

Angela Fernández Otal

Fur del anaerobio estricto
Clostridium difficile: Bases
moleculares de su actividad en
presencia de O₂ y evaluación de
su potencialidad como diana
terapéutica

Departamento

Bioquímica y Biología Molecular y Celular

Director/es

Lana Arbeloa, Ángel
Bes Fustero, María Teresa

<http://zaguan.unizar.es/collection/Tesis>



Reconocimiento – NoComercial – SinObraDerivada (by-nc-nd): No se permite un uso comercial de la obra original ni la generación de obras derivadas.

© Universidad de Zaragoza
Servicio de Publicaciones

ISSN 2254-7606

Tesis Doctoral

FUR DEL ANAEROBIO ESTRICTO CLOSTRIDIUM
DIFFICILE: BASES MOLECULARES DE SU
ACTIVIDAD EN PRESENCIA DE O₂ Y EVALUACIÓN
DE SU POTENCIALIDAD COMO DIANA
TERAPÉUTICA

Autor

Angela Fernández Otal

Director/es

Lana Arbeloa, Ángel
Bes Fustero, María Teresa

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA
Bioquímica y Biología Molecular y Celular

2018

UNIVERSIDAD DE ZARAGOZA

Facultad de Ciencias



Departamento de Bioquímica y Biología Molecular y Celular

TESIS DOCTORAL

**Fur del anaerobio estricto *Clostridium difficile*:
Bases moleculares de su actividad en presencia de O₂ y
evaluación de su potencialidad como diana terapéutica.**

Memoria prentada por

Ángela Fernández Otal

Licenciada en Bioquímica, para optar al título de Doctora por la
Universidad de Zaragoza

Diciembre 2017

Índice de contenidos

Índice de figuras

Índice de tablas

Abreviaturas

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 El patógeno <i>Clostridium difficile</i>	1
1.1.1. Características generales.....	1
1.1.2. Esporulación	2
1.1.3. Características del genoma	4
1.1.4. Patogenia de <i>C. difficile</i>	5
1.1.5. Flexibilidad metabólica.....	7
1.1.6. Problemática actual.....	8
1.2. Captación de hierro y metabolismo redox en procariontes	9
1.2.1. Captación de hierro en procariontes	9
1.2.1.1. Captación de hierro extracelular en bacterias	10
1.2.1.2. Captación de hierro procedente del hemo	12
1.2.1.3. Almacenamiento de hierro en bacterias.....	13
1.2.2. Metabolismo redox en bacterias	14
1.2.2.1. Estrés oxidativo	15
1.2.2.2. Mecanismos de eliminación de ROS	17
1.2.2.3. Mantenimiento de la homeostasis redox	21
1.2.2.4. Sensores del estado redox de la bacteria.....	22
1.2.3. Estrés férrico y redox: el paradigma de Fur	29
1.3. La proteína Fur	30
1.3.1. Características estructurales	31
1.3.2. Regulación por Fur	34
1.3.2.1. Fur como represor.....	34
1.3.2.2. Fur como activador	36
1.3.3. Regulación de Fur	38
1.3.4. Papel de Fur en patógenos.....	39

1.3.5.	Otros miembros de la familia Fur.....	40
1.3.5.1.	Zur (<i>Zinc uptake regulator</i>).....	40
1.3.5.2.	Mur (<i>Manganese uptake regulator</i>).....	41
1.3.5.3.	Nur (<i>Nickel uptake regulator</i>).....	41
1.3.5.4.	Irr (<i>Iron response regulator</i>).....	42
1.3.5.5.	PerR (<i>Peroxide regulator</i>).....	43
1.4.	Estado del arte sobre Fur de <i>C. difficile</i>	45
1.4.1.	Regulón de Fur en <i>C. difficile</i>	45
1.4.2.	Motivación del trabajo: Fur de <i>C. difficile</i> como diana terapéutica.....	47
2.	OBJETIVOS.....	51
3.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
3.1.	Medios de cultivo y cepas de <i>Escherichia coli</i> empleadas.....	55
3.2.	Técnicas de trabajo con DNA.....	57
3.2.1.	Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	57
3.2.1.1.	PCR sobre colonias.....	59
3.2.1.2.	Mutagénesis dirigida.....	59
3.2.2.	Electroforesis de DNA.....	61
3.2.3.	Extracción de DNA plasmídico de <i>E. coli</i> a pequeña escala (<i>miniprep</i>) y cuantificación del DNA.....	62
3.2.4.	Tratamientos enzimáticos del DNA.....	62
3.2.4.1.	Digestión enzimática.....	62
3.2.4.2.	Ligación.....	63
3.3.	Métodos genéticos.....	63
3.3.1.	Células de <i>E. coli</i> termocompetentes.....	63
3.3.1.1.	Obtención de las células termocompetentes.....	63
3.3.1.2.	Transformación mediante choque térmico.....	64
3.3.2.	Células de <i>E. coli</i> electrocompetentes.....	64
3.3.2.1.	Obtención de bacterias electrocompetentes.....	64
3.3.2.2.	Electroporación de células electrocompetentes.....	65
3.3.3.	Sistema de One-Step (mutante <i>knockout</i> de <i>fur</i> en <i>E. coli</i>).....	65
3.4.	Obtención de la proteína Fur de <i>C. difficile</i>	67
3.4.1.	Sobreexpresión de las proteínas a pequeña y gran escala.....	68
3.4.2.	Lisis celular y obtención del extracto crudo.....	69
3.4.3.	Purificación por cromatografía de afinidad a metales (IMAC).....	70

3.4.4.	Diálisis de proteínas	71
3.4.5.	Concentración de proteínas	72
3.4.6.	Cuantificación de proteínas.....	72
3.5.	Caracterización bioquímica de proteínas.....	73
3.5.1.	Electroforesis en gel desnaturalizante (SDS-PAGE).....	73
3.5.1.1.	Análisis de oligomerización por entrecruzamiento.....	74
3.5.1.2.	Análisis de la formación de puentes disulfuro	74
3.5.1.3.	Estudio de la presencia de metal mediante electroforesis	74
3.5.1.4.	Ensayos de alquilación con AMS	74
3.5.2.	Western blot.....	75
3.5.3.	Determinación del número de cisteínas libres por el método Ellman.....	76
3.5.4.	Determinación del contenido en hierro de una proteína	76
3.5.5.	Estudio de la interacción proteína DNA (EMSA)	77
3.5.6.	Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)	79
3.5.6.1.	Preparación de la disolución de hemo	80
3.6.	Métodos espectroscópicos	80
3.6.1.	Absorción UV-Visible	80
3.6.2.	Espectrometría de masas (MALDI-TOF MS)	80
3.6.3.	ICP-OES.....	81
3.6.4.	Dicroísmo Circular (DC)	82
3.6.5.	Resonancia Paramagnética de Electrón (EPR)	83
3.7.	Estudios de interacción con hemo	84
3.7.1.	Espectroscopía diferencial para la determinación de la constante de disociación del hemo.....	84
3.7.2.	Espectroscopía directa	85
3.7.3.	Reconstitución de la proteína con hemo	85
3.8.	Cribado de alto rendimiento de una quimioteca.....	86
3.8.1.	Quimioteca	86
3.8.2.	Búsqueda de condiciones óptimas.....	86
3.8.3.	<i>High-Throughput Screening</i>	87
3.8.4.	Análisis de los resultados	88
3.9.	Ensayos <i>in vivo</i>	89
3.9.1.	Complementación del homólogo Fur de <i>Escherichia coli</i>	89
3.9.2.	Medidas de la actividad β -galactosidasa.....	89

3.10.	Análisis informáticos	91
4.	RESULTADOS	95
4.1.	Obtención de la proteína Fur de <i>C. difficile</i> y caracterización funcional.....	95
4.1.1.	Motivación del trabajo	95
4.1.2.	Identificación del gen <i>fur</i>	95
4.1.3.	Clonaje del gen <i>fur</i> y sobreexpresión de la proteína recombinante.....	98
4.1.4.	Obtención de la proteína recombinante <i>CdFur</i>	99
4.1.4.1.	Purificación mediante IMAC.....	100
4.1.4.2.	Obtención de la proteína <i>CdFur</i> sin cola de histidinas.....	103
4.1.4.3.	Determinación del peso molecular de la proteína por MALDI-TOF.....	104
4.1.4.4.	Purificación de <i>CdFur</i> en anaerobiosis	105
4.1.4.5.	Estudio por EPR de la proteína purificada.....	106
4.1.5.	Actividad de unión al DNA de <i>CdFur in vitro</i>	108
4.1.5.1.	Condiciones óptimas de unión de <i>CdFur</i> al DNA <i>in vitro</i>	108
4.1.5.2.	Búsqueda de promotores diana de <i>CdFur</i>	110
4.1.6.	Complementación funcional de <i>CdFur</i> en <i>E. coli</i>	111
4.1.7.	Regulación de promotores diana de <i>CdFur</i> en <i>E. coli</i>	113
4.1.7.1.	Diseño experimental	113
4.1.7.2.	Curvas de crecimiento.....	115
4.1.7.3.	Medidas de actividad β -galactosidasa	116
4.2.	Caracterización bioquímica de <i>CdFur</i> y estudio de sus residuos de cisteína	118
4.2.1.	Motivación del trabajo	118
4.2.2.	Sobreexpresión y purificación de los mutantes de cisteína.....	118
4.2.3.	Análisis de la estructura secundaria.....	122
4.2.3.1.	Predicción de estructura secundaria.....	122
4.2.3.2.	Dicroísmo circular (DC).....	123
4.2.4.	Residuos de cisteína responsables de la actividad de <i>CdFur</i>	124
4.2.4.1.	Residuos importantes para el estado redox de <i>CdFur</i>	125
4.2.4.2.	Residuos importantes para la unión al metal regulador.....	126
4.2.5.	Análisis de la oligomerización en <i>CdFur</i>	127
4.2.5.1.	Efecto del estado redox de <i>CdFur</i> en la oligomerización	127
4.2.5.2.	Efecto de la oxidación reducción de <i>CdFur</i> en la actividad	129
4.2.5.3.	Estudio de la oligomerización en los mutantes de <i>CdFur</i>	130
4.2.6.	Análisis del estado redox de las cisteínas de <i>CdFur</i>	132

4.2.6.1.	Determinación del número de cisteínas libres.....	132
4.2.6.2.	Ensayos de alquilación	134
4.2.7.	Análisis de la presencia de zinc en la proteína <i>CdFur</i>	136
4.2.7.1.	Detección cualitativa de zinc en <i>CdFur</i>	137
4.2.7.2.	Determinación cuantitativa de zinc en <i>CdFur</i>	138
4.2.7.3.	Identificación de cisteínas implicadas en la coordinación del zinc	139
4.2.7.4.	La pérdida de zinc provoca oligomerización	140
4.2.8.	Modelos tridimensionales.....	142
4.3.	Estudio de la interacción de <i>CdFur</i> con el grupo hemo	146
4.3.1.	Motivación del trabajo	146
4.3.2.	Interacción con el grupo hemo	146
4.3.3.	Cálculo de la K_D	148
4.3.4.	Influencia del hemo en la actividad de <i>CdFur in vitro</i>	149
4.3.5.	Determinación de la constante de disociación del complejo <i>CdFur</i> -hemo en función del estado de oxidación de la proteína	150
4.3.6.	Residuos implicados en la unión de <i>CdFur</i> con el grupo hemo.....	152
4.3.7.	Estudio de <i>CdFur</i> reconstituida con hemo	155
4.4.	Identificación de compuestos moduladores de la actividad de <i>CdFur</i>	157
4.4.1.	Motivación del trabajo	157
4.4.2.	Cribado de alto rendimiento	157
4.4.2.1.	Compuestos positivos	159
4.4.3.	Efecto de los compuestos sobre la actividad de <i>CdFur in vitro</i>	161
4.4.4.	Caracterización de la interacción proteína-compuesto por ITC.....	163
5.	DISCUSIÓN.....	167
5.1.	Obtención de la proteína Fur de <i>C. difficile</i> y caracterización funcional.....	167
5.2.	Caracterización bioquímica de <i>CdFur</i> y estudio de sus residuos de cisteína	174
5.3.	Estudio de la interacción de <i>CdFur</i> con el grupo hemo	182
5.4.	Identificación de compuestos moduladores de la actividad de <i>CdFur</i>	185
6.	CONCLUSIONES	191
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	195

Índice de figuras

Figura 1. Imágenes de <i>C. difficile</i>	1
Figura 2. Microscopía electrónica de transmisión de una espora de <i>C. difficile</i>	2
Figura 3. Esquema del locus de patogenicidad (PaLoc) y CDTLoc.....	4
Figura 4. Sección de colon de un individuo sano y de un individuo con colitis pseudomembranosa.	5
Figura 5. Patogenia de <i>Clostridium difficile</i>	6
Figura 6. Vía de Wood-Ljungdahl y genes implicados de <i>C. difficile</i> 630..	7
Figura 7. Ciclo de Haber-Weiss.....	9
Figura 8. Sistema de captación de hierro extracelular mediado por sideróforos en bacterias Gram-positivas..	11
Figura 9. Sistemas de captación de hemo en bacterias Gram-positivas.....	13
Figura 10. Ferritina.....	14
Figura 11. Proceso de formación de las especies reactivas de oxígeno (ROS).....	16
Figura 12. Inactivación de un grupo Fe-S por parte del ion superóxido..	16
Figura 13. Modelo propuesto de detoxificación de ROS en anaerobios como <i>P. furiosus</i>	20
Figura 14. Representación esquemática del mecanismo de acción de la tiorredoxina y la glutarredoxina.	22
Figura 15. Modelo de actuación de SoxR.....	23
Figura 16. Modelo de actuación de Fnr.	24
Figura 17. Importancia de las cisteínas en la detección del estado redox.....	25
Figura 18. Modelo de funcionamiento de OxyR.	26
Figura 19. Motivos tetracoordinados de zinc donde participan cisteínas como ligando..	28
Figura 20. Interruptor redox basado en la coordinación a zinc.	28
Figura 21. Representación de la estructura cristalina del dímero Fur de <i>P. aeruginosa</i> (resolución 1.8 Å).	32
Figura 22. Representación de la estructura cristalina del dímero Fur de <i>H. pylori</i> (resolución 1.9 Å)..	33
Figura 23. Esquema de represión clásica de Fur.....	34
Figura 24. Representación de la evolución de la caja Fur propuesta.....	35
Figura 25. Mecanismo de activación de Fe ²⁺ -Fur a través del pequeño RNA antisentido RhyB.	36
Figura 26. Fe ²⁺ -Fur como activador directo de la transcripción.....	37
Figura 27. Representación esquemática de la represión de Fe-Fur, la represión de apo-Fur y la activación de Fur.....	38
Figura 28. Representación de la estructura de FurB/Zur de <i>M. tuberculosis</i>	41
Figura 29. Esquema de funcionamiento de Irr con hemo y ferroquelatasa..	43
Figura 30. Diagramas de cintas de la forma apo del dímero de PerR y de la forma activa unida a manganeso.....	44
Figura 31. Proceso de mutagénesis dirigida por PCR.....	61
Figura 32. Estrategia de interrupción de genes en un solo paso (Sistema One-Step) para la construcción de un mutante Δfur en <i>E. coli</i>	67

Figura 33. Elementos de control en el sistema pET (Novagen).....	68
Figura 34. Esquema de la matriz de afinidad “Chelating Sepharose Fast Flow”	70
Figura 35. Disposición del gel y la membrana de PVDF durante la transferencia.	75
Figura 36. Reacción producida durante el ensayo de Ellman.	76
Figura 37. Fundamentos de los ensayos de ITC.	79
Figura 38. Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano asociados con distintos tipos de estructura secundaria.	82
Figura 39. Secuencia de pasos utilizada para el análisis computacional de los datos obtenidos del cribado experimental.	88
Figura 40. Alineamiento de secuencias de diversos homólogos Fur.	97
Figura 41. Análisis de la sobreexpresión de las proteínas recombinantes mediante geles de SDS-PAGE al 15 %.	99
Figura 42. Análisis del proceso total de purificación de <i>CdFur</i> mediante IMAC-Ni y IMAC-Co mediante SDS-PAGE al 15 %.	100
Figura 43. Purificación de <i>CdFur</i>	101
Figura 44. Espectro de absorción UV-Vis de la proteína <i>CdFur</i> según el tipo de metal usado en la cromatografía.	102
Figura 45. Espectro de absorción UV-Vis de la proteína purificada con IMAC-Ni y posteriormente pasada por una columna de IMAC-Co.	102
Figura 46. Corte de la proteína <i>CdFur</i> con trombina en diferentes condiciones.	103
Figura 47. Análisis por SDS-PAGE al 15 % de todas las fracciones recogidas de la columna de IMAC-Ni tras el corte con trombina.	104
Figura 48. Espectro de MALDI-TOF de la proteína <i>CdFur</i>	105
Figura 49. Purificación de <i>CdFur</i> en anaerobiosis.	106
Figura 50. Espectro de EPR de la proteína <i>CdFur</i>	107
Figura 51. Búsqueda de condiciones óptimas de actividad para <i>CdFur</i> mediante ensayos de retardo en gel de poliacrilamida al 8 %.	109
Figura 52. Análisis del efecto de la presencia de metal en la actividad de unión al DNA de <i>CdFur</i> mediante ensayos de retardo en gel de poliacrilamida al 8 %.	109
Figura 53. Secuencia consenso de la región de unión a DNA de <i>CdFur</i>	110
Figura 54. Análisis de la actividad de unión de <i>CdFur</i> a diversos promotores mediante ensayos de retardo en gel de poliacrilamida al 8 %.	111
Figura 55. Ensayo de complementación de Fur de <i>E. coli in vivo</i>	112
Figura 56. Western blot para comprobar la reactividad cruzada entre los anticuerpos de <i>EcFur</i> con la proteína <i>CdFur</i>	113
Figura 57. Estrategia seguida para construir un sistema heterólogo para el estudio de la actividad de <i>CdFur in vivo</i>	114
Figura 58. Curvas de crecimiento de las cepas empleadas en el ensayo de actividad β -galactosidasa.	115
Figura 59. Influencia de <i>CdFur</i> y la disponibilidad de hierro en la expresión de genes regulados por <i>CdFur</i>	117
Figura 60. Secuencia de aminoácidos de Fur de <i>C. difficile</i> 630.	118
Figura 61. Análisis de la sobreexpresión de los mutantes de cisteína mediante geles de SDS-PAGE al 15 %.	119

Figura 62. Análisis por SDS-PAGE al 15 % de la purificación de los mutantes sencillos de cisteína de <i>CdFur</i> por IMAC-Ni.	121
Figura 63. Análisis por SDS-PAGE al 15 % de la purificación de los mutantes dobles de cisteína de <i>CdFur</i> por IMAC-Ni.	122
Figura 64. Predicción de la estructura secundaria de la proteína Fur de <i>C. difficile</i>	123
Figura 65. Espectro de dicroísmo circular de la proteína recombinante <i>CdFur</i>	124
Figura 66. Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de la proteína <i>CdFur</i> WT y sus mutantes de cisteína.	124
Figura 67. Análisis de la actividad de unión al DNA de los mutantes de cisteína de <i>CdFur</i> mediante ensayos de retardo en gel de poliacrilamida al 8 %.	125
Figura 68. Identificación de residuos de cisteína importantes para el estado redox de <i>CdFur</i> mediante ensayos de retardo en gel de poliacrilamida al 8 % en ausencia de DTT.	126
Figura 69. Identificación de residuos de cisteína de <i>CdFur</i> importantes para la unión a metal mediante ensayos de retardo en gel de poliacrilamida al 8 % en presencia de metal regulador.	126
Figura 70. Efecto de la oxidación-reducción en el estado de oligomerización de <i>CdFur</i>	128
Figura 71. Efecto de la oxidación-reducción en la actividad de unión al DNA de <i>CdFur</i> mediante ensayo de retardo en gel de poliacrilamida al 8 %.	129
Figura 72. Efecto de la oxidación-reducción en el estado de oligomerización de los mutantes simples de cisteína de <i>CdFur</i>	131
Figura 73. Efecto de la oxidación-reducción en el estado de oligomerización de los mutantes dobles de cisteína de <i>CdFur</i>	132
Figura 74. Medida del contenido en cisteínas libres de la proteína <i>CdFur</i> y los mutantes de cisteína.	133
Figura 75. Reacción entre el AMS y cisteínas libres.	134
Figura 76. Análisis del estado redox de las cisteínas mediante ensayos de alquilación con AMS.	135
Figura 77. Análisis del ensayo de alquilación con AMS en diversos mutantes simples de cisteína.	135
Figura 78. Detección de zinc por tinción con PAR mediante electroforesis desnaturalizante.	137
Figura 79. Análisis del efecto de la pérdida de zinc en <i>CdFur</i> mediante ensayos de entrecruzamiento químico.	141
Figura 80. Prueba de actividad del mutante doble C101/104A mediante ensayos de retardo en gel de poliacrilamida al 8 %.	142
Figura 81. Comparación del modelo de Fur de <i>C. difficile</i> con Fur de <i>H. pylori</i>	143
Figura 82. Comparación del modelo de Fur de <i>C. difficile</i> con Fur de <i>V. cholerae</i>	144
Figura 83. Comparación del modelo de Fur de <i>C. difficile</i> con Zur de <i>E. coli</i>	144
Figura 84. Comparación del modelo de Fur de <i>C. difficile</i> con Fur de <i>C. jejuni</i>	145
Figura 85. Espectro de absorción en el UV-Vis del grupo hemo libre.	146
Figura 86. Formación del complejo <i>CdFur</i> -hemo mediante espectroscopía.	147
Figura 87. Espectros de absorción en el UV-Vis de la interacción de <i>CdFur</i> con el hemo.	147
Figura 88. Estudio por espectroscopía diferencial de la unión del grupo hemo a <i>CdFur</i>	149
Figura 89. Estudio del efecto del grupo hemo en la actividad de <i>CdFur in vitro</i> mediante ensayos de retardo en gel de poliacrilamida al 8 %.	150
Figura 90. Estudio de la interacción entre <i>CdFur</i> y hemo por ITC.	151

Figura 91. Espectros diferenciales de los mutantes de cisteína de la proteína <i>CdFur</i> interaccionando con el grupo hemo.....	153
Figura 92. Curva de saturación del grupo hemo con los mutantes de cisteína de <i>CdFur</i>	154
Figura 93. Proceso de reconstitución de <i>CdFur</i> con hemo..	156
Figura 94. Espectros de absorción UV-Vis de la proteína <i>CdFur</i> reconstituida con hemo.....	156
Figura 95. Curvas de desnaturalización térmica seguida por fluorescencia de la proteína <i>CdFur</i> en diferentes condiciones.....	158
Figura 96. Curvas de desnaturalización térmica seguida por fluorescencia de la proteína <i>CdFur</i> con diferentes concentraciones de DMSO..	159
Figura 97. Estructura química de los compuestos pertenecientes a la librería química Prestwick® identificados como positivos.	160
Figura 98. Análisis del efecto del DMSO sobre la actividad de <i>CdFur</i> mediante ensayos de retardo en gel de poliacrilamida al 8 %.....	161
Figura 99. Análisis del efecto de los cinco compuestos sobre la actividad de <i>CdFur</i> mediante ensayos de retardo en gel de poliacrilamida al 8 %.....	162
Figura 100. Interacción entre <i>CdFur</i> y los compuestos seleccionados..	163
Figura 101. Propuesta de mecanismo de acción de <i>CdFur</i> basado en un interruptor redox. ..	181

Índice de tablas

Tabla 1. Cepas de <i>E. coli</i> .	55
Tabla 2. Antibióticos utilizados.	55
Tabla 3. Composición del medio mínimo M9 sin hierro.	56
Tabla 4. Plásmidos utilizados y obtenidos en este trabajo.	57
Tabla 5. Rango de concentraciones para cada reactivo en una reacción de PCR.	57
Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados.	58
Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para hacer los mutantes de cisteína mediante el método de mutagénesis dirigida.	60
Tabla 8. Porcentaje de agarosa recomendado según el tamaño del fragmento de DNA.	61
Tabla 9. Mezcla de reacción para la digestión enzimática del DNA.	72
Tabla 11. Composición de los geles desnaturizantes de poliacrilamida.	73
Tabla 12. Recta patrón para la determinación de hierro.	77
Tabla 13. Composición de los geles no desnaturizantes para EMSA.	78
Tabla 14. Composición del tampón de reacción para medir actividad β -galactosidasa.	90
Tabla 15. Porcentajes de identidad y de similitud de las proteínas codificadas por los loci UAB_RS0205265 y UAB_RS0207325 de la cepa <i>C. difficile</i> ATCC 43255 con diversos homólogos Fur.	96
Tabla 16. Promotores de los distintos genes utilizados en los ensayos de actividad de unión al DNA de <i>CdFur</i> .	110
Tabla 17. Parámetros de crecimiento de las cepas empleadas en el ensayo de actividad β -galactosidasa.	116
Tabla 18. Cuantificación y rendimiento de la purificación de la proteína nativa <i>CdFur</i> y de todos los mutantes de cisteína.	120
Tabla 19. Resumen del número de cisteína totales, libres y formando puente disulfuro tras el análisis de los ensayos de alquilación.	136
Tabla 20. Determinación del contenido en metal mediante ICP-OES.	138
Tabla 21. Determinación mediante ICP-OES del contenido en zinc de cada uno de los mutantes de cisteína de <i>CdFur</i> .	139
Tabla 22. Posición de los picos de absorción en los espectros de proteínas de unión a hemo.	148
Tabla 23. Valores de los parámetros de la interacción entre <i>CdFur</i> y hemo.	152
Tabla 24. Posición de los picos de absorción (nm) en los espectros diferenciales de los complejos entre los mutantes de cisteína y el grupo hemo.	152
Tabla 25. Valores de la constante de disociación entre los mutantes simples de <i>CdFur</i> y el grupo hemo.	155
Tabla 26. Valores de la diferencia de temperatura (ΔT_m) causada por la unión de cada compuesto a <i>CdFur</i> .	160
Tabla 27. Valores de los parámetros de la interacción entre <i>CdFur</i> y los compuestos.	163

Abreviaturas

Abs	Absorbancia
Amp	Ampicilina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> (Colección americana de cultivos tipo)
BCA	Ácido bicinconínico
BsFur	Proteína Fur de <i>Bacillus subtilis</i>
BSA	<i>Bovine Serum Albumine</i> (Albúmina sérica bovina)
CdFur	Proteína Fur de <i>Clostridium difficile</i>
CjFur	Proteína Fur de <i>Campylobacter jejuni</i>
Cm	Cloranfenicol
Da	Dalton
DC	Dicroísmo circular
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DNasa	Desoxirribonucleasa
dNTP	Mezcla de cuatro desoxirribonucleótidos
D.O. _x	Densidad óptica a la longitud de onda x
DONS	Deoxinivalenol sulfonato
Dps	<i>DNA binding protein from starved cells</i>
dsDNA	DNA de doble cadena
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)
DTT	1,4-ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMSA	<i>Electrophoretic Mobility Shift Assay</i> (Ensayo de retardo en gel de la movilidad electroforética)
EPR	Resonancia paramagnética de electrón
Feo	<i>Ferrous iron transporter</i>
Fnr	<i>Fumarate and nitrate reduction transcriptional regulator</i>
Fur	<i>Ferric uptake regulator</i>
HpFur	Proteína Fur de <i>Helicobacter pylori</i>
HTS	<i>High-Throughput Screening</i>
ICP-OES	<i>Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry</i>
IMAC	<i>Immobilized Metal ion Affinity Chromatography</i> (cromatografía de afinidad a iones metálicos)
IPTG	isopropyl- β -D-tiogalactopiranosido
Irr	<i>Iron response regulator</i>
ITC	<i>Isothermal Titration Calorimetry</i> (Calorimetría de titulación isotérmica)
Kb	Kilobase
Km	Kanamicina

LB	Medio de cultivo Luria Bertani
LmFur	Proteína Fur de <i>Listeria monocytogenes</i>
M	Concentración Molar
MALDI/TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization- Time of Flight</i>
MCS	<i>Multi cloning site</i> (Sitio de clonaje múltiple)
mM	Concentración milimolar
MQ	Milli-Q
Mur	<i>Manganese uptake regulator</i>
Nm	Nanómetros
Nur	<i>Nickel uptake regulator</i>
ONPG	<i>o</i> -nitrofenil- β -D-galactopiranosido
O/N	<i>Overnight</i> (toda la noche)
PAGE	<i>Polyacrilamide gel electrophoresis</i> (Electroforesis en gel de poliacrilamida)
PAR	4-(2-piridilazo)-resorcinol
pb	pares de bases
PCC	<i>Pasteur Culture Collection</i> (Colección de cultivos del instituto Pasteur)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (reacción en cadena de la polimerasa)
PDB	<i>Protein Data Bank</i>
PEG	Polietilenglicol
PerR	<i>Peroxide regulator</i>
PMSF	Fluoruro de fenil metil sulfonilo
PSA	Persulfato Amónico
Px	Región promotora del gen <i>x</i>
p/v	relación peso / volumen
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido ribonucleico)
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> (Especies reactivas de oxígeno)
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i> (Dodecil sulfato sódico)
SOD	Superóxido dismutasa
TCA	Ácido tricloroacético
TEMED	N, N, N', N'-tetra-metil-etilendiamina
TPEN	N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylenediamine
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano
UV-Vis	Luz UltraVioleta-Visible
V	Voltios
VcFur	Proteína Fur de <i>Vibrio cholerae</i>
v/v	relación volumen / volumen
WT	<i>Wild type</i> (Silvestre)

Zur	<i>Zinc uptake regulator</i>
ϵ	Coeficiente de extinción molar
$^{\circ}\text{C}$	grados centígrados
μg	microgramos
μl	microlitros
μM	Concentración micromolar

BASES NITROGENADAS

A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina

AMINOÁCIDOS

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

INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 El patógeno *Clostridium difficile*

1.1.1. Características generales

*Clostridium difficile*¹ es un bacilo anaerobio estricto, Gram-positivo y formador de esporas que puede ser parte de la microbiota intestinal normal en individuos sanos, aunque esto ocurre en una minoría de la población (entre el 1 y 3 %). En ocasiones, se comporta como un patógeno oportunista, siendo la infección por *C. difficile* (CDI, *Clostridium difficile* Infection) la principal causa de diarrea adquirida en el hospital. Esto se debe a los cambios que se producen en la flora intestinal de los pacientes hospitalizados como consecuencia de un tratamiento prolongado con antibióticos, en especial los de amplio espectro (Carroll and Bartlett, 2011).



Figura 1. Imágenes de *C. difficile*. Microscopía electrónica de barrido coloreada (SEM, *Scanning Electron Microscope*) de una colonia de *C. difficile* (izquierda). Esporas de *C. difficile* alrededor de una célula vegetativa (derecha). Cuando las esporas se purifican en ocasiones se encuentran bacterias individuales en la preparación.

C. difficile puede transmitirse de persona a persona o a través del contacto con objetos contaminados con heces (transmisión fecal-oral) que contienen esporas de este patógeno. El contagio se produce con frecuencia en ambiente hospitalario, por lo que el riesgo aumenta en proporción a la duración de la hospitalización. Las esporas pueden sobrevivir en entornos oxigénicos y son resistentes al calor, la radiación, los productos químicos y los antibióticos, lo que dificulta su eliminación en ambientes contaminados. Los pacientes infectados por *C. difficile* tienen una alta tasa de recaída debido a la capacidad de este patógeno de completar su ciclo vital (espora - célula vegetativa - espora) dentro del hospedador. De hecho, es capaz de esporular una vez que ha colonizado el tracto gastrointestinal, lo que complica aún más el tratamiento de la enfermedad.

¹ *Clostridium difficile* ha sufrido cambios recientemente en cuanto a su nomenclatura. En el año 2013 se redefinió como *Peptoclostridium difficile* (Yutin and Galperin, 2013) y en el año 2016 ha sido de nuevo renombrada como *Clostridioides difficile* (Lawson *et al.*, 2016). Sin embargo, a lo largo de este trabajo se utilizará la nomenclatura anterior y todavía muy extendida de *C. difficile*.

1.1.2. Esporulación

Las esporas son formas de supervivencia bacteriana con actividad metabólica mínima que permanecen viables, aún en condiciones de estrés ambiental, durante largos periodos de tiempo. Se producen cuando las células vegetativas experimentan una alteración específica en su entorno que suele asociarse con deficiencia de nutrientes (Swick *et al.*, 2016). Para algunas bacterias patógenas como *C. difficile*, este estado de desarrollo sirve como medio de supervivencia durante la transmisión de un hospedador a otro. De hecho, *C. difficile* entra en el cuerpo con más frecuencia como espora que como célula vegetativa y una vez dentro del hospedador germina. La propia espora parece ser generalmente no tóxica para el hospedador, más bien, la toxicidad surge de los factores producidos después de la germinación, cuando el crecimiento celular vegetativo se reanuda. Por ello, las esporas son una forma altamente infecciosa de la bacteria que puede permanecer en el intestino después del tratamiento antibiótico, germinar de nuevo en células viables y conducir a la recurrencia de la enfermedad (Carroll and Bartlett, 2011).

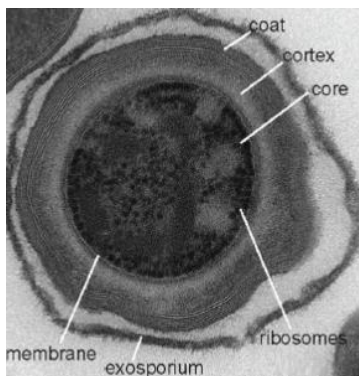


Figura 2. Microscopía electrónica de transmisión de una espora de *C. difficile*. Se muestra la ultraestructura de la espora incluyendo el exosporio, capa, corteza, núcleo, membrana y ribosomas. Imagen tomada de Lawley *et al.*, 2009 .

Gracias a la obtención de esporas de *C. difficile* altamente purificadas por parte de Lawley *et al.*, 2009, se pudieron realizar estudios de su biología e infectividad. La microscopía electrónica de transmisión mostró que las esporas están compuestas por diversas capas dispuestas en anillos concéntricos (figura 2). La capa de la espora más expuesta al exterior se denomina *exosporio*. Tiene una superficie lisa y permanece en estado latente excepto durante la germinación cuando desarrolla numerosas proyecciones filamentosas que se unen a las microvellosidades del colon. El exosporio se separa de la siguiente capa por un "hueco" denominado espacio intermedio. A continuación del exosporio y hacia el interior se encuentran la *capa* o *revestimiento de la espora*, que actúa como un tamiz restringiendo el paso de moléculas grandes y proporciona una protección significativa contra las defensas del hospedador. Tiene una composición bioquímica compleja compuesta aproximadamente por 70 tipos de proteínas organizadas en varias capas. Suele tener una superficie mayor que la corteza en la que se asienta siendo relativamente flexible y puede plegarse y desplegarse en respuesta a cambios en el grado de hidratación de la espora. La *corteza*, está constituida por una capa de peptidoglicano que contiene dos subcapas, la corteza y la pared celular del germen. La pared de la célula germinal, que se encuentra envuelta por la corteza, está

destinada a convertirse en la pared celular naciente de la célula vegetativa cuando empieza el crecimiento. Un papel importante de la corteza es mantener el estado relativamente seco del núcleo mediante la constricción del volumen del mismo. Por último, en el interior de la espora hay una *membrana interna* envolviendo al *núcleo*. En el núcleo se observan ribosomas y nucleoproteínas densamente empaquetadas con el DNA. Este compartimento contiene además iones calcio formando un complejo de estequiometría 1:1 con ácido dipicolínico (DPA) (Ca^{2+} -DPA), que sirve para mantener el estado dormido de la espora y la resistencia a agentes que dañan el DNA (Swick *et al.*, 2016).

Todas las capas exteriores de la espora permiten el paso de los factores de germinación (o germinantes) con el fin de que estos lleguen hasta los receptores. Cuando los germinantes se unen a sus receptores, se inician vías de transducción de señales que conducen en última instancia a la reanudación del metabolismo. En otras bacterias esporulantes como *Bacillus subtilis*, las proteínas receptoras de germinantes se encuentran incrustadas dentro de la membrana interna de la espora y al percibir la presencia de germinantes, activan la liberación de ácido Ca^{2+} -DPA del núcleo de la espora y se produce la posterior hidrólisis de la corteza. Sin embargo, en *C. difficile* el receptor germinante más caracterizado para este patógeno es CspC y se sitúa probablemente en la capa y/o la corteza (Francis *et al.*, 2013). Además, la hidrólisis de la corteza precede a la liberación de Ca^{2+} -DPA y la liberación de este complejo desde el núcleo puede depender del hinchamiento osmótico del núcleo tras la hidrólisis de la corteza (Francis *et al.*, 2015). Los factores de germinación para CspC son sales biliares y derivados de éstas, incluyendo colato, taurocolato y deoxicolato. Además, se ha asignado función germinante a los aminoácidos L-glicina y L-histidina (Sorg and Sonenshein, 2008).

Para *C. difficile*, la germinación en el hospedador depende en gran medida del metabolismo microbiano intestinal ya que la microbiota intestinal es responsable de la conversión de ácidos biliares en ácidos biliares secundarios, que inhiben la germinación de *C. difficile*. El tratamiento con antibióticos altera la estructura del microbioma intestinal y, por lo tanto, altera la capacidad de estas bacterias para sintetizar ácidos biliares secundarios. En ausencia de éstas moléculas inhibitoras, *C. difficile* puede germinar, crecer e infectar (Theriot *et al.*, 2014). En este sentido, el uso de trasplantes fecales para regenerar la flora natural del intestino ha sido exitoso para el tratamiento de la CDI resistente y recurrente (Bowman *et al.*, 2015).

Respecto al inicio de la esporulación en *C. difficile*, no se conoce completamente el proceso pero parece ser controlado por un sistema de dos componentes. Por un lado se conoce que el regulador de respuesta Spo0A es el responsable del inicio de la esporulación. Se trata de un regulador transcripcional global que no sólo controla la esporulación sino también la virulencia y la adaptación del patógeno al hospedador. La inactivación del gen *spo0A* produce una cepa incapaz de esporular (Pettit *et al.*, 2014). Por otro lado, Spo0A parece ser fosforilado directamente por una sensor-quinasa de histidina asociada a la esporulación (Underwood *et al.*, 2009). Además, se ha visto que el control de la esporulación está íntimamente asociado con la regulación de la producción de toxinas por lo que es un proceso adaptado para apoyar la patogénesis (Edwards *et al.*, 2016).

Finalmente, los genes que codifican las proteínas de las esporas están dispersos a través del genoma de *C. difficile*. Las proteasas y las proteínas de respuesta a estrés que protegen a la espora del estrés oxidativo durante la germinación son abundantes, al igual que las proteínas metabólicas. Las proteínas expuestas a la superficie pueden interactuar con el ambiente extracelular y pueden ser importantes en la adhesión celular (por ejemplo, la proteína de la capa S, SlpA) y la germinación (Lawley *et al.*, 2009).

1.1.3. Características del genoma

Existen diversas cepas de *C. difficile* cuyo genoma se ha secuenciado. La tipificación de las cepas se hace en función de tres estudios: ribotipado por PCR, electroforesis en gel de campo pulsado (PFGE) y análisis de endonucleasas de restricción [REA] de DNA de células completas. Como cepa de referencia se utiliza la cepa *C. difficile* 630 (ribotipo 012) por contener los atributos genéticos de una cepa resistente a fármacos, toxigénica, completamente virulenta, epidémica y totalmente transmisible. El genoma de *C. difficile* 630 está constituido por un cromosoma circular (4.290.252 pb) con un contenido G+C del 29,06 % y un plásmido (7.881 pb) con un contenido G+C del 27,9 %. En comparación con los genomas de otros patógenos del género *Clostridium* spp. incluyendo *C. botulinum* y *C. tetani*, *C. difficile* comparte sólo el 15 % de sus secuencias codificantes con estas especies y el 50 % de las secuencias codificadoras son únicas de *C. difficile*. Además, el 11 % del genoma está constituido por elementos genéticos móviles, entre ellos transposones conjugativos capaces de integrarse en el genoma del hospedador (Sebahia *et al.*, 2006).

Todas las cepas de *C. difficile* toxigénicas presentan un locus de patogenicidad (PaLoc) de 19,6 kb. Este locus está formado por 5 genes (*tcdA*, *tcdB*, *tcdC*, *tcdE* y *tcdR*). Los genes *tcdA* y *tcdB* codifican dos enterotoxinas TcdA y TcdB (toxinas A y B, respectivamente), que son los factores de virulencia primarios de *C. difficile*. Ambas son responsables de la patogenicidad de *C. difficile*. El gen *tcdR* actúa como regulador positivo de la expresión de *tcdA* y *tcdB*, mientras que *tcdC* actúa como regulador negativo, evitando la expresión de todo el locus PaLoc. Finalmente, *tcdE* codifica una holina que se encarga de hacer poros en la membrana citoplasmática que permite la liberación de las toxinas (figura 3A) (Rodríguez-Pardo *et al.*, 2013).

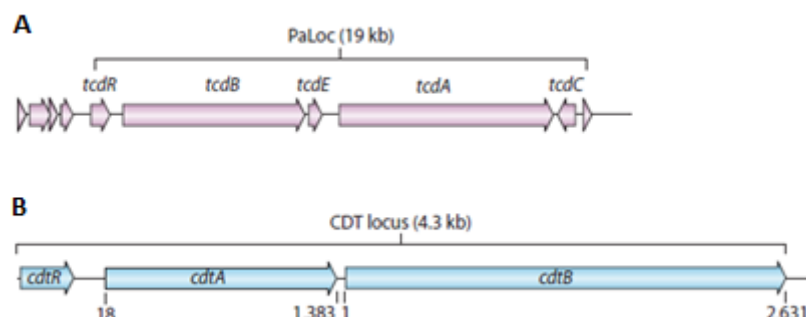


Figura 3. Esquema del locus de patogenicidad (PaLoc) y CDTLoc. A) PaLoc contiene los genes que codifican las 2 toxinas *tcdA* y *tcdB*, los genes reguladores *tcdR* y *tcdC* y la holina *tcdE*. B) CDTLoc es la región que codifica la transferasa de *C. difficile*, también conocida como toxina binaria. Imagen tomada de Carroll and Bartlett, 2011.

Además del mencionado PaLoc, algunas cepas de *C. difficile* expresan una toxina binaria conocida como CDT (*C. difficile Transferase*) formada por 2 subunidades (CDTa y CDTb) y que está implicada en una mayor toxicidad de la cepa. Los genes que codifican esta toxina se encuentran en el locus CDT (CDTLoc) de 6,2 kb. Se encuentra aproximadamente en el 6-12,5 % de las cepas. Las cepas sin toxina binaria CDT tienen una secuencia conservada de 68 pb en lugar del CDTLoc (figura 3B) (Schwan *et al.*, 2009).

Dineen *et al.* han demostrado que la expresión de los genes de las toxinas es reprimida por otro regulador transcripcional global llamado CodY. Este regulador actúa mediante el monitoreo de factores ambientales nutricionales. Además, demostraron que en presencia de nutrientes suficientes, como ciertos aminoácidos y GTP, CodY se une a la región promotora de *tcdR* y reprime la expresión de las toxinas. Cuando faltan nutrientes en el medio ambiente, la expresión génica de la toxina está desreprimida (Dineen *et al.*, 2007).

1.1.4. Patogenia de *C. difficile*

Como ya se ha mencionado, la infección por *C. difficile* es consecuencia de la ingestión de esporas de *C. difficile* toxigénico que resisten la acción del ácido gástrico, germinan en el intestino delgado y colonizan el colon. Una vez allí, la bacteria produce diversas enterotoxinas que inician una serie de fenómenos que culminan con la pérdida de la función de barrera que poseen las células epiteliales, la aparición de diarrea y la formación de pseudomembranas. Por ello es el principal agente causal de la colitis pseudomembranosa.

