100 µl de solución I. Vortexear.
5. Agregar 200 µl de solución II recién preparada. Mezclar por inversión.
6. Agregar 150 µl de solución III. Mezclar por inversión. Guardar en hielo por 3 a 5 minutos.
7. Agregar 200 µl de cloroformo
8. Centrifugar a 12000 g por 5 minutos a 4°C. Transferir el supernadante a un tubo limpio.
9. Agregar 0.6 volúmenes de isopropanol. Dejar temperatura ambiente por 2 minutos.
10. Centrifugar a 12000 g por 5 minutos a 4°C.
11. Remover el sobrenadante por aspiración.
12. Secar el pellet en la speedvac.
13. Agregar 1 ml de etanol 70%. Centrifugar a 13000 g por 10 minutos. Remover el sobrenadante y dejar secar el pellet.
14. Redisolver el ADN en 49 µl de agua destilada y agregar 1 µl de ARNasa H.

5.4_ Geles de Acrilamida

Al 15% para SDS-PAGE

Resolver: 2,5 ml Resolving Buffer; 5,05 ml Acrylamide; 2,55 ml H₂O; 5 µl TEMED; 50 µl de sulfato de amonio al 10%.

Stacker: 1,25 ml Stacking buffer; 0,8 ml de Acrylimide al 30%; 2,95 ml H₂O; 5 µl TEMED; 50 µl de sulfato de amonio al 10%.

Al 8% para tinción con plata y 1 mm de espesor

1,5 ml de Tris Borato 5X; 2 ml Acrilamida:bisacrilamida 30:0,36; 37,5 µl APS al 10%; 3,75 µl TEMED; 4,0 ml H₂O.

El gel se pre corrió en buffer TB 0.5X a 80 volts, durante 1 hr. Pasada esta hora se siembran las muestras y para ver el frente de corrida se usó el loading buffer 6X.

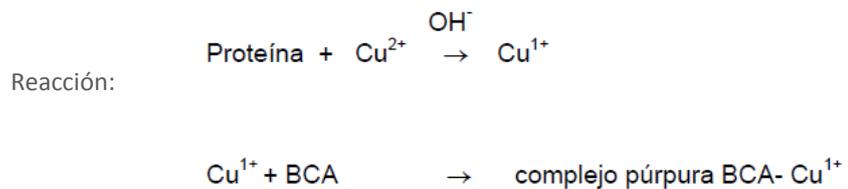
Tinción con Azul de Bromofenol (ABC)

Es el colorante utilizado más frecuentemente como marcador de avance en electroforesis. Las proteínas y los ácidos nucleicos son mayormente incoloros. Cuando están sometidos a electroforesis es importante detener el avance antes de que sobrepasen el extremo del gel. El azul de bromofenol es el colorante trazador más empleado porque es viable en pH neutro y alcalino, es una molécula pequeña, es ionizable y posee carga negativa a pH superior a 4,6, de modo que migra al ánodo. Al ser una molécula pequeña se adelanta a la mayor parte de las proteínas y ácidos nucleicos. Cuando el experimentador observa que el colorante alcanza el extremo anódico del gel, debe desconectar la corriente y dar por terminada la separación. Se puede unir débilmente a las proteínas, dotándolas de color azul.

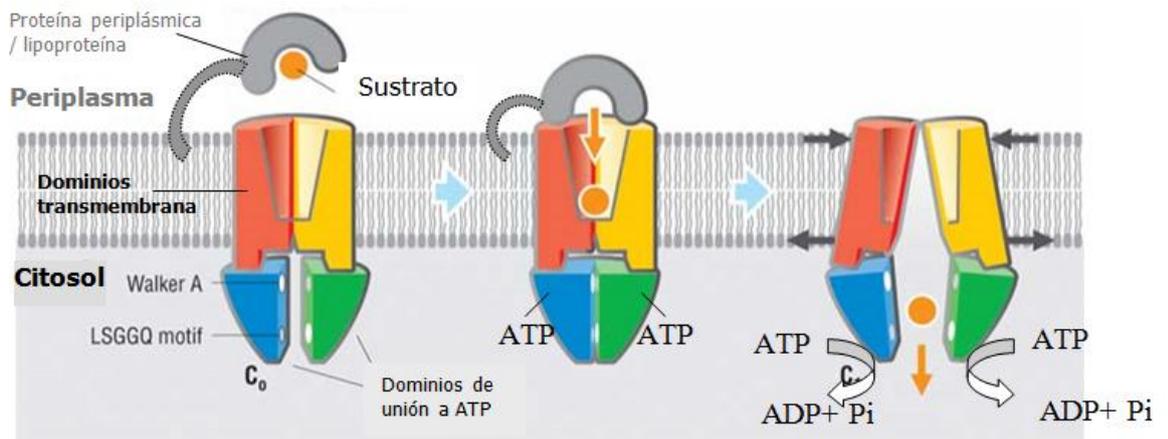
5.5_ Método del ácido bicinconínico (BCA):