Estas pseudomembranas se manifiestan como placas amarillo-blanquecinas de 1-2 mm de diámetro que al evolucionar la enfermedad se unen hasta confluir en toda la pared del colon (figura 4). En el estudio microscópico las pseudomembranas contienen leucocitos necróticos, fibrina, moco y restos celulares, y la mucosa subyacente está infiltrada por neutrófilos.



Figura 4. Sección de colon de un individuo sano (izquierda) y de un individuo con colitis pseudomembranosa (derecha).

Tanto TcdA como TcdB son citotoxinas con actividad glucosiltransferasa, causando la interrupción de las fibras de actina del citoesqueleto que resulta en una disminución de la resistencia transepitelial, la acumulación de líquido y la destrucción del epitelio intestinal. Las toxinas, tras unirse a sus receptores, son introducidas en las células diana mediante endocitosis. Dentro de los endosomas, en un ambiente ácido, ocurre la digestión

autoproteolítica por la que la región N-terminal (con el dominio catalítico) se separa del resto de la toxina. Al parecer sólo esta región catalítica es la que será liberada al citosol y ejercerá su función incorporando glucosa a determinadas guanosin trifosfatasas (GTPasas) como las proteínas Rho y Rac, entre otras. Estas GTPasas se encargan, entre otras cosas, de la regulación de determinados procesos de señalización que están implicados en funciones relacionadas con el mantenimiento de la barrera epitelial y las interacciones intercelulares (formación del citoesqueleto), además de intervenir en la fagocitosis, la producción de citoquinas, etc. Fruto de todo este proceso, las células epiteliales se desestructuran separándose entre ellas e incluso muriendo y, por lo tanto, facilitando la migración de neutrófilos hacia el intestino y contribuyendo a la respuesta inflamatoria típica de la colitis. Finalmente cabe destacar que TcdA estimula la liberación del factor de necrosis tumoral de macrófagos activados, así como la producción de citoquinas (figura 5).

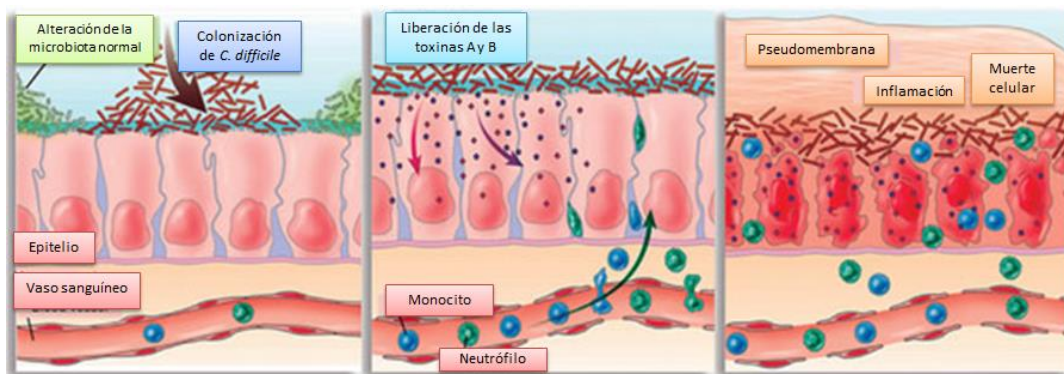


Figura 5. Patogenicidad de *Clostridium difficile*. Las células de *C. difficile* vegetativas al llegar al colon producen y liberan las toxinas A y B asociadas a enzimas hidrolíticas. Las toxinas A y B llevan a la producción del factor de necrosis tumoral y citoquinas proinflamatorias lo que provoca un aumento de la permeabilidad vascular y el reclutamiento de neutrófilos y monocitos. Esto produce la alteración de las uniones intercelulares de la barrera epitelial y apoptosis de las células epiteliales. La producción local de enzimas hidrolíticas conlleva la degradación del tejido conectivo, colitis, formación de pseudomembrana y diarrea acuosa.

En cambio, la toxina binaria CDT ya mencionada, es una ADP-ribosiltransferasa específica de actina. Esta toxina pertenece al mismo tipo que las toxinas diftérica, pertussis o del cólera. El mecanismo patogénico de dicha toxina aún no está del todo claro, pero parece que interviene incrementando la adhesión de las cepas de *C. difficile* y además actúa a nivel del citoesqueleto de la célula provocando una mayor pérdida de líquidos. Así, las cepas portadoras de toxina binaria se han asociado a una mayor virulencia (Carter *et al.*, 2007).

C. difficile presenta, además, muchos otros factores de patogenicidad, como algunas proteínas de superficie implicadas en su adhesión y estimulación del proceso inflamatorio (proteínas de la capa S que recubren toda la superficie celular externa) (Fagan *et al.*, 2009), u otras implicadas en la unión a las células epiteliales intestinales y cuya expresión se ve afectada por determinados antibióticos como la ampicilina y la clindamicina (Carroll and

Bartlett, 2011), pero sin duda todas ellas son de menor importancia que las mencionadas previamente.

1.1.5. Flexibilidad metabólica

Generalmente se supone que todos los patógenos bacterianos humanos (incluyendo a *C. difficile*) son organismos heterótrofos puesto que la colonización del intestino humano da acceso a un ambiente rico en nutrientes orgánicos. Principalmente se alimentan de almidón y azúcares (sacarolíticos) o de proteínas y péptidos (proteolíticos). Estos sustratos se fermentan en el intestino principalmente a ácidos orgánicos, dióxido de carbono e hidrógeno. Bajo condiciones anaerobias, existen dos vías bien conocidas que pueden hacer uso de esta mezcla de gases. Una es la que utilizan las bacterias metanógenas, microorganismos pertenecientes al género Archaea que obtienen energía mediante la producción de gas metano. La otra es la que utilizan los microorganismos acetógenos, que representan a las Eubacterias. Estos emplean la vía Wood-Ljungdahl (figura 6) para convertir $\text{CO}_2 + \text{H}_2$ en acetato (en ocasiones también en otros compuestos como etanol, 2,3-butandiol, butanol y/o butirato). La vía reductora de acetyl-CoA o Wood-Ljungdahl es la única vía de fijación lineal de CO_2 conocida y se ha especulado con la idea de que sea una de las primeras vías bioquímicas existentes en la Tierra (Wood *et al.*, 1986). El organismo modelo por el que se determinó esta vía enzimática fue *Moorella thermoacetica* (anteriormente *Clostridium thermoaceticum*) (Drake *et al.*, 2008), que se aisló originalmente en condiciones heterotróficas.

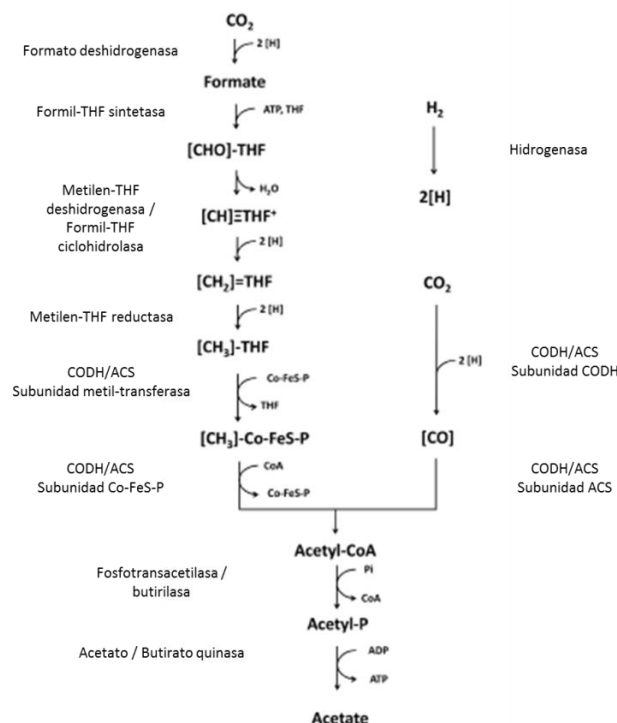


Figura 6. Vía de Wood-Ljungdahl y genes implicados de *C. difficile* 630. ACS, acetyl-CoA sintasa; CODH, monóxido de carbono deshidrogenasa; CoFeS, proteína corrinoide-hierro-azufre; THF, tetrahidrofolato. Imagen adaptada de Köpke, Straub and Dürre, 2013.

En un estudio realizado en 2013 se demostró que los genes de la vía de Wood-Ljungdahl estaban presentes y altamente conservados en todas las cepas de *C. difficile* secuenciadas hasta ese momento. Es decir, que *C. difficile* también era capaz de crecer en presencia de CO₂ + H₂ como única fuente de carbono y energía lo que representaría el primer patógeno bacteriano autotrófico identificado. En dicho estudio se demostró además que la capacidad de usar mezclas de gases para el crecimiento disminuye o se pierde tras el cultivo prolongado en condiciones heterotróficas. Por todo esto, la flexibilidad metabólica de *C. difficile* en el medio intestinal le permite crecer no sólo alimentándose de azúcares y proteínas (crecimiento heterotrófico) sino también de CO₂ y H₂ producidos por otras bacterias (autotrofia). Esto puede ser un rasgo importante para la patogenicidad de *C. difficile* ya que es capaz de evitar la competencia por diferenciación de nicho y contribuye a su supervivencia cuando crece en condiciones desfavorables que causan la muerte a otras bacterias (Köpke *et al.*, 2013).

1.1.6. Problemática actual

Desde el punto de vista epidemiológico ha habido en los últimos quince años, tanto en EEUU y Canadá como en Europa, un aumento del número y severidad de los casos, peor respuesta clínica a los tratamientos habituales y mayor mortalidad. Estos cambios se atribuyen a la aparición y diseminación de una cepa conocida como cepa B1/NAP1/027 (por presentar el patrón de restricción [REA] tipo B1, el patrón de campo pulsado NAP1, pertenecer al ribotipo 027 y tener, además, el toxinotipo iii).

Aunque los genomas de diferentes cepas de *C. difficile* están altamente conservados, el genoma de las cepas con ribotipo 027 tiene 234 genes adicionales en comparación con la cepa de referencia 630 (ribotipo 012), lo que puede contribuir a las distintas diferencias fenotípicas que se observan entre estas cepas en relación con la motilidad, la resistencia a los antibióticos y la toxicidad. Además, la cepa epidémica B1/NAP1/027 tiene cinco regiones genéticas únicas, ausentes tanto en cepas con ribotipo 027 no epidémicas, como en la cepa 630. Estas regiones genéticas incluyen una nueva isla fágica, un sistema regulador de dos componentes y reguladores transcripcionales (Stabler *et al.*, 2009).

En concreto, el motivo por el que la cepa *C. difficile* 027 presenta mayor virulencia se asocia a la presencia de una mutación en el gen regulador *tcdC*. Esto hace que la cepa produzca elevados niveles de las toxinas TcdA (16 veces más) y TcdB (23 veces más) comparadas con otras cepas toxigénicas aisladas. Además, expresa la toxina binaria CDT, tiene la capacidad de hiperesporular y muestra alta resistencia a antibióticos.

En el tratamiento contra las infecciones de leves a moderadas por *C. difficile* se suelen usar actualmente los antibióticos metronidazol y vancomicina siendo el metronidazol el que se usa en primer lugar debido a su bajo coste. Hay estudios recientes que vinculan la resistencia a metronidazol en *C. difficile* 027 con la alteración de la expresión de proteínas de reparación del DNA como RecA o la endonucleasa III; proteínas redox como tiorredoxina, tiorredoxina reductasa o ruberitina; y proteínas del metabolismo del hierro como ferredoxina, transportadores de hierro ABC o el regulador transcripcional Fur (*Ferric Uptake Regulator*) (Chong *et al.*, 2014).

1.2. Captación de hierro y metabolismo redox en procariotas

El hierro es un nutriente esencial para el crecimiento de microorganismos, así como un metal nocivo debido a su capacidad de generar especies reactivas de oxígeno (ROS) como el ion superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo extremadamente destructivo ($\cdot OH$), a través de la reacción de Fenton (figura 7). Por esta razón, las bacterias deben controlar estrechamente la captación y almacenamiento de hierro de una manera que restrinja la acumulación de ROS.

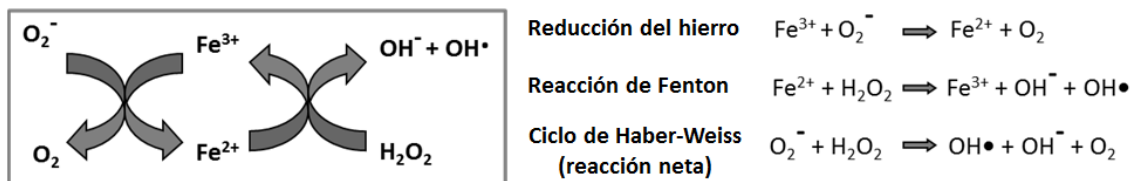


Figura 7. Ciclo de Haber-Weiss. El ciclo representa la reacción neta entre la reacción de reducción del hierro y la reacción de Fenton.

Como consecuencia de la exposición natural a ROS, muchas bacterias, particularmente aerobios y patógenos, han desarrollado mecanismos para resistir el ataque de estrés oxidativo al que son sometidos por las células del hospedador en respuesta a la infección del patógeno. La principal estrategia que emplean las bacterias, es la producción de enzimas que degradan las especies ROS (y sus precursores) para mantener niveles de estrés dentro del rango de tolerancia. Entre las enzimas de degradación de ROS se incluyen superóxido dismutasas, catalasas, alquilhidroperoxidadas, superóxido reductasas y peroxidadas y algunas de ellas, curiosamente, poseen hierro como cofactor (por ejemplo, Fe mononuclear en algunas superóxido dismutasas y superóxido reductasas y hierro hemínico en el caso de catalasas) (Cornelis *et al.*, 2011).

Puesto que el hierro es un elemento esencial para la vida a la par que uno de los principales factores que contribuyen al estrés oxidativo, y además es requerido por algunas enzimas degradantes de ROS, no es sorprendente encontrar que el control de la homeostasis del hierro y las vías de respuesta a estrés oxidativo estén coordinados.

1.2.1. Captación de hierro en procariotas

El hierro, metal de transición, es el cuarto elemento en abundancia en la corteza terrestre. Existe en un amplio rango de estados de oxidación (desde -2 hasta +6) aunque Fe^{2+} (forma ferrosa) y Fe^{3+} (forma férrica) son las habituales en condiciones fisiológicas. El potencial de óxido-reducción de Fe^{2+}/Fe^{3+} hace al hierro extremadamente versátil cuando es incorporado como centro catalítico o como portador de electrones (Pandey *et al.*, 1994). Tras la evolución de la fotosíntesis oxigénica, la química del hierro se alteró significativamente. La

forma predominante del hierro cambió del estado ferroso, relativamente soluble (0,1 M a pH 7,0), a la forma férrica extremadamente insoluble (10^{-18} M a pH 7,0). Por eso, a pesar de su abundancia, se encuentra poco biodisponible ya que la forma férrica reacciona rápidamente con el oxígeno formando hidróxidos insolubles (Andrews *et al.*, 2003).

El hierro es un factor de crecimiento esencial para los organismos ya que participa en múltiples procesos metabólicos como la fotosíntesis, fijación del N_2 , metanogénesis, respiración, ciclo de los ácidos tricarboxílicos, transporte de oxígeno, regulación génica y síntesis del DNA. Esta funcionalidad tan diversa reside en su capacidad para incorporarse a las proteínas en distintas formas; como especie mono o binuclear o dentro de estructuras más complejas como los grupos sulfoférricos (Fe-S) y los grupos hemo (Andrews *et al.*, 2003).

Debido a la escasa biodisponibilidad del hierro, los microorganismos ambientales aeróbicos se enfrentan frecuentemente con escasez de este metal. Para los microorganismos patógenos, el problema de la restricción de hierro es aún más extremo ya que el hospedador limita la disponibilidad de hierro al secuestrarlo dentro de proteínas intracelulares tales como hemoglobina, citocromos o ferritinas, o por quelación de Fe^{3+} extracelular utilizando glicoproteínas, transferrina y lactoferrina (Andrews *et al.*, 2003).

A continuación se describen las principales estrategias desarrolladas por los organismos procariontes para enfrentarse a la deficiencia de hierro. Estas consisten principalmente en la inducción de genes que codifican proteínas de captación de metal y en la disminución de la expresión de aquellos que codifican proteínas dependientes de hierro, en favor de las que no lo requieren. También se favorece la liberación de metal de depósitos intracelulares.

1.2.1.1. Captación de hierro extracelular en bacterias

Uno de los principales sistemas de captación de hierro extracelular que poseen las bacterias es la secreción de unas moléculas pequeñas quelantes de Fe^{3+} denominadas sideróforos. Estos compuestos de bajo peso molecular (<1000 Da) poseen una alta afinidad y especificidad por el ion férrico ($K_{aff} > 10^{30}$) y se sintetizan y secretan al exterior cuando hay deficiencia de hierro. Los sideróforos forman complejos hexadentados octaédricos con el Fe^{3+} y suelen ser catecolatos, hidroxamatos y carboxilatos, aunque también pueden ser péptidos ribosomales. Algunos sideróforos bien caracterizados en *Escherichia coli* son la enterobactina (catecolato) y el ferricromo (hidroxamato) (Andrews *et al.*, 2003).

En bacterias Gram-positivas como *C. difficile*, que sólo poseen una membrana, el ferrisideróforo (Fe^{3+} -sideróforo) se une a una lipoproteína receptora de sideróforos (SBP, *Siderophore Binding Protein*) presente en la membrana citoplasmática (Fukushima *et al.*, 2014). A continuación, el ferrisideróforo es transferido a una permeasa de tipo ABC acoplada que lo introduce directamente en el citoplasma. Las SBPs suelen estar presentes en la membrana sólo bajo condiciones de carencia de hierro. Así se regula de forma muy precisa la entrada de hierro en la bacteria y se impide la entrada de moléculas perjudiciales como antibióticos o incluso bacteriófagos, que podrían emplear esos receptores como punto de entrada a la bacteria. Una vez dentro de la bacteria, el ferrisideróforo se disocia para que el metal pueda emplearse en el metabolismo celular. Este proceso suele estar mediado por una esterasa, como en el caso del sideróforo enterobactina, o hay un proceso reductor que

conduce a la liberación de Fe^{2+} dejando intacto el quelante de hierro (apo-sideróforo), permitiendo así que pueda ser reutilizado (figura 8) (Andrews *et al.*, 2003). Poco se sabe acerca de estas ferrisideróforo-reductasas, pero parece que algunas son proteínas que contienen un centro Fe-S, mientras que otras son flavoproteínas dependientes de NADP(H). En *C. difficile* 630 además de los genes *fhuCGBD* (*ferric hydroxamate uptake*) que codifican un sistema de transporte de ferricromo, el genoma codifica un sistema homólogo a la proteína Fpi/Ycl de *B. subtilis* que es un transportador de tipo ABC para el sideróforo de tipo catecolato, petrobactina.

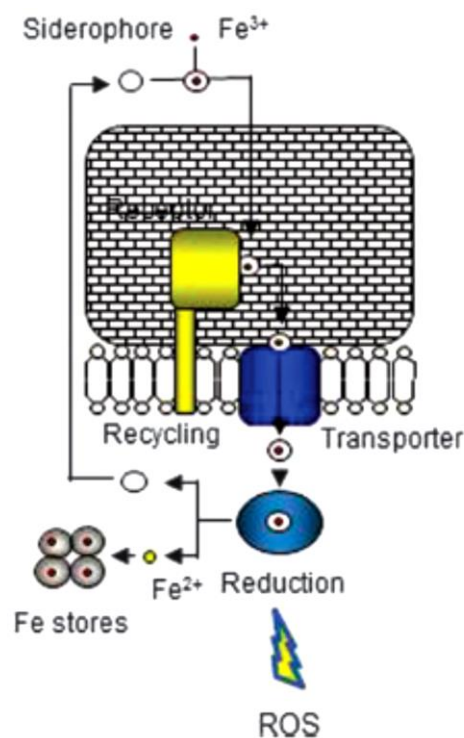


Figura 8. Sistema de captación de hierro extracelular mediado por sideróforos en bacterias Gram-positivas. El Fe^{3+} es quelado por el sideróforo excretado y el complejo ferrisideróforo se une a un receptor que posteriormente lo transfiere a un transportador de membrana. Una vez en el citoplasma, el hierro se disocia gracias a un proceso de reducción o por una esterasa. Imagen tomada de Cornelis *et al.*, 2011.

Muchas bacterias poseen además, un sistema de transporte de hierro llamado Feo (*Ferrous iron transporter*), que difiere de manera importante con el sistema de transporte dependiente de sideróforos. Este sistema actúa bajo condiciones anaerobias transportando Fe^{2+} en lugar de Fe^{3+} . Fue descrito por primera vez en *E. coli* y se trata de un complejo transmembrana codificado por los genes altamente conservados *feoAB* que se reprime en suficiencia de hierro (Kammler *et al.*, 1993). Generalmente, estos sistemas requieren de la proteína de membrana, FeoB, y la proteína citoplasmática, FeoA. A pesar de que se sabe poco acerca de los sistemas de captación de hierro en organismo patógenos anaerobios como *C. difficile*, en el genoma de *C. difficile* 630 se han identificado tres sistemas FeoAB (CD630_14770-14790, CD630_15170-15180 y CD630_32730-32740) más una proteína aislada

FeoA (CD630_17451). Estos sistemas son importantes en la captación de hierro en este patógeno al ser un organismo anaerobio (Ho and Ellermeier, 2015).

El tercer sistema de adquisición de hierro descrito en bacterias está compuesto por los transportadores de metal de tipo ABC. Estos sistemas tienen especificidad por el hierro pero no precisan de receptores situados en la membrana externa o sideróforos. Un ejemplo serían los sistemas Sfu y Fbp que parecen estar implicados en el transporte de hierro liberado por transferrina o lactoferrina a través de la membrana citoplasmática. El genoma de *C. difficile* 630 presenta tres operones de genes que codifican sistemas de transporte de hierro de tipo ABC (CD630_16470-16500, CD630_29970-29990 y CD630_35250-35300) que todavía no han sido caracterizados. Además, en el genoma hay otros dos grupos de genes de transporte tipo ABC (CD630_29920-29890 y CD630_18910-18920) cuyos sustratos no han sido identificados.

Aunque se conoce más sobre los sistemas transportadores de hierro desarrollados por las bacterias en deficiencia de éste, en condiciones de suficiencia (~10 µM), la captación de hierro podría producirse mediante transportadores de baja afinidad aún por caracterizar. Una vez internalizado, el hierro puede ser utilizado para el ensamblaje de cofactores activos como hemo, citocromos o grupos Fe-S.

1.2.1.2. Captación de hierro procedente del hemo

Otra fuente importante de hierro, sobre todo para las bacterias patógenas, es el hemo que obtienen de los hospedadores que colonizan. De hecho, el hemo es la fuente más abundante de hierro en mamíferos, por lo que no es de extrañar que las bacterias patógenas hayan desarrollado mecanismos para obtener hierro a partir de este grupo prostético. Para los patógenos extracelulares, la obtención del hemo a partir del hospedador requiere de la liberación de la hemoglobina de los glóbulos rojos, proceso realizado por hemolisinas y proteasas. El hemo liberado de esta proteína se asocia rápidamente con proteínas presentes en el plasma del hospedador como la hemopexina (principal proteína transportadora de hemo en el plasma) o la albúmina. Esto ocurre porque el hemo en forma libre es tóxico y altamente hidrofóbico. Se han descrito dos tipos de vías para la captación de hemo en bacterias: una basada en la liberación de hemóforos extracelulares que se unen directamente al hemo liberado y lo internalizan en la bacteria, mientras que la otra vía implica proteínas receptoras que se unen directamente a las hemoproteínas, hemoglobina y hemopexina. En esta segunda vía, los receptores presentes en la membrana citoplasmática de la bacteria, extraen el hemo de las hemoproteínas y lo internalizan en el citoplasma mediante transportadores de tipo ABC (Andrews *et al.*, 2003). Una vez dentro de la bacteria, el hemo es degradado por una hemooxigenasa a biliverdina y CO, liberándose el hierro (figura 9). Recientemente se ha descrito en una cepa de *E. coli* una vía anaeróbica en la que se obtiene el hierro del hemo dejando intacto el anillo tetrapirrólico y sin utilizar oxígeno como cosustrato (LaMattina *et al.*, 2016).

En el genoma de *C. difficile* 630 se han encontrado varios genes que codifican proteínas de la ruta de biosíntesis del hemo, dos transportadores de hemo, una hemolisina hipotética. Además, se ha estudiado cómo *C. difficile* es capaz de crecer con hemoproteínas como única fuente de hierro *in vitro* demostrando la importancia que este grupo prostético tiene para el

patógeno (Cernat and Scott, 2012). Debido al carácter anaeróbico de este patógeno, no se ha encontrado ninguna hemooxigenasa en su genoma.

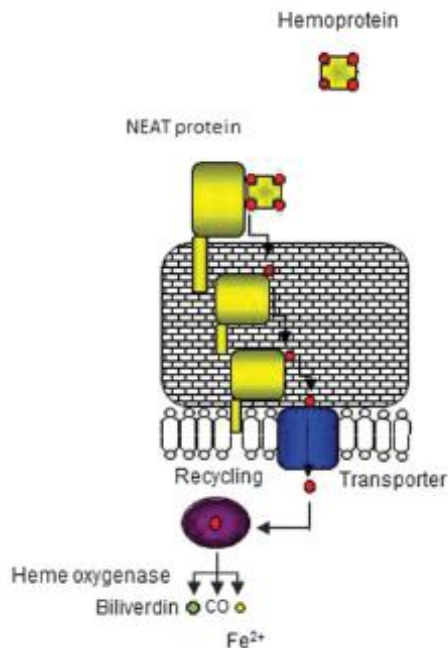


Figura 9. Sistemas de captación de hemo en bacterias Gram-positivas. La hemoproteína es reconocida por un receptor y el hemo extraído es transferido por las proteínas NEAT (Near Transporters) hasta un transportador. Una vez en el citoplasma, el hemo es degradado por una hemooxigenasa a biliverdina, CO y hierro. Imagen tomada de Cornelis *et al.*, 2011.

1.2.1.3. Almacenamiento de hierro en bacterias

Además del hierro y hemo extracelulares, otra fuente importante de hierro en las bacterias es el que se encuentra almacenado en sus reservas intracelulares dentro de las proteínas de almacenamiento de hierro. Estos depósitos de hierro pueden usarse para aumentar el crecimiento bacteriano cuando el hierro extracelular es escaso y, además, previene el daño celular de los ROS porque el metal se encuentra quelado. Existen tres tipos conocidos de proteínas de almacenamiento de hierro en las bacterias: las ferritinas, las bacterioferritinas y las Dps (*DNA-binding proteins from starved cells*). Los tres tipos de proteínas pueden existir en la misma bacteria y conservan semejanza estructural y funcional. La característica clave de estas proteínas es su arquitectura molecular, que les proporciona su capacidad de almacenamiento de hierro. Todas están compuestas por muchas subunidades iguales o muy parecidas que se ensamblan para formar una envoltura proteica aproximadamente esférica. Esta envoltura rodea una cavidad central que actúa como un depósito de almacenamiento de hierro (Andrews *et al.*, 2003). Estas proteínas normalmente captan el hierro en forma ferrosa soluble hasta depositar la forma férrica oxidada en el interior. El proceso de ferroxidación es llevado a cabo por residuos internos de las propias proteínas de almacenamiento. Las características principales de cada una de ellas se describen a continuación:

- Ferritinas: se encuentran en procariotas y en eucariotas. Son relativamente grandes con pesos moleculares de unos 500 kDa. Constan de 24 subunidades y pueden acumular de 2000 - 3000 átomos de hierro (figura 10) (Andrews *et al.*, 2003). Suelen emplear oxígeno en el proceso de reducción del hierro. *C. difficile* posee en su genoma el gen *ftnA* (CD630_21950) que codifica una ferritina todavía no caracterizada.
- Bacterioferritinas: sólo se encuentran en eubacterias. Su estructura es muy similar a la de las ferritinas y almacenan una cantidad de hierro semejante. La principal diferencia es que contienen hemo como grupo prostético, habiendo normalmente 12 en cada molécula de bacterioferritina. También *C. difficile* posee un gen de bacterioferritina (CD630_28650).
- Dps (DNA-binding proteins from starved cells): sólo se encuentran en procariotas. También se conocen con el nombre de mini-ferritinas porque constan de sólo 12 subunidades, por lo que son más pequeñas que las anteriores (tienen un tamaño aproximado de unos 250 kDa) y acumulan menos hierro (500 átomos). En lugar de oxígeno, suelen emplear H₂O₂ como oxidante del Fe²⁺. Por ello parece que el objetivo primario de las proteínas Dps en *E. coli* sea proteger el DNA del daño oxidativo que puede producir la presencia combinada de Fe²⁺ y H₂O₂ (Zhao *et al.*, 2002). No se han identificado por el momento en el genoma de *C. difficile*.

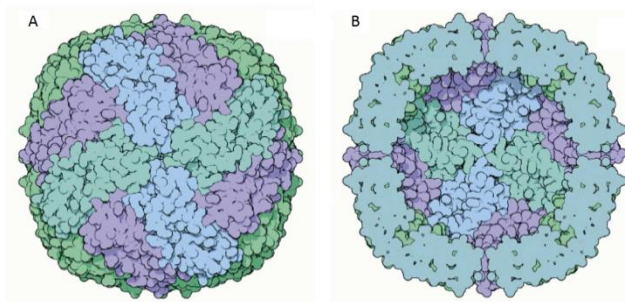


Figura 10. Ferritina. Se muestran las superficies externa (A) e interna (B) de una molécula de ferritina. Se puede apreciar el centro hueco donde se secuestran los átomos de hierro.

1.2.2. Metabolismo redox en bacterias

La vida en la Tierra comenzó bajo una atmósfera reductora siendo los primeros organismos vivos anaeróbicos. La aparición de las cianobacterias y posteriormente las algas y plantas terrestres provocó un incremento en la cantidad de oxígeno atmosférico hasta alcanzar los niveles actuales. Esto condicionó el modo de vida en la Tierra ya que a medida que el nivel de O₂ atmosférico aumentó, muchos anaerobios murieron o evolucionaron para adaptarse. Aquellos microorganismos que fueron adquiriendo tolerancia al oxígeno, fueron desechando a su vez enzimas que usan radicales glicilo y grupos de bajo contenido de hierro-azufre, que pueden ser degradados directamente por el oxígeno (Imlay, 2008a). Así, los microorganismos que se convirtieron en aerobios llegaron a usar finalmente el oxígeno para

producir energía, empleando para ello cadenas de transporte de electrones con el O₂ como aceptor final (respiración celular). El metabolismo aeróbico es eficiente debido al alto potencial de reducción del oxígeno molecular. Como contrapartida a dicha eficiencia, los microorganismos aeróbicos tuvieron que hacer frente al estrés oxidativo generado por la presencia de oxígeno y derivados de este (Latifi *et al.*, 2009).

Otros microorganismos, como los anaerobios y los fotosintéticos, tuvieron que preservar o desarrollar métodos para producir energía a través de la respiración anaeróbica, la fermentación o la fotosíntesis. Además, debido a la presencia del oxígeno y a pesar de mantenerse en ambientes anaeróbicos, también tuvieron que desarrollar estrategias para hacer frente a eventuales exposiciones al oxígeno que podrían causar daño oxidativo y afectar a la viabilidad celular.

En todos los procesos mencionados, se produce energía a través de reacciones redox que implican transportadores de electrones eficientes. Por lo tanto, la maquinaria redox desempeña un papel crítico en el mantenimiento de la homeostasis celular. Varios procesos metabólicos, de señalización y de transcripción, como la reducción de ribonucleótidos, la biosíntesis de aminoácidos o el plegamiento de proteínas, implican de hecho diferentes reacciones redox (Trachootham *et al.*, 2008).

1.2.2.1. Estrés oxidativo

Tanto en el metabolismo aeróbico como en el anaeróbico, existen mecanismos para hacer frente al estrés oxidativo provocado por el hecho de vivir en una atmósfera con oxígeno. El estrés oxidativo es causado por las especies reactivas de oxígeno (ROS, *Reactive Oxygen Species*). Las ROS son derivados parcialmente reducidos del oxígeno molecular que se generan 'accidentalmente' a través de la reducción incompleta del O₂ durante la respiración y a través de procesos reductores mediados por flavina (Woodmansee and Imlay, 2002). Las células fagocíticas de mamíferos, como por ejemplo los macrófagos, producen intencionalmente tales especies reactivas de oxígeno (así como especies reactivas de nitrógeno, NOS) con el fin de atacar y destruir microorganismos fagocitados. Esto implica la respuesta llamada "explosión oxidativa", que es un componente importante de la defensa inmune innata (Imlay, 2011). Estas ROS pueden causar daño a los grupos Fe-S, carbonilación de proteínas, oxidación de los residuos de cisteína o metionina, peroxidación de lípidos de membrana y daño al DNA.

Por sí mismo, el oxígeno molecular no tiene la suficiente capacidad oxidante para dañar las biomoléculas. Sin embargo, puede reducirse aceptando un electrón de radicales orgánicos o metales de transición como hierro o cobre. De este modo, se forman intracelularmente las especies: O₂⁻ (superóxido) y H₂O₂ (peróxido de hidrógeno) (figura 11) (Imlay, 2003). En los organismos anaerobios, en cambio, el oxígeno molecular sí puede inactivar directamente algunas enzimas especializadas que emplean radicales glicilo o centros metálicos de bajo potencial. La piruvato:formiato liasa y la ribonucleótido reductasa anaeróbica son ejemplos del primer grupo, mientras que la piruvato:ferredoxina oxidoreductasa y nitrogenasa son ejemplos del segundo (Sawers and Watson, 1998; Pieulle *et al.*, 1997).

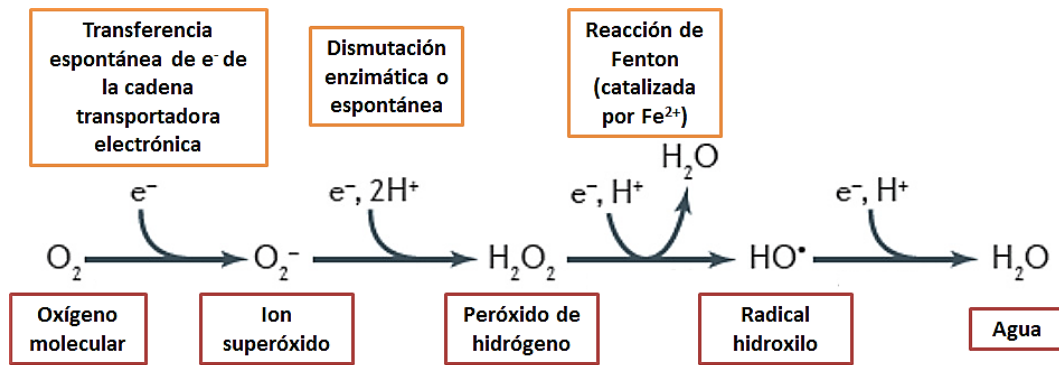


Figura 11. Proceso de formación de las especies reactivas de oxígeno (ROS). Se muestran los distintos estados redox del oxígeno por reducción univalente a partir del oxígeno molecular (O_2). Con excepción del O_2 , el superóxido (O_2^-), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y el radical hidroxilo ($OH \cdot$) son potentes oxidantes univalentes. Adaptado de Imlay, 2013.

Las especies reactivas de oxígeno difieren unas de otras en su reactividad, niveles de toxicidad y dianas. Algunas de las más importantes son:

- Oxígeno singlete (1O_2). Es una forma excitada del oxígeno molecular en la cual los dos electrones del orbital π antienlazante se encuentran apareados. Se produce por la captación de energía por parte del oxígeno (Imlay, 2003). El oxígeno singlete formado es extremadamente reactivo, tiene una vida media muy corta dentro de las células y reacciona con proteínas y lípidos.
- Ión superóxido (O_2^-). Se produce a partir de la reducción del oxígeno molecular. Su principal diana son los centros sulfoférricos [4Fe-4S] presentes en muchas enzimas del ciclo de Krebs o de la biosíntesis de aminoácidos. Este ion es atraído electrostáticamente por los átomos de hierro del clúster, produciendo la oxidación de éste y su inestabilización. Esto provoca a su vez la liberación de uno de los átomos de Fe^{2+} y la inactivación de la enzima (figura 12). El ion superóxido también altera la estructura de los aminoácidos aromáticos y de aquellos que contienen azufre (Imlay, 2003).

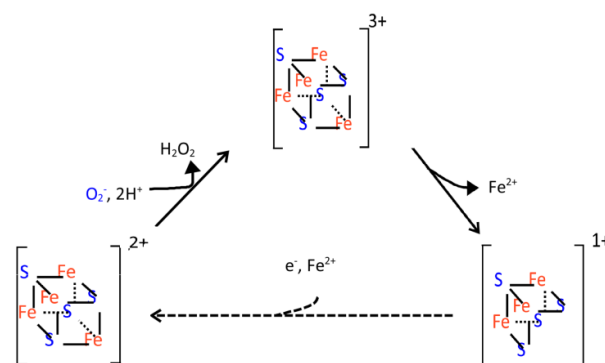
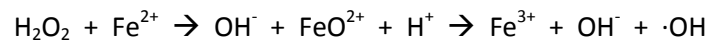


Figura 12. Inactivación de un grupo Fe-S por parte del ion superóxido. La flecha interior indica la vía de reparación del clúster. Imagen adaptada de Imlay, 2013.

- Peróxido de hidrógeno (H₂O₂). La principal causa de formación de peróxido de hidrógeno es la dismutación del ion superóxido, ya sea espontánea o inducida por la enzima superóxido dismutasa (SOD). Esta especie actúa sobre las proteínas, oxidando los grupos tiol de las cisteínas a ácido sulfénico que puede estabilizarse o provocar la formación de un puente disulfuro en la proteína. En menor medida también puede producir la carbonilación de las metioninas. Aunque con una velocidad menor que el ion superóxido, también es capaz de oxidar los centros sulfoferricos.
- Radical hidroxilo (·OH). Es la especie reactiva de oxígeno más dañina para las biomoléculas y se genera por radiólisis del agua o por la ya mencionada reacción de Fenton cuando el H₂O₂ se reduce:



Este radical es capaz de oxidar a la mayoría de las moléculas pero, afortunadamente, tiene una tasa de difusión muy baja, por lo que su efecto se limita al lugar donde se produce la reacción de Fenton. Tradicionalmente, se ha asociado el daño producido por el radical hidroxilo con la carbonilación de proteínas y la peroxidación de membranas. Sin embargo, el mayor impacto lo produce sobre el DNA ya que cualquier mínima lesión puede ser mutagénica e incluso letal (Imlay, 2003). Además se ha demostrado que los ácidos nucleicos unen hierro con bastante facilidad lo que les convierte en diana del radical hidroxilo.

1.2.2.2. Mecanismos de eliminación de ROS

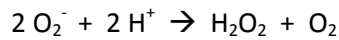
Los organismos disponen de varias estrategias para hacer frente al estrés oxidativo. Por un lado, la síntesis de un conjunto de proteínas encargadas tanto de eliminar las especies reactivas de oxígeno presentes en la célula, como de reparar los daños producidos. Por otro lado, la regulación de factores de transcripción que, a través de mecanismos redox, controlan la expresión de las proteínas anteriormente citadas.

Estos mecanismos de protección contra el daño oxidativo son de especial importancia para aquellas bacterias patógenas que además son anaerobias estrictas como *C. difficile*. Las primeras hipótesis (McCord *et al.*, 1971) llevaron a la idea, todavía proclamada en algunos libros de texto, de que los anaerobios estrictos son deficientes en enzimas de eliminación de ROS. Sin embargo, diversos trabajos realizados con anaerobios estrictos como *Bacteroides thetaiotaomicron*, algunos del género *Clostridia* o *Desulfovibrio gigas*, han demostrado que estos microorganismos poseen una maquinaria específica de detoxificación de ROS (Mishra and Imlay, 2012; Almeida *et al.*, 2013). Todos estos estudios apoyan la visión actual de que los anaerobios estrictos están altamente evolucionados y disponen de mecanismos eficaces para tratar el estrés oxidativo.

Los encargados de eliminar las especies reactivas de oxígeno son enzimas como la superóxido dismutasa, catalasa o peroxidasa y antioxidantes no enzimáticos como glutatión o ascorbato. A continuación se describen con más detalle cada una de ellas.

1.2.2.2.1. Superóxido dismutasas (SOD)

Estas enzimas catalizan la dismutación de dos moléculas de ion superóxido produciendo peróxido de hidrógeno y oxígeno:



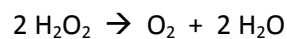
A pesar de que se transforma una especie reactiva de oxígeno (O_2^-) en otra también dañina para la célula, ésta última es menos tóxica, y además los mecanismos para eliminarla son muy eficaces (Farr and Kogoma, 1991).

La superóxido dismutasa es una enzima que actúa como homodímero, utilizando un metal de transición como cofactor para facilitar el intercambio de electrones. Existen cuatro tipos de SOD según el metal que se encuentra en su sitio activo: Fe-SOD, presente fundamentalmente en procariontas; Mn-SOD, que aparece tanto en procariontas como en eucariotas; Cu/Zn-SOD y Ni-SOD. Las dos primeras SOD son muy homólogas en cuanto a secuencia y estructura, mientras que difieren bastante de las SOD dependientes de Cu/Zn y Ni.

C. difficile posee una única superóxido dismutasa, la enzima SodA (CD630_16310). Esta proteína puede funcionar tanto con Fe como con Mn, aunque la isoforma Mn-SodA es diez veces más activa. Esta especificidad del metal que muestra SodA puede beneficiar la patogenicidad de *C. difficile* ya que presenta diferente afinidad por ligando según el metal que utiliza para su actividad (Li *et al.*, 2015). SodA se encuentra en la superficie de la espora y parece que juega un importante papel en la polimerización del revestimiento. Sin embargo, su función como proteína de detoxificación de ROS no se ha caracterizado todavía (Permpoonpattana *et al.*, 2013).

1.2.2.2.2. Catalasas

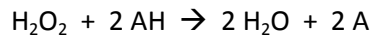
Las catalasas son las enzimas que catalizan la descomposición del peróxido de hidrógeno, dando lugar a oxígeno y agua:



La reacción es exotérmica y no requiere consumo de ATP, por lo que se puede llevar a cabo aunque la célula haya agotado sus reservas energéticas. Se pueden dividir en hemo-catalasas monofuncionales, hemo-catalasas bifuncionales (con actividad catalasa-peroxidasa) y catalasas dependientes de manganeso. Estas últimas presentan, en lugar de Fe en forma de hemo, dos átomos de manganeso en su centro activo y, por lo tanto, difieren de las anteriores en el mecanismo catalítico. Son las que tienen una menor actividad, además de estar presentes en un menor número de organismos (se encuentran únicamente en procariontas). Sin embargo, son el único tipo de enzima con actividad catalasa detectado hasta el momento en *C. difficile*. En concreto, el genoma de *C. difficile* 630 presenta las proteínas CotCB, CotD y CotG con actividad catalasa dependiente de manganeso (Monot *et al.*, 2011). Estas enzimas se encuentran en la capa de recubrimiento exterior de la espora y, al igual que SodA, podrían desempeñar un importante papel en el ensamblaje del revestimiento de la misma, polimerizando monómeros proteicos y como defensa de la espora al daño oxidativo ejercido por el hospedador.

1.2.2.2.3. Peroxidasas

A diferencia de las catalasas, que sólo son capaces de dismutar el agua oxigenada, las peroxidasas tienen como sustratos un amplio rango de peróxidos, que reducen a hidroperóxidos orgánicos gracias a los electrones suministrados por reductores de bajo peso molecular como el ascorbato y el glutatión (AH). Suelen tener mayor afinidad por el H₂O₂ y menor k_{cat} que las catalasas (Farr and Kogoma, 1991).



- Ascorbato peroxidasas: reducen el agua oxigenada usando ascorbato como reductor. Se genera monodehidroascorbato, que da lugar de forma espontánea a ascorbato y dehidroascorbato. Posteriormente, la enzima dehidroascorbato reductasa emplea glutatión para reducir de nuevo el dehidroascorbato a ascorbato. El glutatión oxidado es luego regenerado por la NADPH-glutatión reductasa.
- Glutatión peroxidasas: reducen peróxidos empleando glutatión como fuente de poder reductor. De nuevo, el glutatión oxidado es luego regenerado por la NADPH-glutatión reductasa.

Estos sistemas parecen no estar presentes en el genoma de *C. difficile*.

1.2.2.2.4. Peroxirredoxinas (Prx-s)

Pertenecen a la familia de las tiorredoxinas y también reciben el nombre de tiolperoxidasas. Al igual que las peroxidasas, se encargan de reducir el H₂O₂ y otros hidroperóxidos usando en este caso agentes reductores que contienen tioles como donadores de electrones.

Todas las peroxirredoxinas tienen el mismo mecanismo básico de funcionamiento. En una primera etapa, una cisteína del extremo N-terminal de la enzima reacciona con H₂O₂ oxidándose a ácido sulfénico. En una segunda etapa, el ácido sulfénico es reducido a tiol antes de que comience un nuevo ciclo catalítico (Mishra and Imlay, 2012). Dependiendo de cómo tiene lugar el proceso de regeneración del ácido sulfénico y del número y posición de las cisteínas que contienen, las peroxirredoxinas se clasifican como:

- 1-Cys Prx-s: el puente disulfuro es regenerado por una proteína que contiene un grupo tiol, pero el mecanismo aún no ha sido determinado.
- 2-Cys Prx-s: forman homodímeros. El ácido sulfénico formado en una de las subunidades es reducido por la cisteína localizada en el extremo C-terminal de la otra subunidad. Como consecuencia de esa reacción se forma un puente disulfuro entre las dos subunidades que es reducido luego por tiorredoxinas o glutarredoxinas.
- 2-Cys Prx-s atípicas: a diferencia de las anteriores son monoméricas. Aun así, el mecanismo de funcionamiento es muy similar, siendo el ácido sulfénico reducido por una cisteína localizada en la misma cadena polipeptídica. Dentro de este grupo, aquellas que presentan homología de secuencia con la proteína BCP de *E. coli* (BCP,

Bacterioferritin Comigratory Protein) se han denominado subclase Prx-Q. El genoma de *C. difficile*, únicamente presenta una peroxirredoxina de este tipo (CD630_18220).

1.2.2.2.5. Sistemas de detoxificación de ROS propios de anaerobios

Como ya se ha mencionado, en un principio se pensó que las bacterias anaerobias estrictas carecían de enzimas detoxificadoras de ROS puesto que no utilizan el oxígeno en su metabolismo. Este sería el caso de *C. difficile*. De hecho, en su genoma no se encuentran algunas de las enzimas anteriormente citadas. Sin embargo, la razón por la que estos microorganismos no puedan tolerar una aireación significativa es porque el oxígeno molecular *per se* daña directamente enzimas clave. Por ello, los anaerobios estrictos sí poseen mecanismos de eliminación de ROS especiales que además, son de vital importancia. De esta forma, se asegura la integridad de multitud de enzimas que son sensibles al oxígeno, y por tanto, la viabilidad global de la célula (Imlay, 2008b).

Estos organismos suelen carecer de SOD y catalasas ya que ambas producen O_2 . Sin embargo emplean superóxido reductasas como enzimas detoxificadoras. Tal es el caso del hipertermófilo *Pyrococcus furiosus*, que utiliza una superóxido reductasa (NROR) para reducir el superóxido a peróxido de hidrógeno, que luego es reducido a agua por las peroxidasa (figura 13). A diferencia de la superóxido dismutasa, la enzima que protege los aerobios de los efectos tóxicos del oxígeno, la superóxido reductasa no cataliza la producción de oxígeno a partir del superóxido y por lo tanto confiere una ventaja selectiva a los anaerobios (Jenney *et al.*, 1999). Otro caso descrito sería el del anaerobio *Desulfoarculus baarsii*, que emplea la enzima desulfoferrodoxina con actividad superóxido reductasa. La desulfoferrodoxina es una pequeña proteína que se encuentra en las bacterias reductoras de sulfato que contiene dos centros independientes de hierro mononuclear, uno férrico y uno ferroso. La expresión de la proteína desulfoferrodoxina de *D. baarsii* complementa funcionalmente una cepa de *E. coli* deficiente en superóxido dismutasa (Lombard *et al.*, 2000).

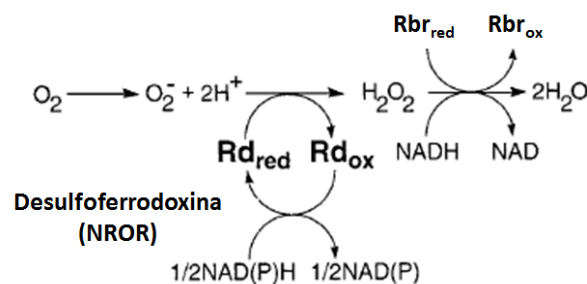


Figura 13. Modelo propuesto de detoxificación de ROS en anaerobios como *P. furiosus*. Las abreviaturas son las siguientes: NROR, NAD(P)H-rubredoxina oxidoreductasa (enzima con actividad superóxido reductasa); Rd, rubredoxina; Rbr, rubreritina (enzima con actividad peroxidasa). Imagen adaptada de Jenney *et al.*, 1999.

En concreto, *C. difficile* posee este tipo de sistema de detoxificación de ROS, que además se expresa en la célula vegetativa (Pettit *et al.*, 2014) y es alternativo al sistema formado por

las superóxido dismutasas y catalasas de los microorganismos aerobios. Este sistema, consiste en las proteínas dependientes de hierro (no hemo) rubredoxina (Rd), rubredoxina oxidoreductasa que es el producto del gen *rbo* (también denominada desulfoferredoxina o NROR) y rubreritina (Rbr). La rubredoxina contiene un centro $\text{Fe}(\text{Cys})_4$ y cede un electrón para reducir el O_2^- . Este proceso lo cataliza la enzima desulfoferredoxina. La rubreritina contiene un sitio activo di-hierro en el que el hierro está ligado a los residuos His y Glu y es donde el H_2O_2 se reduce a dos moléculas de agua, y un sitio mono-hierro tipo rubredoxina que participa en la transferencia de electrones. Es probable que para las reducciones estas enzimas utilicen electrones de NADPH o NADH. Además *C. difficile* contiene una rubredoxina dependiente de flavina (FlavoRb) codificada por el gen *norV* con actividad peroxidasa. Al igual que se ha descrito para la bacteria anaeróbica *Desulfovibrio vulgaris* (Lumppio *et al.*, 2001a), la proteína Rbo tendría actividad superóxido reductasa mientras que la proteína Rbr ejercería el papel de peroxidasa.

1.2.2.3. Mantenimiento de la homeostasis redox

El metabolismo bacteriano y la integridad celular se mantienen gracias al equilibrio del estado redox de todos los componentes celulares siendo vital para una función global óptima. Sin embargo, la alteración de este equilibrio, provoca aumento de las reacciones de oxidación (estrés oxidativo) que pueden dañar componentes celulares esenciales, como ya se ha comentado.

El citoplasma bacteriano mantiene generalmente un ambiente reductor, gracias a la presencia de altas concentraciones de agentes reductores como el glutatión (alrededor de 5 mM). La proporción de glutatión reducido (GSH) a oxidado (GSSG) en el citoplasma de *E. coli* es aproximadamente de 50:1 a 200:1 (Ritz and Beckwith, 2002). Los dos sistemas principales que mantienen la homeostasis redox citoplásmica son los sistemas tiorredoxina (Trx) / tiorredoxina reductasa (TrxR) y glutaredoxina (Grx) / glutatión (figura 14). Tanto Trx como Grx son pequeñas enzimas oxidoreductasas implicadas en la detección y regulación redox (Holmgren *et al.*, 2005).

La tiorredoxina es una pequeña proteína soluble, muy conservada, presente en la mayoría de los organismos. Debido a su bajo potencial redox (-270 mV), es capaz de catalizar la reducción de puentes disulfuro, siendo mucho más eficaz que otros reductores como el ditioneitol (DTT) o el glutatión (GSH). Al actuar como reductor, la tiorredoxina se oxida, formándose un puente disulfuro entre las dos cisteínas presentes en su centro activo (WCGPC). La enzima es regenerada a su forma reducida por la tiorredoxina reductasa que obtiene el poder reductor del NADPH o de la ferredoxina (Holmgren, 1995).

La tiorredoxina tiene como función actuar como donador de electrones en los ciclos catalíticos de enzimas biosintéticas y proteger a las proteínas citosólicas de la inactivación producida por la formación de puentes disulfuro, tanto inter- como intramoleculares, lo que la caracteriza como antioxidante intracelular.

En el genoma de *C. difficile* se han identificado dos tiorredoxina reductasas (CD630_21170, CD630_23560), una tiorredoxina disulfuro reductasa (CD630_16910) y al

menos cuatro tioredoxinas distintas (CD630_15070, CD630_16900, CD630_23550 y CD630_30330).

El sistema de la glutarredoxina está compuesto, además de por la enzima, por glutatión, glutatión reductasa y NADPH. El glutatión (GSH), γ -L-glutamyl-L-cisteinil-glicina, es un importante antioxidante que puede reaccionar con las especies reactivas de oxígeno: H_2O_2 , $HOO\cdot$ o O_2^- , para formar el radical estable ($GS\cdot$). Este radical es capaz de dimerizar dando lugar a GSSG que es regenerado a glutatión reducido (GSH) por la enzima glutatión reductasa usando NADPH como donador de electrones. El glutatión es una molécula muy abundante en las células. Suele encontrarse en su forma reducida y tiene como función reducir los puentes disulfuro producidos por el estrés oxidativo. Además también es capaz de regenerar a la glutarredoxina, proteína que reduce los puentes disulfuro producidos por el estrés oxidativo y los formados entre proteínas y glutatión. Su mecanismo de acción se basa en la formación de un puente disulfuro entre las cisteínas presentes en su centro catalítico (CPYC) (Holmgren *et al.*, 2005). Este sistema, por el momento, no se ha identificado en *C. difficile*.

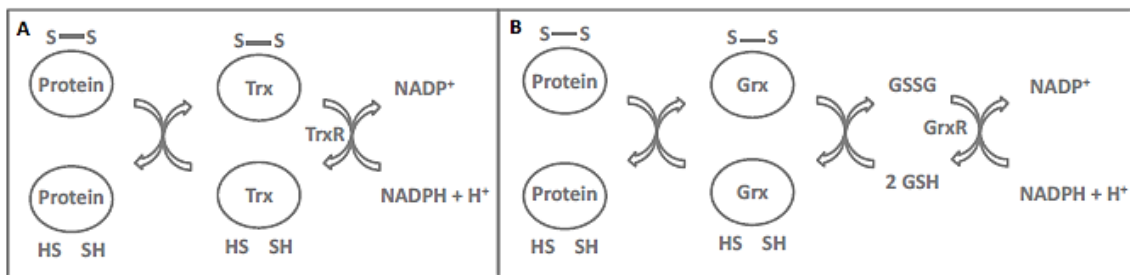


Figura 14. Representación esquemática del mecanismo de acción de la tioredoxina (Trx) (A) y la glutarredoxina (Grx) (B).

1.2.2.4. Sensores del estado redox de la bacteria

Los mecanismos de defensa frente a estrés oxidativo antes mencionados se encuentran expresados a un nivel basal en las células. De esta forma se mantienen los niveles de ROS dentro de un límite seguro sin que provoquen daño celular. Cuando estos niveles de ROS exceden el límite, se induce la expresión de genes de enzimas antioxidantes y sistemas de reparación del daño oxidativo, entre otros. La regulación de la expresión de estos genes es compleja y es llevada a cabo por factores de transcripción que actúan como “interruptores o moduladores redox”.

Los grupos reactivos sensibles al estado redox de estos factores transcripcionales suelen ser el hierro (grupo hemo, grupo Fe-S o hierro mononuclear) o los grupos tiol de las cisteínas. Estos grupos actúan como sensores detectando los niveles de ROS lo que suele provocar un cambio conformacional en la proteína. De esta forma, se modula su interacción con las secuencias de DNA diana influyendo en la transcripción de los genes que regulan (Cornelis *et al.*, 2011).

1.2.2.4.1. Sensores con centro activo Fe

Las proteínas Fe-S han sido estudiadas durante mucho tiempo como componentes clave de las reacciones de transferencia de electrones. Sin embargo, también se ha visto que los centros Fe-S están implicados en la detección del estado redox y/o estrés oxidativo en varias proteínas reguladoras (Touati, 2000). Su actividad depende del hierro y del oxidante ambiental. Algunos de los factores transcripcionales redox más estudiados son:

- SoxR: es un sensor del estrés producido por el superóxido y el óxido nítrico. SoxR es un miembro de la familia de activadores transcripcionales MerR que incluyen reguladores que responden a metales pesados (por ejemplo, mercurio). SoxR de *E. coli* es una proteína homodimérica que contiene un grupo [2Fe-2S] por monómero. Tanto las formas reducida ($[2\text{Fe-2S}]^{1+}$) y oxidada ($[2\text{Fe-2S}]^{2+}$) de SoxR son capaces de unirse al DNA. Sin embargo, sólo la forma oxidada, que se obtiene al exponer el regulador a agentes oxidantes (oxígeno, paraquat entre otros), es capaz de activar la transcripción del único gen que regula, *soxS*. Como resultado, SoxS actúa como un factor de transcripción secundario que induce la expresión de genes de defensa a estrés oxidativo como *sodA* (superóxido dismutasa), *nfo* (endonucleasa IV) y *fpr* (NADPH-flavodoxina oxidorreductasa), entre otros (figura 15). Además, el regulón SoxRS confiere resistencia a antibióticos, solventes orgánicos y metales pesados (Imlay, 2013).

Este tipo poco frecuente de regulación de dos componentes para agentes oxidantes sólo se ha observado en enterobacterias. Por el momento no se ha caracterizado la proteína SoxR en *C. difficile*, sin embargo, existen en su genoma 12 genes reguladores pertenecientes a la familia MerR.

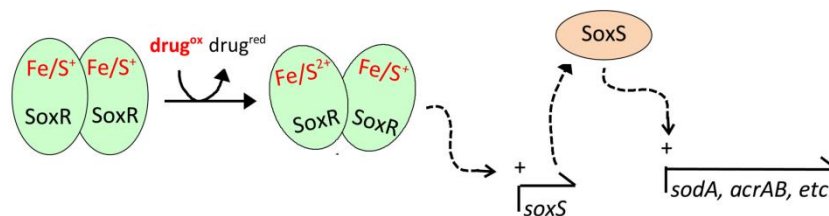


Figura 15. Modelo de actuación de SoxR. SoxR es un factor de transcripción homodimérico y cada monómero contiene un grupo [2Fe-2S]. El dímero se activa a través de la oxidación directa de estos clúster por compuestos redox activos, típicamente fenazinas o quinonas, que son producidos por plantas y competidores bacterianos. SoxR oxidado estimula la transcripción de *soxS*, y la proteína SoxS actúa como un factor de transcripción secundario que pasa a activar la expresión del regulón. Imagen adaptada de Imlay, 2013.

- Fnr: es un sensor del oxígeno ambiental. La proteína Fnr de *E. coli* reprime los genes implicados en la respiración aeróbica y activa los genes necesarios para la respiración anaeróbica. Bajo condiciones anaeróbicas, Fnr es un homodímero en el que cada monómero contiene dos dominios: una región de unión al DNA en el extremo C-terminal, que reconoce una secuencia de DNA específica en los promotores diana, y un

dominio sensor de oxígeno en el extremo N-terminal. Esta última región contiene cuatro residuos de cisteína esenciales que se unen a un grupo $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$. La exposición del grupo $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ al oxígeno provoca la oxidación de éste a la forma $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ a través de la formación del intermedio $[3\text{Fe-4S}]^{1+}$. Si el oxígeno persiste se produce la degradación completa del grupo hasta obtener la forma apo-Fnr. Este proceso impulsa la transición de un estado homodimérico a otro monomérico con una disminución de la capacidad de unión al DNA (figura 16).

Además, en *Salmonella enterica serovar Typhimurium*, el regulador Fnr regula la expresión de factores de virulencia como genes de virulencia dentro de la isla 1 de patogenicidad de Salmonella (SPI-1), genes flagelares recientemente identificados (mcpAC, cheV) y el operón de virulencia (srfABC) (Fink *et al.*, 2007).

En el genoma de *C. difficile*, aparecen cuatro genes pertenecientes a la familia de reguladores Crp identificados como reguladores Fnr.

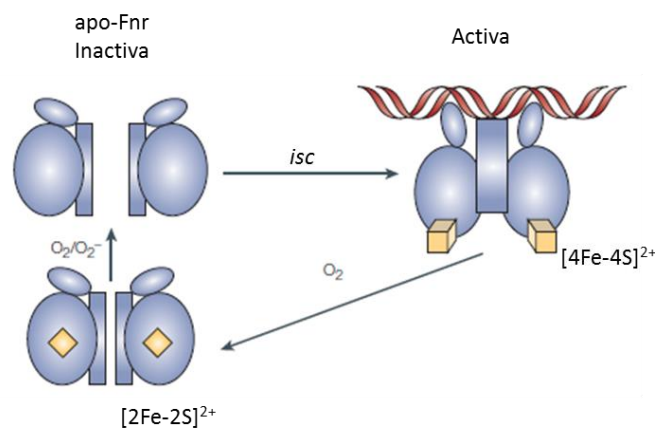


Figura 16. Modelo de actuación de Fnr. Los productos del gen *isc* incorporan grupos $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ (cubos amarillos) en apo-Fnr. Esto promueve la dimerización y provoca un cambio conformacional en los dominios de unión al DNA de Fnr de manera que interactúan específicamente con los promotores diana. En presencia de oxígeno, se degradan los grupos $[4\text{Fe-4S}]^{2+}$ a $[2\text{Fe-2S}]^{2+}$ (diamantes amarillos). Esto conduce a cambios conformacionales que resultan en la formación del monómero e inactivación de Fnr. La exposición prolongada al oxígeno produce apo-Fnr. Imagen adaptada de Green and Paget, 2004.

1.2.2.4.2. Sensores basados en hemo

Los microorganismos disponen de proteínas sensoras basadas en hemo que aprovechan la química de este grupo para detectar tanto gases del entorno como el estado redox intracelular de la bacteria. Estas proteínas normalmente contienen hemo b (protoporfirina IX) en su forma unida a hierro, como grupo prostético en su centro activo. La interacción del hemo con la proteína se produce mediante unión axial entre el hierro del hemo y residuos aminoácidos. En la mayoría de hemoproteínas, esta interacción tiene lugar mediante residuos de histidina aunque el hemo puede interactuar también con residuos de cisteína, metionina o tirosina. El hierro presente en el centro del anillo de porfirina es capaz de coordinarse con seis ligandos: cuatro ligandos serían los átomos de nitrógeno pertenecientes a los cuatro anillos pirrólicos del anillo de porfirina, otro ligando sería la cadena lateral de un residuo de la proteína que

suele ser histidina o cisteína y por último un ligando exógeno o la cadena lateral de otro aminoácido. Este sexto sitio de unión en algunas hemoproteínas es capaz de unir gases diatómicos como O_2 , CO o NO . En estas proteínas, la oxidación, reducción o modificación del hemo generalmente conduce a una alteración de la actividad de la proteína. A continuación se detalla un caso representativo:

- RcoM: es un regulador del metabolismo aeróbico y anaeróbico del CO . En esta proteína los ligandos axiales del hemo son cisteína e histidina. En la forma oxidada $Fe(III)$, la proteína es inactiva. La reducción a la forma ferrosa $Fe(II)$ lleva al reemplazamiento de la cisteína (tiolato) por un residuo de metionina. La unión de los ligandos gaseosos CO y NO al hierro del hemo se produce por el desplazamiento de dicho aminoácido. La exposición de $Fe(II)$ al oxígeno conduce a la formación de $Fe(III)$, lo que sugiere que esta proteína puede actuar como un sensor redox (Marvin *et al.*, 2008).

1.2.2.4.3. Sensores basados en cisteínas

Los grupos $-SH$ de los residuos de cisteína pueden oxidarse de manera reversible a diferentes estados de oxidación al exponerse a especies reactivas de oxígeno. De esta manera, en los factores de transcripción que basan su actividad en la química de los grupos tiol, una señal química se transforma en una señal biológica a través de un cambio conformacional en el regulador. La estabilidad de los diferentes estados de oxidación difiere significativamente y depende del entorno local en el que se encuentren las cisteínas. Las modificaciones oxidativas que pueden sufrir estos residuos se muestran en la figura 17.

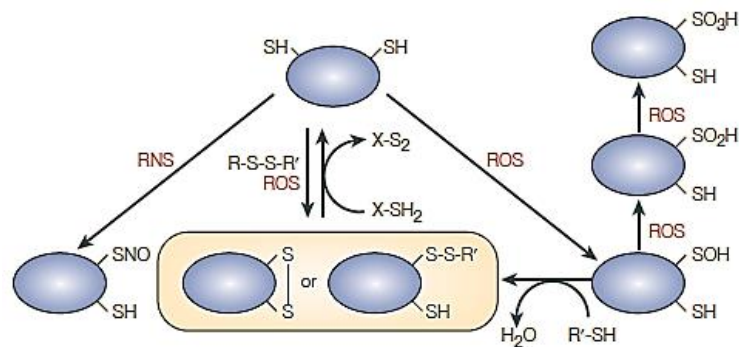


Figura 17. Importancia de las cisteínas en la detección del estado redox. La cisteína es capaz de detectar una amplia gama de señales redox ya que la cadena lateral del grupo tiol ($-SH$) puede oxidarse a varios estados redox reversibles diferentes tales como disulfuro ($R-S-S-R'$), ácido sulfénico ($R-SOH$) y S-nitrosotiol ($R-SNO$). Mientras que los disulfuros son estables y resistentes a la oxidación adicional, los ácidos sulfénicos pueden sobreoxidarse a los productos irreversibles ácidos sulfínicos ($R-SOOH$) y ácidos sulfónicos ($R-SOOH$). La forma completamente reducida de la proteína puede ser restaurada por intercambio de tiol-disulfuro con un reductor celular ($X-SH_2$) como la tiorredoxina. Adaptado de Green and Paget, 2004.

Es importante destacar que no todas las cisteínas son igualmente reactivas. El entorno proteico del tiol es clave en la determinación de esta reactividad ya que afecta a su estado de ionización (el ion tiolato es mucho más reactivo a los peróxidos que la forma protonada) y a su accesibilidad global (Green and Paget, 2004).

A continuación, se describen algunos de los reguladores transcripcionales redox que pertenecen a esta categoría y que están mejor caracterizados:

- OxyR: pertenece a la familia de reguladores transcripcionales LysR y detecta los niveles de peróxido de hidrógeno en bacterias, especialmente en bacterias Gram-negativas como *E. coli*. Se caracteriza por la regulación positiva de sus genes diana y la regulación negativa de su propia expresión (Tao, 1999). OxyR se une al DNA como dímero o tetrámero usando un motivo de unión al DNA hélice-giro-hélice (HTH, *helix-turn-helix*) localizado en el extremo N-terminal de cada uno de sus monómeros. En cuanto a su modo de actuación, se ha propuesto que la forma inactiva de la proteína contiene sus seis tioles reducidos. Después de la exposición a H_2O_2 (> 100 nM) o el cambio en el estado redox del citoplasma, los residuos C_{199} y C_{208} de cada monómero forman un puente disulfuro intramolecular reversible (Lee *et al.*, 2004). Esto provoca un cambio conformacional que lleva a la formación del tetrámero y por consiguiente, a la activación de los genes de respuesta antioxidante (figura 18). La reducción del enlace disulfuro en OxyR es catalizada por la glutarredoxina-1, una tiol-disulfuro oxidorreductasa que está regulada por OxyR, proporcionando un mecanismo de autorregulación (Zheng *et al.*, 1998).

El regulón de OxyR en *E. coli* está compuesto por más de 20 genes entre los que se encuentran genes implicados en la detoxificación de H_2O_2 : *katG* (hidroperoxidasa I) y *ahpCF* (alquihidroperóxido reductasa); genes de producción de poder reductor: *grxA* (glutarredoxina 1) y *gorA* (glutatió reductasa); genes de reparación de centros Fe-S: *sufA-E* y *sufS*; genes de represión de captación de hierro como *fur*.

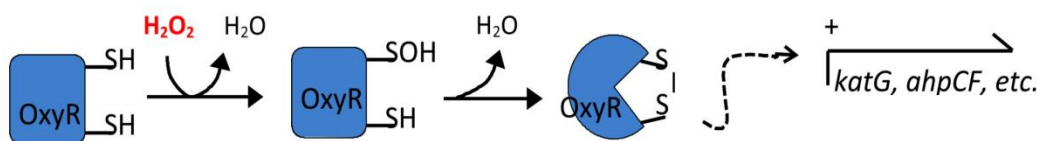


Figura 18. Modelo de funcionamiento de OxyR. La activación de OxyR se produce cuando un residuo de cisteína sensible redox reacciona rápidamente con H_2O_2 formándose ácido sulfénico. Este luego reacciona con otra cisteína dando como resultado un puente disulfuro que bloquea OxyR en una conformación que le permite actuar como un factor de transcripción positivo. Imagen adaptada de Imlay, 2013.

Además, se ha determinado que el potencial redox de OxyR es de -185 mV. Puesto que el citosol de *E. coli* tiene un potencial redox de unos -270 mV, se asegura de esta manera que el regulador se encuentra reducido (inactivo) en ausencia de estrés

oxidativo (Zheng *et al.*, 1998). No se han encontrado homólogos de OxyR en el genoma de *C. difficile*.

- OhrR: pertenece a la familia de reguladores transcripcionales de tipo MarR. Este factor de transcripción utiliza residuos de cisteína que son sensibles al estado redox de forma similar al regulador OxyR. Actúa como un represor cuando sus residuos de cisteína están en la forma reducida y al oxidarse se libera de la secuencia promotora permitiendo la transcripción de los genes que regula. OhrR responde a la presencia de peróxidos orgánicos y uno de sus principales objetivos reguladores es un gen que codifica una tiol-peroxidasa. El regulador OhrR se encuentra en *B. subtilis*, *Xanthomonas campestris* y *Pseudomonas aeruginosa*. Tampoco se ha detectado en el genoma de *C. difficile* por el momento.

1.2.2.4.4. Sensores basados en el motivo redox CXXC coordinado a Zn²⁺

Dentro de las secuencias primarias de aminoácidos de las proteínas, el espacio entre los residuos de cisteína no es un hecho al azar. Con frecuencia, las cisteínas se ordenan en secuencias CXXC (donde X es cualquier aminoácido) que suelen estar implicados en reacciones redox y coordinación a iones metálicos (Maret, 2006). Normalmente, las propiedades redox del motivo CXXC suelen estar determinadas por la secuencia del dipéptido XX localizado entre las cisteínas (Quan *et al.*, 2007). Los aminoácidos polares entre las dos cisteínas del motivo influyen fuertemente en el pKa de las cisteínas, resultando en la estabilización de su forma de anión tiolato (Benoit and Auer, 2011). Los tiolatos en el motivo CXXC pueden estabilizarse mediante enlaces de hidrógeno, residuos básicos proximales o iones metálicos (Lucana, 2012). La coordinación de hemo, grupo Fe-S o zinc por residuos de cisteína pertenecientes a un motivo CXXC es una característica común en muchos sensores redox. Sin embargo, en otros sensores, las cisteínas del motivo CXXC también pueden ser libres de reaccionar cuando sea necesario mediante un mecanismo de formación de enlaces disulfuro (por ejemplo como ocurre con el regulador transcripcional FurA de *Anabaena* sp. (Botello-Morte *et al.*, 2016).

La coordinación de los motivos CXXC a un átomo de Zn²⁺ se produce en los sitios catalíticos de enzimas y en sitios estructurales. La esfera mínima estable de coordinación para el zinc está formada por cuatro ligandos y adopta una geometría de coordinación tetraédrica (Laitaoja *et al.*, 2013). Por tanto, cuando los dos átomos de azufre de los residuos de cisteína de un motivo CXXC están coordinando un átomo de zinc, la esfera de coordinación del metal se suele completar con, nombrados en orden de frecuencia, una o dos cisteínas más, histidinas, aniones carboxilato procedentes de residuos de aspartato o glutamato o incluso con una molécula de agua (figura 19).

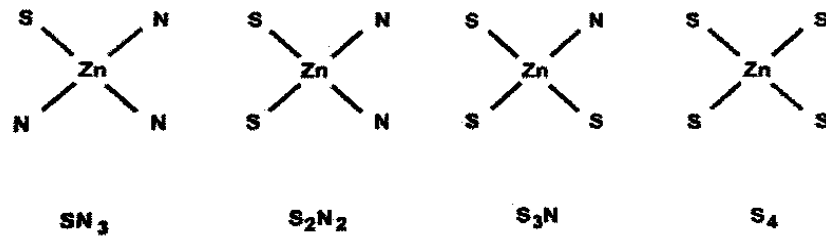


Figura 19. Motivos tetracoordinados de zinc donde participan cisteínas como ligando. Imagen tomada de Maret, 2006.

Curiosamente, en los sistemas biológicos los iones zinc siempre permanecen en estado Zn^{2+} y no tienen actividad redox (al contrario de lo que ocurre con el hierro o el cobre). Sin embargo, como los residuos de cisteína sí tienen actividad redox, el complejo zinc-azufre tiene la propiedad de que los grupos tiol de las cisteínas pueden oxidarse y luego reducirse de nuevo con la consecuente liberación y unión de zinc, respectivamente. De este modo, el ligando de cisteína confiere propiedades redox sobre el complejo, vinculando algunas proteínas de unión a zinc con la señalización redox (figura 20).

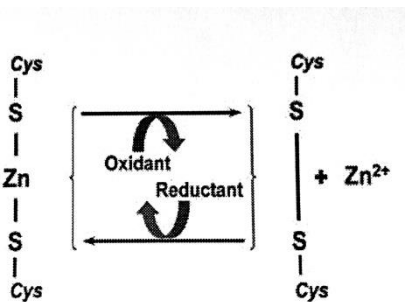


Figura 20. Interruptor redox basado en la coordinación a zinc. La interconversión entre cisteína-cistina está ligada a la pérdida o unión de zinc. La oxidación del grupo tiol de la cisteína que actúa como ligando del zinc provoca la pérdida del metal mientras que la reducción de un puente disulfuro formado entra las dos cisteínas de un motivo CXXC induce la unión del zinc. Imagen tomada de Maret, 2006.

A continuación se presentan dos ejemplos de sensores redox que basan su actividad en la coordinación de un átomo de zinc a través de un motivo CXXC:

- σ^R -RsrA: es un sensor del estrés disulfuro. El sistema σ^R -RsrA se encuentra en bacterias Gram-positivas como *Streptomyces coelicolor* y *Mycobacterium tuberculosis*. σ^R , el producto del gen *sigR*, es un factor sigma de la RNA polimerasa que controla la expresión de varias tiol-disulfuro oxidorreductasas (por ejemplo, tiorredoxina). En la forma inactiva se encuentra unido al factor anti-sigma RsrA, una pequeña metaloproteína de zinc rica en cisteínas. En respuesta al estrés disulfuro, RsrA forma al menos un enlace disulfuro intramolecular en un motivo CXXC, que causa la liberación del zinc y un cambio conformacional que lleva a la disociación de σ^R . Esto permite que σ^R se asocie con la RNA polimerasa y se active el regulon de σ^R . Al menos *in vitro*, la tiorredoxina puede reducir la RsrA oxidada, creando así un circuito de retroalimentación de homeostasis en el que el regulón σ^R se regula en respuesta a cambios en el estado redox de tiol-disulfuro de la célula.

Mediante estudios de mutagénesis dirigida, se ha demostrado que, en la forma reducida de RsrA de *S. coelicolor*, tres cisteínas (C₁₁, C₄₁ y C₄₄) y una histidina (H₃₇) coordinan el átomo de Zn²⁺. La forma oxidada parece que contiene un enlace disulfuro entre C₁₁-C₄₁ o C₁₁-C₄₄ lo que provoca la liberación del zinc (Bae *et al.*, 2004).

- FurS, de la actinobacteria *S. reticuli*, es un homodimero perteneciente a la familia de proteínas Fur que contiene seis cisteínas, cuatro de ellas dispuestas en dos motivos redox CXXC (C₉₆RSC₉₉ y C₁₃₆PDC₁₃₉) que coordinan un átomo zinc por monómero (Lucana *et al.*, 2003). Esta proteína de unión al DNA está estrechamente relacionada con FurA de *M. tuberculosis* y otras proteínas Fur de micobacterias, aunque difiere considerablemente en las estructuras primarias y secundarias de los ortólogos Fur presentes en *E. coli* y otras bacterias. Como en varias cepas micobacterianas y no en otras bacterias, el gen *furS* se co-transcribe con el gen *cpeB* al que precede y que codifica una enzima catalasa-peroxidasa con un alto grado de identidad con *katG* de *M. tuberculosis*. Tanto en el estado reducido como en presencia del metal corepresor, FurS reprime la transcripción del operón que contiene el *cpeB* y los genes *furS* (Ortiz de Orué Lucana and Schrempf, 2000). Sin embargo, las cisteínas presentes en el motivo C₉₆RSC₉₉ son capaces de formar un enlace disulfuro después de tratamientos con H₂O₂ o diamida, liberando el ion zinc. En consecuencia, el represor pierde su afinidad por el DNA debido a cambios conformacionales y la catalasa-peroxidasa CpeB así como el regulador FurS pueden ser transcritos (Lucana *et al.*, 2003).

1.2.3. Estrés férrico y redox: el paradigma de Fur

Como ya se ha mencionado a lo largo de esta introducción, niveles elevados de hierro intracelular pueden conducir a la producción de ROS a través de la reacción de Fenton. Por otro lado, en condiciones fisiológicas el hierro está poco biodisponible. Por ello, la homeostasis del hierro debe estar estrictamente regulada dentro de la célula. Además, dicha regulación es importante en la defensa frente al estrés oxidativo (algunos sensores redox como Fnr o SoxR usan como cofactores grupos Fe-S y algunas enzimas de detoxificación como SOD también utilizan Fe). Por ello, existe un acoplamiento entre la respuesta y la protección frente al estrés oxidativo y la regulación del metabolismo del hierro.

Dos familias de proteínas, Fur y DtxR, regulan la homeostasis del hierro en las bacterias en respuesta a la disponibilidad de hierro (Hantke, 2001). El regulador global dependiente de hierro en la mayoría de las bacterias es Fur (*Ferric Uptake Regulator*) con un regulón de hasta más de 90 genes, pertenecientes a diferentes categorías funcionales, en algunos microorganismos como *E. coli*. Sin embargo, en las bacterias Gram-positivas de alto contenido en guanina y citosina como *Corynebacterium*, *Streptomyces* o *Mycobacterium*, el regulador de la toxina diftérica dependiente de hierro DtxR (también llamado IdeR en micobacterias o SirR en los estafilococos) media la regulación global del hierro (Andrews *et al.*, 2003). Aunque no existe una homología de secuencia clara entre ambas familias de proteínas, existen algunas semejanzas estructurales como la presencia de un dominio de unión al ADN en el extremo N-

terminal así como un dominio de dimerización y unión a metal en el extremo C-terminal (Hantke, 2001).

En concreto, mutaciones en el gen *fur* en *E. coli* producen una desregulación del metabolismo del hierro que hace que aumenten los niveles de hierro libre intracelular. Como consecuencia, aumenta la sensibilidad de la bacteria al estrés oxidativo. Este efecto puede revertirse empleando quelantes de hierro o sobreexpresando proteínas de almacenamiento de hierro como la ferritina (Touati, 2000).

Además de la conexión entre el metabolismo del hierro y la defensa frente a estrés oxidativo orquestada por las proteínas Fur, estas proteínas pueden regular su actividad en respuesta al estado redox de la bacteria. Esto sucede con el homólogo FurA de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120. En un estudio realizado en el grupo de investigación donde se ha realizado este trabajo, se ha demostrado por primera vez para un homólogo de Fur, que la interconversión tiol-disulfuro controla la actividad de esta proteína. Este homólogo contiene cinco residuos de cisteína, cuatro de ellos dispuestos en dos motivos redox activos de tipo CXXC. La proteína necesita no sólo metal sino también condiciones reductoras para permanecer plenamente activa *in vitro*. FurA en estado reducido puede unir su metal correpresor y, por lo tanto, unirse al DNA siendo fundamental en la coordinación del metal una cisteína de uno de los motivos CXXC. Cuando esta cisteína se oxida, FurA pierde el metal y se disocia del DNA. El intercambio tiol-disulfuro de FurA responde a la alteración del potencial redox celular. Por lo tanto, la unión de FurA al metal correpresor mediado por su estado redox proporciona la base de un mecanismo concertado de la homeostasis de hierro en respuesta al estado redox del citosol en dicha bacteria (Botello-Morte *et al.*, 2016).

1.3. La proteína Fur

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

En concreto, Fur está implicada en la homeostasis del hierro regulando genes de captación y almacenamiento del mismo. Por ejemplo en *Escherichia coli*, Fur regula el sistema de transporte de citrato férrico (*fecABCDE*) y en *B. subtilis*, Fur regula genes que codifican un sistema de transporte de ferrihidroxamato (*fhuDC*) (Bsat *et al.*, 1998). Además del metabolismo del hierro, Fur es un regulador global que controla genes tanto de la respiración, del ciclo de TCA, de la glicólisis como de la síntesis de DNA, entre otros (Andrews *et al.*, 2003). Además es esencial para la virulencia de muchos patógenos (Carpenter *et al.*, 2009b).

1.3.1. Características estructurales

Las estructuras obtenidas por rayos X de homólogos de la familia Fur entre los que se encuentran una versión truncada de Fur de *E. coli* (Fur-(1-82)) (Pecqueur *et al.*, 2006), Fur de *P. aeruginosa* (Pohl *et al.*, 2003), *Vibrio cholerae* (Sheikh and Taylor, 2009), *Helicobacter pylori* (Dian *et al.*, 2011) y *Campylobacter jejuni* (Butcher *et al.*, 2012), Nur de *S. coelicolor* (An *et al.*, 2009), FurB/Zur de *M. tuberculosis* (Lucarelli *et al.*, 2007) o PerR de *B. subtilis* (Jacquamet *et al.*, 2009), presentan características similares.

Estas proteínas, de unos 150 aminoácidos y pesos moleculares que varían entre 15 y 17 kDa, muestran un plegamiento básico con dos dominios bien definidos: un dominio N-terminal de reconocimiento y unión al DNA (unos 80 aa) y un dominio C-terminal de dimerización (unos 70 aa), conectados ambos por una “bisagra”. Además, en la secuencia de aminoácidos destaca un motivo rico en histidinas HHXHX₂CXXC altamente conservado al comienzo del dominio de dimerización, y otro motivo CXXC menos conservado en el extremo C-terminal de la proteína, que son potenciales sitios de unión a metal.

En Fur de *P. aeruginosa* (PaFur), primera estructura cristalina obtenida para un homólogo de Fur (figura 21), el dominio de unión a DNA está compuesto por cuatro hélices α seguidas de una lámina β antiparalela de dos hebras, formando un motivo alado hélice-giro-hélice. El dominio de dimerización consiste en un dominio α/β en el que tres hebras β antiparalelas cubren una larga hélice α . Esta estructura presenta dos sitios de unión a metal (Zn1 y Zn2). El sitio 1, situado en el dominio de dimerización, está constituido por las cadenas laterales de los residuos His86, Asp88 (ligando bidentado), Glu107 y His124 y una molécula de agua que da como resultado una geometría octaédrica distorsionada. El sitio 2, localizado en la “bisagra” que conecta el dominio de unión al DNA con el dominio de dimerización, incluye la cadena lateral de los residuos His32, Glu80, His89 y Glu100 con una geometría tetraédrica. El metal que se une al sitio 1 se conoce como metal regulador mientras que el que se une al sitio 2 se denomina metal estructural, necesario para el correcto plegamiento de la proteína. En esta estructura, ambos sitios están ocupados por un átomo de Zn²⁺, aunque el sitio 1 también puede estar coordinado a un átomo de Fe²⁺ (Pohl *et al.*, 2003). La presencia de un sitio estructural de unión a Zn²⁺ se ha encontrado en la mayoría de las proteínas Fur cristalizadas hasta la fecha.

Un modelo revisado basado en estudios de mutagénesis de varias proteínas Fur sugiere que realmente el sitio 2 descrito para Fur de *P. aeruginosa*, que es el localizado en la interfase entre ambos dominios, corresponde al metal regulador, donde se une un átomo de Fe²⁺. Su geometría suele conservarse en los distintos homólogos. Sin embargo, el sitio 1 podría ser un sitio de unión a metal de baja afinidad sin significado biológico (Lee and Helmann, 2007).

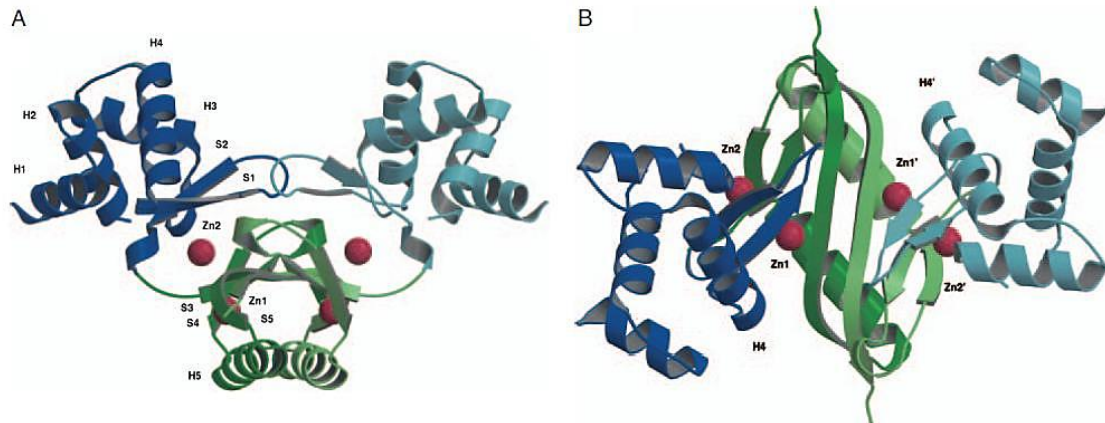


Figura 21. Representación de la estructura cristalina del dímero Fur de *P. aeruginosa* (resolución 1.8 Å). El dominio N-terminal de unión al DNA se presenta en azul, mientras que el dominio C-terminal de dimerización se representa en verde. Los átomos de Zn^{2+} presentes en la estructura se representan como esferas rojas. A) Vista perpendicular del eje binario cristalográfico. B) Vista sobre el eje binario. Imagen adaptada de Pohl *et al.*, 2003.