El ácido bicinconínico, sal sódica, es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con inones 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 Cu^{2+} en medio alcalino (reacción de Biuret). La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporciona un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, muy sensible, y que muestra una gran tolerancia a compuestos que afectan a otros métodos.



5.6_ Modelo de acción para un transportador tipo ABC:



Modelo de acción para un transportador tipo ABC.

El sustrato es presentado al transportador por la proteína de unión a sustrato. La hidrólisis de ATP induce el cambio de conformación necesario para el pasaje del sustrato hacia el citoplasma.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Watson**, “Biología molecular del gen”, 2008.
2. **Jacob F. & Monod J. (1961)**. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *J Mol Biol* 3 :318-356.
3. **Cristalización** <http://www.xtal.igfr.csic.es/> Dept. de Cristalografía y Biol. Estruct. c/ Serrano 119 E-28006 Madrid (España).
4. **IRA N. LEVINE, 2004**. FISICOQUÍMICA, p. 1042-1050. In Concepción Fernández Madrid (ed.), quinta edición vol. 2.
5. **Platero, R. 2008**. Estudio de la actividad de la proteína Fur y su participación en el transporte de manganeso en *Sinorhizobium meliloti*. Tesis de doctorado.
6. **Helmann J.D., Sooanga S., and Gabriel S. 2007**. Metalloregulators: arbiters of metal sufficiency., p. 38-71. In D. H. a. S. Nies, S. (ed.), *Molecular Microbiology of Heavy Metals*. M vol. 6. Springer-Verlag. , Berlin Heidelberg.
7. **Hantke K. (2001)**. Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin. Microbiol* 4: 172–177.
8. **Alahari A., Tripathi A.K., Le Rudulier D. (2006)**. Cloning and characterization of a fur homologue from *Azospirillum brasilense* Sp7. *Curr Microbiol* 52: 123–127.
9. **Bagg , A. a., J. B. Neilands. 1987**. Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 26:5471-5477.
10. **Hantke, K. 1981**. Regulation of ferric iron transport en *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive metal. *Mol. Gen Genet.* 182:288-292.

11. **Gaballa, A. a., and J. D. Helmann.** 1998. Identification of a zinc-specific metalloregulatory protein, Zur, controlling zinc transports operons in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 180:5815-5821.
12. **de Lorenzo V., S. Wee, M. a. Herrero, and J. B. Neilands.** 1987. Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (*fur*) repressor. *J. Bacteriol.* 169:2624-2630.
13. **Escolar, L., J. Perez-Martin, and V. de Lorenzo.** 1999. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* 181:6223-6229.
14. **Panina, E. M., A. A. a. Mironov, and M. S. Gelfand.** 2001. Comparative analysis of FUR regulons in gamma-proteobacteria. *Nucleic Acids Res.* 29:5195-5206.
15. **Rodionov, D. A., I. Dubchank, A. Arkin, E. a. Alm, and M. S. Gelfand.** 2004. Recostuction of regulatory and metabolic pathways in metal-reducing delta-proteobacteria. *Genome Biol.* 5:R90.
16. **Lavrrar, J. L., and M. A. McIntosh.** 2003. Architecture of a fur binding site: a comparative analysis. *J. Bacteriol.* 185:2194-2202.
17. **Escolar, L., J. Perez-Martin, and V. de Lorenzo.** 1999. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* 181:6223-6229.
18. **Wexler M., Todd J.D., Kolade O., Bellini D., Hemmings A.M., et al.** (2003). Fur is not the global regulator of iron uptake genes in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology* 149:357–1365.
19. **Chao T.C., Becker A., Buhrmester J., Puhler A., Weidner S.** (2004). The *Sinorhizobium meliloti* fur gene regulates, with dependence on Mn (II), transcription of the *sitABCD* operon, encoding a metal-type transporter. *J. Bacteriol* 186: 3609–3620.
20. **Hantke, K.** 1987. Selection procedure for deregulated iron transport mutants (*fur*) in *Escherichia coli* K12: fur not only affects iron metabolism. *Mol. Gen. Genet.* 210:135-139.
21. **Kehres, D. G., and M. L. Zaharik, B. B. Finlay, and M. E. Maguire.** 2000. The NRAMPproteins of *Salmonella typhium* and *Escherichia coli* are

selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. *Mol. Microbiol.* 36:1085-1100.

22. **Makui, H., E. Roig, S. T. Cole, J. D. Helmann, P. Gros, and M. F. Callier.** 2000. Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. *Mol. Microbiol.* 35:1065-1078.
23. **Que, Q., and J. D. Helmann.** 2000. Manganese homeostasis in *Bacillus subtilis* is regulated by MntR, a bifunctional regulator related to the diphtheria toxin repressor family of proteins. *Mol. Microbiol.* 35:1454-1468.
24. **Claverys, J. P.** 2001. A new family of high-affinity ABC manganese and zinc permeases. *Res. Microbiol.* 152:231-243.
25. **Edit Díaz-Mireles, Margaret Wexler, Jonathan D. Todd, Dominico Bellini, Andrew W. B. Johnston and R. Gary Sawers.** 2005. The manganese-responsive repressor Mur of *Rhizobium leguminosarum* is a member of the Fur-superfamily that recognizes an unusual operator sequence. *Microbiology* (2005), 151, 4071–4078.
26. **Diaz-Mireles, E., M. Wexler, G. Sawers, D. Bellini, J. D. Todd, and A. W. Johnston.** 2004. The Fur-like protein Mur of *Rhizobium leguminosarum* is a Mn²⁺-responsive transcriptional regulator. *Microbiology* 150:1447-1456.
27. **Kitphati, W., P. Ngok-Ngam, S. Suwanmaneerat, R. Sukchawalit, and S. Mongkolsuk.** 2007. *Agrobacterium tumefaciens fur* has important physiological roles in iron and manganese homeostasis, the oxidative stress response, and full virulence. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 4760-4768.
28. **Platero, R., L. Peixoto, M. R. O'Brian, and E. Fabiano.** 2004. Fur is involved in manganese-dependent regulation of mntA (sitA) expression in *Sinorhizobium meliloti*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4349-4355.
29. **Pecqueur, L., B. D'Autreaux, J. Dupuy, Y. Nicolet, L. Jacquamet, B. Brutscher, I. a. Michaud-Soret, and B. Bersch.** 2006. Structural changes of *Escherichia coli* ferric uptake regulator dirung metal-dependent

dimerization and activation explored by NMR and X-ray crystallography. *J. Biol. Chem* 281:21286-21295.

30. **Platero, R., Jauregui, F. Batistoni, and E. Fabiano.** 2003. Mutations in *sitB* and *sitD* genes affects manganese-growth requirements in *Sinorhizobium meliloti*. *FEMS Microbiol. Lett.* 218:65-70.

31. **Platero, R., B. Garat, V. de Lorenzo and E. Fabiano.** 2007. The *Sinorhizobium meliloti* Fur like (Mur) protein binds a Fur box like secuencia present in the *mntA* promoter in a manganese responsive manner. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:4832-4838.

32. **Pohl, E., J. C. Haller, A. Mijovilovich, W. Meyer-Klaucke, E. Graman, and M. L. Vasil.** 2003. Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol. Microbiol.* 47:903-915.

33. **Pecqueur, L., B. D'Autreaux, J. Dupuy, Y. Nicolet, L. Jacquamet, B. Brutscher, I. a. Michaud-Soret, and B. Bersch.** 2006. Structural changes of *Escherichia coli* ferric uptake regulator during metal-dependent dimerization and activation explored by NMR and X-ray crystallography. *J. Biol. Chem.* 281:21286-21295.

34. **Sambrook, J., F. Fritsch, y T. Maniatis.** 1989. *Molecular cloning. A laboratory manual.* Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, USA.