En algunos casos, el sitio estructural de unión a metal presenta coordinación tetraédrica regular de cuatro residuos de cisteína pertenecientes a los dos motivos CXXC. Tal es el caso de los homólogos Fur de *H. pylori* (*HpFur*) y *C. jejuni* (*CjFur*), Zur de *M. tuberculosis* (*MtZur*) o PerR de *B. subtilis* (*BsPerR*). Sin embargo, la existencia de ambos motivos en la secuencia de la proteína no parece asegurar la unión del zinc estructural. De hecho, Cys_4Zn parece no ser esencial para mantener la conformación correcta de unión a DNA y, por tanto, para la actividad de Nur (An *et al.*, 2009). Este es también el caso del homólogo FurA de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 que presenta los dos motivos CXXC pero no contiene zinc en su estructura (Hernández *et al.*, 2002). Por otro lado, como ya se ha mencionado para el homólogo *PaFur*, tampoco la presencia de un átomo de zinc estructural implica que estén presentes los dos motivos CXXC. También se ha observado zinc estructural en el homólogo Fur de *E. coli* (*EcFur*) donde está coordinado en un entorno $S_2(N/O)_2$. Ensayos de mutagénesis dirigida y modificación química indican que las cisteínas del motivo $C_{92}XXC_{95}$ son esenciales para la actividad y función de *EcFur* como ligandos directos del Zn^{2+} , mientras que las del motivo $C_{132}XXXXC_{137}$ son prescindibles (Coy *et al.*, 1994; Gonzalez De Peredo *et al.*, 1999).

En cuanto al sitio de unión del metal regulador, parece estar presente en todas las proteínas pertenecientes a la familia aunque muestra cierta variabilidad en cuanto al metal que une (dependiendo del homólogo de Fur) y su coordinación. Sin embargo, siempre implica un residuo de histidina del bucle entre α_2 y α_3 en el dominio de unión al DNA.

En resumen, existe una gran variabilidad entre los distintos homólogos en referencia al número de sitios de unión a metal que presentan y su coordinación, participando residuos de His, Cys, Asp o Glu (Fillat, 2014). En homólogos de la proteína como *MtZur* (Lucarelli *et al.*, 2007) y *HpFur* (Dian *et al.*, 2011) se han descrito hasta tres sitios de unión a metal. Por ejemplo, *HpFur* presenta el sitio designado como S1 que sería el sitio de unión a zinc estructural con coordinación Cys_4Zn , siendo esencial para su dimerización. Un segundo sitio conocido como S2 corresponde al sitio de unión al metal regulador, homólogo al sitio 2 de *P.*

aeruginosa, y es esencial para la actividad de unión al DNA de la proteína. El tercer sitio, S3, se localiza en el dominio de dimerización, y en un principio no es esencial para la unión al DNA pero sí parece tener relación con la fuerza con la que Fur se une al DNA (figura 22). Este sitio presenta homología con el sitio 1 descrito en *P. aeruginosa*.

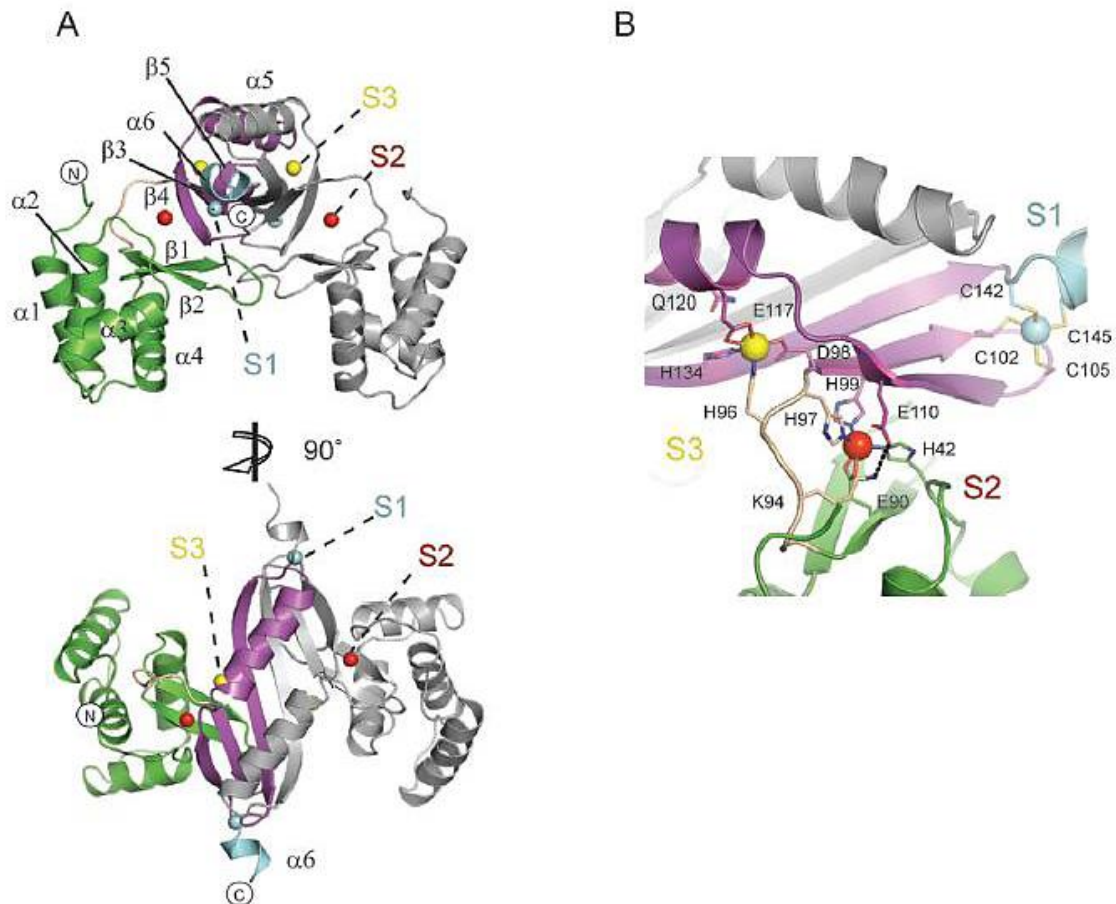


Figura 22. Representación de la estructura cristalina del dímero Fur de *H. pylori* (resolución 1.9 Å). A) Dos vistas de la estructura dimérica de Fur, donde un monómero se representa en gris, y el otro monómero presenta el dominio de unión a DNA en verde, el dominio de dimerización en violeta, la bisagra que conecta ambos dominios en beige, y los átomos de Zn^{2+} se representan como esferas en azul (S1, sitio estructural), rojo (S2, sitio regulador) y amarillo (S3). B) Geometría de los tres sitios de unión a metal. Adaptado de Dian *et al.*, 2011.

A pesar del papel crítico de Fur como sensor de los niveles intracelulares de hierro, la proteína es sorprendentemente tolerante a las mutaciones en los residuos candidatos a actuar como ligandos del metal correpressor. Por ejemplo, estudios mutacionales de *BsFur* demuestran que la mayoría de las mutaciones puntuales en los residuos candidatos a ligandos del metal represor, no afectan de forma significativa a la regulación por hierro *in vivo* (Lee and Helmann, 2007). En *Bradyrhizobium japonicum*, un mutante cuádruple de Fur en el que se sustituyeron por alanina los cuatro ligandos que corresponderían por homología al sitio 1 de *PaFur*, mantenía la capacidad de unirse al DNA *in vitro* en respuesta a Mn^{2+} , con una afinidad reducida sólo a la mitad respecto a la de la proteína

silvestre. Por otro lado, el cuádruple mutante de los ligandos correspondientes al sitio 2 de *PaFur*, también era capaz de unirse al DNA *in vitro* con una afinidad similar a la proteína silvestre, aunque perdía la capacidad de formar uno de los complejos de baja movilidad. Cabe destacar que los mutantes cuádruples tanto del sitio 1 como del sitio 2 fueron capaces de reprimir la expresión de genes *in vivo* (Friedman and O'Brian, 2004).

1.3.2. Regulación por Fur

1.3.2.1. Fur como represor

Generalmente, las proteínas Fur son represores transcripcionales clásicos que usan el hierro como metal correpressor. Fur actúa regulando los niveles intracelulares de hierro de forma que cuando éste es suficiente, un átomo de Fe^{2+} se coordina con un monómero de Fur y la proteína dimeriza. En estas condiciones, Fur se une al DNA en los promotores de los genes que regula impidiendo la unión de la RNA polimerasa, y por consiguiente, la transcripción del gen. Bajo condiciones de deficiencia de hierro, el metal correpressor se libera de la proteína y, en consecuencia, Fur pierde su afinidad por la región operadora y permite la transcripción (figura 23) (Lee and Helmann, 2007).

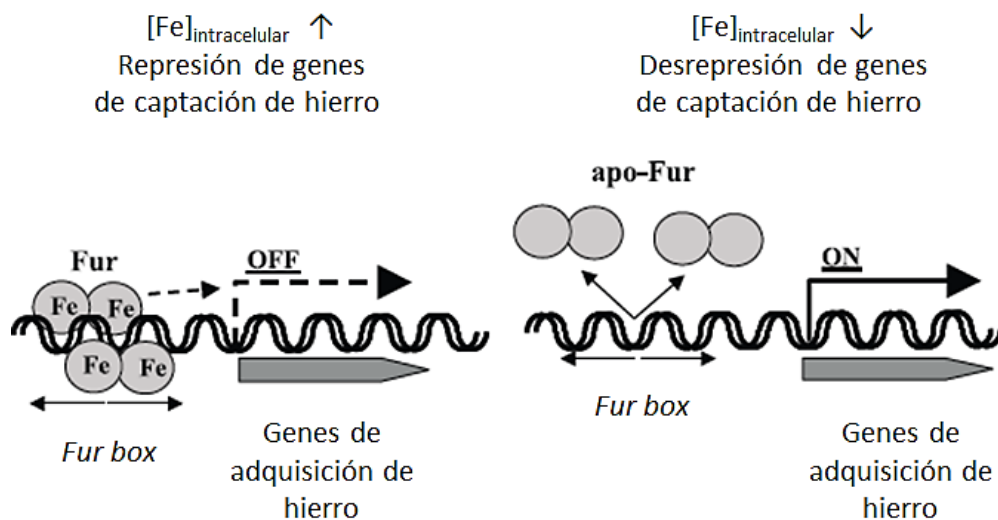


Figura 23. Esquema de represión clásica de Fur. Imagen adaptada de Andrews *et al.*, 2003.

En cuanto al sitio de unión al DNA de la proteína Fur, mediante ensayos de *footprinting* usando el promotor de la enterobactina de *E. coli*, se definió por primera vez una secuencia consenso. Esta secuencia rica en A y T se denominó caja Fur (*Fur box* o *iron box*) (GATAATGATAATCATTATC) (de Lorenzo *et al.*, 1987). Inicialmente se interpretó como una secuencia repetida invertida de 9 pb separadas por un solo par de bases pero con el tiempo ha sido revisada por varios autores presentando una disposición con un mínimo de tres repeticiones del motivo hexamérico GATAAT en lugar de una secuencia palindrómica de 19 pb. Otras propuestas indicaron la presencia de una secuencia conservada de 13 pb dispuesta en un

motivo 6-1-6 o una región central de 15 pb que contiene un motivo 7-1-7 conservado (TGATAATNATTATCA), relacionado con la interacción de dos dímeros de Fur en cada *Fur box* de la doble hélice de ADN (figura 24) (Lee and Helmann, 2007). En todos los casos, las cajas Fur tienen un alto contenido en A y T.

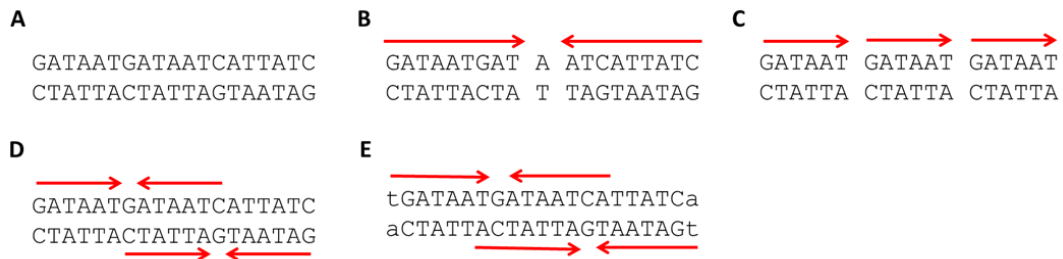


Figura 24. Representación de la evolución de la caja Fur propuesta. A) Primera secuencia consenso de repetición invertida de 19 pb. B) Modelo de unión clásica con una secuencia de 9 pb repetida invertida. C) Modelo de unión hexamérica con tres o más repeticiones de 6 pb. D) Modelo revisado que consta de dos motivos 6-1-6 superpuestos para unir dos dímeros a cada hebra del DNA. E) Modelo de unión de dos motivos 7-1-7 superpuestos descritos en *B. subtilis*.

Además de su actividad como holo-represor, también se ha observado la represión de algunos genes por parte de Fur en su forma apo (en ausencia de hierro). Esto sucede en *H. pylori* con el gen de la ferritina, *pfr*, donde la transcripción del gen es reprimida por Fur ya que su expresión se ve aumentada en un mutante Δfur . Sin embargo, en la estirpe silvestre la transcripción aumenta en presencia de hierro, indicando que no es la forma Fe^{2+} -Fur la que se une a este promotor (Delany *et al.*, 2001). Así, en condiciones de deficiencia de hierro, apo-Fur se une al promotor del gen *pfr* e impide su transcripción, mientras que en condiciones de abundancia de hierro, la forma Fe^{2+} -Fur se separa del promotor y el gen se transcribe. También se ha visto represión mediada por apo-Fur de los genes *sodB*, *hydA* y *c₅₅₃* (Ernst *et al.*, 2005; Carpenter *et al.*, 2013). Un alineamiento de las regiones promotoras de estos genes junto con ensayos de *footprinting* y retardo en gel permitieron identificar una secuencia consenso de 6 pares de bases (AAATGA) esencial para la represión por parte de apo-Fur (Carpenter *et al.*, 2013). Este mecanismo también se ha descrito en otras bacterias como *D. vulgaris* (Bender *et al.*, 2007) y *C. jejuni* (Butcher *et al.*, 2012) ya que varios genes del metabolismo del hierro están reprimidos en condiciones de deficiencia de este.

La estructura cristalina de *C. jejuni* apo-Fur ha arrojado cierta luz sobre la base estructural de este mecanismo alternativo. En esta estructura el dominio de unión al DNA de la forma apo aparece girado 180° en comparación con las estructuras previamente resueltas para la forma holo-dimérica de otros organismos (Butcher *et al.*, 2012). Estas diferencias estructurales entre las formas apo y holo del regulador podrían provocar el reconocimiento de diferentes secuencias de DNA dentro de los promotores regulados con y sin hierro.

Adicionalmente, se ha visto para Fur de *H. pylori* que en respuesta a estrés oxidativo, Fur se dirige específicamente a los genes regulados en su forma apo y que es necesario el estado

reducido para ello. Es decir, la regulación alostérica de Fur permite la transducción de señales de estrés oxidativo en *H. pylori*, apoyando el concepto de que los genes reprimidos por apo-Fur pueden ser considerados como objetivos regulados e inducibles por oxidación (Pellicieri *et al.*, 2015)

1.3.2.2. Fur como activador

Además de como represor, también se ha estudiado el papel de Fur como activador. Por un lado, Fur activa indirectamente genes a través de un pequeño RNA antisentido regulador (*small RNA*) RhyB, cuya transcripción está reprimida por Fe^{2+} -Fur. RhyB requiere de la chaperona Hfq para ejercer su función, proteína altamente conservada en muchos genomas bacterianos. Hfq favorece la unión de RhyB con sus mRNAs diana. Una vez que RhyB se une a su RNA mensajero diana, la degradación del complejo tiene lugar por parte de la RNasa E (Massé *et al.*, 2003). De esta forma, el mecanismo por el que Fe^{2+} -Fur actúa como activador sería el siguiente: cuando los niveles intracelulares de hierro son bajos, Fur está en forma apo y no se une al DNA con lo que no se reprime la síntesis de RhyB. RhyB se unirá entonces a los mRNAs diana y no habrá traducción. El proceso contrario sucede cuando aumenta la concentración de hierro ya que en este caso Fe^{2+} -Fur impide la transcripción de RhyB. Así, este no puede unirse a los RNA mensajeros diana y sí se sintetizarán las proteínas codificadas por los mismos (figura 25). En *E. coli*, esta forma de regulación se ha descrito para genes como *sodB* (superóxido dismutasa), *acnA* (aconitasa), *fumA* (fumarasa A) y *bfr* (bacterioferritina) que además no contienen *Fur box* en sus secuencias promotoras. Como resultado de la disminución en la producción de estas enzimas que contienen hierro y de las proteínas de almacenamiento de hierro, *E. coli* es capaz de remodelar su proteoma para usar de forma más eficiente el hierro disponible para sus funciones esenciales (respuesta a la escasez de hierro).

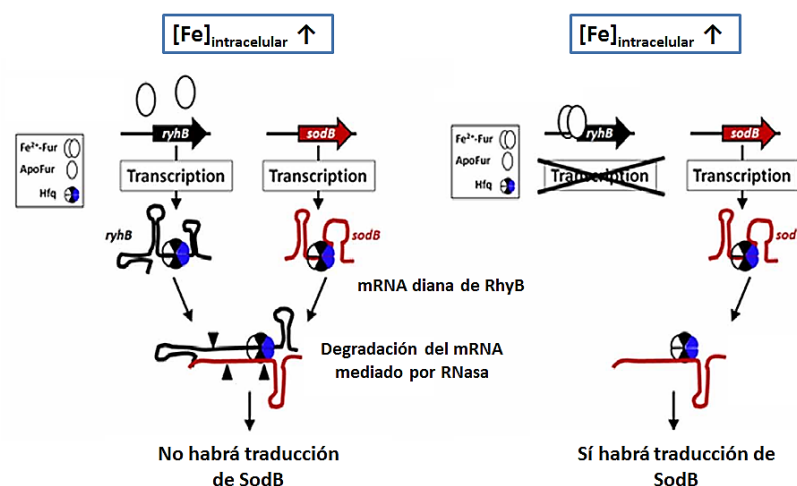


Figura 25. Mecanismo de activación de Fe^{2+} -Fur a través del pequeño RNA antisentido RhyB. Imagen adaptada de Troxell and Hassan, 2013.

Por otro lado, también se ha descrito el papel de Fur como activador directo de la transcripción (figura 26). En microorganismos como *N. meningitidis*, *H. pylori*, *V. cholerae* y *S.*

typhimurium, Fur es capaz de unirse al DNA provocando un cambio conformacional en el mismo, lo que favorece la unión de la RNA polimerasa y la transcripción de los genes diana. Por ejemplo, la transcripción de los genes *norB*, *pan1* y *nuoA* de *N. meningitidis* está regulada positivamente por Fur, disminuyendo drásticamente en un mutante de delección de Fur y también cuando la estirpe silvestre es tratada con un quelante de hierro (Delany *et al.*, 2006). El sitio de unión de Fur al DNA en las regiones promotoras de los genes activados parece situarse unos 100-200 pb aguas arriba del sitio de inicio de la transcripción. De esta forma, Fur ya no bloquea el acceso de la RNA polimerasa, sino que lo favorece.

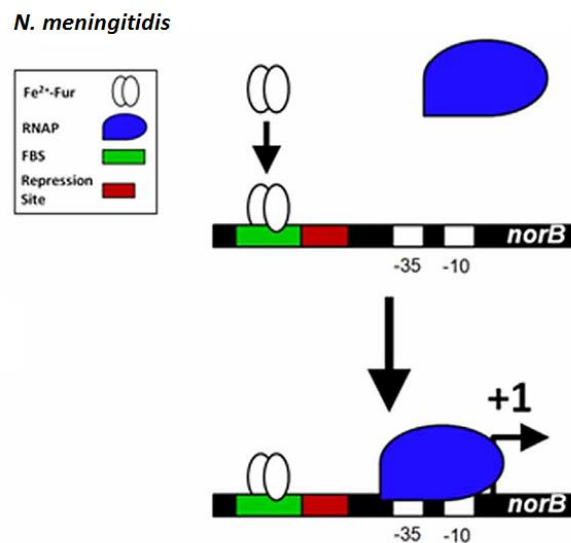


Figura 26. Fe²⁺-Fur como activador directo de la transcripción. La unión de a la secuencia de DNA activadora favorece la unión de la RNA Polimerasa. Imagen adaptada de Troxell and Hassan, 2013.

Por último, la definición del regulón de Fur en *C. jejuni*, *N. gonorrhoeae* y *H. pylori* reveló una serie de genes activados por la forma apo-Fur. También en *V. vulnificus*, *S. typhimurium* y *Staphylococcus aureus*, entre otros, se ha demostrado que apo-Fur activa la expresión de *fur*, de la proteína regulada por hierro IRO-28 y de *norA* (Fillat, 2014).

Las secuencias consenso identificadas para apo-Fur como activador, podrían ser significativamente diferentes de las *Fur box* previamente identificadas para la apo-represión. Por ejemplo, para Fur de *C. jejuni*, estas secuencias consisten en dos secuencias no palindrómicas de repetición directa de TTTGG que difieren marcadamente de las dos repeticiones invertidas en Fur (TGATAAT) (Butcher *et al.*, 2012). Además, otras proteínas Fur son capaces de reconocer diferentes secuencias de DNA, como BosR de *B. burgdorferi* que reconoce una nueva secuencia de repetición directa (TAAATTAAAT) (Ouyang *et al.*, 2011). En general, es razonable pensar que el reconocimiento de dianas de DNA por las proteínas Fur podría depender en gran medida de la conformación espacial del DNA y no de las secuencias consenso de las cajas Fur.

A continuación se muestra una imagen resumen de todos los posibles casos de regulación por parte de Fur que han sido descritos hasta la fecha.

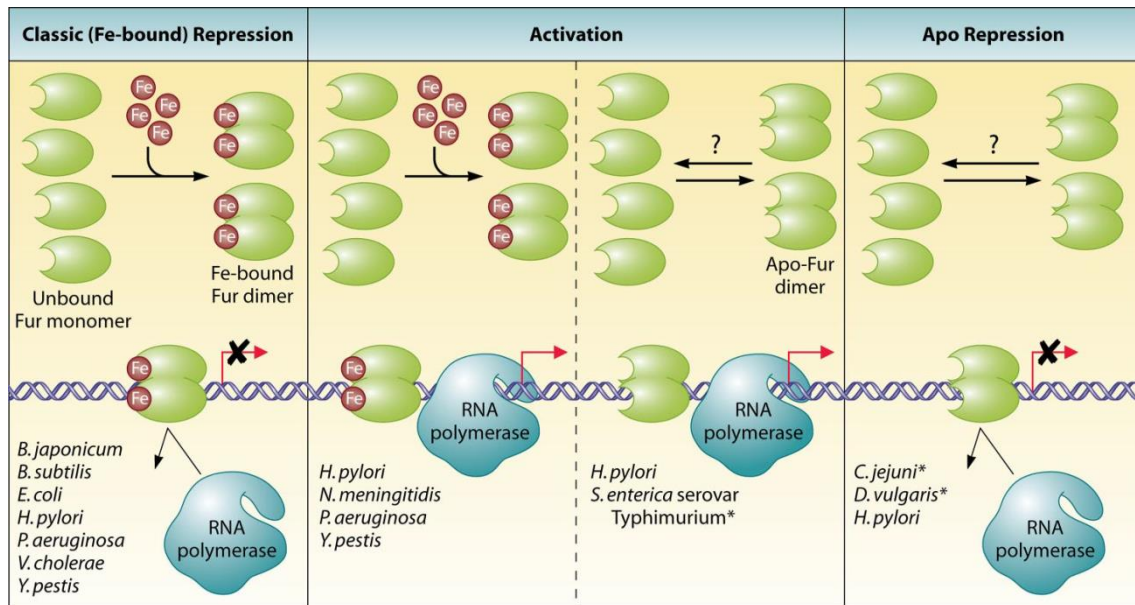


Figura 27. Representación esquemática de la represión de Fe-Fur, la represión de apo-Fur y la activación de Fur. Se muestran las características de cómo Fur interacciona con la región promotora en cada tipo de regulación. Imagen tomada de Carpenter *et al.*, 2009b.

1.3.3. Regulación de Fur

Dado que las proteínas Fur son reguladores globales con extraordinaria relevancia para la célula y su abundancia relativa es sorprendentemente alta en comparación con otros reguladores transcripcionales, su expresión debe estar estrictamente regulada. Se ha visto que la proteína Fur está regulada a distintos niveles del flujo de información genética:

- Nivel transcripcional. Se ha demostrado que Fur se une a su propio promotor en respuesta a hierro (Delany *et al.*, 2002), de forma que se autorregula. Sin embargo, también hay microorganismos como *Bartonella* sp. en los que Fur no está autorregulada (Park *et al.*, 2001). Además de la propia Fur, la transcripción del gen *fur* también puede estar controlado por los reguladores SoxRS y OxyR en *E. coli* (Zheng *et al.*, 1999), PerR en *S. aureus* (Horsburgh *et al.*, 2001) y NtcA en *Anabaena* sp. PCC 7120 (López-Gomollón *et al.*, 2007).
- Nivel post-traducciona. Estudios llevados a cabo en el grupo donde se ha realizado este trabajo indican que moléculas pequeñas son capaces de modular la actividad de Fur. En particular, se ha demostrado que FurA de *Anabaena* sp. PCC 7120 une hemo en el rango de concentración micromolar, y que la presencia de este compuesto inhibe la unión de la proteína a promotores diana en función de la concentración del mismo (Hernández *et al.*, 2004b). En este caso, la cisteína 141, que pertenece a un motivo

cisteína-prolina (CP) que forma parte de un motivo regulador de hemo (*HRM, Heme Regulatory Motif*), es uno de los ligandos axiales del Fe^{3+} hemínico (Pellicer *et al.*, 2012). Por otro lado, en *E. coli* Fur está regulada por nitrosilación. El óxido nítrico (NO) es capaz de reaccionar con los iones ferrosos de los sitios reguladores de la proteína y formar un complejo. De esta manera, aunque se mantiene el dímero proteico, este pierde su capacidad de unión al DNA (D'Autreaux *et al.*, 2002).

1.3.4. Papel de Fur en patógenos

Debido a la necesidad de hierro que presentan la mayoría de microorganismos, Fur desempeña un importante papel en los sistemas de captación y almacenamiento de hierro en patógenos, siendo por tanto esencial para su supervivencia. Por ejemplo, en *P. aeruginosa*, Fur regula la producción del sideróforo pioverdina, que es una proteína de unión a hierro que la bacteria secreta para captarlo del ambiente (Prince *et al.*, 1993). En *Haemophilus ducreyi*, la regulación de *hgbA*, gen que codifica una proteína de unión a hemoglobina, también está mediada por Fur, de forma que la bacteria es capaz de captar hierro del grupo hemo (Carson *et al.*, 1996). En cuanto a los sistemas de almacenamiento de hierro, en *Listeria monocytogenes* y *H. pylori*, Fur regula los genes *fri* y *pfr* respectivamente. Ambos genes codifican una molécula tipo ferritina (Fiorini *et al.*, 2008; Bereswill *et al.*, 2000).

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

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

1.3.5. Otros miembros de la familia Fur

1.3.5.1. Zur (*Zinc uptake regulator*)

Se definen como Zur aquellos miembros de la familia que coordinan zinc como metal regulador y que controlan principalmente la homeostasis de este metal. Aunque no es tan ubicuo como los homólogos Fur, existen más de 2000 entradas sobre proteínas Zur de diversas bacterias en las bases de datos.

Algunos de los análogos de Zur caracterizados son los de las bacterias *Staphylococcus epidermis* (Heidrich *et al.*, 1996), *Listeria monocytogenes* (Dalet *et al.*, 1999), *S. aureus* (Lindsay and Foster, 2001), *Salmonella enterica* (Campoy *et al.*, 2002), FurB/Zur de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Hernández *et al.*, 2004a), *Corynebacterium diphtheriae* (Smith *et al.*, 2009) y *Corynebacterium glutamicum* (Schröder *et al.*, 2010).

Zur normalmente funciona como un represor transcripcional de una manera dependiente de metal bloqueando el acceso de la RNA polimerasa a sus promotores diana, generalmente de genes que codifican sistemas de captación de zinc. Dentro del regulón de Zur (que suele abarcar unos 10-30 genes) se encuentra el sistema *znuABC* de captación de zinc presente en las enterobacterias *E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *N. gonorrhoeae* y *S. enterica*, entre otros (Fillat, 2014). Es decir, Zur regula la homeostasis del zinc de forma análoga a como Fur regula la homeostasis del hierro. En condiciones de suficiencia de zinc, Zur reprime la transcripción de genes de captación de zinc y, en deficiencia del metal, Zur se libera del metal y permite la expresión de los genes antes citados.

Además de como represor, también se han descrito algunos casos en los que Zur tiene la capacidad de actuar como activador. En concreto, en el fitopatógeno *Xantomonas campestris*, Zur activa la expresión de un sistema de bombeo de Zn^{2+} (Huang *et al.*, 2008). Estos sistemas exportan Zn^{2+} del citoplasma cuando la concentración intracelular excede un nivel crítico. También se ha descrito la capacidad de esta proteína de activar al gen *hrpX*. El producto génico activa a su vez la transcripción de los operones *hrpA-hrpF*, que contienen genes implicados en la patogenicidad de las bacterias, causante de diversas fitopatologías.

La primera proteína Zur en cristalizarse fue FurB de *M. tuberculosis* (Lucarelli *et al.*, 2007). Al igual que otros miembros de la familia Fur, posee un dominio N-terminal de unión al DNA (residuos 1-77) y un dominio C-terminal de dimerización (residuos 78-131). El dominio de unión al DNA contiene tres hélices α y dos láminas β , mientras que el dominio de dimerización consta de tres láminas β antiparalelas y una hélice α . Al igual que en Zur de *S. coelicolor* (Shin *et al.*, 2011) se identificaron tres sitios de unión a zinc (figura 28).

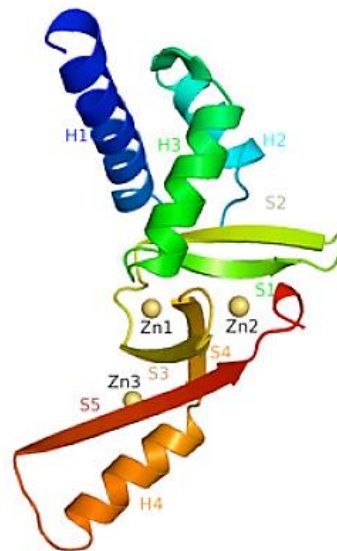


Figura 28. Representación de la estructura de FurB/Zur de *M. tuberculosis*. Los sitios de unión a metal se muestran como esferas amarillas. El dominio de unión a DNA se muestra en azul-verde. El dominio de dimerización se muestra en amarillo-rojo. Las hélices α se muestran con una H mientras que las láminas β se muestran con S. Imagen tomada de Lucarelli *et al.*, 2007.

1.3.5.2. Mur (*Manganese uptake regulator*)

Aunque el número de reacciones biológicas que utilizan cofactores con manganeso es escaso si lo comparamos con el de aquellas que requieren hierro o zinc, el manganeso forma parte de importantes enzimas de detoxificación de ROS como superóxido dismutasas y catalasas.

La homeostasis del manganeso en algunos microorganismos está regulada por la subfamilia Mur, formada por aquellas proteínas tipo Fur que contienen manganeso en el sitio regulador. Una de las primeras proteínas Mur en identificarse fue la de *Rhizobium leguminosarum*, que carece de zinc como metal estructural y une dos iones de manganeso por dímero (Bellini and Hemmings, 2006). En presencia de manganeso, esta proteína reprime la transcripción del operón *sitABCD*, que codifica un transportador de manganeso (Díaz-Mireles *et al.*, 2004).

1.3.5.3. Nur (*Nickel uptake regulator*)

Al igual que ocurre con el manganeso, el número de cofactores que contienen níquel es escaso. Sin embargo, es imprescindible ya que participa en procesos como la oxidación del hidrógeno molecular y está además presente en varias enzimas como ureasas, monóxido de carbono deshidrogenasas, acetil coenzima A sintasas y superóxido dismutasas.

El primer parálogo Fur descrito que regulaba la captación de níquel fue en la bacteria *S. coelicolor* y se designó como Nur. En presencia de níquel, Nur reprime la transcripción del grupo de genes *nikABCDE*, que codifica un sistema de transporte de níquel. Además, Nur

también está implicado en la respuesta antioxidante en *S. coelicolor* a través de la regulación negativa de *sodF* que codifica para una superóxido dismutasa dependiente de hierro (FeSOD). Por el contrario, Nur no está directamente implicado en la inducción de NiSOD en *S. coelicolor*, ni parece utilizar un mecanismo mediado por sRNA (Ahn *et al.*, 2006).

1.3.5.4. Irr (*Iron response regulator*)

Las proteínas Irr en lugar de contener hierro u otro metal regulador, contienen un grupo hemo, con el hierro en forma férrica o ferrosa dependiendo del microorganismo. Irr funciona bajo condiciones deficientes de hierro y actúa como regulador tanto positivo como negativo de la expresión génica que modula una serie de genes relacionados con el metabolismo del hierro. Estos reguladores se encuentran en α -proteobacterias (rizobiales) que son microorganismos con una alta demanda de hierro ya que al fijar nitrógeno tienen gran cantidad de enzimas que lo utilizan como cofactor (centros Fe-S y hemo en el complejo de la nitrogenasa y citocromos, respectivamente).

El primer miembro de esta subfamilia en ser caracterizado fue Irr de *B. japonicum*, que coordina la ruta de síntesis de hemo con la disponibilidad de hierro en la célula. En situación de deficiencia de hierro, reprime la expresión de la primera enzima de la ruta de síntesis de hemo, la deshidratasa del ácido δ -aminolevulínico o HemB (Hamza *et al.*, 1998). El grupo hemo se sintetiza a partir del ácido δ -aminolevulínico, a través de seis reacciones enzimáticas que conducen a la protoporfirina IX. En la última etapa de la ruta, la ferroquelatasa cataliza la incorporación de hierro ferroso sobre el anillo de protoporfirina IX para dar lugar al grupo hemo. La coordinación entre la síntesis de hemo y la disponibilidad de hierro es muy importante pues de lo contrario, en deficiencia de hierro se produciría la acumulación de porfirinas, perjudiciales para la célula.

El mecanismo de Irr es diferente al propuesto para el resto de los miembros de la familia Fur (figura 29). Este mecanismo se basa en la modificación postraducciona de Irr por hemo, lo que causa diferentes efectos en el regulador dependiendo de la especie. En *B. japonicum*, cuando hay suficiencia de hierro, Irr interactúa directamente con la ferroquelatasa. Esta interacción inhibe a Irr y por tanto, se desreprime la ruta de síntesis de hemo. El hemo que se produce por acción de la enzima ferroquelatasa se une a Irr provocando su degradación. En cambio, cuando hay deficiencia de hierro, Irr funciona como una proteína de unión al DNA, reprimiendo la transcripción de los genes de síntesis de hemo (Qi and O'Brian, 2002). Así, se evita que se acumulen porfirinas en la célula, que no darán lugar a hemo ya que hay ausencia de hierro disponible. Paradójicamente, en *R. leguminosarum*, el hemo unido a Irr no conduce a la destrucción de la proteína, sino que resulta en una disminución en la afinidad de la proteína por la región operadora de DNA a la que se une (Singleton *et al.*, 2010). Los diferentes efectos que causa la unión de hemo en estos dos reguladores parece que se deben a la diferente interacción de este efector con la proteína, dependiendo de si se une hemo con hierro en forma férrica o ferrosa.

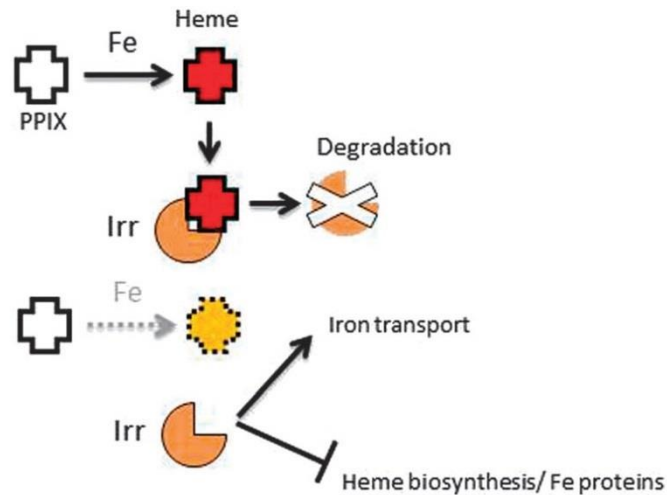


Figura 29. Esquema de funcionamiento de Irr con hemo y ferroquelatasa. El regulador Irr se une a hemo después de ser incorporado en el anillo de protoporfirina IX (PPIX); esto promueve la degradación del regulador Irr. Cuando el nivel de hierro es tan bajo como para no poder formarse el hemo, Irr es estable y puede unirse al DNA para activar la transcripción de genes implicados en la captación de hierro y reprimir genes de la biosíntesis del hemo. Imagen tomada de Cornelis *et al.*, 2011.

Además de Irr, en *B. japonicum* también existe Fur que regula la expresión de *irr* y del gen *hemA* en respuesta a hierro (Hamza *et al.*, 1999). El sitio de unión que reconoce *BjFur* es bastante diferente a la caja Fur canónica (Friedman and O'Brian, 2004).

1.3.5.5. PerR (*Peroxide regulator*)

PerR es otro miembro de la familia de proteínas Fur, que en este caso responde al estrés oxidativo. Este homólogo se encuentra principalmente en bacterias Gram-positivas que carecen de OxyR como *B. subtilis*, *C. acetobutylicum* o *S. aureus*. Sin embargo también se ha encontrado en algunas bacterias Gram-negativas como *C. jejuni* y *N. gonorrhoeae*, donde coexisten OxyR y PerR.

PerR de *B. subtilis* también forma un homodímero donde cada monómero presenta dos sitios de unión a metal: un sitio de unión al metal regulador (Fe^{2+} o Mn^{2+}) y un sitio de unión a metal estructural (Zn^{2+}). El metal regulador se encuentra coordinado por tres residuos de histidina y dos de aspartato (Lee and Helmann, 2006a). En todas las estructuras de PerR descritas hasta la fecha el Zn^{2+} estructural está coordinado por las cuatro cisteínas de los dos motivos CXXC presentes en el C-terminal. La liberación del zinc por el tratamiento con peróxido o diamida causa la disociación del dímero de PerR, evidenciando su papel estructural. Una comparación de las estructuras de PerR de *B. subtilis* activo (Mn:Zn-PerR) y la forma apo (Zn-PerR) muestra que la unión del metal regulador bloquea el dímero en una conformación adecuada para unirse al DNA (figura 30) (Jacquamet *et al.*, 2009). El modelo por el que PerR detecta estrés oxidativo consiste en una reducción del H_2O_2 a radical hidroxilo catalizada por el Fe^{2+} del sitio regulador. El radical hidroxilo generado oxida dos de los residuos de histidina que componen el sitio de unión, alterando la coordinación con el Fe^{2+} y provocando la liberación de

PerR del DNA. Como consecuencia se produce la expresión de genes que componen su regulón en el que se incluyen enzimas de detoxificación de ROS (Lee and Helmann, 2006b).

En microorganismos como *B. subtilis* que poseen tanto Fur como PerR, se ha visto que ambos parálogos reconocen sitios de unión a DNA similares aunque parece que regulan conjuntos de genes distintos. Sin embargo, en *C. jejuni* hay cierto solapamiento entre los regulones de Fur y PerR, ya que el gen *katA* (que codifica una catalasa) está controlado por ambos reguladores. Esto sugiere que Fur y PerR han evolucionado divergentemente de un antepasado común por duplicación de genes, con una proteína que ha conservado su papel en controlar la homeostasis del hierro mientras que la segunda proteína evolucionó para especializarse en responder al estrés oxidativo.

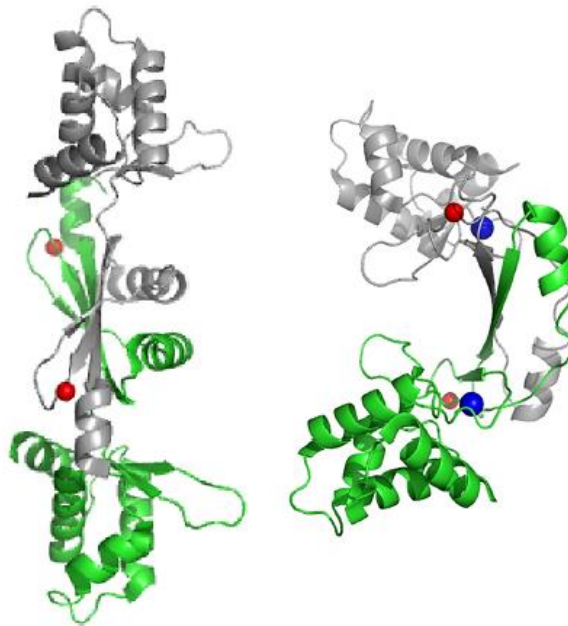


Figura 30. Diagramas de cintas de la forma apo del dímero de PerR (izquierda) (PDB ID 2FE3) y de la forma activa unida a manganeso (derecha) (PDB ID 3F8N). La cadena A está en gris y la cadena B en verde. La forma apo retiene el ion de zinc estructural que se representa como una esfera roja. Los iones de manganeso unidos en el sitio regulador están coloreados en azul oscuro.

1.4. Estado del arte sobre Fur de *C. difficile*

1.4.1. Regulón de Fur en *C. difficile*

Hasta la fecha, es poco lo que se conoce sobre los mecanismos de captación de hierro y su regulación por medio de la proteína Fur en el patógeno *C. difficile* (CdFur). Como en otros microorganismos, el hierro es un factor de crecimiento esencial y necesario para su supervivencia. Por el contrario, una sobreabundancia de hierro puede ser tóxica, por lo tanto su metabolismo es probable que esté estrictamente regulado (Cernat and Scott, 2012). El análisis de la secuencia del genoma disponible, ha revelado la presencia de múltiples sistemas de captación de hierro (apartado 1.2.1) así como del regulador Fur (gen CD630_12870) lo que refleja la importancia de este metal para *C. difficile* (Monot *et al.*, 2011).

En un artículo publicado en el 2013 por Janoir *et al.*, se realizó un análisis de la expresión temporal del genoma de *C. difficile* 630 durante las primeras horas después de infectar ratones monoxénicos (carentes de microbiota intestinal) con este patógeno (Janoir *et al.*, 2013). Se comparó la expresión de genes de *C. difficile* en bacterias recuperadas del ciego del intestino de ratón a las 8, 14 y 38 horas después de la infección. De esta forma, se identificaron los genes que se modulan durante el proceso de colonización del ratón con el fin de comprender las estrategias adaptativas utilizadas por este patógeno.

Un total de 549 genes mostraron una expresión diferencial durante la infección. La mayoría de los cambios se produjeron en genes que codifican proteínas implicadas en metabolismo (fermentación y metabolismo de aminoácidos y lípidos), regulación, procesos celulares, patogenicidad y esporulación y respuesta a estrés (Janoir *et al.*, 2013). En este último contexto, durante el proceso de infección, *C. difficile* debe hacer frente y adaptarse a diversos cambios en el entorno. Uno de estos estreses, ya comentado de forma extensa, es la adaptación a la baja disponibilidad de hierro que ofrece el hospedador (Troxell and Hassan, 2013). Se ha demostrado que *C. difficile*, al igual que otros patógenos Gram-positivos, es capaz de adaptarse y utilizar varias fuentes de hierro para su crecimiento. Es capaz de utilizar tanto hierro inorgánico en forma Fe^{2+} y Fe^{3+} , así como fuentes orgánicas de hierro férrico como la ferritina o compuestos con hemo (Cernat and Scott, 2012).

Probablemente, esta capacidad depende de los diversos sistemas de captación de hierro y hemo presentes en *C. difficile*. Por ejemplo, se observó cambio en la transcripción de algunos de los genes que codifican los sistemas de captación de hierro ferroso, Feo (Janoir *et al.*, 2013). Las proteínas Feo en algunas bacterias entéricas contribuyen a una eficiente colonización del intestino. Esto puede deberse a que el aumento de la necesidad de hierro en las células está relacionado no sólo con el aumento de la población bacteriana, sino también con la síntesis *de novo* de proteínas dependientes de hierro, tales como una presunta óxido-reductasa de ferredoxina (CD630_01150) o una rubreritina (CD630_28480), cuya expresión se incrementó de forma tardía durante la infección (Janoir *et al.*, 2013).

En el único estudio realizado hasta la fecha sobre Fur de *C. difficile*, publicado por Ho y Ellermeier durante la elaboración de este trabajo, generaron mediante mutagénesis un mutante de inserción de *fur* en la cepa *C. difficile* 630 para identificar su regulón. Utilizaron tanto el análisis de *microarrays* como qRT-PCR (PCR cuantitativa) para comparar las diferencias

transcripcionales entre el mutante de *fur* y la cepa silvestre cuando se cultivaron en medio con hierro. En el mutante de *fur* se vio aumentada la expresión de más de 70 unidades transcripcionales (genes reprimidos por Fur), mientras que en 44 genes se observó un descenso de la transcripción (genes inducidos por Fur) (Ho and Ellermeier, 2015). Esto podría sugerir que, al igual que ocurre en otros microorganismos como *H. pylori* o *N. meningitidis* (Fillat, 2014), *CdFur* podría actuar como represor y como activador.

Entre los genes reprimidos por *CdFur*, se encontraron varios de los sistemas de captación de hierro: dos de los ya mencionados sistemas Feo (*feo1* y *feo3*) y el sistema de transporte de sideróforos, Fhu. Un análisis de la expresión de estos genes *in vivo* en un modelo de infección en hámster, reveló que se encontraban inducidos durante la infección. Este hecho, sugirió que el hierro se encuentra limitado durante el proceso de infección del hámster por *C. difficile*. Por tanto, dicho estudio sugiere que *C. difficile* posee y expresa múltiples mecanismos de transporte de hierro en respuesta a la limitación del hierro, tanto *in vitro* como *in vivo*, y que muchos de estos mecanismos están regulados directamente por el regulador transcripcional Fur (Ho and Ellermeier, 2015).

Además, también se observó que *CdFur* regula la expresión de otros genes no implicados en el transporte de hierro pero sí relacionados con su metabolismo. Por ejemplo, un gen que codifica una flavodoxina (*fldX*, CD630_19990) cuya expresión fue fuertemente reprimida por *CdFur* y por la presencia de hierro, o un gen que codifica una ferredoxina (CD630_06271), que tuvo menor expresión en el mutante *fur* o en condiciones de escasez de hierro. La ferredoxina y la flavodoxina son proteínas de transferencia de electrones isofuncionales implicadas en numerosas reacciones metabólicas (Yoch and Valentine, 1972). Las ferredoxinas requieren un clúster de hierro-azufre para transferir electrones, mientras que las flavodoxinas usan flavinas y no requieren hierro. La regulación por parte de *CdFur* de estos genes sugiere que este homólogo puede desempeñar un papel en el equilibrio de la expresión de ferredoxina-flavodoxina (Ho and Ellermeier, 2015).

Otro de los estreses a que tiene que hacer frente *C. difficile* durante la infección es el estrés oxidativo causado por especies reactivas de oxígeno. Como anaerobio estricto, *C. difficile* es extremadamente sensible al estrés oxidativo y el hierro potencia los efectos perjudiciales de dicho estrés. Por lo tanto, otro motivo por el que *CdFur* podría jugar un importante papel en la regulación de la homeostasis del hierro en este patógeno, es evitando niveles excesivos de hierro intracelular que podrían causar tanto daño al DNA como a diversas enzimas sensibles redox. Además, la supresión del gen *fur* en otras cepas del género *Clostridium* provoca un aumento de la sensibilidad frente a estrés oxidativo (Vasileva *et al.*, 2012). Por ello, la desregulación de los genes regulados por Fur parece tener un impacto significativo en la supervivencia de *C. difficile* durante la infección. Por último, en un estudio reciente sobre un mutante Δfur de la cepa de referencia *C. difficile* 630 Δerm , se ha visto que dicho mutante expresa niveles hasta 1000 veces más bajos de las toxinas TcdA y TcdB (Monaghan *et al.*, 2017). Esto revela la importancia de *CdFur*, no sólo en la adaptación durante la infección, sino también en el desarrollo de la enfermedad por parte de este patógeno.

1.4.2. Motivación del trabajo: Fur de *C. difficile* como diana terapéutica

En la actualidad existen diferentes protocolos para tratar la infección por *C. difficile*, siendo la terapia con antibióticos el método normalmente elegido. Sin embargo, en un 20 % de los casos se produce una recaída y entre el 40-60 % de estos pacientes experimentan además múltiples episodios de recurrencia (Johnson, 2009). En estos casos, el trasplante de microbiota fecal (FTM, *Fecal Trasplant Microbiota*), método muy eficiente pero que consume mucho tiempo y es muy laborioso, constituye un recurso para su tratamiento (Bakken, 2009). Sin embargo, los antibióticos de primera línea como vancomicina o fidaxomicina son caros y en particular, en el caso de la vancomicina, no puede evitarse la aparición de cepas de enterococos resistentes, cuestión que plantea otro importante problema desde el punto de vista clínico (Mullane, 2014). Además, el trasplante de microbiota fecal es poco atractivo para médicos y pacientes. Así pues, *C. difficile* ha generado mucho interés en el desarrollo de nuevos antibióticos y en la actualidad existen diversos fármacos sobre los que se está investigando, algunos de ellos en diferentes fases de estudio clínico (Tsutsumi *et al.*, 2014). Ahora bien, muchos de estos compuestos, de estructuras químicas muy diferentes, actúan inhibiendo un espectro limitado de procesos celulares esenciales durante el crecimiento logarítmico de la bacteria, como son la biosíntesis de proteínas, RNA, DNA, pared celular o ácido fólico (Tsutsumi *et al.*, 2014). Estos procesos, comunes en las bacterias, dan como resultado una actividad de amplio espectro para estos compuestos, de modo que son muy propensos a generar resistencia debido a la alta presión selectiva (Rao and Anné, 2011). En consecuencia, se necesita entender la biología del patógeno para poder identificar nuevos objetivos y desarrollar estrategias de tratamiento.

En general, los patógenos bacterianos responden a señales nutricionales específicas dentro del microambiente del hospedador y su patogenicidad viene dictada por factores de virulencia que se requieren para establecer la infección en un sitio dado y por rutas metabólicas necesarias para apoyar su crecimiento. En este escenario, el hospedador puede ser considerado como un medio de cultivo usado por el patógeno para multiplicarse y producir enfermedad (Brown *et al.*, 2008). En consecuencia, la restricción en el acceso a nutrientes esenciales para el patógeno constituye una parte integral de la inmunidad innata desarrollada por el hospedador. Para mantener la infección, casi todas las bacterias dependen del aporte continuo de hierro por parte del hospedador, pues es necesario en muchos procesos metabólicos esenciales de la bacteria. Como ya se ha comentado, existen evidencias que sugieren que la disponibilidad de hierro y la procedencia del mismo son importantes para el crecimiento de *C. difficile in vitro* (Cernat and Scott, 2012). Así pues, la posibilidad de manipular el acceso de este microbio al hierro se plantea como una estrategia para prevenir y tal vez tratar la infección por *C. difficile*. En general, en el hospedador infectado es posible conseguir que los patógenos experimenten deficiencia de hierro utilizando quelantes del mismo o antagonistas de su captación. Pero también puede conseguirse alterando la capacidad de la bacteria para sintetizar sistemas de adquisición y de utilización de hierro. En particular, el bloqueo de reguladores de estos sistemas constituye una estrategia para controlar el desarrollo de patógenos (Ballouche *et al.*, 2009).

Teniendo en cuenta que Fur es el regulador responsable de la homeostasis de hierro en muchas bacterias, entre ellas *C. difficile*, una posible estrategia anti *C. difficile* es el bloqueo de

Fur en su forma activa para inhibir la síntesis de sistemas de captación y transporte de hierro en entornos deficientes en este nutriente, como es el hospedador durante la infección. En esta tesis se explora esta posibilidad.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

En los últimos años ha habido un aumento de la mortalidad y morbilidad causada por el patógeno digestivo anaerobio estricto *C. difficile*. Además, es conocida la relación del regulador de la homeostasis del hierro Fur en el desarrollo de patogenicidad en muchos microorganismos. Es por ello que como objetivo general de esta Tesis se planteó obtener proteína Fur de *C. difficile* en forma activa y cantidad suficiente para poder llevar a cabo su caracterización bioquímica y funcional con el fin de evaluar su idoneidad como diana terapéutica. Para alcanzarlo, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Obtención de la proteína recombinante CdFur en *E. coli* mediante el clonaje, sobreexpresión y puesta a punto de un método de purificación.
2. Búsqueda de las condiciones óptimas para el desarrollo de su actividad biológica tanto *in vitro* como *in vivo*, utilizando en este último caso un sistema heterólogo en *E. coli*.
3. Generación, sobreexpresión y purificación de diversos mutantes en residuos de cisteína de CdFur, que en otros homólogos son fundamentales para el desarrollo de su actividad. Caracterización bioquímica y funcional de los mutantes y estudio de la implicación de las cisteínas en el funcionamiento de CdFur.
4. Estudio de la interacción de CdFur con el grupo hemo, fuente de hierro para el patógeno en el hospedador, y análisis del efecto de dicha unión sobre la actividad de la proteína. Identificación de posibles aminoácidos implicados en la interacción.
5. Identificación mediante un cribado de alto rendimiento de compuestos pertenecientes a una quimioteca capaces de interactuar con la proteína CdFur. Estudio del efecto de los compuestos positivos sobre la actividad de unión al DNA de la proteína y determinación de la fortaleza de la interacción.

MATERIALES Y METÓDOS

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Medios de cultivo y cepas de *Escherichia coli* empleadas

En la tabla 1 se muestra el listado de los microorganismos empleados en este trabajo. Los cultivos en medio líquido se incubaron con agitación mecánica constante de 200 rpm a 37 °C utilizando Luria-Bertani (LB) esterilizado (10 g/l NaCl, 10 g/l triptona, 5 g/l extracto de levadura). Esta solución se suplementó con agar al 1,5 % para el medio sólido. La selección bacteriana, tanto en medio de cultivo sólido como líquido, se realizó añadiendo el antibiótico correspondiente a la concentración indicada en la tabla 2.

Tabla 1. Cepas de *E. coli*.

Cepa	Genotipo	Procedencia	Uso
DH5 α	<i>U169</i> (Φ 80 Δ <i>lacZ</i> Δ M15) <i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺) <i>supE44 relA1 deoR</i> Δ (<i>lacZYA-argF</i>)	Invitrogen	Clonaje y conservación de plásmidos
BL21 (DE3)	F ⁻ , <i>ompT hsdSB</i> (rB ⁻ , mB ⁺) <i>dcm gal</i> λ (DE3)	Novagen	Sobreexpresión de proteínas
TG1	K12, Δ (<i>lac-pro</i>), <i>supE, thi, hsdD5/F'</i> <i>traD36, proA</i> ⁺ B ⁺ , <i>lacI</i> ^q , <i>lacZ</i> Δ M15	Stratagene	Clonaje
JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺), <i>relA1, supE44, \Delta(<i>lac-proAB</i>), [F', <i>traD36, proAB, lacI</i>^q, <i>lacZ</i> ΔM15]</i>	Promega	Clonaje One-Step
JW0669	F ⁻ , Δ (<i>araD-araB</i>)567, Δ <i>lacZ4787</i> (::rrnB-3), Δ <i>fur-731</i> :: <i>kan, \lambda, rph-1, \Delta(<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i></i>	Keio Collection	Ensayos de actividad β -galactosidasa
H1780	<i>araD139 \Delta(<i>argF-lac</i>)<i>U169 rpsL150 relA1 flbB5301 deoC1 ptsF25 rbsR fur fiu</i>::λ<i>placMu Km</i></i>	Hantke	Complementación funcional de <i>EcFur</i>

Tabla 2. Antibióticos utilizados. Se preparó un stock 1000 veces más concentrado que la concentración final. Una vez disueltos los antibióticos en el solvente adecuado, se filtraron con un filtro de 0,2 μ m en esterilidad y se conservaron a -20 °C.

Antibiótico	Abreviatura	Concentración en el medio (μ g/ml)	Solvente
Kanamicina	Km	50	Agua
Ampicilina	Amp	100	Agua
Cloranfenicol	Cm	30	Etanol

Todas las cepas se conservaron a -80 °C con una concentración final de glicerol del 15-20 %. Para ello se añadió 1 ml de cultivo crecido durante toda la noche a 200 μ l de glicerol estéril.

Para los ensayos de actividad β -galactosidasa, el medio agar MacConkey (Panreac), que permite distinguir bacterias que fermentan la lactosa de las que no, se preparó de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Para ello, se disolvieron 50 g en un litro de agua destilada, se llevó a ebullición durante un minuto y a continuación se esterilizó mediante autoclave. El medio se dejó enfriar y cuando alcanzó una temperatura de 45-50 °C, se suplementó con el antibiótico necesario y en algunas ocasiones además con 100 μ M FeCl₃ o 200 μ M 2,2'-dipiridilo (Sigma-Aldrich), preparados en esterilidad.

El medio mínimo M9 (tabla 3), utilizado en ensayos de medida de la actividad β -galactosidasa en cultivo líquido, se obtuvo según el siguiente protocolo:

1. Preparar una solución concentrada de sales al 10x cuya composición es: 60 g/l Na₂HPO₄ anhidro, 30 g/l KH₂PO₄, 5 g/l NaCl, 10 g/l NH₄Cl. Una vez disueltas las sales, se ajusta el pH a 7,2 con NaOH. Por último, se enrasa con agua destilada hasta un volumen final de 1 litro. Autoclavar.
2. Preparar por separado disoluciones 1 M MgSO₄ y 1 M CaCl₂ y autoclavarlas.
3. Preparar glucosa al 20 % (p/v). Esterilizar por filtración con membrana de 0,20 μ m.
4. Preparar la siguiente solución concentrada al 100x de oligoelementos. Para 100 ml pesar: 8,5 mg de ZnCl₂, 3,2 mg de CuSO₄ · 5H₂O, 14 mg de MnCl₂ · 4H₂O, 9 mg de CoCl₂ anhidro, 6 mg de Na₂MoO₄ · 2H₂O y 1 mg de H₃BO₃.
5. Para preparar 1 litro de medio mínimo M9 (sin hierro), se mezclan en condiciones de esterilidad: 100 ml de la solución de sales 10x, 2 ml 1 M MgSO₄, 100 μ l 1 M CaCl₂, 20 ml glucosa 20 % y 10 ml de la solución de oligoelementos 100x. Por último, se añade agua destilada estéril y atemperada, enrasando hasta un volumen final de 1 litro.

Tabla 3. Composición del medio mínimo M9 sin hierro. Se detallan las concentraciones finales de cada reactivo. El medio se preparó de acuerdo al protocolo anteriormente detallado. Para su conservación se guardó a 4 °C.

Reactivo	Concentración final
Na ₂ HPO ₄	33,7 mM
KH ₂ PO ₄	22 mM
NaCl	8,55 mM
NH ₄ Cl	9,35 mM
MgSO ₄	1 mM
CaCl ₂	100 μ M
Glucosa	0,2 % (v/v)
ZnCl ₂	1 x 10 ⁻⁸ M
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1 x 10 ⁻⁸ M
MnCl ₂ · 4H ₂ O	8 x 10 ⁻⁸ M
CoCl ₂	3 x 10 ⁻⁸ M
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	3 x 10 ⁻⁹ M
H ₃ BO ₃	4 x 10 ⁻⁷ M

3.2. Técnicas de trabajo con DNA

A continuación se describen las técnicas utilizadas para realizar los clonajes de los plásmidos usados en este trabajo (tabla 4). En la tabla se hace referencia a la aplicación concreta de cada uno de ellos así como la de los plásmidos comerciales o cedidos por otros grupos de trabajo.

Tabla 4. Plásmidos utilizados y obtenidos en este trabajo.

	Plásmido	Resistencia	Descripción	Procedencia
Plásmidos utilizados	pET-28a(+)	Km	Sobreexpresión de proteínas	Novagen
	pACYCT2	Cm	Vector de clonaje de bajo/medio número de copias	Cedido por el Dr. Luc Ponchon
	pFU62	Amp	Vector para fusionar un promotor al gen <i>lacZ</i>	Cedido por la Dra. Petra Dersch
	pKD46	Amp	Expresión del sistema recombinasa λ Red (Sistema One-Step)	Cedido por la Dra. Laura Botello
	pKD4	Km	Amplificación <i>cassette</i> kanamicina (Sistema One-Step)	Cedido por la Dra. Laura Botello
Plásmidos obtenidos	pET- <i>furCd</i>	Km	Gen <i>fur</i> clonado entre los sitios NdeI/HindIII	Este trabajo
	pACYC- <i>furCd</i>	Cm	Gen <i>fur</i> clonado entre los sitios NdeI/XhoI	Este trabajo
	pFU62- <i>Pfur</i>	Amp	Promotor del gen <i>fur</i> clonado entre los sitios BamHI/PstI	Este trabajo
	pFU62- <i>PfeoA</i>	Amp	Promotor del gen <i>feoA</i> clonado entre los sitios BamHI/PstI	Este trabajo

3.2.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La amplificación de genes o promotores para clonaje se realizó mediante la técnica de PCR usando para ello la enzima de alta fidelidad DNA polimerasa *Pfu* ULTRA (Agilent) que posee actividad exonucleasa 3' \rightarrow 5'. En los demás casos se empleó la enzima *Taq* Polimerasa (Biotools). En la tabla 5 se indican las concentraciones de cada reactivo en una reacción de PCR. Las mezclas de reacción para cada enzima se prepararon siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tabla 5. Rango de concentraciones para cada reactivo en una reacción de PCR.

Reactivo	Concentración stock	Concentración final
Tampón	10x	1x
MgCl ₂	50 mM	1,5-4 mM
dNTP's	10 mM	200 μ M c/u
Oligonucleótidos	100 μ M o dilución	0,2-1 μ M
DNA polimerasa	5 U/ μ l	20-25 mU/ μ l
DNA molde	-	10-100 ng
H ₂ O Milli-Q	-	Hasta 20-50 μ l

Las reacciones de amplificación se realizaron en un termociclador Thermal Cycler 2720 (Applied Biosystems). En cada caso se empleó un programa de PCR que constaba de las siguientes etapas:

1. Desnaturalización inicial del DNA, 5 min a 95 °C
 2. Desnaturalización del DNA, 30 s a 95 °C
 3. Hibridación del DNA, 30 s a la T_m (45-55 °C)
 4. Etapa de elongación, 45 s a 72 °C
 5. Elongación final: 10 min a 72 °C
 6. Conservación: a 4 °C
- } 30 ciclos

La temperatura de hibridación (T_m) varió en cada caso según la pareja de oligonucleótidos empleados. En la tabla 6 se detalla tanto la T_m como la secuencia de cada uno de los oligonucleótidos utilizados que fueron suministrados por Invitrogen o Biomers.

Tabla 6. Oligonucleótidos utilizados. Cuando el oligonucleótido fue empleado para realizar un clonaje, el sitio de corte de la enzima aparece subrayado.

Nombre	Secuencia 5' → 3'	Empleo	T _m
Fur_Cdiff-dw (HindIII)	CCCAAGCTTTATTCTTCTGAATCGCTTAC	Clonaje gen <i>fur</i> en pET-28a(+)	56
Fur_Cdiff-up (NdeI)	GGAATTCATATGGCAAATACAATGGATTTATTTAAAAG		58
pfur_Cdiff-up	GCTGTGTATACTGCTATAATGG	Promotor gen <i>fur</i> EMSA	59
pfur_Cdiff-dw	CATCACCTTACTATTTTCAATTG		55
CdpfhuD_up	GCAAGTGATTTTATTTTTTTCATG	Promotor gen <i>fhuD</i> EMSA	55
CdpfhuD_dw	GCATTATCACAATATACTAAATG		55
CdpfeoA_up	CGCTTTTAAAAAAGAATAAAGC	Promotor gen <i>feoA</i> EMSA	55
CdpfeoA_dw	CATCATATAATATCCCTCCTC		55
CdpfhuB_up	CAGTCAATCATACAATCCAATTGG	Promotor gen <i>fhuB</i> EMSA	53
CdpfhuB_dw	CCCCAATAGTTATGGATAATACAATTCC		53
Cdcluster2gen1_up	CTACACCCTATAAGACCTCCTACC	Promotor cluster2 gen1 EMSA	53
Cdcluster2gen1_dw	CGCTACTGTATACGGATACGAAATC		53
Cdcluster2gen2_up	CAGAGCCAAATGCTACACACAC	Promotor cluster2 gen2 EMSA	53
Cdcluster2gen2_dw	CGGAAACCTATGGGTGTTTGC		53
Fur_Cdiff_dw (XhoI)	CCGCTCGAGTTATTCTTCTGAATCGCTTAC	Clonaje gen <i>fur</i> en pACYCT2	57
pfur_up(BamHI)	CGCGGATCCGCTGTGTATACTGCTATAATG	Clonaje promotor gen <i>fur</i> en pFU61-62	57
pfur_dw(PstI)	AAAAGTGCAGCATCACCTTACTATTTTCAATTG		59
pfeoA_up(BamHI)	CGCGGATCCCGCTTTTAAAAAAGAATAAAGC	Clonaje promotor gen <i>feoA</i> en pFU61-62	56
pfeoA_dw(PstI)	AAAAGTGCAGCATCATATAATATCCCTCCTC		55

Cuando fue necesario eliminar los reactivos sobrantes de la reacción (oligonucleótidos y dNTP's que podrían interferir en etapas posteriores del trabajo) los productos de PCR se purificaron empleando QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen).

3.2.1.1. PCR sobre colonias

Cuando se realiza un clonaje en el que se introduce un fragmento de DNA de interés en un plásmido determinado, un método rápido para verificar si el vector clonado contiene dicho fragmento es realizar una PCR sobre la colonia recién transformada. Esto permite analizar un gran número de colonias simultáneamente sin necesidad de aislar el DNA plasmídico de cada uno de ellas. El protocolo utilizado fue el siguiente:

1. Tomar con ayuda de una punta o palillo estéril una pequeña cantidad de la colonia a analizar.
2. Disolver la colonia en 15 μ l de H₂O Milli-Q estéril y a continuación estriar el resto en una nueva placa Petri para su conservación.
3. Hervir la mezcla 5 min a 95 °C para romper las células.
4. Centrifugar durante 5 min a 13300 *g* para precipitar los restos celulares.

El sobrenadante se empleó como DNA molde para la reacción de amplificación, siendo suficientes 5 μ l en un volumen final de mezcla de PCR de 20 μ l.

3.2.1.2. Mutagénesis dirigida

La mutagénesis dirigida es una técnica que permite sustituir uno o varios aminoácidos previamente seleccionados en una proteína por otros. El método de mutagénesis dirigida por PCR presenta varias ventajas como son su rapidez y su alta eficiencia. Sin embargo, no permite realizar en un solo paso mutantes dobles de aminoácidos alejados en la secuencia.

En este trabajo, dicho método se usó para obtener mutantes de cisteína de la proteína CdFur utilizando como molde el plásmido pET-*furCd* (gen *fur* de *C. difficile* clonado en los sitios NdeI y HindIII del vector pET-28a(+)). En concreto con esta técnica se obtuvieron los plásmidos con las mutaciones simples C51A, C81A y C93A. Los plásmidos con las mutaciones C101A, C104A, C141A y C144A fueron suministrados por GenScript. Los mutantes dobles C101A:C104A y C141A:C144A se obtuvieron utilizando como molde los plásmidos que contenían las mutaciones simples C101A y C144A, respectivamente.

Para realizar la mutagénesis se estableció un protocolo basado en las recomendaciones de QuickChange® Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) prestando especial atención tanto al diseño de los oligonucleótidos como a las condiciones de la PCR.

1. Diseño de los oligonucleótidos. Los requisitos fueron los siguientes: los cebadores debían ser totalmente complementarios, la mutación debía quedar en el centro del cebador con unas 15 bases a cada lado, el contenido en GC del oligonucleótido debía ser al menos el 40 % siendo aconsejable que en los extremos se encontrase una o más G o C, y la T_m debía ser próxima a 78 °C usando para estimar su valor la siguiente fórmula:

$$T_m = 81,5 + 0,41(\%GC) - 675/N - n/N$$

Los oligonucleótidos utilizados para la mutagénesis dirigida se adquirieron en Invitrogen (tabla 7). Las bases resaltadas en negrita corresponden a los nucleótidos mutados y las subrayadas al codón que codifica para el aminoácido mutado.

Tabla 7. Oligonucleótidos utilizados para hacer los mutantes de cisteína mediante el método de mutagénesis dirigida.

Nombre	Secuencia 5' 3'	Aplicación
<i>CdFur_C51A_up</i>	CTATGATTTAGTTAGAGTTGAC <u>GCT</u> CCTGAAATAGGCTTAGCTACTG	Mutante <i>CdFur</i> C51A
<i>CdFur_C51A_dw</i>	CAGTAGCTAAGCCTATTTTCAGG <u>AGC</u> GTCAACTCTAACTAAATCATAG	
<i>CdFur_C81A_up</i>	CAAACTAACTTAGACGATGGAGCTATAAGATATGAGATTAGTCTC	Mutante <i>CdFur</i> C81A
<i>CdFur_C81A_dw</i>	GTAGACTAATCTCATATCTTATAGCTCCATCGTCTAAGTTTAGTTTTG	
<i>CdFur_C93A_up</i>	GATTAGTCTACATAAAGAAGAC <u>GCT</u> CATAATCATCATCATCTTATTG	Mutante <i>CdFur</i> C93A
<i>CdFur_C93A_dw</i>	CAAATAAGATGATGATGATTATGAGCGTCTTCTTTATGTAGACTAATC	
C101A:C104A_up	CATCTTATTGCGAAAAAT <u>GCT</u> GGAAAGATAATGGAAGC	Mutante <i>CdFur</i> C101A:C104A
C101A:C104A_dw	GCTTCCATTATCTTTCCAGCATTITTTTCGCAATAAGATG	
C141A:C144A_up	GTAAATTTTATGGACTAGCTGACGAGGCGAATGGAG	Mutante <i>CdFur</i> C141A:C144A
C141A:C144A_dw	CTCCATTGCGCTCGT <u>AGC</u> TAGTCCATAAAAATTTAAC	

2. Condiciones de la PCR: En la mutagénesis dirigida por PCR, el plásmido (sirve como molde de DNA y contiene la secuencia del gen a mutar) se amplifica completo a partir de los oligonucleótidos con la mutación, por lo que el tiempo de extensión es mucho más largo que en una PCR convencional. Se prepararon 50 μ l de mezcla de reacción usando la enzima DNA polimerasa *Pfu* de alta fidelidad. El programa aplicado fue el siguiente:

1. Desnaturalización inicial del DNA, 1 min a 95 °C
 2. Desnaturalización del DNA, 30 s a 95 °C
 3. Hibridación del DNA, 1 min a 55 °C
 4. Etapa de elongación, 12 min (2 min/kb) a 72 °C
 5. Elongación final: 12 min a 72 °C
 6. Conservación: ∞ a 4 °C
- } 25 ciclos

Una vez realizada la PCR se trataron 20 μ l de la mezcla de reacción con 0,5 μ l de la enzima DpnI durante 1 hora a 37 °C. Esta enzima digiere el plásmido molde que se encuentra metilado mientras que deja intacto el plásmido que resulta de la amplificación y que contiene la mutación (al ser un producto de PCR no está metilado). A continuación se transformaron células DH5 α competentes con la mezcla de digestión mediante el método de choque térmico (apartado 3.3.1.2.). El plásmido mutado que tenía las dos hebras melladas a causa de la amplificación, era reparado en las células durante el proceso de transformación (figura 31). Como control se transformaron células con la mezcla de la PCR sin digerir. Cuando la mutagénesis había funcionado correctamente, el número de colonias que se obtenían al transformar *E. coli* con la mezcla tratada con DpnI (la que contiene el plásmido con la mutación) era menor que el resultante de la mezcla sin tratar.

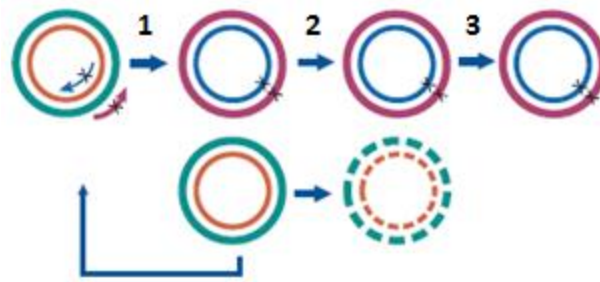


Figura 31. Proceso de mutagénesis dirigida por PCR. 1) Síntesis de la hebra mutada por PCR con oligonucleótidos que contienen la mutación. 2) Digestión del DNA molde con DpnI. 3) Transformación en células competentes y reparación de la hebra mellada. Adaptado de Agilent.

3.2.2. Electroforesis de DNA

La amplificación de cada fragmento por PCR y ausencia de contaminantes se comprobó mediante electroforesis de los productos en gel de agarosa. La preparación de los geles se llevó a cabo calentando en un horno microondas la cantidad de agarosa adecuada (tabla 8) en tampón TBE 1x (90 mM Tris/HCl pH 8, 90 mM H₃BO₃, 2 mM EDTA) hasta conseguir su disolución.

Tabla 8. Porcentaje de agarosa recomendado según el tamaño del fragmento de DNA.

Tamaño del DNA lineal (pb)	% agarosa en el gel (p/v)
1000-3000	0,5
500-1000	1
400-7000	1,2
200-3000	1,5
50-2000	2,0

Para la visualización de los ácidos nucleicos, una vez disuelta la agarosa y antes de la solidificación del gel, se añadió bromuro de etidio a una concentración final de 0,5 µg/ml. Este compuesto se intercala entre las bases nitrogenadas del DNA con alta afinidad siendo su límite de detección de 5 ng dsDNA/pocillo. Cuando este compuesto se excita con luz ultravioleta a una longitud de onda en torno a 300 nm, emite una luz roja-anaranjada a 590 nm lo que permitía observar la posición y cantidad relativa del DNA en el gel tras la electroforesis.

Las muestras se prepararon en presencia de tampón de carga 1x compuesto por 10 mM Tris/HCl pH 7,6, 0,03 % azul de bromofenol, 0,03 % xilenocianol FF, 60 mM EDTA y 60 % glicerol. El volumen máximo de muestra que podía cargarse por pocillo dependía de las dimensiones de los pocillos practicados. Como marcadores de peso molecular, se emplearon λ/HindIII (Fermentas), φX174 RF/HaeIII (Invitrogen) o TrackIt™ 1Kb Plus DNA Ladder (Invitrogen) en función del tamaño del fragmento a analizar.

Las electroforesis se realizaron en cubetas horizontales usando el equipo Mini-Sub® Cell GT (Bio-Rad) con tampón TBE 1x, aplicando un voltaje de 90 V durante 30-40 minutos con una fuente de corriente PowerPac300 (Bio-Rad). Por último, los resultados se visualizaron y registraron con un equipo GelDoc 2000 (Bio-Rad), que disponía de una lámpara de luz UV con $\lambda=302$ nm. El equipo GelDoc se controlaba con el programa Multi-Analyst® 1.1 proporcionado por el fabricante.

3.2.3. Extracción de DNA plasmídico de *E. coli* a pequeña escala (*miniprep*) y cuantificación del DNA

Para la extracción de DNA plasmídico, habitualmente de células *E. coli* DH5 α , se utilizó GenElute™ Plasmid Miniprep Kit (Sigma-Aldrich). Siguiendo las instrucciones del fabricante, el protocolo aplicado fue el siguiente:

1. Se recogen de 1 a 5 ml de células cultivadas toda la noche mediante centrifugación a 13300 *g*.
2. El precipitado se resuspende en el tampón proporcionado y se rompen las células mediante lisis alcalina con SDS.
3. Se neutraliza la mezcla y se centrifuga a máxima velocidad para eliminar restos celulares. El DNA queda en la fracción soluble.
4. El DNA se adsorbe sobre una columna de sílice.
5. Se lava el DNA para eliminar impurezas con una solución de etanol.
6. Finalmente se eluye el DNA de la columna con H₂O Milli-Q estéril.

La detrmnación de la concentración del plásmido extraído, así como la de los productos de PCR, se llevó a cabo mediante un equipo NanoVue Plus™ (GE Healthcare). Este equipo proporciona el valor de la concentración por espectroscopía de absorción UV a 260 nm, máximo de absorción del DNA como consecuencia de la presencia de bases nitrogenadas en su estructura. La absorbancia obtenida se relacionó con la concentración mediante la siguiente expresión:

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

3.2.4. Tratamientos enzimáticos del DNA

3.2.4.1. Digestión enzimática

La digestión del DNA con enzimas de restricción se realizó en todos los procesos de clonaje llevados a cabo en este trabajo. Para cada clonaje, se digirieron con el mismo par de enzimas tanto el plásmido como el fragmento a insertar en el vector, para generar así los mismos extremos cohesivos. Las enzimas empleadas fueron suministrados por Fermentas y se utilizaron de acuerdo a las instrucciones del fabricante (tabla 9).

Tabla 9. Mezcla de reacción para la digestión enzimática del DNA. La cantidad de enzima puede variar en función de la actividad que presenta en el tampón de reacción utilizado.

Reactivo	Cantidad
DNA	1-2 µg
Tampón de la enzima 10x	5 µl
Enzima de restricción (10 U/µl)	1-2 µl
H ₂ O Milli-Q	Hasta 50 µl

Las mezclas de reacción se incubaron durante 3 horas a la temperatura adecuada para cada enzima. En el caso de que ambas enzimas presentaban actividad en el mismo tampón se hizo la digestión doble con las dos enzimas en la misma mezcla de reacción. A continuación se purificaron tanto el vector como el inserto con QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen).

3.2.4.2. Ligación

Una vez digeridos el vector y el fragmento, se realizó la ligación utilizando para ello la enzima T4-DNA Ligasa (Promega) y preparando la mezcla de reacción de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se puso una relación inserto/vector de al menos 5:1 para asegurar el éxito de la ligación. Las mezclas se incubaron durante 3 horas a 37 °C o 2 horas a temperatura ambiente y posteriormente toda la noche a 4 °C.

El último paso en el proceso de clonación fue la secuenciación de los plásmidos para verificar la correcta secuencia del fragmento de DNA introducido en el vector. Para ello se enviaron al servicio de secuenciación de Sistemas Genómicos (Valencia) o al Servicio de Secuenciación y Genómica Funcional del Servicio General de Apoyo a la Investigación de la Universidad de Zaragoza.

3.3. Métodos genéticos

3.3.1. Células de *E. coli* termocompetentes

Para que una bacteria sea capaz de adquirir DNA exógeno (proceso de transformación), es necesario hacerla competente. Una forma de conseguirlo es mediante un tratamiento con sales (CaCl₂) que provocan un cambio fisiológico en el que se altera la estructura de la membrana celular bacteriana. Así, al aplicar un choque térmico se favorece la entrada de DNA plasmídico.

Una vez que se ha transformado la célula con el plásmido deseado, la bacteria se ve obligada a mantener dicho DNA ya que se cultiva en un medio con un antibiótico al que adquiere resistencia a través del plásmido introducido.

3.3.1.1. Obtención de las células termocompetentes

Se siguió el siguiente protocolo:

1. A partir de un cultivo crecido durante 14-18 h de la cepa deseada, se hace un inóculo al 1 % en 200 ml de medio LB estéril.
2. Se incuba a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una D.O. a 600 nm de 0,35-0,45 (fase exponencial temprana).
3. A continuación se mantiene el cultivo en hielo durante 20 min para detener el crecimiento.
4. Se centrifugan las células a 2000 g durante 15 min y 4 °C. Se elimina el sobrenadante.
5. El precipitado se resuspende en 40 ml de tampón de trituración estéril preenfriado en hielo, cuya composición es 14,7 g/l CaCl₂, 14,23 g/l MgCl₂, 3,28 g/l CH₃COONa.
6. Se vuelven a centrifugar las células en frío, se retira el sobrenadante y el precipitado se resuspende en 4 ml de tampón de conservación, cuya composición es: 14,7 g/l CaCl₂, 15% glicerol.
7. Finalmente se reparten las células en alícuotas de 200 µl y se congelan a -80 °C para su conservación.

3.3.1.2. Transformación mediante choque térmico

El protocolo utilizado para la transformación por choque térmico fue el siguiente:

1. Descongelar de 100 a 200 µl de células competentes en hielo.
2. Añadir en esterilidad el DNA plasmídico. Habitualmente, se añaden de 100 a 200 ng de DNA en un volumen inferior a 5 µl. Incubar 20 min en hielo.
3. Aplicar un choque térmico de 90 segundos a 42 °C usando para ello un termobloque. A continuación incubar 2 min en hielo.
4. Completar hasta 1 ml con medio LB estéril (sin antibiótico) e incubar de 45 minutos a 1 hora a 37 °C con agitación.
5. Sembrar 100-200 µl de cultivo en LB agar con el antibiótico adecuado.
6. Incubar la placa a 37 °C durante 18/24 horas.

3.3.2. Células de *E. coli* electrocompetentes

Otro método por el que se puede hacer a la bacteria competente es por electroporación. Con esta técnica se introduce DNA exógeno en la bacteria al aplicar un campo eléctrico, ya que aumenta la conductividad eléctrica y la permeabilidad de la membrana plasmática.

3.3.2.1. Obtención de bacterias electrocompetentes

La obtención de células electrocompetentes de *E. coli* se llevó a cabo mediante el siguiente protocolo:

1. A partir de un cultivo crecido durante 14-18 horas de la cepa deseada, se hace un inóculo al 5 % en 200 ml de medio LB estéril.
2. Se incuba a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una D.O. a 600 nm de 0,4-0,6 (fase exponencial media).
3. Se centrifugan las células a 2000 g durante 20 min y 4 °C empleando tubos de centrifuga estériles. Se elimina el sobrenadante.

4. El precipitado se resuspende en 40 ml de H₂O Milli-Q estéril pre-enfriada en hielo. Se vuelven a centrifugar las células a 2000 g durante 20 min y 4 °C. Se retira el sobrenadante.
5. Se repite el proceso anterior resuspendiendo esta vez el precipitado en 20 ml de H₂O Milli-Q estéril pre-enfriada en hielo. Centrifugar y desechar el sobrenadante.
6. El precipitado se resuspende lentamente en 16 ml de solución de glicerol al 10 % (v/v) estéril frío. Se centrifugan las células a 2000 g durante 20 min y 4 °C. Se retira el sobrenadante.
7. Por último se resuspende el precipitado en 1 ml de solución de glicerol al 10 % (v/v) estéril frío. Finalmente se reparten las células en alícuotas de 150 µl y se congelan a -80 °C para su conservación.

3.3.2.2. Electroporación de células electrocompetentes

Para la electroporación se utilizó un electroporador Nucleofector® II de Amaxa Biosystems y se siguió el siguiente protocolo:

1. Primero se atemperan en hielo las cubetas de electroporación.
2. Se descongela la cantidad necesaria de stock de células electrocompetentes en baño de hielo.
3. A continuación se añade el DNA en esterilidad (150-200 ng).
4. Se trasvasa la mezcla a una cubeta de electroporación esterilizada asegurándose de que se deposita en el fondo de la cubeta y sin burbujas.
5. Se aplica una corriente eléctrica de 2,5-2,0 kV, 200 Ω, 25 µF.
6. Luego se añade 1 ml de medio LB/SOC en esterilidad en la propia cubeta y se mezcla cuidadosamente. Posteriormente se transfiere la mezcla a un eppendorf estéril y se incuba a 37 °C y 200 rpm durante 1 h.
7. Por último se siembran las células en placa de LB agar con el antibiótico adecuado y se incuban a 37 °C durante 14-18 horas.

3.3.3. Sistema de One-Step (mutante *knockout* de *fur* en *E. coli*)

El método de inactivación de genes en un solo paso (figura 32) (Datsenko and Wanner, 2000), se utilizó para obtener una cepa de *E. coli* Δ*fur*. Este método permite interrumpir un gen del cromosoma de *E. coli* al sustituirlo por un *cassette* de resistencia a un antibiótico mediante recombinación homóloga. El *cassette* de antibiótico se introduce en la bacteria como un producto de PCR y los cebadores utilizados para amplificarlo poseen extensiones que son regiones homólogas flanqueantes al gen diana. Además, se utiliza un plásmido ayudante termosensible (pKD46) que expresa el sistema de la recombinasa del fago lambda bajo un promotor inducible por arabinosa. Los pasos a seguir para la sustitución del gen fueron los siguientes:

1. Diseño de oligonucleótidos. Crear oligonucleótidos de unas **50 pb** que hibriden con las zonas flanqueantes del gen a deleccionar (H1 y H2) (en este caso el gen *fur* de *E. coli*). Se delecciona desde el nucleótido anterior al codón de inicio del gen hasta el nucleótido

siguiente al codón stop. Para amplificar el *cassette* de resistencia al antibiótico, a cada oligonucleótido se le añade en el extremo 3' la cola P1 o P2 (parte subrayada). Ambas hibridan con el plásmido molde (pKD4). Los oligonucleótidos diseñados fueron:

H1+P1 CTTGCATAAAAAAGCCAACCCGCAAGTTGGCTTTTCTCGTTCAGGCTGGCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC

H2+P2 GTCACCTCTTCTAATGAAGTGAACCGCTTAGTAACAGGACAGATTCCGGCCATATGAATATCCTCCTTAGT

2. Obtención del *cassette* de kanamicina como producto de PCR. El plásmido pKD4 se utiliza como plantilla para amplificar el producto de PCR que contiene el gen de resistencia a kanamicina (1,6 kb). Para la mezcla de PCR se preparan 5 tubos de 50 µl de mezcla de reacción, añadiendo a cada uno 10 ng de plásmido molde. Utilizar 54 °C como Tm y 1 min 30 s de extensión. Correr un gel agarosa del 1 % para comprobar que ha habido reacción. Purificar mediante kit el total del producto de PCR y cuantificar.
3. Preparación de células termocompetentes de la cepa de trabajo y transformación con pKD46. Las células termocompetentes de la cepa de *E.coli* se prepararon de acuerdo al protocolo descrito en el apartado 3.3.1. A continuación se transforman con el plásmido pKD46 (200 ng) que es un plásmido de bajo número de copias, con resistencia a ampicilina y termosensible (se propaga a 30 °C y se pierde a 42 °C). Este plásmido expresa el sistema Red bajo un promotor inducible por arabinosa, permitiendo una recombinación específica. Hay que tener la precaución de que, tras aplicar el choque térmico y añadir 1 ml de LB, se deben incubar las células 2 horas a 30 °C en lugar de a 37 °C, puesto que es un plásmido termosensible. También las placas, una vez sembradas las células, se incuban a 30 °C.
4. Preparar células electrocompetentes de transformantes que llevan pKD46. Los transformantes de *E. coli* con el plásmido pKD46 se hicieron electrocompetentes siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.2. con las siguientes modificaciones: a partir de un cultivo crecido durante toda la noche a 30 °C, se hace el preinóculo en 20 ml de LBamp. Se incuban las células a 30 °C hasta D.O. a 600 nm de 0,15, momento en el que se inducen con L-arabinosa 1 mM. Se continúa la incubación hasta D.O. a 600 nm de 0,75. A continuación se sigue el protocolo para la preparación de células electrocompetentes de manera habitual.
5. Electroporar producto de PCR. En las células electrocompetentes recién preparadas introducir por electroporación 200 ng del producto de PCR purificado siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.3.2. Estas células contienen pKD46 expresando el sistema Red para que se produzca la recombinación del *cassette* de antibiótico en el sitio correcto del cromosoma, reemplazando al gen que se desea delecionar. Una vez sembradas las placas se incuban toda la noche a 42 °C para eliminar el plásmido ayudante pKD46.
6. Replicar colonias. Replicar las colonias que aparezcan en el siguiente orden con el mismo palillo: primero en LBKm para comprobar el mutante y obtener más masa, después en LBamp para ver si han perdido el pKD46 y por último en LB por si no ha crecido en las dos anteriores para ver si es porque no había suficiente masa bacteriana o bien porque no tenían la resistencia. Si la colonia crece en todas las placas, se inocula en LBKm en líquido y se deja creciendo a 42 °C toda la noche y a la mañana siguiente se repite el plaqueo. Así hasta que crezca en LB y LBKm pero no en LBamp.

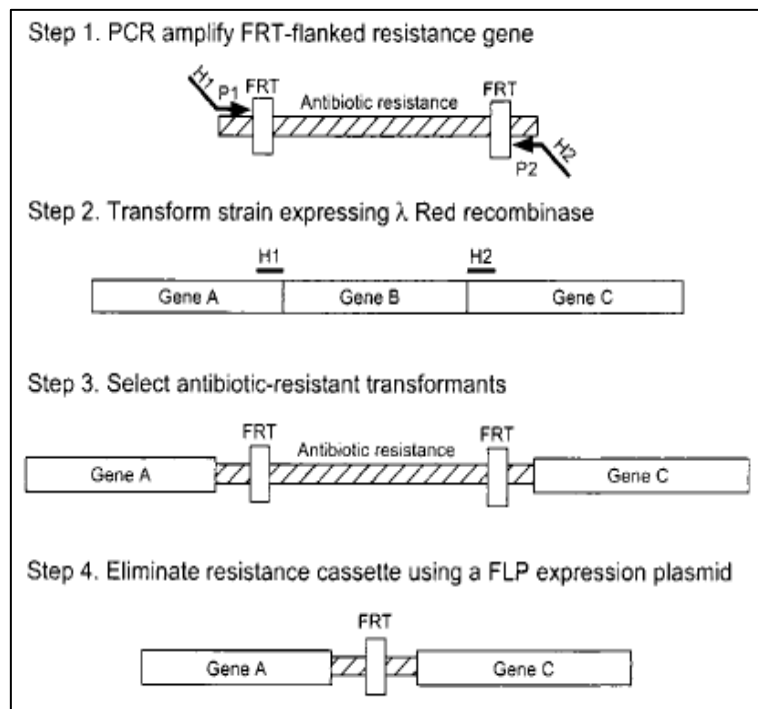


Figura 32. Estrategia de interrupción de genes en un solo paso (Sistema One-Step) para la construcción de un mutante Δfur en *E. coli*. El primer paso consiste en la amplificación por PCR del *cassette* de resistencia a kanamicina (KmR) usando el vector pKD4 como molde, con cebadores que contienen las secuencias H1 y H2 (son las regiones homólogas flanqueantes del gen *fur*). A continuación, la cepa de *E. coli* se transforma con el vector pKD46 para expresar la recombinasa λ Red. Finalmente, se transforma esta cepa el producto de PCR para promover la recombinación homóloga y se seleccionan los transformantes resistentes al antibiótico kanamicina. Adaptado de Datsenko and Wanner, 2000.

3.4. Obtención de la proteína Fur de *C. difficile*

Habitualmente, para la expresión de una proteína se elige *E. coli* como sistema heterólogo debido, entre otros motivos, a su rápido crecimiento y fácil manejo. El método de purificación es determinado por las propiedades físico-químicas de la proteína.

Como cepa se eligió *E. coli* BL21 (DE3) junto con el sistema pET (Novagen) para la sobreexpresión de la proteína recombinante. El plásmido utilizado, pET-28a(+), es un vector que proporciona una gran cantidad de proteína recombinante gracias a la potencia del promotor del bacteriófago T7, bajo cuyo control se expresará el gen de interés. A dicho promotor se une la T7-RNA polimerasa, cuyo gen está codificado en el DNA cromosómico de la cepa de sobreexpresión empleada. Estos dos elementos permiten un elevado nivel de sobreexpresión de la proteína recombinante, cuando ésta se induce con isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG). El IPTG es un análogo de la galactosa capaz de difundir a través de las membranas, que se une a la proteína represora LacI, provocando un cambio conformacional en ésta y haciendo que pierda afinidad por la región operadora. De esta forma se puede unir la RNA polimerasa al promotor y comenzar la transcripción. Así, este sistema

posee un doble mecanismo de represión, de manera que en ausencia de IPTG, LacI impide la transcripción tanto de la T7-RNA polimerasa como del gen clonado en el vector, reduciendo los niveles de expresión basal de proteína cuando ésta no se ha inducido (figura 33).

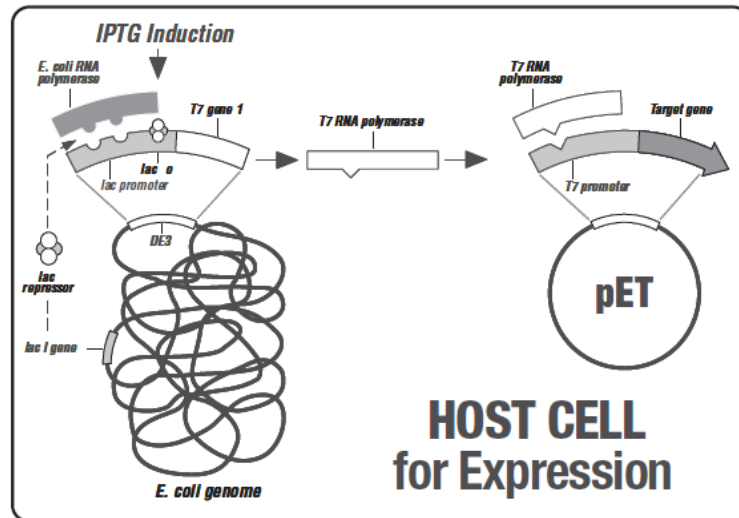


Figura 33. Elementos de control en el sistema pET (Novagen).

Para la obtención de la proteína Fur recombinante de *C. difficile* se clonó el gen *fur* en el plásmido de sobreexpresión pET-28a(+). Para ello se amplificó el gen mediante la técnica de la PCR descrita en el apartado 3.2.1. usando como molde DNA genómico de la cepa *C. difficile* ATCC 43255. Los cebadores utilizados, *Cdfur_up* y *Cdfur_dw* (tabla 6), se diseñaron para clonar el gen entre los sitios NdeI y HindIII del MCS del pET28, con el fin de obtener la proteína con una cola de histidinas en el extremo N-terminal.

Para la obtención de las proteínas de *Cdfur* mutantes se siguió el mismo procedimiento que para la proteína salvaje, utilizando en este caso los plásmidos pET28 que contenían el gen *fur* de *C. difficile* con la mutación correspondiente y generados mediante el método de mutagénesis dirigida descrito en el apartado 3.2.1.2.

3.4.1. Sobreexpresión de las proteínas a pequeña y gran escala

En la sobreexpresión de proteínas, primero se realizó una prueba a pequeña escala, analizando tres colonias de *E. coli* BL21 (DE3) recién transformadas con el constructo pET28-*furCd* o sus variantes conteniendo la mutación. Para ello se siguió el siguiente protocolo:

1. Se inoculan las colonias a analizar (1, 2, o 3) en 10 ml de LBKm y se incuban durante 14-18 horas a 37 °C y 200 rpm. Además se replican las tres colonias en LBKm agar para poder disponer de ellas una vez que sepamos cuál es la que más proteína expresa.

2. A partir de estos cultivos se hace un inóculo al 1 % en 10 ml de medio LBKm y se incuba a 37 °C y 200 rpm hasta alcanzar una D.O. a 600 nm de 0,5-0,6 (2-3 horas aproximadamente).
3. Alcanzada esa absorbancia se divide el cultivo en dos. A la mitad del cultivo se le añade IPTG (AppliChem) a una concentración final de 1 mM para inducir la expresión de la proteína recombinante. La otra mitad servirá como control sin inducir. Ambas mitades se incuban durante 3 h a 37 °C y 200 rpm.
4. Se analiza el nivel de sobreexpresión de la proteína en las distintas colonias mediante SDS-PAGE (apartado 3.5.1). A continuación se detalla el procedimiento para preparar las muestras:
 - a. Se añade 1 ml de cada cultivo (6 en total, 3 sin inducir y 3 inducidos) a un eppendorf y se centrifuga 5 min a 13300 g. Se elimina el sobrenadante.
 - b. El precipitado se resuspende en 50 µl de H₂O Milli-Q y se añaden 50 µl de tampón de carga 2x con β-mercaptoetanol.
 - c. Se hierven las muestras 5 min a 95 °C. Se centrifugan 5 min a 13300 g.
 - d. Se aplican 10 µl del sobrenadante en cada pocillo del gel de SDS-PAGE. Se desarrolla la electroforesis de manera habitual.
5. Se selecciona la colonia (1, 2, o 3) que muestra un mayor nivel de expresión de la proteína.

El proceso de sobreexpresión a gran escala o producción de biomasa, se realizó mediante el siguiente protocolo:

1. A partir de la placa réplica o del cultivo sin inducir de la colonia que más proteína sobreexpresa, se hace un inóculo en un tubo Falcon que contiene 10 ml de LBKm. Se incuba toda la noche a 37 °C y 200 rpm.
2. Se esterilizan Erlenmeyer de 2 litros que contienen 1 litro de medio LB. Se añade el antibiótico adecuado cuando el medio está atemperado.
3. Se hace un inóculo del 1 % (10 ml en 1 litro de LBKm) reproduciendo las mismas condiciones que en la prueba de sobreexpresión. Cuando se alcanza la D.O. a 600 nm de 0,5-0,6 se añade IPTG a una concentración final de 1 mM (1 ml de IPTG 1 M) y se continúa la incubación durante 3 horas.
4. Finalmente, se recoge la biomasa por centrifugación del cultivo a 11300 g durante 10 min y 4 °C.
5. Se lava el precipitado con NaCl al 0,85 % y se vuelve a centrifugar.
6. Se recogen las células en un tubo Falcon nuevo y se pesan para conocer la cantidad de biomasa obtenida. Para su conservación, se congela el precipitado a -20 °C hasta su posterior utilización.

3.4.2. Lisis celular y obtención del extracto crudo

Previo al proceso de purificación es necesario someter a la biomasa obtenida a un proceso de rotura celular. Uno de los métodos físicos de rotura a pequeña escala más usados, y que fue aplicado en este trabajo, es la sonicación. Este método consiste en la aplicación de frecuencias superiores a 20 kHz a una disolución provocando un burbujeo. Conforme las burbujas gaseosas

se rompen, se forman ondas de choque, que se irradian a través de la muestra consiguiendo la rotura de muchos tipos de células microbianas, incluyendo *E. coli*. En este proceso se genera calor que puede provocar daño en las proteínas por lo que la masa celular se debe mantener en hielo. El protocolo utilizado para la sonicación fue el siguiente:

1. Se descongelan unos 10 g de biomasa y se resuspenden en 50 ml de tampón de lisis (5 ml de tampón / g de biomasa) (tabla 10) que contiene 1 mM PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonio) como inhibidor de proteasas.
2. La suspensión celular se sonica en baño de hielo (10 ciclos de 45 seg con descansos de 30 seg entre ellos, a una amplitud del 90 %) utilizando un sonicador Dr. Hielscher UP200s.
3. El extracto crudo se clarifica centrifugándolo 3 veces a 48400 g durante 20 min y 4 °C.
4. Finalmente, se filtra primero con una membrana de 0,8 μm y posteriormente con otra de 0,45 μm, y se mantiene en hielo hasta ser cargado en la columna cromatográfica.

3.4.3. Purificación por cromatografía de afinidad a metales (IMAC)

La cromatografía de afinidad a un ión metálico inmovilizado (IMAC, *Immobilized Metal ion Affinity Chromatography*) permite la separación de proteínas por formación de enlaces de coordinación débiles entre iones metálicos inmovilizados en una columna y grupos funcionales de las proteínas, principalmente histidina y en menor medida triptófano y cisteína. Por ello está especialmente indicada para purificar proteínas recombinantes con cola de histidinas en uno de los extremos, o bien proteínas con residuos de histidina expuestos de forma natural.

La matriz cromatográfica utilizada (*Chelating Sepharose Fast Flow*, GE Healthcare) está formada por partículas esféricas de agarosa al 6 % altamente entrecruzada a las que se une un brazo espaciador más un quelante de metales, basado normalmente en estructuras de tipo iminodiacetato (IDA). El brazo espaciador establece una distancia suficiente para que la proteína se una al ion metálico quelado a la matriz, con el menor impedimento estérico (figura 34).

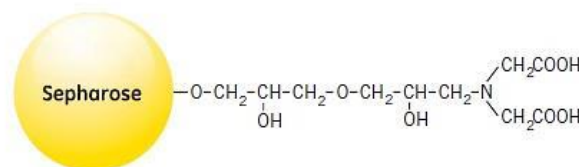


Figura 34. Esquema de la matriz de afinidad “Chelating Sepharose Fast Flow” (GE Healthcare). Se observa como se ha unido a la matriz de agarosa un grupo de ácido iminodiacético con un brazo espaciador de 6 átomos de carbono.

El montaje de la columna cromatográfica se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Se lavan las gomas conectoras y la columna de cristal con abundante agua destilada.

2. Se aplica el volumen deseado de matriz bien homogeneizada (el volumen final de matriz empaquetada depende de la cantidad de extracto crudo y por tanto de la cantidad de proteína a fijar) y la columna se rellena con H₂O Milli-Q. Se deja depositar la matriz en el fondo de la columna por gravedad.
3. Se cierra el sistema y se conecta a una bomba peristáltica con un flujo de 5 ml/min de H₂O Milli-Q para empaquetar la columna. Se lava la matriz con 10 vol. de H₂O Milli-Q para eliminar por completo los restos de etanol que contiene el líquido de preservación.
4. Se fija el metal a la matriz pasando 1-2 vol. de una disolución 200 mM de una sal del metal seleccionado.
5. A continuación se lava la columna con 10 vol. de H₂O Milli-Q para eliminar el exceso de metal no fijado y se equilibra con 5 vol. de tampón A (tabla 10).

Una vez preparada la columna cromatográfica con el metal al cual se iba a fijar la proteína se procedió a la purificación de la misma siguiendo el siguiente protocolo:

1. Se pasa el extracto crudo por la columna a un flujo lento de 1 ml/min para permitir una buena interacción proteína-metal. Es importante recoger y conservar todas las fracciones que salen de la columna para luego verificar por SDS-PAGE que la proteína se ha purificado correctamente.
2. Se lava la columna con el tampón de lavado (tabla 10) para arrastrar las proteínas unidas con baja afinidad al metal de la matriz, hasta que el eluido muestre una absorbancia a 280 nm inferior a 0,1.
3. Se eluye la proteína fijada a la columna con un gradiente de imidazol de 45 mM a 1 M en tampón A. La histidina es un aminoácido que posee un anillo de imidazol por lo que al añadirlo en forma libre, compite con los residuos de histidina de la proteína recombinante por el metal quelado a la matriz, de manera que desplaza a las proteínas unidas específicamente a la columna.
4. El eluido se recoge en fracciones de 1 ml y las alícuotas se mantienen a 4 °C hasta su análisis por SDS-PAGE.
5. Finalmente se lava y regenera la columna según las especificaciones del fabricante: 5 vol. de H₂O Milli-Q, 0,5 vol. de *Strip buffer* (50 mM EDTA, 500 mM NaCl, pH 8), 5 vol. de 500 mM NaCl, 5 vol. de H₂O Milli-Q y por último 5 vol. de etanol al 20 %.

3.4.4. Diálisis de proteínas

Una vez analizado por SDS-PAGE el proceso de purificación e identificadas las fracciones más ricas y puras de la proteína recombinante, las soluciones proteicas se juntaron y dializaron para retirar el imidazol de la disolución y dejar las muestras en las condiciones deseadas. La membrana de diálisis, con un tamaño de poro inferior a 10 kDa, se introdujo en un recipiente con un volumen de tampón de conservación (tabla 10) al menos 100 veces mayor que el volumen de proteína a dializar. La diálisis se mantuvo al menos 3 h a 4 °C y en agitación, y tras ello se renovó el tampón. Después de 3 cambios (uno de ellos al menos duró toda la noche), se procedió a cuantificar y concentrar las proteínas para su posterior conservación a -20 °C hasta su utilización.

Tabla 10. Composición de los tampones utilizados en la purificación.

Tampón	Composición
A	50 mM Tris/HCl pH 8, 500 mM NaCl
Lisis	20 mM imidazol, 1 mM PMSF en tampón A
Lavado	45 mM imidazol en tampón A
Elución	1 M imidazol en tampón A
Conservación	50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 10 % glicerol

3.4.5. Concentración de proteínas

Cuando fue necesario, las fracciones de proteína más puras se concentraron utilizando tubos “Amicon® Ultra” (Millipore) con un tamaño de poro de 3K. Este sistema impide que moléculas con un peso molecular superior a 3 kDa atraviesen la membrana del dispositivo, de forma que se concentran sobre la misma. También se probó con tubos 10K ya que la proteína posee un peso de 19,7 kDa pero por razones desconocidas la proteína se quedaba pegada a la membrana del tubo Amicon.

Antes de usar la membrana, se equilibró con tampón de conservación centrifugando a 2000 *g* durante 10 min y 4 °C. Posteriormente se cargó la proteína y se fue concentrando con ciclos de centrifugación a 2000 *g* y 4 °C, hasta alcanzar la concentración deseada.

3.4.6. Cuantificación de proteínas

Para conocer la concentración de proteína obtenida tras la purificación, una forma de cuantificar fue por espectroscopía de absorción molecular en el UV (apartado 3.6.1.), aplicando la ley de Beer-Lambert: $Abs = -\log(I/I_0) = \epsilon l C$. Así se relaciona la concentración de una sustancia, *C* (M), con su absorción, donde ϵ es el coeficiente de extinción molar ($M^{-1} \cdot cm^{-1}$) y *l* representa el paso óptico (1 cm).

Las proteínas presentan un máximo de absorción en torno a 280 nm debido a la presencia de residuos aromáticos, especialmente triptófanos. La concentración se calculó utilizando un ϵ teórico para las proteínas recombinantes purificadas, obtenido mediante el servidor ExPASy (<http://au.expasy.org>). El valor utilizado en este trabajo fue $\epsilon(280\text{ nm}) = 7825\text{ M}^{-1}\text{ cm}^{-1}$.

Además, se calculó la concentración de proteína mediante el método colorimétrico Bradford (Bio-Rad). Siguiendo las indicaciones del fabricante, primero se obtuvo una recta de calibrado usando como patrones disoluciones de albúmina sérica bobina de concentración conocida. A continuación, se calculó la concentración por extrapolación de los valores de absorbancia.

3.5. Caracterización bioquímica de proteínas

3.5.1. Electroforesis en gel desnaturizante (SDS-PAGE)

Los geles de poliacrilamida se prepararon de acuerdo al método desarrollado por Laemmli (1970) basado en un sistema discontinuo de geles: un gel separador con un porcentaje de poliacrilamida variable del 12-17 % y un gel concentrador con un porcentaje fijo del 5 % de poliacrilamida. La presencia en el gel del detergente dodecilsulfato sódico (SDS) como desnaturizante permite que la separación tenga lugar en función únicamente del peso molecular. La composición de los geles se detalla en la tabla 11. Los geles se prepararon utilizando un equipo Dual Gel Caster (GE Healthcare).

Tabla 11. Composición de los geles desnaturizantes de poliacrilamida. Se detallan las cantidades de reactivos necesarias para preparar geles del 15 y 17 % que fueron los utilizados en la mayoría de los casos.

Reactivo	Gel separador 15 %	Gel separador 17 %	Gel concentrador 5 %
H ₂ O	1,06 ml	0,72 ml	2,8 ml
1,5 M Tris/HCl pH 8,8	3,36 ml	4,48 ml	--
0,5 M Tris/HCl pH 6,8	--	--	0,5 ml
Acrilamida:Bisacrilamida 30 %	4,5 ml	6,8 ml	0,6 ml
SDS 10 % (p/v)	45 µl	60 µl	20 µl
PSA 10 % (p/v)	30 µl	40 µl	20 µl
TEMED	15 µl	20 µl	20 µl

Para la preparación de las muestras y una vez hecho el tratamiento deseado a las proteínas, se añadió tampón de carga cuya composición final fue 50 mM Tris/HCl pH 6,8, 2 % SDS, 1 % β-mercaptoetanol, 10 % glicerol y 0,02 % azul de bromofenol o tampón de carga con la misma composición pero sin el agente reductor β-mercaptoetanol. A continuación se hirvieron las muestras 5 min a 95 °C para desnaturizar las proteínas y se aplicó un pulso de centrifuga antes de cargarlas en el gel. Para la identificación de las proteínas se utilizó el marcador de pesos moleculares “Low Molecular Weight Calibration Kit For SDS Electrophoresis” (GE Healthcare) preparado del mismo modo que las muestras.

Una vez aplicadas las muestras en los pocillos, la electroforesis se llevó a cabo suministrando una corriente constante de 35 mA por gel durante 45 min aproximadamente, en un tampón compuesto por 25 mM Tris/HCl pH 8,8, 200 mM glicina, 3,5 mM SDS. Se utilizó un dispositivo para electroforesis vertical Mighty Small II SE250 / SE260 (Hoefer) junto con una fuente de corriente PowerPac Basic (Bio-Rad).

Para visualizar las proteínas, se tiñó el gel de poliacrilamida durante al menos 20 min con una disolución colorante compuesta por 10 % ácido acético, 45 % metanol, 45 % agua y 0,25 % (p/v) Coomassie Blue R-250. El colorante azul de Coomassie presenta una sensibilidad de 0,2-0,5

μg de proteína y se une de forma no covalente a residuos básicos e hidrofóbicos de la proteína. Para eliminar el exceso de colorante en el gel, se realizaron varios lavados con una disolución decolorante cuya composición era 10 % ácido acético, 25 % metanol y 65 % agua.

3.5.1.1. Análisis de oligomerización por entrecruzamiento

El estudio de las especies oligoméricas *in vitro* se realizó usando EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida) como agente de entrecruzamiento junto con NHS (N-hidroxisuccinimida). Las proteínas a una concentración final 30 μM se incubaron en oscuridad durante 30 minutos con EDC 2 mM y NHS 2 mM. Las reacciones se detuvieron mediante la adición del tampón de carga sin agentes reductores y posterior ebullición. Las muestras se resolvieron mediante SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie.

3.5.1.2. Análisis de la formación de puentes disulfuro

Con el fin de analizar la presencia de enlaces disulfuro intermoleculares e intramoleculares en las especies oligoméricas de la proteína *CdFur* y sus mutantes, se evaluó el efecto del agente reductor de puentes disulfuro ditioneitol (DTT, Sigma-Aldrich) y del peróxido de hidrógeno como agente oxidante. Las muestras de proteína a una concentración de 30-50 μM se trataron durante 15 minutos a temperatura ambiente con 10 mM DTT o con 10 mM H_2O_2 . Se utilizó un tampón de carga sin agentes reductores. Las proteínas se resolvieron mediante SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie.

3.5.1.3. Estudio de la presencia de metal mediante electroforesis

Una forma cuantitativa de detectar la presencia de zinc en una proteína es mediante una tinción en gel con el reactivo PAR (4-(2-Pyridylazo)resorcinol, Sigma-Aldrich). Una vez cargadas las muestras en el gel y desarrollada la electroforesis, el gel se incubó durante 2 minutos en 50 ml de una solución cuya composición era: 25 mM Tris/HCl pH 8,0, 75 mM NaCl, 5 % glicerol y 500 μM PAR. A continuación, se añadió 50 mM H_2O_2 sobre el gel teñido para revelar la presencia de zinc por oxidación de las proteínas y formación de los complejos coloreados zinc-PAR. Debido a que el complejo coloreado es transitorio se debe hacer la fotografía en el momento en el que aparece color.

3.5.1.4. Ensayos de alquilación con AMS

Las muestras de proteína a una concentración de 30-50 μM se prepararon en un volumen final de 20 μl en un tampón redox que contenía 100 mM DTT_{ox} (trans-4,5-dihidroxi-1,2-dithiane, Sigma-Aldrich) o 100 mM DTT_{red} (ditioneitol), para obtener proteínas *CdFur* totalmente oxidadas o reducidas, respectivamente. Se incubaron durante 3 horas a 30 °C y las reacciones se detuvieron mediante precipitación con TCA 5 % (p/v) (ácido tricloroacético). Para ello se utilizó el siguiente protocolo:

1. Se añaden a la mezcla de reacción 20 μl de TCA al 10 % (p/v) y se incuba 10 minutos en hielo.
2. A continuación se centrifuga a 13300 *g* durante 10 minutos a 4 °C.
3. Se desecha el sobrenadante con cuidado de no arrastrar el precipitado proteico.
4. Se añaden 200 μl de acetona preenfriada en hielo para lavar el precipitado.
5. Se centrifuga a 13300 *g* durante 10 minutos a 4 °C.
6. Se desecha el sobrenadante y se deja secar la proteína precipitada unos 10 minutos al aire con el eppendorf abierto.

Una vez precipitadas las muestras, las proteínas se resuspendieron en 15 μ l de tampón de alquilación (20 mM Tris/HCl pH 8, 3 % SDS (p/v), 20 mM del agente alquilante AMS) y se incubaron 15 minutos a temperatura ambiente. El AMS (sal disódica del ácido 2,2'disulfónico 4-acetamido- 4'maleimidilestilbeno, Sigma-Aldrich) es un derivado de maleimida que se une a los grupos tiol libres, causando una migración diferencial de las proteínas en la electroforesis SDS-PAGE en función del número de cisteínas libres, equivalente a entre 0,5 y 1 kDa por cada una. Por último se añadió a las muestras tampón de carga sin agentes reductores y se resolvieron mediante SDS-PAGE y tinción Coomassie.

3.5.2. Western blot

Una vez realizada la electroforesis en geles de SDS-PAGE al 15 %, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF (Millipore), aplicando un voltaje de 15 V durante 60 minutos con un dispositivo Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Cell (Bio-Rad) y una fuente de corriente PowerPac 300 (Bio-Rad). Antes de la transferencia, se lavó la membrana de PVDF con metanol durante 10 segundos y con tampón de transferencia (48 mM Tris/HCl pH 9,2, 39 mM glicina, 0,4 % SDS y 20 % metanol) durante 2 minutos. También se sumergieron el gel y los papeles de filtro en tampón de transferencia alrededor de 1 minuto. El montaje final se realizó siguiendo el esquema de la figura 35.

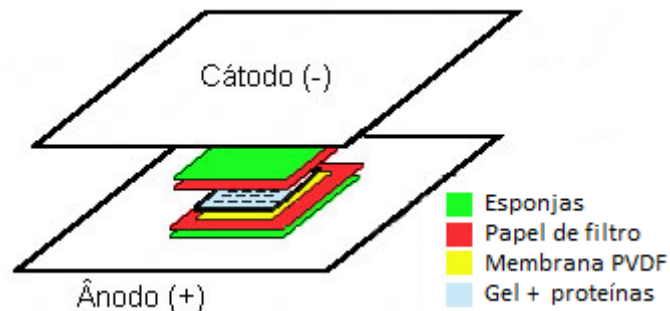


Figura 35. Disposición del gel y la membrana de PVDF durante la transferencia.

Una vez finalizada la transferencia, la membrana se bloqueó durante una hora a temperatura ambiente en una disolución de TBST (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 150 mM NaCl y 0,1 % Tween 20) y leche descremada al 4 %. Tras efectuar 3 lavados de 5 minutos con TBST, se incubó la membrana durante una hora con los anticuerpos primarios adecuados. Tras lavar de nuevo con TBST, se incubó durante otra hora con anticuerpo anti-IgG conjugado con peroxidasa. A continuación, la membrana se lavó 3 veces con TBST y 2 veces con tampón fosfocitrato (ácido cítrico 24,3 mM, Na_2HPO_4 5,14 mM pH 5,3). Finalmente, se introdujo en la disolución de revelado (20 mg TMB, 80 mg DONS, 10 ml etanol absoluto y 15 μ l H_2O_2) hasta observar la aparición de bandas color azul asociadas a la proteína.

3.5.3. Determinación del número de cisteínas libres por el método Ellman

La determinación de los grupos tiol en estado reducido de una proteína se puede realizar mediante el método espectrofotométrico desarrollado por Ellman (1959). El procedimiento está basado en la reacción que se produce entre los grupos tiol (-SH) presentes en las cisteínas reducidas, con el reactivo DTNB (5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid), Sigma-Aldrich) (figura 36).

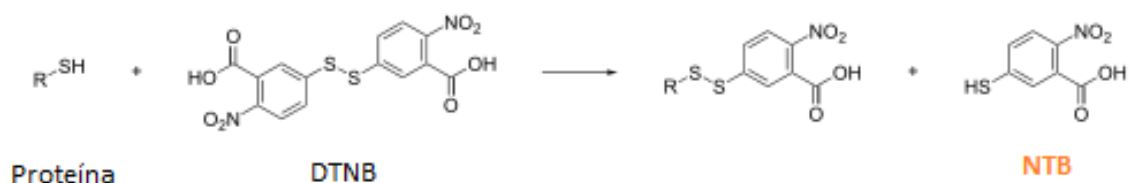


Figura 36. Reacción producida durante el ensayo de Ellman.

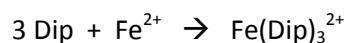
En la reacción se libera como subproducto NTB (5-tio-2-nitrobenzoato), cuya absorción a 412 nm se sigue con el tiempo por ser un producto coloreado. Dado que se conoce el coeficiente de extinción molar del compuesto generado ($\epsilon_{412 \text{ nm}} = 13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), es posible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

$$\Delta \text{Abs } 412 \text{ nm} = n \text{-SH} \cdot [\text{Proteína}]_{\text{cubeta}} \cdot 13600 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Para el ensayo se incubaron, en un volumen final de 1000 μl , 10 μM de proteína diluida en el tampón de conservación (50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl y 10 % glicerol), con 10 μl del reactivo DTNB recién preparado y en oscuridad a una concentración de 4 mg/ml en tampón 50 mM Tris/HCl pH 8. El blanco se hizo antes de añadir la proteína, y tras su adición en la cubeta de muestra, se añadió el mismo volumen de tampón en la cubeta de referencia. La reacción se siguió por el incremento de absorbancia a 412 nm con el tiempo hasta alcanzar un máximo en la señal (alrededor de 20 minutos).

3.5.4. Determinación del contenido en hierro de una proteína

Una forma de valorar el contenido en hierro presente en una proteína es mediante el uso del reactivo 2,2'-bipiridilo. El 2,2'-bipiridilo (Dip), forma un complejo coloreado con el hierro (II) cuya formación puede seguirse midiendo la absorbancia a 520 nm. Este método permite detectar hierro en el rango de concentración mg/l (ppm).



En este ensayo, el hierro se libera de la proteína mediante la adición de un tampón ácido. Si en la muestra hay Fe (III) este es reducido previamente mediante la adición de hidroxilamina. Para la determinación de hierro, primero se obtuvo una recta patrón con diluciones de concentración conocida de $\text{Fe}(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ (tabla 12) y posteriormente se siguió el protocolo descrito a continuación.

Tabla 12. Recta patrón para la determinación de hierro. Se muestran los volúmenes necesarios de agua y disolución de hierro (II) para preparar las diluciones de la recta patrón.

Volumen de H_2O Milli-Q (μl)	Volumen del stock 2 mM $\text{Fe}(\text{NH}_4)\text{SO}_4$ (μl)	[Fe] mM
200	0	0
195	5	0,05
190	10	0,1
185	15	0,15
180	20	0,2
175	25	0,25
170	30	0,3

1. Hacer las mezclas de la recta patrón y las diluciones de las muestras, todas en un volumen final de 200 μl .
2. Añadir 100 μl de 0,1 N HCl. La adición de medio ácido hace que se desnaturalice la proteína y se libere el hierro.
3. Incubar 10 minutos a 80 °C. Dejar enfriar y centrifugar 5 min a 13300 *g*.
4. Añadir 588 μl de H_2O Milli-Q.
5. Añadir 50 μl de hidroxilamina al 20 % (p/v).
6. Añadir 62 μl de 20 mM 2,2'-bipiridilo.
7. Incubar 1 hora a temperatura ambiente.
8. Medir la absorbancia a 520 nm tanto de la recta patrón como de las muestras. Con los datos de absorbancia de las muestras y la ecuación de la recta patrón obtenida, calcular el contenido en hierro de la proteína.

3.5.5. Estudio de la interacción proteína DNA (EMSA)

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

Los promotores de DNA empleados en el ensayo se amplificaron por la técnica de PCR (apartado 3.2.1.), con los oligonucleótidos descritos en la tabla 6, y su cuantificación se hizo por espectroscopía de absorción UV (apartado 3.2.3.). En todos los casos se utilizó como DNA

inespecífico un fragmento de DNA de *Anabaena sp.* PCC 7120 perteneciente al promotor del gen *nifJ* (*PnifJ*, 234 pb) al cual *CdFur* no se une.

En el ensayo se utilizaron geles de poli(acrilamida) en condiciones no desnaturizantes al 8 % cuya composición se detalla en la tabla 13. En cada ocasión, se prepararon en el momento y se precorrieron a 60 V y 4 °C durante 45 min para equilibrar el sistema y eliminar posibles trazas de poli(acrilamida) y PSA presentes en el pocillo que pudiesen desestabilizar el complejo proteína-DNA. Para la preparación de los geles y el desarrollo de la electroforesis se utilizó un equipo Mini-Protean II (Bio-Rad) y se realizó en el tampón de electroforesis cuya composición al 1X era: 25 mM Tris/HCl pH 8, 190 mM glicina y 10 mM EDTA.

Tabla 13. Composición de los geles no desnaturizantes para EMSA. Se detallan las cantidades de reactivos necesarias para preparar dos geles.

Reactivo	Gel 6 %	Gel 8 %
H ₂ O	4,86 ml	4 ml
R.B. 5X	1,86 ml	1,86 ml
Acrilamida:Bisacrilamida 30 %	2 ml	2,67 ml
Glicerol 50 % (v/v)	1,4 µl	1,4 µl
PSA 10 % (p/v)	50 µl	50 µl
TEMED	30 µl	30 µl

Las mezclas de reacción se prepararon en un volumen final de 20 µl. La proteína *CdFur* o sus mutantes, en el rango de concentración nM, se incubaron con 50-100 ng de DNA específico y 50-100 ng de DNA inespecífico, usando un tampón de unión cuya composición final al 1X era: 20 mM Tris/HCl pH 8, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 % glicerol, 0,05 mg/ml BSA. Con el tampón de unión se buscaba simular las condiciones que existen en el interior celular: pH próximo al fisiológico, fuerza iónica moderada y elevada concentración proteica (glicerol y BSA). La interacción proteína-DNA se estudió en distintas condiciones por lo que cuando fue necesario se añadieron a la mezcla de reacción:

- Metales divalentes como ZnSO₄ y MnCl₂ a concentraciones de 5 µM a 1 mM.
- Quelantes de metales divalentes: EDTA, TPEN (disuelto en DMSO puro) a concentraciones variables.
- Grupo hemo preparado según el apartado 3.7.1. a distintas concentraciones (proteína/hemo 1:5, 1:8 y 1:14).
- Compuestos procedentes de una librería química. Los compuestos se disolvieron inicialmente en DMSO al 100 %, y se probaron distintas concentraciones proteína/compuesto: 1:1, 1:10, 1:50 y 1:100).

Las proteínas se añadieron siempre en último lugar, y la mezcla de reacción se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Por último, se añadieron 3 µl del tampón de carga 6X (composición del tampón 1X: tampón de unión al 1X con un 50 % glicerol y azul de bromofenol 0.0025 % (p/v) como colorante). Tras aplicar las muestras, la electroforesis transcurrió durante 2h 15 minutos a 95 V y 4 °C. A continuación se tiñeron los geles durante 30 min a temperatura

ambiente con una disolución compuesta por el revelador de ácidos nucleicos SYBR®Safe 10000X (Invitrogen) a una concentración del 1X disuelto en el tampón de electroforesis. Para la visualización de los geles se utilizó el dispositivo GelDoc 2000 (Bio-Rad).

3.5.6. Calorimetría de titulación isotérmica (ITC)

La calorimetría de titulación isotérmica (ITC, *Isothermal Titration Calorimetry*) es una técnica que permite determinar cuantitativamente, y de manera directa, la estequiometría, entalpía de formación y constante de unión de la interacción entre dos especies mediante la medición directa del calor liberado o absorbido a presión constante durante la formación del complejo. Esta técnica se ha aplicado al estudio de interacciones del tipo proteína-proteína; proteína-ligando y proteína-DNA/RNA (Ladbury and Chowdhry, 1996). En este trabajo se empleó para analizar la interacción de CdFur y los diversos mutantes con el grupo hemo.

En los experimentos típicos de ITC, para estudiar la interacción entre una molécula y su ligando, se coloca la primera en la célula de muestra (en este caso proteína) mientras que la célula de referencia contiene sólo agua o tampón. Al ir inyectando cantidades crecientes de ligando sobre la célula de muestra se genera o se absorbe calor como consecuencia de la interacción proteína-ligando. La reacción se realiza en condiciones isotérmicas por lo que el sistema debe aportar o retirar calor para mantener las células de muestra y referencia a la misma temperatura. La medición del calor ($\mu\text{cal/s}$) que hay que aportar para mantener constante la diferencia de temperatura entre la celda de muestra y la de referencia nos permite obtener una curva a partir de la que se pueden calcular los parámetros que caracterizan la interacción proteína-ligando (figura 37). En las primeras inyecciones la mayor parte del ligando se une a la proteína por lo que las señales son mayores que las obtenidas en las últimas inyecciones cuando la proteína está saturada.

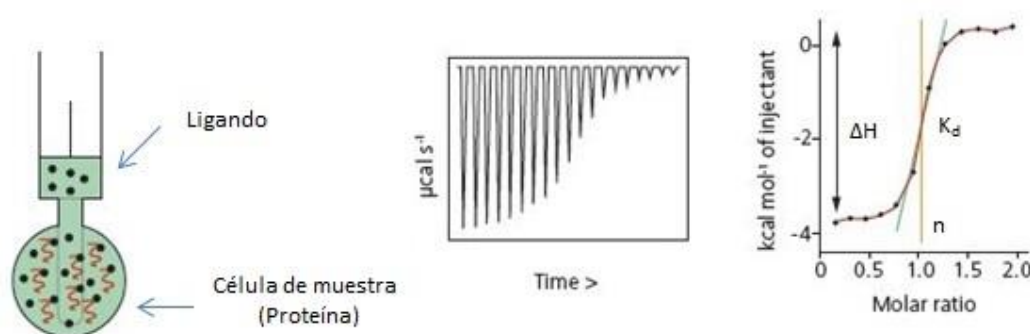


Figura 37. Fundamentos de los ensayos de ITC. Cada inyección de ligando da como resultado un pulso de calor que integrado en términos de tiempo y normalizado para la concentración genera una curva de titulación de Kcal/mol vs. ratio molar (ligando/muestra). La isoterma obtenida se ajusta a un modelo de unión para obtener los datos de afinidad (K_D), estequiometría (n) y entalpía de la interacción (ΔH).

Se utilizó un calorímetro Microcal Auto-iTC200 (Malvern) termostatzado a 20 °C. La célula de muestra contenía proteína 20 μM y la jeringa de inyección el ligando 400 μM , encontrándose ambos disueltos en el mismo tampón de trabajo: 50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl y 10 % glicerol. También se ensayó el efecto de la presencia de DTT por lo que se añadió a dicho tampón a una concentración final 2 mM. Previo al experimento, fue necesario desgasear las disoluciones de proteína, ligando y tampón durante 10 minutos en un sistema Thermovac de Microcal, para evitar la posterior formación de burbujas en la célula que podían distorsionar la medida. El análisis de los datos se realizó con el programa ORIGIN-ITC (Microcal), utilizando modelos de ajuste a uno o dos sitios de unión.

3.5.6.1. Preparación de la disolución de hemo

La disolución de hemo se preparó según el protocolo descrito por Chim *et al.*, 2010. En concreto, se disolvieron 3,3 mg del reactivo hemina (Sigma-Aldrich) en 500 μl de 0,1 N NaOH. A continuación, se añadieron 500 μl de 500 mM Tris/HCl pH 8. Esta solución se llevó hasta 10 ml enrasando con el tampón de trabajo (50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 10 % glicerol). Posteriormente, se pasó la solución por una membrana de 0,20 μm . La concentración final de esta disolución de hemo se calculó por espectroscopía utilizando el coeficiente de extinción molar en medio básico del hemo ($\epsilon_{385\text{ nm}} = 58.44\text{ mM}^{-1}\text{ cm}^{-1}$).

3.6. Métodos espectroscópicos

3.6.1. Absorción UV-Visible

Las proteínas absorben luz y emiten radiación en la región UV del espectro. Además de la pequeña contribución del enlace peptídico que absorbe fuertemente por debajo de 230 nm y la débil señal de los puentes disulfuro alrededor de 250 nm, la absorción de las proteínas en la región entre 230-300 nm viene determinada por los aminoácidos de cadena lateral aromática: tirosina, triptófano y fenilalanina. Este último presenta un coeficiente de absorción un orden de magnitud menor, por lo que el espectro de absorción de una proteína está dominado por la contribución de los dos primeros.

Todos los espectros realizados en este trabajo en la región del UV-Visible se registraron a 25 °C a las longitudes de onda correspondientes en cada caso, utilizando para ello un espectrofotómetro de doble haz SPECORD 250 PLUS (Analytik Jena) y empleando cubetas de cuarzo de 1 cm de paso de luz (Höllma).

3.6.2. Espectrometría de masas (MALDI-TOF MS)

La espectrometría de masas MALDI (*Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization*), acoplada a un analizador TOF (*Time of Flight*), es una técnica de ionización suave que permite el análisis de biomoléculas como proteínas y moléculas orgánicas grandes (como polímeros,

dendrimeros y otras macromoléculas) que tienden a hacerse frágiles y fragmentarse cuando son ionizadas por métodos más convencionales.

En esta técnica la muestra se mezcla con la matriz en exceso sobre una superficie de metal de tal forma que ambas cocristalizan cuando se evapora el solvente. Esta preparación es sometida a pulsos cortos de láser en alto vacío lo que provoca que la absorción de energía por parte de la matriz sea convertida en energía de excitación y en transferencia de H^+ a la muestra (ionización) dando lugar, normalmente, a especies monocargadas que son analizadas mediante TOF. Este analizador permite la determinación de la masa en una región de alto vacío mediante una medida muy precisa del período de tiempo desde la aceleración de los iones en la fuente hasta que impactan con el detector.

Entre sus aplicaciones están:

- Obtención del mapa peptídico tras la digestión de la muestra e identificación de proteínas utilizando el servidor MASCOT de Matrix Science, como algoritmo de búsqueda. Este análisis se realizó para verificar que la proteína obtenida era el homólogo Fur de *C. difficile*.
- Determinación de la masa molecular de una muestra. En este trabajo se utilizó para determinar la masa molecular de la proteína CdFur purificada.

Ambas determinaciones se hicieron sobre 100 μ l de proteína a una concentración 50 μ M en tampón 20 mM Tris/HCl pH 8, 15 mM NaCl, 1 % glicerol. Las muestras se analizaron en el servicio de Proteómica del Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud utilizando un espectrómetro de masas 4800plus MALDI-TOF/TOF™ Analyzer de Applied Biosystems.

3.6.3. ICP-OES

ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma - Optical Emission Spectrometry*) es una técnica de espectroscopía atómica que permite el análisis elemental de la mayoría de los elementos de la tabla periódica con gran sensibilidad, pues su límite de detección en muestras líquidas es de 0,01 ppm.

En esta técnica, la introducción continua de la muestra líquida y un sistema de nebulización forma un aerosol que es transportado por el argón a la antorcha del plasma, acoplado inductivamente por radio frecuencia. En el plasma, debido a las altas temperaturas generadas, los analitos son atomizados e ionizados generándose los espectros de emisión atómicos de líneas características. Los espectros son dispersados por la red de difracción y el detector sensible a la luz se encarga de medir las intensidades de las líneas. La información es procesada por un sistema informático.

Las muestras se disolvieron en una solución de ácido nítrico al 5 % (Aristar®) en un volumen final de 10 ml en tubos Falcon de 15 ml y se analizaron en el Servicio de Ionómica del Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS-CSIC).

3.6.4. Dicroísmo Circular (DC)

La luz polarizada en un plano es la suma de la luz polarizada circularmente a derecha y a izquierda. Cuando atraviesa una muestra ópticamente activa sus componentes se absorben en distinta cantidad. El dicroísmo circular proporciona información acerca de la diferencia en la absorción de luz polarizada a derecha y a izquierda por parte de un determinado compuesto.

En el caso de las proteínas, las señales de dicroísmo circular se observan en las mismas regiones espectrales en las que aparecen las bandas de absorción. En el UV lejano o región amida (170-250 nm) están dominadas por las contribuciones del enlace peptídico, mientras que las señales de DC de la región UV cercano (250-300 nm) están originadas por los aminoácidos aromáticos. Además, los puentes disulfuro dan lugar a señales menores alrededor de 250 nm.

Las señales de DC en el UV lejano de una proteína, contienen información acerca del enlace peptídico y la estructura secundaria de la misma. En particular, la hélice α muestra un espectro con forma de "W" con mínimos alrededor de 208 y 222 nm. En cambio, la hoja β muestra un espectro con forma de "V" con un mínimo en torno a 217-220 nm. Las contribuciones espectrales de otros elementos de la estructura secundaria al espectro de DC de una proteína están menos definidas (figura 38).

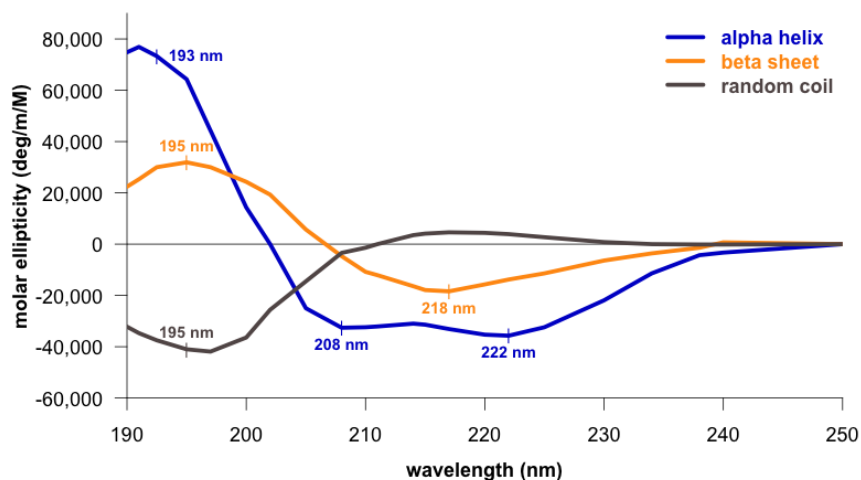


Figura 38. Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano asociados con distintos tipos de estructura secundaria.

Las señales de DC en el UV cercano se observan cuando las cadenas laterales aromáticas se encuentran inmovilizadas en un entorno asimétrico debido al plegamiento de la proteína. La señal de DC de los residuos aromáticos es muy pequeña en ausencia de estructura ordenada (por ejemplo en péptidos pequeños). El signo, la magnitud, así como la longitud de onda de las bandas aromáticas de DC no se pueden predecir ya que dependen del entorno electrónico y estructural del cromóforo inmovilizado. Sin embargo, el espectro de DC en el UV cercano representa un criterio muy sensible para determinar el estado nativo de una proteína y por ello puede ser usado como una huella digital de la conformación correctamente plegada.

Las medidas de dicroísmo circular se llevaron a cabo en el espectropolarímetro termostatzado Chirascan de Applied Photophysics. Las medidas fueron tomadas con una anchura de banda de 1 nm y un tiempo de respuesta de 15 s en el UV lejano (200-250 nm). Se utilizaron cubetas de cuarzo de 0,1 cm de paso de luz para el lejano y 1 cm para el cercano (Hellma).

3.6.5. Resonancia Paramagnética de Electrón (EPR)

La Resonancia Paramagnética Electrónica es una técnica espectroscópica en la que el campo magnético de la radiación interacciona con el dipolo magnético asociado al momento magnético intrínseco (espín) asociado a la estructura del centro paramagnético, cuyos niveles de energía han sido previamente desdoblados mediante la aplicación de un campo magnético externo uniforme. Las características de la radiación absorbida mediante este proceso están relacionadas con la estructura electrónica del centro paramagnético, y la espectroscopía de EPR aporta, por tanto, información sobre ella. Dada la necesidad de la presencia de paramagnetismo, esto es, estados degenerados que se desdoblan en presencia de un campo magnético externo, las sustancias que pueden estudiarse mediante este tipo de espectroscopía son fundamentalmente: estados paramagnéticos de iones de metales de transición, moléculas con un número impar de electrones, radicales libres generados por exposición a radiación de alta energía, procesos químicos u otras causas, moléculas orgánicas en estado y radicales orgánicos. Esta técnica proporciona información sobre la estructura electrónica y molecular de los centros metálicos paramagnéticos, incluyendo información sobre estados electrónicos, fundamentales o excitados, y sobre la geometría y simetría de la molécula.

Esta técnica se utilizó para determinar la posible presencia de grupos prostéticos de tipo sulfoférrico en la proteína purificada, así como para estudiar el entorno del grupo hemo en la proteína CdFur reconstituida con este grupo prostético. Para ello, las diferentes muestras se trasvasaron a un tubo de cuarzo de EPR, dentro del cual se congelaron en nitrógeno líquido (77 K) hasta que fueron transferidas a la cavidad de medida de EPR, conservándose congeladas durante esa transferencia. A las muestras se les añadió glicerol al 20-50 % con objeto de evitar el *g-strain* y ensanchamiento debido a la presión que ejercen los cristales de hielo sobre la proteína.

Los experimentos de EPR se realizaron en un espectrómetro Bruker ELEXSYS E-580 que trabaja en banda X (9.7 GHz). Los espectros se adquirieron manteniendo una temperatura constante de 18 K mediante el uso de un criostato de flujo de helio continuo. Tanto las condiciones de potencia de microondas, como de modulación de campo, se eligieron de manera que no se distorsionara el espectro, típicamente 0.005 mW y 0.4 mT, respectivamente.

3.7. Estudios de interacción con hemo

3.7.1. Espectroscopía diferencial para la determinación de la constante de disociación del hemo

Para analizar los efectos específicos sobre un cromóforo proteico inducidos por una perturbación del medio, por ejemplo la adición de un ligando proteico, se utiliza la espectroscopía diferencial. Un espectro diferencial representa el registro de las diferencias entre dos espectros de absorción. Se obtiene situando la solución del soluto problema en las cubetas de referencia y muestra y además a esta última se adiciona el agente de perturbación. El espectro mostrará bandas de absorción si las propiedades espectroscópicas del soluto están afectadas por el agente. En este trabajo se ha utilizado esta técnica para analizar la interacción entre CdFur y sus mutantes con el grupo hemo.

El espectro del grupo hemo libre presenta un máximo de absorción a 385 nm. Cuando éste se encuentra interaccionando con una proteína, su espectro cambia y el máximo de absorción se desplaza en torno a 415 nm. De esta forma, se puede seguir por espectroscopía diferencial el cambio que se produce en el espectro de absorción en el UV-Visible del grupo hemo, al ir añadiendo cantidades crecientes de proteína a una solución de este compuesto. El protocolo a seguir para preparar la disolución de hemo fue el siguiente:

1. Se disuelve una pequeña cantidad del reactivo hemina (3-5 mg) (Sigma-Aldrich) en 2 ml de una disolución NaOH 0,1 N y etanol absoluto en proporción 1:9 (v/v), en recipiente de cristal y protegido de la luz en todo momento.
2. Se agita vigorosamente y se filtra con una membrana de 0,20 μm .
3. Se calcula la concentración de la disolución de hemo recién preparada por espectrofotometría diluyendo 20-50 μl de la misma en 980-950 μl de NaOH 0,1 N (blanco) y usando el coeficiente de extinción molar del hemo en medio básico ($\epsilon_{385 \text{ nm}} = 58,44 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).
4. A partir de la solución cuantificada, se prepara una disolución 2 μM de hemo en 50 mM Tris/HCl pH 8 con precisión, usando para ello un matraz aforado.

La disolución de hemo tiene que usarse inmediatamente ya que el hemo tiende a dimerizar y la disolución es inservible al cabo de 2-3 horas. En cuanto a la proteína, debe estar a una concentración 50-100 μM conociendo con exactitud cuál es su concentración. Una vez preparados tanto el hemo como la proteína, se hace una titulación de proteína sobre la disolución de hemo y se procede a registrar el espectro diferencial tras cada adición, programando para ello el espectrofotómetro para que realice un barrido de 300 a 700 nm. Los pasos seguidos fueron los siguientes:

1. Se ponen tanto en la cubeta de muestra (*M*) como en la de referencia (*R*) 800 μl de la disolución de hemo 2 μM y se hace la corrección de la línea base. Se registra el espectro que debe salir plano.
2. Se van realizando adiciones de pequeño volumen de la disolución de proteína sobre la de hemo. En la cubeta de referencia se va añadiendo el mismo volumen de tampón donde se encuentra disuelta la proteína.

3. En cada adición se registra el espectro y se anota la variación de absorbancia entre el máximo del complejo proteína-hemo (en torno a 415 nm) y el mínimo del espectro (aproximadamente 385 nm).
4. Se hacen adiciones hasta que se alcanza la condición de saturación que es cuando la variación de absorbancia se mantiene constante al menos durante 3 medidas.
5. Una vez formado el complejo proteína-hemo en condiciones de saturación, se reduce añadiendo ditionito sódico (DTH, Merck) disuelto en agua a una concentración final de 5 mM y el mismo volumen de agua a la cubeta de referencia. Se registra el espectro diferencial.

A partir de la representación de las diferencias de absorción entre 385 nm y 416-419 nm frente a la concentración de proteína, se calculó la constante de disociación (K_D). Para ello, los datos experimentales se ajustaron a la ecuación teórica para una estequiometría 1:1 por medio de regresión no lineal utilizando el programa KalediaGraph 2.1 de Albebeck.

3.7.2. Espectroscopía directa

Con el objetivo de visualizar la interacción de proteínas y grupo hemo de una segunda manera se realizó el análisis de espectros directos entre 300 nm y 700 nm. Para ello, sobre 500 μ l de proteína 16 μ M se realizaron sucesivas adiciones de una solución de hemo 250 μ M y se registraron dichos espectros.

3.7.3. Reconstitución de la proteína con hemo

Se trataron entre 1-2 mg de proteína *CdFur* toda la noche con una disolución con doble exceso de hemo, a 4 °C y en agitación constante de 10 rpm. La disolución de hemo se preparó según la forma descrita en el apartado 3.7.1. A continuación, se pasó la proteína por una columna PD10 (GE, Healthcare) para eliminar el exceso de hemo. Para ello, se siguió el siguiente protocolo:

1. Eliminar el líquido de preservación de la columna PD10.
2. Equilibrar la columna con 5 vol. del tampón de conservación (50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 10 % glicerol).
3. Una vez que ha salido todo el tampón de la columna, aplicar la muestra. Se pueden añadir hasta 2,5 ml de muestra. Si el volumen de ésta es menor, una vez aplicada la muestra y dejando que entre por completo en la columna, se añade tampón hasta 2,5 ml. Desechar el eluido.
4. Añadir 3,5 ml de tampón para eluir la proteína.
5. Recoger el eluido (3,5 ml) y conservar en las condiciones adecuadas.
6. Cuantificar la concentración de proteína (apartado 3.4.6.).

3.8. Cribado de alto rendimiento de una quimioteca

La unión de un determinado compuesto al estado nativo de una proteína incrementa su estabilidad conformacional, la cual viene determinada por su temperatura de fusión (T_m , temperatura a la cual el 50 % de la proteína se encuentra desnaturalizada). Así pues, la medida de la T_m , obtenida a partir de la curva de desnaturalización térmica seguida por fluorescencia en presencia de diferentes ligandos, constituye una manera sencilla de identificar qué compuestos interaccionan con las proteínas diana (Pantoliano *et al.*, 2001). Para determinar cuales de los compuestos que forman parte de una quimioteca interaccionan con la proteína CdFur, se ha desarrollado un método de cribado de alto rendimiento (*High-Throughput Screening*) mediante ensayos miniaturizados en un formato de microplaca de 96 pocillos utilizando un fluorímetro de placas termostatizado FluoDia T70 (Photon Technology Intl.). Dado que la proteína CdFur no posee fluorescencia intrínseca, se utilizó una sonda fluorescente.

3.8.1. Quimioteca

La quimioteca (colección de compuestos) utilizada fue Prestwick Chemical Library®, compuesta por 1120 moléculas pequeñas, en su mayoría fármacos aprobados por FDA (*Food and Drug Administration*), EMA (*European Medicines Agency*) y otras agencias. Estos compuestos fueron seleccionados por un equipo de químicos y farmacéuticos por su alta diversidad química y farmacológica, así como por su biodisponibilidad y seguridad conocidas en humanos. La quimioteca se suministró en placas de 96 pocillos, donde en cada pocillo había un compuesto en concentración 10 mM disuelto en DMSO. Para su conservación se guardó congelada a -20 °C.

3.8.2. Búsqueda de condiciones óptimas

Para poder realizar un correcto cribado fue necesario primero poner a punto el experimento y buscar las condiciones adecuadas que permitieran obtener unas curvas de desnaturalización térmica reproducibles. En una curva de desnaturalización térmica se puede observar la transición entre el estado nativo o plegado de la proteína y el estado desnaturalizado.

Las condiciones del experimento que hubo que determinar fueron las siguientes:

- Concentración óptima de proteína. Se analizó la proteína a una concentración final de 2, 5 y 10 μM en un volumen final de 100 μl .
- Sonda fluorescente adecuada. Se probaron dos sondas. Una fue ANS (8-Anilino-1-naphthalenesulfonic acid ammonium salt, Sigma-Aldrich) y la otra SyPro Orange Protein Gel Stain (Life-Technologies). Ambas disueltas en DMSO (Dimetil Sulfóxido, Sigma-Aldrich) al 100 %. La sonda ANS se une principalmente a las proteínas por apareamiento de iones entre los grupos sulfonato cargados negativamente del ANS

con aminoácidos cargados positivamente, como histidina, lisina o arginina. Además, se requieren interacciones complementarias tales como interacciones de van der Waals para estabilizar los pares de iones. El uso del colorante Sypro Orange como sonda fluorescente se basa en el aumento de la intensidad de fluorescencia de este cuando se une a áreas hidrófobas de proteínas desplegadas térmicamente (Hawe, Sutter and Jiskoot, 2008).

- Relación proteína/sonda. La sonda ANS se probó a una concentración 30, 50 y 70 veces mayor que la concentración de proteína usando un stock de ANS 200 mM. En cambio la sonda SyPro se analizó a una concentración final 1x, 5x y 10x partiendo del preparado comercial a 5000x.
- Tampón adecuado. La proteína se analizó en su propio tampón de conservación compuesto por 50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl y 10 % glicerol. Además se probó el efecto del agente reductor DTT a una concentración final de 1 y 10 mM.

El fluorímetro de placas FluoDia T70 se programó para que realizara una rampa de temperatura de 20 a 70 °C excitando a una longitud de onda de 390 nm o 465 nm y emitiendo a 500 nm o 580 nm según si la sonda utilizada fue ANS o SyPro, respectivamente. Se ensayaron todas las condiciones posibles y se analizaron las curvas obtenidas mediante el programa Origin 7.0.

3.8.3. High-Throughput Screening

Una vez encontradas las condiciones en las que se obtuvieron las mejores curvas de desnaturalización de la proteína CdFur, se analizó la cantidad máxima de DMSO en la que la proteína mantenía su estabilidad. Esto daría idea del número de compuestos que podrían analizarse a la vez ya que los compuestos estaban disueltos en DMSO al 100 %. Se probaron concentraciones finales de DMSO al 2,5 %, 5 %, 7,5 %, 10 % y 12,5 % lo que significaría poder añadir de 1 a 5 compuestos diferentes en el mismo pocillo de la placa. Por último, se ensayaron los compuestos de acuerdo al siguiente protocolo:

1. Preparar la mezcla de reacción, para lo que se añadió en el siguiente orden: tampón de conservación, DTT, proteína y sonda. La mezcla se homogeneizó por pipeteo.
2. Descongelar las placas de la quimioteca. Homogeneizar el contenido utilizando un agitador de placas.
3. Añadir el volumen adecuado de mezcla a cada pocillo.
4. Añadir DMSO a los controles (columnas 1 y 12).
5. Añadir 2,5 µl de los compuestos de uno en uno siguiendo el orden mismo que en las placas de la quimioteca. Los compuestos se añaden a una concentración final de 250 µM.
6. Homogeneizar el contenido de cada pocillo pipeteando y evitando la formación de burbujas.
7. Añadir 50 µl de aceite mineral en la parte superior de cada pocillo para evitar la evaporación de la muestra.
8. Introducir la placa en el fluorímetro FluoDia T70 y aplicar el programa adecuado.

3.8.4. Análisis de los resultados

Para la identificación de compuestos capaces de unirse a la proteína y, por tanto, aumentar la T_m de esta, se utilizó un software desarrollado por la Dra. Nunilo Cremades. La identificación se basó en la localización del punto medio de las curvas de desnaturalización, así como del máximo de la primera derivada de la curva (figura 39).

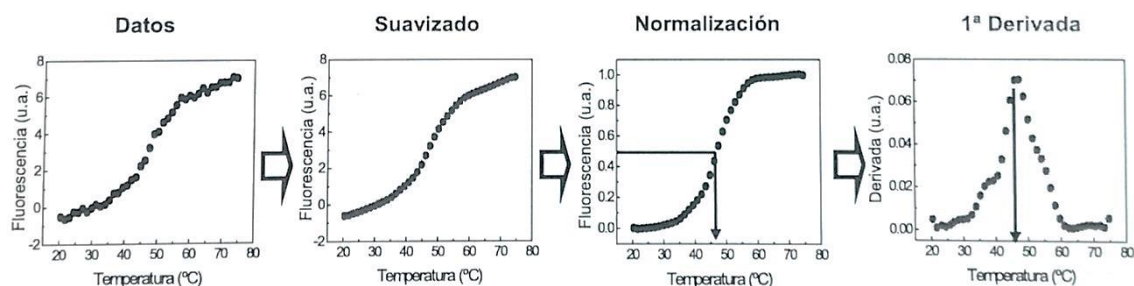


Figura 39. Secuencia de pasos utilizada para el análisis computacional de los datos obtenidos del cribado experimental.

En el primer paso del proceso, la curva experimental se suaviza, de manera que se disminuye la derivada experimental para un mejor reconocimiento de la T_m . Posteriormente, se eliminan las pendientes inicial y final de la curva originadas por la dependencia con la temperatura de las señales de los estados inicial y final de la transición, respectivamente, para así obtener la curva correspondiente únicamente a la transición. Al eliminar las líneas base, la señal se normaliza entre 0 y 1. Por tanto, para una transición entre dos estados, la T_m corresponderá con el punto medio de la transición, es decir, el valor de la temperatura a la cual la señal normalizada de la transición corresponde a 0,5. Este valor de T_m se toma como un primer método de identificación de compuestos positivos (Método del punto medio). El punto de inflexión de cualquier curva se caracteriza por ser un máximo o mínimo de la primera derivada de la curva. De esta manera, la T_m de la curva corresponderá con el máximo o mínimo de la derivada de la curva. Este es el segundo método utilizado para la identificación de la T_m (Método de la primera derivada). Se utilizaron dos métodos de aproximación para la identificación de positivos ya que se optimizaba de manera significativa la localización de los verdaderos positivos, mejorando la discriminación de los falsos positivos y falsos negativos.

3.9. Ensayos *in vivo*

3.9.1. Complementación del homólogo Fur de *Escherichia coli*

Para estudiar si la proteína CdFur era capaz de funcionar como el homólogo Fur de *E. coli*, se realizó un ensayo de complementación *in vivo*. Para ello, células de *E. coli* Δfur H1780 se hicieron competentes según el protocolo descrito en el apartado 3.3.1. A continuación, se transformaron con el plásmido pACYC-*furCd*. A partir de una colonia aislada, se puso un cultivo celular en LB durante toda la noche. Al día siguiente, se refrescaron dichos cultivos en medio LB fresco y se incubaron a 37 °C y 200 rpm hasta fase exponencial media (D.O. a 600 nm de 0,5). La expresión de la proteína CdFur se llevó a cabo añadiendo desde el inicio IPTG 1 mM al medio de cultivo. Se inocularon 150-200 μ l de los cultivos en placas de agar MacConkey con el antibiótico cloranfenicol, 1 mM IPTG y además suplementadas bien con 100 μ M FeCl₃ para un medio rico en hierro, o con 200 μ M 2,2'-dipiridilo para un medio deficiente en hierro. Las placas inoculadas se incubaron durante 18-24 h a 37 °C. Según la coloración de las colonias, blancas o rojas, se asignó fenotipo Lac(-) o Lac(+), respectivamente. Como control del ensayo se usó *E. coli* H1780 sin plásmido.

3.9.2. Medidas de la actividad β -galactosidasa

La enzima β -galactosidasa tiene como función en la célula hidrolizar la lactosa a glucosa y galactosa para que puedan ser utilizadas como fuente de carbono/energía. El compuesto sintético *o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG) es reconocido también como sustrato de la enzima y al hidrolizarlo, da como productos galactosa y *o*-nitrofenol el cual tiene color amarillo. Cuando el ONPG está en exceso respecto a la enzima en una reacción, la producción de *o*-nitrofenol por unidad de tiempo es proporcional a la actividad de la enzima β -galactosidasa, por consiguiente, la producción de color amarillo puede ser usada para determinar la actividad de esta.

En este trabajo, se ha fusionado un promotor de interés delante del gen *lacZ* codificado en el plásmido pFU62 para usar los niveles de actividad β -galactosidasa como control de la actividad del promotor objeto de estudio en presencia de CdFur y bajo diferentes condiciones.

Antes de medir la actividad de la enzima en un cultivo celular, es necesario preparar el tampón Z (tabla 14) que contiene β -mercaptoetanol ya que estabiliza la enzima β -galactosidasa. La parte importante del β -mercaptoetanol es un grupo tiol reactivo. Los tioles reaccionan con el oxígeno del aire y se oxidan con el tiempo. Por consiguiente, es mejor preparar la cantidad de tampón Z que se vaya a usar en unos pocos días y guardarlo siempre a 4°C.

Tabla 14. Composición del tampón de reacción (tampón Z) para medir actividad β -galactosidasa. Una vez añadidos los diferentes reactivos, ajustar el pH a 7 y enrasar con agua destilada.

Reactivo (concentración final)	Para 100 ml
60 mM Na ₂ HPO ₄ anhidro	0,84 g
40 mM NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	0,56 g
10 mM KCl	0,5 ml KCl 1M
1 mM MgSO ₄	0,05 ml MgSO ₄ 1M
3,5ml/l β -mercaptoetanol	350 μ l

Para las medidas de actividad β -galactosidasa se siguió el siguiente protocolo:

1. Partir de colonias aisladas en placas de LB. Para ello sacar un glicerol a -80 °C de la cepa deseada y sembrar por agotamiento en placa de LB (con el antibiótico que sea necesario).
2. Poner cultivo O/N de una colonia aislada en el medio de cultivo de ensayo (M9, LB, ...). Si es necesario se pondrá precultivo O/N en LB a partir de una colonia y al día siguiente cultivo O/N en M9.
3. Al día siguiente, refrescar el cultivo haciendo inóculo del 1-2 % del cultivo O/N en medio fresco (con antibiótico si es necesario). Crecer a 37 °C, 200 rpm hasta D.O. a 600 nm deseada.
4. Tomar 1 ml de cultivo, añadirlo a una cubeta de plástico y medir las D.O. a 600 nm. Anotar.
5. Tomar entre 50 y 200 μ l de cultivo de la cubeta y añadirlo a un tubo de ensayo en el que se ha introducido previamente y por este orden: 50 μ l cloroformo, 25 μ l SDS 0,1 %, 1 ml tampón Z. Agitar vigorosamente durante 10 segundos para lisar las células. Dejar reposar hasta que desaparezca la turbidez (5 minutos aproximadamente).
6. Añadir 200 μ l de sustrato ONPG (4 mg/ml) preparado en el momento y disuelto en tampón fosfato 100 mM a pH 7. Agitar suavemente y anotar el tiempo inicial. Incubar a temperatura ambiente.
7. Cuando el cultivo vire a amarillo, detener la reacción con Na₂CO₃ 1M (1 ml). El Na₂CO₃ para la reacción ya que eleva el pH de la disolución hasta 11. A este pH la enzima no es activa. Agitar vigorosamente y anotar el tiempo final (normalmente de 5 a 10 minutos). Dejar reposar 5 minutos.
8. Tomar, de la fase superior, 1 ml para medir la absorbancia a 420 y 550 nm.
9. Calcular la actividad β -galactosidasa en unidades Miller utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Unidades Miller} = 1000 * \frac{\text{Abs}420 - (1,75 * \text{Abs}550)}{t \text{ (min)} * V \text{ (ml)} * \text{Abs}600}$$

3.10. Análisis informáticos

La búsqueda de secuencias de los genes pertenecientes a la familia FUR de *C. difficile* se realizó utilizando la base de datos *Gene* del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) de la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos. Para el alineamiento de secuencias de proteínas Fur en varias cepas de *C. difficile* se utilizó el programa BLASTP de la herramienta BLAST (*Basic Local Alignment Sequence Search Tool*) del NCBI (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastp&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome).

Las secuencias de diversos homólogos Fur se obtuvieron del portal UniProtKB y el alineamiento de dichas secuencias se realizó con la herramienta Align (<http://www.uniprot.org/align/>).

Las propiedades físico-químicas de las proteínas se obtuvieron con la herramienta ProtParam del servidor ExPaSy (<http://web.expasy.org/protparam/>).

La base de datos PSIPRED (*Protein Sequence Analysis Workbench*) se utilizó para predecir la estructura secundaria de la proteína (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>).

Los modelos estructurales de Fur de *C. difficile* se obtuvieron en base a la similitud de secuencia explorada con el algoritmo HHPred en modo global y local, usando la librería pdb70. Las búsquedas dieron significativas homologías ($E\text{-value} \leq 6.0 \times 10^{-35}$) con las estructuras cristalográficas de *Helicobacter pylori* (pdb 2xig), *Campylobacter jejuni* (pdb 4ets), *Vibrio cholerae* (2w57) y *Escherichia coli* (pdb 4mts). El modelado estructural se realizó con Modeller (Sali and Blundell, 1993). Las estructuras moleculares y los modelos estructurales se inspeccionaron, analizaron y dibujaron con PyMol 1.4.1 (Schrodinger LLC).

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. Obtención de la proteína Fur de *C. difficile* y caracterización funcional

4.1.1. Motivación del trabajo

Al inicio de este trabajo no existían datos bibliográficos sobre el homólogo Fur del patógeno *C. difficile*, por lo que el primer paso consistió en el clonaje y purificación de la proteína recombinante y en su caracterización funcional. Para ello, lo primero fue confirmar la presencia de este homólogo en el genoma de *C. difficile* y analizar su secuencia.

Una vez identificado el gen, se clonó en un plásmido adecuado y se sobreexpresó. A continuación, se estableció y optimizó un protocolo de purificación de CdFur que permitiera obtener proteína soluble, preferiblemente en un tampón de pH próximo al fisiológico, en cantidad suficiente para realizar los estudios previstos.

Posteriormente, se llevó a cabo una caracterización funcional de la proteína. Por un lado, se comprobó la actividad de unión al DNA *in vitro* de la proteína recombinante obtenida en condiciones aeróbicas y por otro se establecieron las condiciones óptimas para su actividad.

Finalmente, dada la imposibilidad de trabajar en el laboratorio donde se ha realizado este trabajo con una bacteria patógena como *C. difficile* (clasificada como agente biológico del grupo 2), se desarrolló un sistema de expresión heterólogo que permitió estudiar aspectos del carácter regulatorio de CdFur *in vivo* en diferentes condiciones nutricionales.

4.1.2. Identificación del gen *fur*

Como se ha descrito en la introducción, es habitual la existencia de más de un locus homólogo a la familia Fur en el mismo microorganismo (Bsat *et al.*, 1998; Hernández *et al.*, 2004a). Puesto que el genoma de la cepa de referencia *Clostridium difficile* 630 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/genomes/535>) está secuenciado, se pudieron identificar dos loci pertenecientes a la familia de proteínas Fur: CD630_08260 y CD630_12870. En el laboratorio se disponía de DNA genómico de la cepa de referencia *C. difficile* ATCC 43255 por lo que se buscaron, utilizando la herramienta BLAST del portal NCBI, ambas secuencias en dicho genoma. Los loci encontrados con una identidad del 99 % para ambos fueron: UAB_RS0205265 y UAB_RS0207325, respectivamente. Las secuencias correspondientes de las proteínas codificadas por ambos loci tenían una identidad del 100 % en las dos cepas de referencia.

Se calcularon para las dos proteínas de *C. difficile* pertenecientes a la familia Fur, los porcentajes de identidad y similitud con las secuencias de diversos homólogos Fur caracterizados, tanto de microorganismos Gram-negativos como Gram-positivos (tabla 15). Así se pudo llegar a la conclusión de que el locus UAB_RS0207325 (CD630_12870 en la cepa *C.*

difficile 630) correspondería al homólogo Fur, puesto que la secuencia de aminoácidos de esta proteína presentaba mayor grado de identidad: entre un 30-48 % frente al 19-33 % de identidad que mostró el homólogo codificado por el gen UAB_RS0205265. Las proteínas Fur de los microorganismos con las que presentó mayor identidad fueron las de *Listeria monocytogenes* (41 %), *Staphylococcus aureus* (43 %) y *Bacillus subtilis* (48 %), todos ellos Gram-positivos al igual que *C. difficile*.

Tabla 15. Porcentajes de identidad y de similitud de las proteínas codificadas por los loci UAB_RS0205265 y UAB_RS0207325 de la cepa *C. difficile* ATCC 43255 con diversos homólogos Fur.

		UAB_RS0207325		UAB_RS0205265	
		% Identidad	% Similitud	% Identidad	% Similitud
Gram-negativas	<i>Anabaena FurA</i>	35	56	27	51
	<i>Campylobacter jejuni Fur</i>	31	59	30	57
	<i>Escherichia coli Fur</i>	35	62	28	50
	<i>Helicobacter pylori Fur</i>	31	55	24	50
	<i>Magnetospirillum gryphiswaldense Fur</i>	31	52	21	42
	<i>Pseudomonas aeruginosa Fur</i>	29	58	25	47
	<i>Salmonella typhimurium Fur</i>	35	62	28	50
	<i>Vibrio cholerae Fur</i>	35	62	28	51
Gram-positivas	<i>Bacillus cereus Fur</i>	43	66	30	55
	<i>Bacillus subtilis Fur</i>	48	70	28	57
	<i>Listeria monocytogenes Fur</i>	41	64	22	45
	<i>Staphylococcus aureus Fur</i>	43	68	29	53
	<i>Streptomyces reticuli FurS</i>	27	46	33	57

La comparación de la secuencia de aminoácidos de Fur de *C. difficile* (CdFur) con las secuencias de aminoácidos de diversos homólogos Fur se muestra en la figura 40. El alineamiento mostró que CdFur, al igual que varios homólogos, posee dos motivos CXXC en el extremo C-terminal. En la secuencia de aminoácidos de CdFur corresponderían a los residuos C₁₀₁, C₁₀₄, C₁₄₁ y C₁₄₄. En concreto el residuo C₁₀₁ se encuentra en todas las secuencias analizadas mientras que los residuos C₁₀₄ y C₁₄₁ están altamente conservados en todos los homólogos. Es más habitual la presencia del primer motivo CXXC que la del segundo. En el caso de los residuos de histidina, dos de ellos (H₉₆ y H₉₈) están presentes en todas las secuencias del alineamiento y forman parte del motivo rico en histidinas característico de las proteínas Fur. Otros residuos de histidina se encuentran altamente conservados como H₃₇ y H₉₇. Además, los residuos R₂₁ e Y₆₀ están presentes en todas las secuencias de proteínas Fur conocidas.

<i>CdFur</i>	1	-----MANTMDLLKDKLKETGFKITPQ	RAIVEILLK-HDHSLSSEEIYDLVRVD--	50
<i>BsFur</i>	1	-----MENRIDRIKKQLHSSSYKLTPO	REATVRVLE-NEEDHLSAEDVYLLVKEK--	50
<i>BcFur</i>	1	-----MNLTEALRLMKDKGYKHTGKR	REEMRLFAA--HNRYLTAKDVL EHMKDD--	47
<i>SaFur</i>	1	-----MEERLNRVKQQLQSSYKLTPO	REATVRVLE-NEKDHLAEDVYLVKVKDK--	50
<i>LmFur</i>	1	-----MEGRIGRIKAQLHDASYKLTPO	REATVRVLE-NEKDHLAEEVFLRVKDI--	50
<i>StFur</i>	1	-----MTDNN TALKKAGLKVTLPR	LKILEVLQE-PDNHHVSAEDLYKRLIDM--	46
<i>CjFur</i>	1	MLIENVEYDVLLEFRKKILRQGGLKYTKQ	REVLKTLYH-SD-THYTPESLYMEIKQAE	58
<i>EcFur</i>	1	-----MTDNN TALKKAGLKVTLPR	LKILEVLQE-PDNHHVSAEDLYKRLIDM--	46
<i>HpFur</i>	1	-MKRLETLESILERLRMSIKKNGLKNSKQ	REEVSVLYR-SG-THLSPEEITHSIRQK--	55
<i>VcFur</i>	1	-----MSDNNQALKDAGLKVTLPR	LKILEVLQ-PEQHISAEELYKKLIDL--	46
<i>AnFurA</i>	1	-----MTVYTNTSLKAEENERGWRLTPQ	RETILHIFQELPQGEHLSAEDLYHRLEAD--	52
<i>PaFur</i>	1	-----MVENSELRKAGLKVTLPR	VKILQMLDS-AEQRHMSAEDVYKALMEA--	45
<i>SrFurS</i>	1	-----MTASPTPTAEELRGAGLRVTAAR	VALLETVR---DGDHLGVEAIASGVRDR--	49
<i>CdFur</i>	51	CPEIGLATVYRTMQLLDEIGLISKLNLDG	CIRYEISLHKEDCHNHHHLICCKNC	CGKIMEA 110
<i>BsFur</i>	51	SPEIGLATVYRTLELLTELKVVDKINFGD	GVSRVYDLRKE-GAAHFHHHLVCM	CGAVDEI 109
<i>BcFur</i>	48	YPGLSFDTIYRNLTVFAEIGVLEQTE	NGE-KHFRFTS--IMEHHHFI	CLDCGGTKEI 104
<i>SaFur</i>	51	APEIGLATVYRTLELLAELKVVDKINFGD	GVARFDLRKE-GAKHFHHHLVCM	CGRVDEI 109
<i>LmFur</i>	51	APDTGLATVYRTLELLTELRVVDKINFGD	GVSRVYDLRQE-GAKHFHHHLV	CLECGSVEEI 109
<i>StFur</i>	47	GEEIGLATVYRVLNQFDDAGIVTRHNF	EGGKSVFELTQ--H--HHDHLI	CLDCGKVIEF 102
<i>CjFur</i>	59	DLNVGIATVYRTLNLLEEAEMVTSIS	FGSAGKKEYELANK--P--HHDHMI	CKNCGKIIEF 114
<i>EcFur</i>	47	GEEIGLATVYRVLNQFDDAGIVTRHNF	EGGKSVFELTQ--H--HHDHLI	CLDCGKVIEF 102
<i>HpFur</i>	56	DKNTSISSVYRILNFLEKENFIVLETS	SKSGRRYIAAK--E--HHDHII	CLHCGKIIEF 111
<i>VcFur</i>	47	GEEIGLATVYRVLNQFDDAGIVTRHNF	EGGKSVFELSTQ--H--HHDHLV	CLDCGEVIEF 102
<i>AnFurA</i>	53	GEGISLSTIYR TLKLMARMGILRELE	LGEGHKHYEINQP--YPHHHHHLI	CVKCNSTIEF 110
<i>PaFur</i>	46	GEDVGLATVYRVL TQFEAAGLVVRHN	FDGGHAVFELADS--G--HHDHVM	CVDTGEVIEF 101
<i>SrFurS</i>	50	VGHISLQAVYEALHALTAAGLVRRIE	PAGHPARYEGRVG--D--NHHHIV	CRSCGAVADV 105
<i>CdFur</i>	111	KEDLLDNIEKEIQSLYKFKILDHDVK	FYGLCDECVNGVSDSEE-----	152
<i>BsFur</i>	110	EEDLLEDVEEIIERDVKFKIKDHRLT	TFHGICHRNCGKETE-----	149
<i>BcFur</i>	105	TSCPMDFMNK---DFNGYEVGTGKFEI	YGRCPKCAK-----	137
<i>SaFur</i>	110	DEDLLPEVENRVENEFNFKILDHRLT	TFHGV CETCQAKGKG-----	149
<i>LmFur</i>	110	QEDLLEDVEKIVESKWNFLVKDHRLT	TFQGI CADCRQKTKKE-----	150
<i>StFur</i>	103	SDDSIEARQREIAAKHGIRLTNHSLY	LYGHC AEGDCREDEHAHDDATK	150
<i>CjFur</i>	115	ENPIIERQQUALIAKEHGFKLTGHL	MQLYGVCGDCNNQKAKVKI---	157
<i>EcFur</i>	103	SDDSIEARQREIAAKHGIRLTNHSLY	LYGHC AEGDCREDEHAHEGK--	148
<i>HpFur</i>	112	ADPEIENRQNEVVKKYQAKLISHDM	KMFVWCKE CQESEC-----	150
<i>VcFur</i>	103	SDDVIEQRQKEIAAKYNVQLTNHSLY	LYGKCGSDGSCCKDNPNAHKPKK-	150
<i>AnFurA</i>	111	KNDSILKIGAKTAQKEGFHLLDCQ	MTIHAVCPKQRALMPL-----	151
<i>PaFur</i>	102	MDAEIEKRQKEIVRERGFELVDHNL	VLVYVRKKK-----	134
<i>SrFurS</i>	106	CAVGDAPCLTAADDHGFAIDEAEV	VYWG LCPDCSTGRSS-----	145

Figura 40. Alineamiento de secuencias de diversos homólogos Fur. El motivo rico en histidinas se muestra recuadrado en verde y las histidinas de cada secuencia resaltadas en el mismo color. Los residuos de cisteína de los motivos CXXC se encuentran encuadrados y coloreados en rojo. El resto de cisteínas de *CdFur* se muestran resaltadas en azul. Otros residuos presentes en todas las secuencias se muestran resaltados en amarillo. Las abreviaturas correspondientes a cada microorganismo se indican a continuación así como el número de acceso de cada secuencia; *Cd*: *C. difficile* (UniProtKB [Q18BE9](#)), *Bs*: *B. subtilis* (UniProtKB [P54574](#)), *Bc*: *B. cereus* (UniProtKB [Q634Q8](#)), *Sa*: *S. aureus* (UniProtKB [Q9R303](#)), *Lm*: *L. monocytogenes* (UniProtKB [A0A0E0UXJ6](#)), *St*: *S. typhimurium* (UniProtKB [Q7CQY3](#)), *Cj*: *C. jejuni* (UniProtKB [P0C631](#)), *Ec*: *E. coli* (UniProtKB [P0A9A9](#)), *Hp*: *H. pylori* (UniProtKB [Q25671](#)), *Vc*: *V. cholerae* (UniProtKB [P0C6C8](#)), *An*: *Anabaena* sp. 7120 (UniProtKB [Q7A2F4](#)), *Pa*: *P. aeruginosa* (UniProtKB [Q03456](#)), *Sr*: *S. reticuli* (UniProtKB [O87863](#)). El alineamiento se realizó con la herramienta Align del servidor UniProtKB.

4.1.3. Clonaje del gen *fur* y sobreexpresión de la proteína recombinante

Como paso previo en la obtención de la proteína recombinante se realizó el clonaje del gen *fur* de *C. difficile* en el plásmido de sobreexpresión pET-28a(+) (Novagen). Utilizando los oligonucleótidos Fur_*Cdiff*-up y Fur_*Cdiff*-dw (tabla 6), se obtuvo el plásmido pET-*furCd* con el gen clonado entre los sitios NdeI y HindIII. Ambos oligonucleótidos se diseñaron de acuerdo a la secuencia del gen y contenían los sitios de restricción NdeI y HindIII en los extremos 5' y 3', respectivamente. De esta forma, la proteína se expresaba con una cola de histidinas en el extremo N-terminal.

Tras realizar el clonaje mediante los pasos descritos en el apartado 3.2., se procedió a verificar que el plásmido contenía el gen *fur*. Esto se comprobó mediante una digestión enzimática doble del plásmido con las enzimas de restricción NdeI/HindIII usadas en el clonaje, y mediante una PCR utilizando como molde el plásmido generado. En ambos casos se observó una banda del tamaño correspondiente al gen *fur*. Por último, el plásmido se secuenció en el servicio de Secuenciación de Sistemas Genómicos (Valencia) para comprobar que el gen clonado no presentaba ninguna mutación. El resultado obtenido indicó que correspondía al gen *fur* de *C. difficile*.

Con la intención de producir una gran cantidad de proteína que permitiera llevar a cabo su caracterización estructural y funcional, se eligió el sistema de expresión pET junto con una cepa de *E. coli* con genotipo DE3. Su uso en el grupo de trabajo había dado buenos resultados en la sobreexpresión de otros homólogos Fur.

Para la sobreexpresión de la proteína CdFur, se introdujo el vector pET-*furCd* en células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) mediante transformación por choque térmico. Se realizaron varias pruebas en diferentes combinaciones de tiempo, temperatura o concentración del inductor IPTG, para conseguir la mayor cantidad de proteína recombinante. Las condiciones en las que la proteína mostró mayor nivel de sobreexpresión fueron aquellas en las que los transformantes crecieron hasta fase exponencial, momento en el que se indujeron con IPTG 1 mM durante 3 h a 37 °C. Tras ello se analizó la expresión proteica mediante electroforesis desnaturalizante. Las muestras se sometieron a lisis celular mediante hervido en tampón de carga (Materiales y Métodos, apartado 3.5.1.) en presencia de SDS. Se tomó una alícuota de cada cultivo sin inducir con IPTG como control (figura 41).

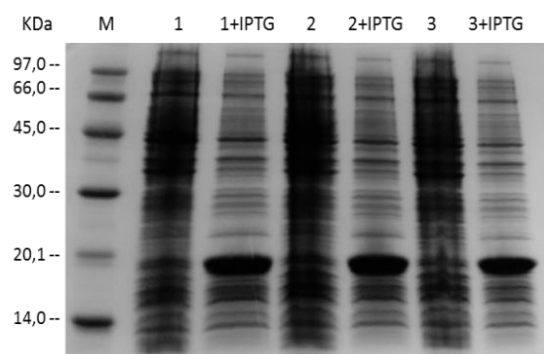


Figura 41. Análisis de la sobreexpresión de las proteínas recombinantes mediante geles de SDS-PAGE al 15 %. Se muestra la inducción del gen *fur* de *C. difficile* clonado en el plásmido pET-*furCd* transformado en células de *E. coli* BL21 (DE3). Se cargaron lisados celulares de tres colonias distintas. Carril 1: marcadores de masa molecular, carriles 2, 4 y 6: tres colonias analizadas (control sin inducir), carriles 3, 5 y 7: las mismas colonias inducidas con IPTG 1 mM 3 h a 37 °C. La banda gruesa que aparece en los carriles 3, 5 y 7 corresponde a la proteína CdFur con una masa molecular de 19,7 kDa. A la izquierda del gel se indican los tamaños de los marcadores de masa molecular. Tampón de carga con agentes reductores.

Como se observa en la figura 41, en los extractos proteicos de los cultivos inducidos con IPTG se apreció claramente la banda correspondiente a CdFur con una masa molecular aproximada de 19,7 kDa. La proteína recombinante mostró un buen nivel de sobreexpresión. Además, la proteína sobreexpresada era la mayoritaria en el extracto celular. Los cultivos a gran escala para la obtención de la biomasa se realizaron a partir de la colonia del cultivo nº 3.

4.1.4. Obtención de la proteína recombinante CdFur

Como método de purificación se escogió la cromatografía de afinidad a un ion metálico inmovilizado (IMAC, *Immobilized Metal Affinity Chromatography*). Este tipo de cromatografía es útil para purificar proteínas y péptidos que tienen cierta afinidad por iones metálicos ya que el metal inmovilizado interactúa con algunos aminoácidos presentes en la superficie de la proteína (principalmente histidina, pero a menudo también cisteína y triptófano), si las cadenas laterales de dichos residuos están suficientemente expuestas o si la proteína posee una cola de histidinas. La proteína unida puede posteriormente eluirse utilizando un agente competidor como imidazol.

Según datos bibliográficos, la fuerza de la unión entre una proteína y un ion metálico está determinada por varios factores, incluyendo las características de la proteína diana, la presencia de una etiqueta de afinidad en la proteína, el tipo de ion metálico utilizado, y el pH y la fuerza iónica de los tampones. En este tipo de cromatografía, el Ni²⁺ proporciona generalmente la unión más fuerte para proteínas con cola de histidinas. También suele utilizarse Co²⁺ aunque proporciona una unión a la proteína algo más débil. La elección del ion metálico es importante ya que alguno puede afectar a la conformación de la proteína y por tanto provocar la pérdida de su actividad (Ancker *et al.*, 2006).

4.1.4.1. Purificación mediante IMAC

La purificación de la proteína *CdFur* se llevó a cabo tal y como se describe en el apartado 3.4.3. fijando a la matriz tanto Ni^{2+} como Co^{2+} . En ambos casos se siguió el mismo protocolo añadiendo desde el inicio una pequeña cantidad de imidazol para minimizar las interacciones inespecíficas de proteínas contaminantes a la matriz.

Las fracciones eluidas con un gradiente de imidazol tanto de la columna de IMAC-Ni como de IMAC-Co se sometieron a una electroforesis desnaturalizante para comprobar en cuales de ellas se encontraba la proteína así como su pureza (figura 42).

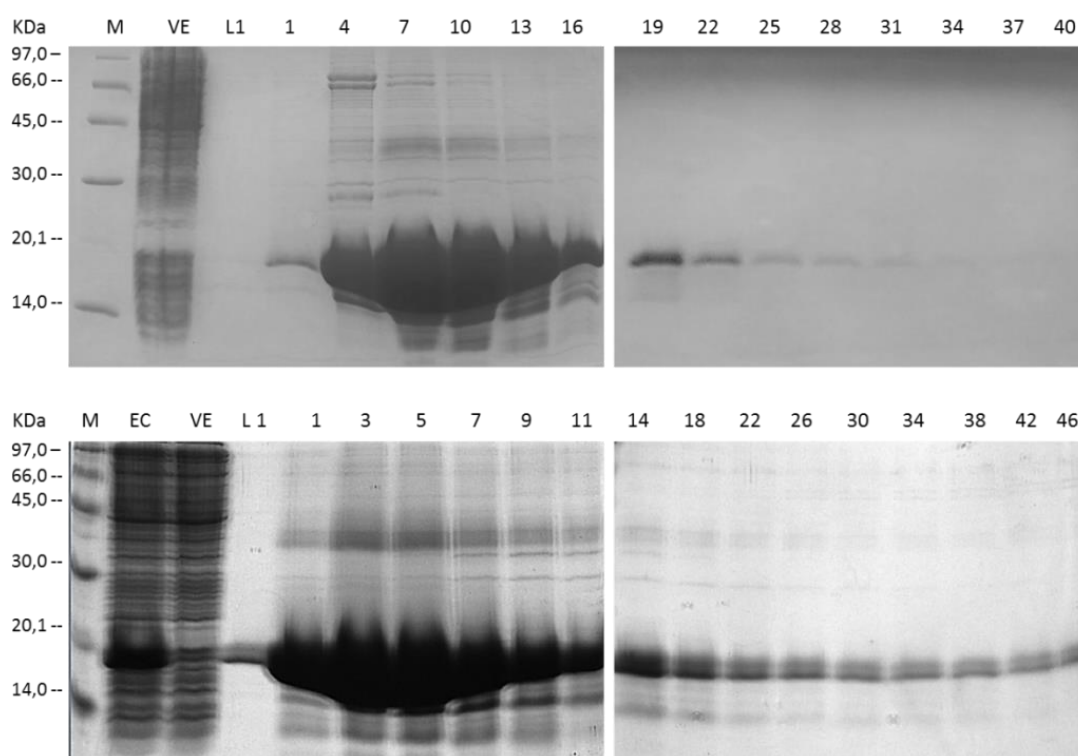


Figura 42. Análisis del proceso total de purificación de *CdFur* mediante IMAC-Ni (arriba) y IMAC-Co (abajo) mediante SDS-PAGE al 15 %. M: marcadores de masa molecular, EC: extracto crudo, VE: volumen escurrido (material no fijado a la columna tras cargar el extracto crudo), L: lavado, 1 - 50: fracciones alternas recogidas durante la elución con el gradiente de imidazol de 0 a 1 M. Tampón de carga con agentes reductores.

Con ambos métodos se consiguió mantener la proteína adherida a la matriz. Ahora bien, mientras en la purificación con Ni^{2+} no se detectó la proteína de interés en las fracciones recogidas antes de la elución, con Co^{2+} se perdió algo de proteína en la fase de lavado. Con IMAC-Ni, la proteína eluyó de la columna al inicio del gradiente de imidazol a una concentración inferior a 0,5 M. El grado de pureza obtenido era apto para el análisis bioquímico de la proteína. En cambio, utilizando Co^{2+} se observó que la proteína eluía a lo largo de todo el gradiente de imidazol saliendo la mayor parte al inicio. Además, el grado de pureza fue menor que el observado en la columna de Ni^{2+} .

Como se muestra en la figura 43A, durante la cromatografía se observó una banda con color adherida a la matriz que se desplazó con el gradiente de imidazol. Al realizar un espectro de absorción UV-Vis de la fracción que mayor color presentó se observó la presencia de varias bandas con máximos a distintas longitudes de onda (figura 43B). Una vez eluido todo el gradiente, las fracciones más ricas y puras de proteína presentaron un ligero color rojo/violeta que se perdió de manera progresiva con el tiempo, quedando la solución de proteína resultante incolora.

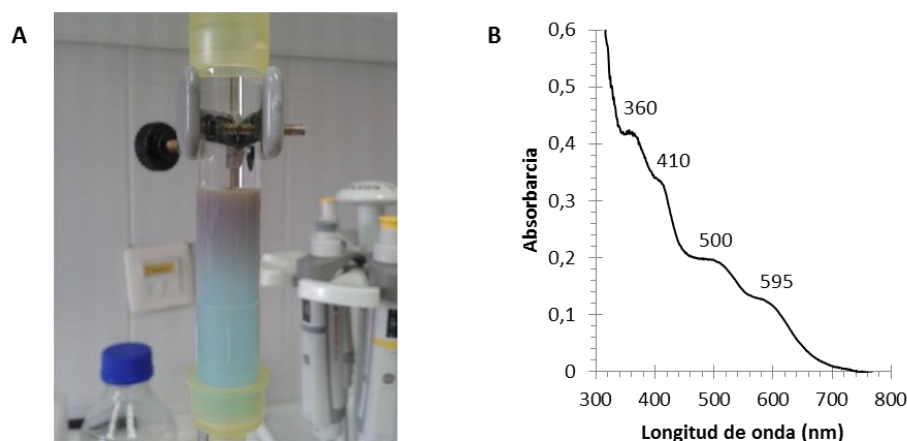


Figura 43. Purificación de CdFur. A) Columna cromatográfica con la matriz de IMAC con Ni²⁺ inmovilizado una vez hecho el lavado, momento previo a la elución con imidazol donde se observa una franja coloreada. Se observó el mismo efecto en la columna de IMAC-Co. B) Espectro UV-Vis de la fracción eluida que presentaba mayor color.

La proteína se dializó, una vez purificada, para eliminar el imidazol y conservarla en las condiciones deseadas a -20 °C (50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 10 % glicerol). En el proceso de diálisis, la proteína recombinante CdFur se mantuvo en todo momento en forma soluble. Esto permitió realizar los ensayos de caracterización de la proteína a un pH próximo al fisiológico, así como concentrarla.

Se probaron distintos métodos de concentración, entre ellos la ósmosis utilizando polietilenglicol (PEG) o sacarosa, o la concentración por centrifugación mediante el sistema "Amicon® Ultra" (Millipore) de 3K o 10K. Finalmente se optó por el método de concentración por centrifugación en lugar del de ósmosis ya que de esta forma no se alteraba la composición del tampón de conservación de la proteína. Los dispositivos que ofrecieron mejores resultados fueron los Amicon 3K debido a que con los 10K la proteína se quedaba adherida a la membrana.

Una vez finalizada la diálisis se realizó un espectro de absorción UV-Vis de la muestra para calcular su concentración y comprobar la presencia de algún grupo prostético. CdFur presentó un máximo en su espectro de absorción en el UV-Vis en torno a 276 nm cuyo coeficiente de extinción molar teórico (ϵ) a 280 nm es $7825 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ (dato obtenido mediante la herramienta ProtParam del servidor ExpASY: <http://web.expasy.org/protparam/>). De las bandas que se

observaron en el espectro de absorción UV-Vis de la fracción recién eluida de la columna (figura 43B), sólo permaneció una pequeña banda poco resuelta con máximo en torno a 410 nm (figura 44A).

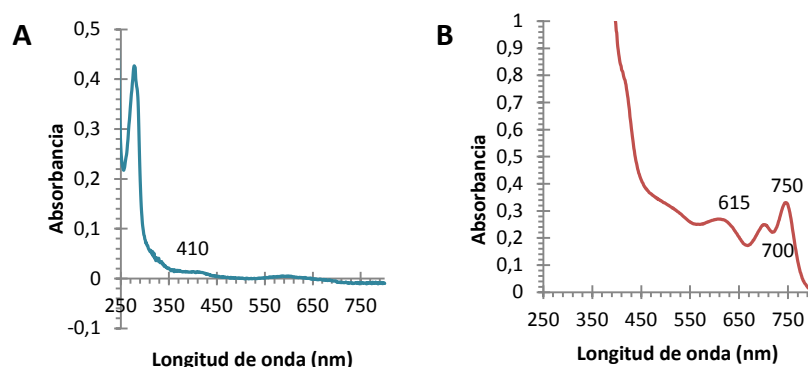


Figura 44. Espectro de absorción UV-Vis de la proteína CdFur según el tipo de metal usado en la cromatografía. A) Cromatografía mediante IMAC-Ni (alícuota 40 µM CdFur). B) Cromatografía mediante IMAC-Co (alícuota 400 µM CdFur). Ambas proteínas dializadas en tampón 50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 10 % glicerol.

Comparando ambos métodos de purificación (IMAC-Ni e IMAC-Co), se observó que en el espectro UV-Vis de la proteína purificada mediante IMAC-Co aparecían tres picos a 615, 700 y 750 nm (figura 44B). Sin embargo, estos picos no aparecían en el espectro de la proteína purificada mediante IMAC-Ni. Para comprobar que el ion Co^{2+} era el responsable de la aparición de dichos picos, la proteína purificada mediante IMAC-Ni se pasó por una columna de IMAC-Co. El espectro UV-Vis de esta proteína presentaba dichos picos mientras que en el espectro previo al paso por la columna de IMAC-Co no aparecían (figura 45).

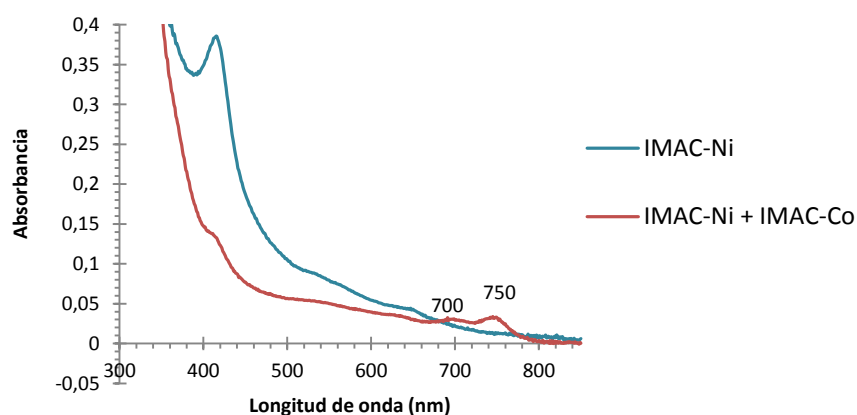


Figura 45. Espectro de absorción UV-Vis de la proteína purificada con IMAC-Ni y posteriormente pasada por una columna de IMAC-Co.

A la vista de estos resultados, se escogió como método de purificación IMAC-Ni ya que además permitía obtener una proteína con un grado de pureza mayor que con IMAC-Co y apto para la caracterización. La proteína pudo concentrarse hasta 440 μ M (8,7 mg/ml) y el rendimiento fue de 15,6 mg de proteína por litro de cultivo.

4.1.4.2. Obtención de la proteína CdFur sin cola de histidinas

Puesto que la cola de histidinas introducida para facilitar la purificación de la proteína podía interferir en estudios posteriores, se eliminó mediante corte con trombina y posterior cromatografía. En la proteína recombinante había un sitio de corte para esta proteasa entre la cola de histidinas situada en el extremo N-terminal y la secuencia nativa de la proteína. En primer lugar, se realizó una prueba para determinar las condiciones de corte de la trombina (figura 46).

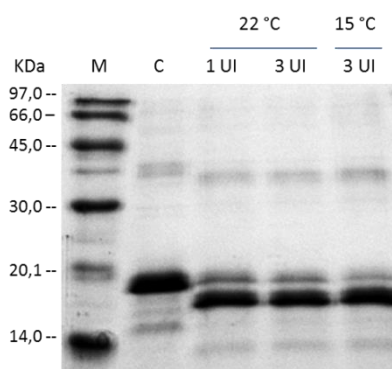


Figura 46. Corte de la proteína CdFur con trombina en diferentes condiciones. La eficiencia del corte se analizó mediante electroforesis en un gel de SDS-PAGE al 15 %. Se trataron 10 μ g de proteína CdFur con 1 o 3 UI de trombina durante 16-18 horas a la temperatura indicada sobre cada carril. M: marcadores de masa molecular. C: proteína control sin cortar. Tampón de carga con agentes reductores.

En base a estos resultados, se trataron 10 mg de proteína CdFur purificada mediante IMAC-Ni con 3 UI de trombina (*GE Healthcare*) durante 16 horas a 22 °C. A continuación, se sometió la mezcla de digestión a una cromatografía de IMAC-Ni para separar CdFur de la cola de histidinas y de la fracción de proteína que quedara sin cortar. Como se ha descrito, CdFur contiene en su secuencia de aminoácidos un motivo rico en histidinas (H₉₄NHHH₉₈), que en ocasiones ha sido suficiente para purificar otros homólogos de Fur mediante este tipo de cromatografía (Hernández *et al.*, 2002). Dado que CdFur podía unirse por sí sola a la cromatografía, la proteína se eluyó con 100 mM de imidazol. Todas las fracciones obtenidas tras los lavados y la elución se analizaron mediante electroforesis desnaturalizante (figura 47).

Las fracciones que contenían la proteína se reunieron y dializaron en el tampón de conservación (50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 10 % glicerol) para eliminar el imidazol. Se registró el espectro UV-Vis de la solución para cuantificarla y se almacenó finalmente a -20 °C. Este proceso permitió recuperar 6 mg de proteína con buen grado de pureza.

Dado que el rendimiento en la obtención de proteína fue mucho mayor en la forma con cola de histidinas, se optó por realizar la caracterización bioquímica y biofísica con esta proteína, y utilizar la proteína sin la cola de histidinas sólo en los estudios en los que ésta pudiera interferir.

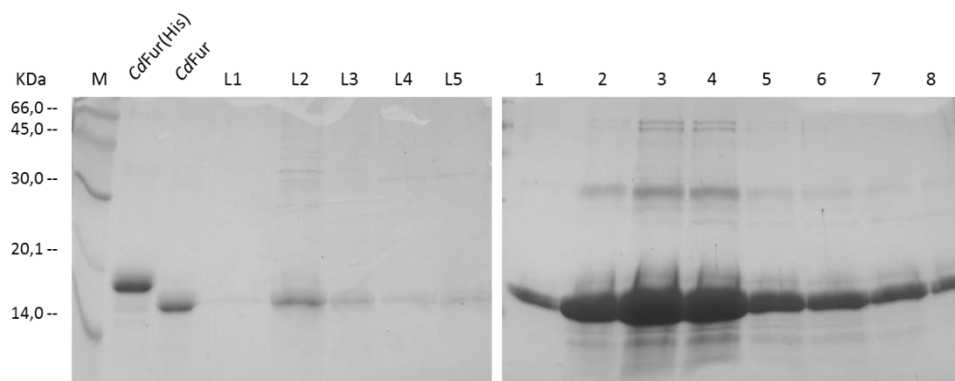


Figura 47. Análisis por SDS-PAGE al 15 % de todas las fracciones recogidas de la columna de IMAC-Ni tras el corte con trombina. M: marcadores de masa molecular, CdFur(His): 40 μ M de proteína purificada mediante IMAC-Ni, CdFur: 40 μ M de la mezcla de digestión cargada en la columna, Carriles L1-L5: lavados donde se cargaron 15 μ l de cada fracción recogida, Carriles 1-8: se cargaron 15 μ l de las fracciones recogidas tras la elución con imidazol 100 mM. Tampón de carga con agentes reductores.

4.1.4.3. Determinación del peso molecular de la proteína por MALDI-TOF

La digestión de la proteína purificada con tripsina y el análisis de los péptidos obtenidos por MALDI-TOF mediante el programa MASCOT corroboró que la proteína obtenida era el homólogo Fur de *C. difficile*.

La proteína CdFur nativa tiene una masa molecular teórica de 17586 Da, valor calculado con la herramienta ProtParam del servidor ExPASy (<http://web.expasy.org/protparam/>). Al analizar mediante la técnica MALDI-TOF la masa molecular de la proteína CdFur obtenida sin cola de histidinas tras el tratamiento con trombina (figura 48), se obtuvo una masa molecular de $17853 \pm 0,2$ Da. La diferencia de masas entre el dato teórico y el experimental (267 Da) puede deberse a los residuos de arginina y glicina que deja la trombina tras el corte, cuya suma de masas moleculares teóricas corresponde a 249 Da.

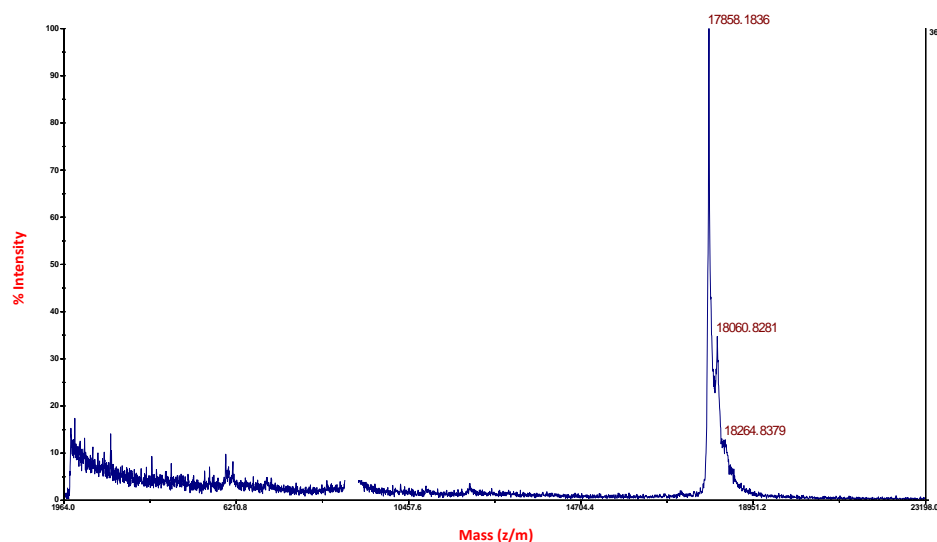


Figura 48. Espectro de MALDI-TOF de la proteína *CdFur*. Proteína purificada sin cola de histidinas mediante el tratamiento con trombina.

4.1.4.4. Purificación de *CdFur* en anaerobiosis

Como se ha descrito, la proteína recombinante purificada presentaba un tono rojizo de mayor intensidad cuanto más concentrada estaba. Este color se perdía con el tiempo, por lo que se planteó la posibilidad de que la proteína Fur de *C. difficile* pudiera poseer algún grupo prostético. A partir del perfil de bandas del espectro de absorción UV-Vis obtenido durante la purificación (figura 43A) no se pudo identificar ese grupo prostético, aunque dio cierta idea sobre la naturaleza metálica del cofactor. Picos de absorción en el rango de 340-420 nm pueden resultar de una variedad de cromóforos biológicos comunes que van desde carotenos a porfirinas, pero estas bandas características también son típicas de muchas proteínas que contienen grupos Fe-S. Existen varias proteínas de unión al DNA que poseen como cofactores grupos Fe-S como las proteínas WhiB (Alam *et al.*, 2009) o la proteína Fnr (Esbelin *et al.*, 2012). Teniendo en cuenta que la proteína proviene de un organismo anaerobio estricto y que se purificó en condiciones aeróbicas, no se podía descartar que dicho grupo prostético se degradara al entrar en contacto con la atmósfera oxigénica. Por ello, se decidió purificar la proteína *CdFur* en condiciones anaeróbicas para poder identificar el posible cofactor.

La purificación en anaerobiosis se realizó en el laboratorio del Dr. Luis Rubio del grupo 'Bioquímica de la Fijación del Nitrógeno' en el Centro de Biotecnología y Genómica de Plantas de la Universidad Politécnica de Madrid. Para ello, se utilizó el protocolo de purificación optimizado para *CdFur* partiendo de células crecidas en condiciones anaeróbicas, realizando en este caso todo el proceso en una cámara anaeróbica Coy (Laboratory Products, Inc) que permitía mantener una atmósfera de nitrógeno con niveles de oxígeno teóricos por debajo de los 2 ppm.

Tras la purificación, la proteína obtenida presentó color verdoso (figura 49A) lo que indicaba la presencia de un grupo prostético que se confirmó con el espectro de absorción UV-

Vis (figura 49B). El contenido en hierro de la preparación de CdFur obtenida en anaerobiosis se determinó mediante el ensayo colorimétrico descrito en el apartado 3.5.4. y por espectroscopía de absorción atómica (ICP-OES). Además se analizó la preparación proteica obtenida en condiciones normales. Los resultados obtenidos mediante las dos técnicas fueron similares y confirmaron la presencia de hierro en la muestra anaeróbica. Sin embargo, los resultados convergen a una relación <1 átomo de hierro por monómero de proteína en dicha preparación. En la preparación obtenida en presencia de oxígeno no se detectó presencia de hierro. Teniendo en cuenta el alto nivel de producción de proteína recombinante tanto en ausencia como en presencia de oxígeno, este resultado sugiere que si la proteína tuviera un grupo prostético con Fe, con la purificación anaeróbica sólo se logró una incompleta formación del mismo lo que condujo a una relación subestequiométrica. Probablemente esto se deba a que no se realizaron todos los procedimientos en condiciones estrictamente anaeróbicas.

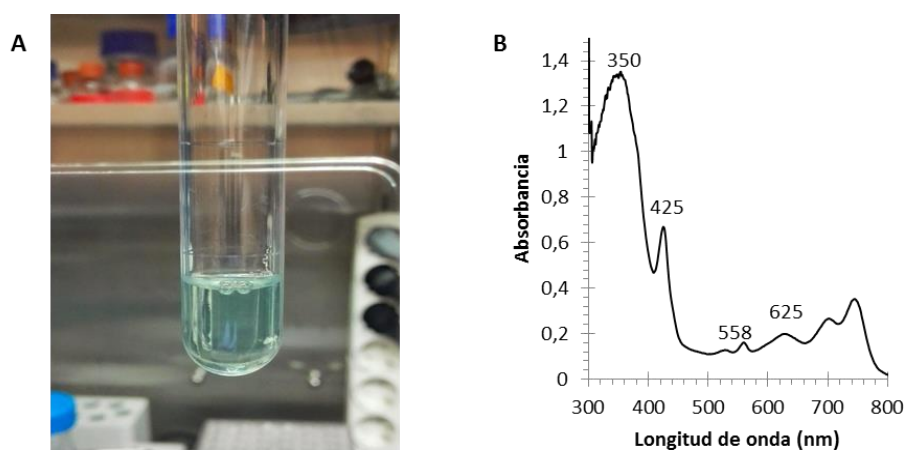


Figura 49. Purificación de CdFur en anaerobiosis. A) Proteína obtenida tras la purificación en anaerobiosis. B) Espectro UV-Vis de la proteína obtenida en ausencia de oxígeno.

4.1.4.5. Estudio por EPR de la proteína purificada

Una forma de caracterizar grupos prostéticos metálicos es mediante la técnica de Resonancia Paramagnética de Electrón (EPR). Por ello, se realizó el espectro de EPR a la proteína purificada en anaerobiosis con el fin de obtener más información acerca de la naturaleza del grupo prostético.

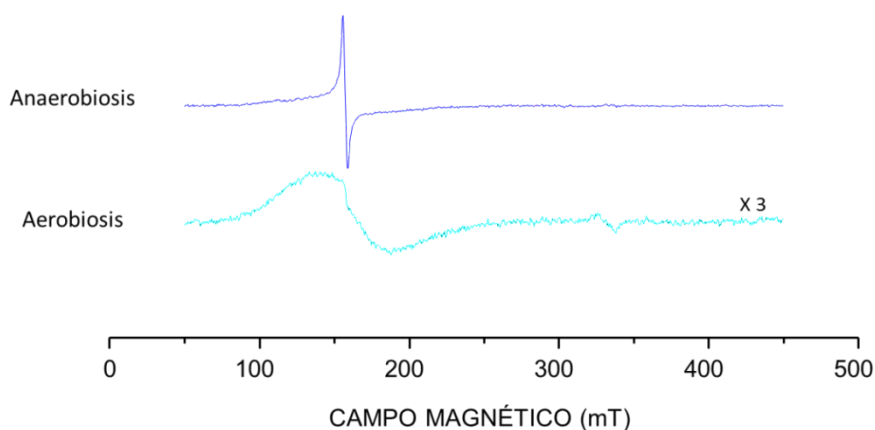


Figura 50. Espectro de EPR de la proteína CdFur. Se muestran los espectros de EPR obtenidos al someter a un campo magnético a dos preparaciones de proteína CdFur obtenidas en anaerobiosis (parte superior) y en presencia de oxígeno (parte inferior). En ambas preparaciones la proteína se encontraba en tampón 50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 20 % glicerol.

En la figura 50 se muestra el espectro de EPR continuo medido a baja temperatura ($T = 18$ K) para dos muestras de proteína, una purificada en anaerobiosis y la otra en aerobiosis. En la primera, encontramos una señal relativamente estrecha, centrada en un campo magnético en torno a 155 mT, lo que corresponde a un valor de $g = 4,3$. Se trata de una típica señal de Fe(III) en entorno de baja simetría. No está asociada a grupos prostéticos conocidos en proteínas que unen hierro, por lo que probablemente se trata de hierro unido de manera inespecífica por la proteína. El origen de esta relativamente grande cantidad de hierro podría estar relacionado con el deterioro de la proteína que se detecta tras su purificación en anaerobiosis, caracterizada por su cambio de color (de verde a marrón). Si la proteína purificada presentase un grupo prostético que contiene hierro, como un grupo sulfoférico, que se descompone tras la purificación, ese podría ser el origen del hierro que posteriormente se une inespecíficamente y se detecta mediante EPR, y que no aparece en muestras purificadas en presencia de oxígeno (ver más abajo). El espectro, por tanto, no identifica la presencia de un grupo sulfoférico en la proteína anaeróbica, pero sería compatible con un proceso de descomposición como el descrito.

Por su parte, el espectro de la muestra purificada en presencia de oxígeno (aerobiosis) presenta una señal mucho más ancha, centrada en una posición de campo magnético en torno a 160 mT. Superpuesta con ella, se detecta la misma señal estrecha en $g = 4,3$ de la muestra anaeróbica, pero en una cantidad al menos dos órdenes de magnitud menor, lo que demuestra que, en esta muestra, la cantidad de hierro libre disponible para su unión inespecífica con la proteína era mucho menor. Respecto a la señal ancha, podría ser compatible con un centro hemo unido a la proteína. Aunque habitualmente las hemoproteínas presentan configuraciones de "hemo de alto espín" o "hemo de bajo espín", con espectros de EPR bien caracterizados, la señal que aquí se observa no correspondería a ninguna de estas dos configuraciones. Sin embargo, señales anchas y en posiciones semejantes a la detectada se han medido en hemos cuya configuración se describe en la literatura como "espín intermedio". La muestra purificada en aerobiosis presentaría, por tanto, una señal de EPR compatible con la unión de hemo.

4.1.5. Actividad de unión al DNA de *CdFur* *in vitro*

Las proteínas Fur actúan como reguladores de la transcripción uniéndose al DNA en la región promotora de los genes que regulan. Por tanto, una forma de analizar la actividad de estas proteínas es mediante ensayos de retardo en gel (EMSA), donde se comprueba la unión de la proteína al DNA *in vitro*. Si una proteína se une a un determinado fragmento de DNA, el complejo proteína-DNA provoca una disminución en la movilidad electroforética con respecto al DNA libre.

4.1.5.1. Condiciones óptimas de unión de *CdFur* al DNA *in vitro*

Cuando se abordaron estos ensayos no se conocía el regulón de *CdFur*, así pues como DNA específico se decidió ensayar la unión de *CdFur* con su propio promotor (*Pfur*) ya que se había descrito para diversos homólogos de esta proteína que es capaz de autorregularse (Carpenter *et al.*, 2009b). Como DNA competidor, se utilizó un fragmento de DNA de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 perteneciente al promotor del gen *nifJ*. Ambos fragmentos de DNA se amplificaron mediante la técnica de PCR utilizando DNA genómico de cada microorganismo y empleando los oligonucleótidos indicados en la tabla 6.

Para establecer las condiciones óptimas de unión, se realizaron ensayos de retardo en gel variando la concentración de proteína, en presencia de ditioneitol (DTT) como agente reductor y de Mn(II) como metal correpresor, pues son las condiciones estándar descritas para otras proteínas Fur. El Mn(II), para la mayoría de homólogos Fur sustituye al Fe(II) como metal correpresor en los ensayos *in vitro*, ya que éste último se oxida a Fe(III) en contacto con el O₂ ambiental y precipita (Lee and Helmann, 2006a). Al realizar dichos experimentos se observó que la proteína no se unía al DNA (figura 51A), por lo que o bien la proteína no se unía a su propio promotor o bien no eran las condiciones adecuadas para su actividad.

También se realizaron ensayos en presencia de DTT y Zn(II) ya que cabía la posibilidad de que fuera el zinc el metal regulador como ocurre con los homólogos Zur. A pesar de observarse una ligera desaparición de la banda correspondiente a *Pfur*, indicando que *CdFur* sí era capaz de unirse a su propio promotor, tampoco parecía que fueran las condiciones idóneas de actividad para la proteína, pues sólo se observaba a alta concentración de proteína una pequeña disminución de la intensidad de la banda correspondiente al complejo proteína-DNA específico (figura 51B).

Al no presentar actividad de unión al DNA en presencia de metal y teniendo en cuenta que se ha descrito para diversos homólogos Fur apo-regulación (Carpenter *et al.*, 2009a), se realizaron los ensayos sin añadir metal o incluso en presencia de EDTA que actúa como quelante de metales divalentes. Sin añadir metal, *CdFur* presentó cierta actividad (figura 51C), semejante a la observada en presencia de DTT y Zn(II) (figura 51B). En cambio, la proteína resultó tener mayor actividad en presencia de 10 mM DTT y EDTA tanto en la mezcla de ensayo a 200 µM como en el tampón de electroforesis a una concentración final de 10 mM (figura 51D). De esta manera se comprobó que la proteína recombinante purificada *CdFur* era activa y que además era capaz de unirse a su propio promotor.

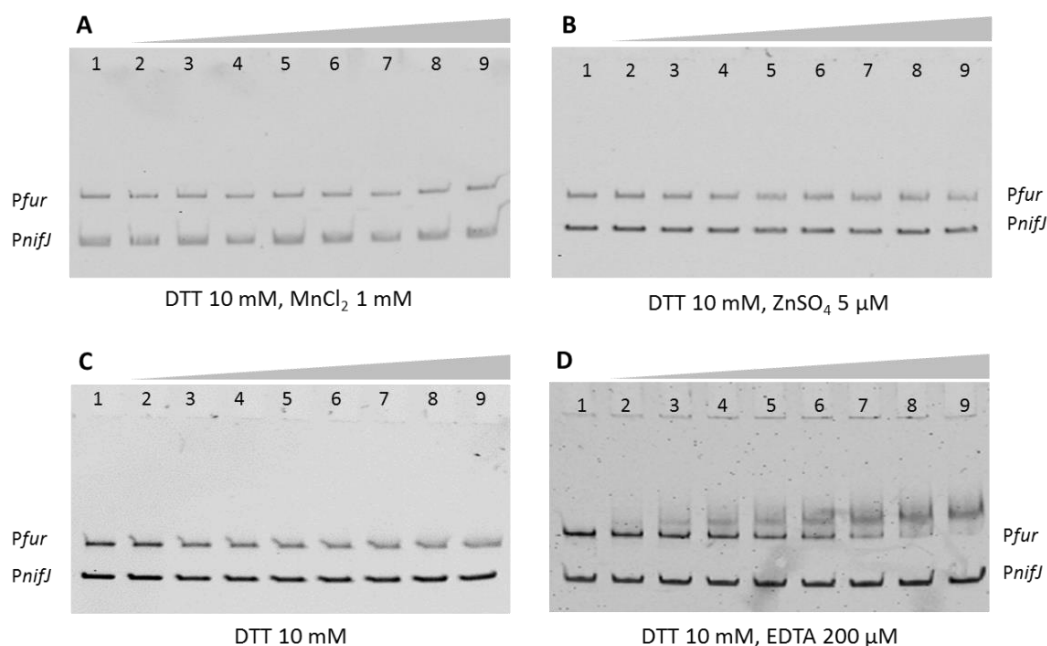


Figura 51. Búsqueda de condiciones óptimas de actividad para *CdFur* mediante ensayos de retardo en gel de poliacrilamida al 8 %. Titulación de la proteína *CdFur* con 50 ng de *Pfur* y 50 ng de *PnifJ*. Carril 1: corresponde al control negativo (sin proteína). Carriles 2-9: contienen cantidades crecientes de proteína a una concentración final de 100 a 800 nM. En todos los casos, la proteína se incubó en un tampón de unión cuya composición al 1x era: 20 mM Tris/HCl pH 8, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 % glicerol, 0,05 mg/ml BSA. Además, en cada experimento se añadieron a la mezcla de reacción los siguientes reactivos: A) 10 mM DTT y 1 mM MnCl₂, B) 10 mM DTT y 5 μM ZnSO₄, C) 10 mM DTT, D) 10 mM DTT y 200 μM EDTA. Las electroforesis se desarrollaron durante 2 horas y 15 minutos a 95 V en un tampón de composición 25 mM Tris/HCl pH 8, 190 mM glicina excepto en el caso D en el que se añadió además 10 mM EDTA.

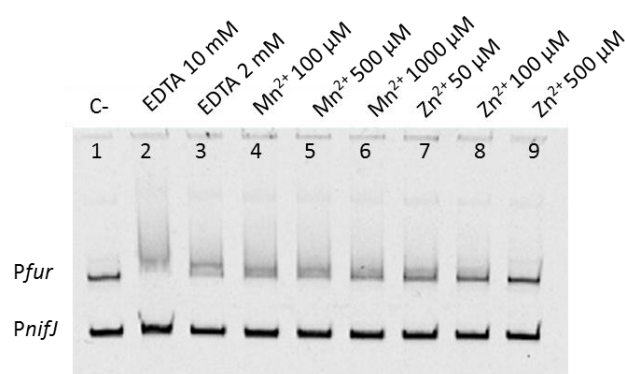


Figura 52. Análisis del efecto de la presencia de metal en la actividad de unión al DNA de *CdFur* mediante ensayos de retardo en gel de poliacrilamida al 8 %. Se incubaron 700 nM de *CdFur* con 50 ng de *Pfur* y 50 ng de *PnifJ* en un tampón de unión cuya composición al 1x era: 20 mM Tris/HCl pH 8, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 % glicerol, 0,05 mg/ml BSA, 10 mM DTT. Carril 1: control negativo (sin proteína), carril 2: EDTA 10 mM, carril 3: EDTA 2 mM, carriles 4-6: cantidades crecientes de MnCl₂, carriles 7-9: cantidades crecientes de ZnSO₄. La electroforesis se desarrolló en un tampón de composición 25 mM Tris/HCl pH 8, 190 mM glicina (sin EDTA) durante 2 horas y 15 minutos a 95 V.

Para corroborar que la presencia de metal afectaba a la actividad de la proteína se hizo una titulación manteniendo fija la concentración de proteína y variando la concentración de metal, tanto de Mn(II) como de Zn(II). Como se observa en la figura 52, al añadir cantidades crecientes de ambos metales divalentes, se inhibe la unión al DNA. En cambio, en presencia de un quelante, la proteína resultaba ser activa.

4.1.5.2. Búsqueda de promotores diana de *CdFur*

Una vez determinadas las condiciones óptimas de unión de la proteína al DNA, se analizó si *CdFur* era capaz de unirse a otros promotores de genes implicados en el metabolismo del hierro. Para la selección de estos promotores, se realizó una búsqueda sobre el genoma de *C. difficile* de diversos genes relacionados tanto con la captación como con el almacenamiento de hierro. Se escogieron regiones promotoras (unas 300 pb desde el codón de inicio de la transcripción) de genes para los que previamente se había descrito su regulación por Fur en otros microorganismos (Carpenter *et al.*, 2009b). Concretamente se analizó la unión de *CdFur* a los promotores de los siguientes genes: *feoA*, *fhuD*, *fhuB*, *gen1*, *gen2*, *fldX* (tabla 16).

Tabla 16. Promotores de los distintos genes utilizados en los ensayos de actividad de unión al DNA de *CdFur*.

Promotor	Proteína	Locus en <i>C. difficile</i> 630
Pfur	ferric uptake regulator	CD630_12870
PfeoA	ferrous iron transport protein FeoA	CD630_14770
PfhuD	ferrichrome-specific ABC transporter substrate-binding protein	CD630_28780
PfhuB	ferrichrome-specific ABC transporter permease	CD630_28770
Pgen1	ABC-type transport system, iron-family extracellular solute-binding protein	CD630_29990
Pgen2	ABC-type transport system, iron-family permease	CD630_29980
PfldX	flavodoxine	CD630_19990

Una vez seleccionadas las regiones promotoras, se realizó una comparación de todas ellas para poder obtener una aproximación de caja Fur usando para ello el programa WebLogo (<http://weblogo.berkeley.edu/>). En la figura 53 se muestra la secuencia consenso identificada y que es similar a la caja Fur de 19 pb identificada en *B. subtilis* (Baichoo and Helmann, 2002).

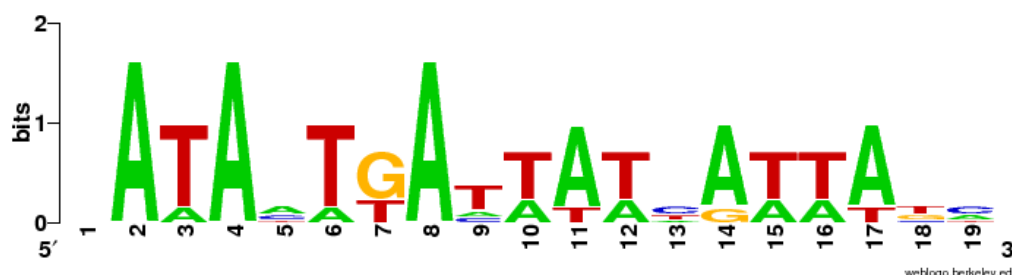


Figura 53. Secuencia consenso de la región de unión a DNA de *CdFur*.

Todos los promotores, se amplificaron mediante la técnica de PCR utilizando como molde el DNA genómico de *C. difficile* ATCC 43255 excepto en el caso del promotor de la flavodoxina que se utilizó el DNA genómico de *C. difficile* 630. Para cada caso se utilizaron los oligonucleótidos detallados en la tabla 6.

Una vez obtenidos los promotores, se realizaron ensayos de retardo en gel con la proteína recombinante para analizar la posible interacción de la misma con los promotores seleccionados. Todos los ensayos se realizaron en las condiciones óptimas de unión establecidas anteriormente: 10 mM DTT y 200 μ M EDTA (figura 54).

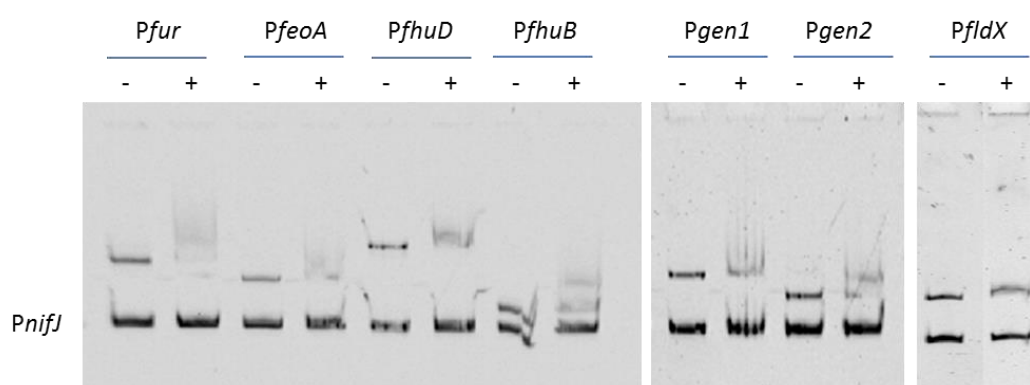


Figura 54. Análisis de la actividad de unión de *CdFur* a diversos promotores mediante ensayos de retardo en gel de poliacrilamida al 8 %. Se incubó la proteína *CdFur* con 50 ng del promotor a ensayar junto a 50 ng del promotor inespecífico *PnifJ* en un tampón de unión cuya composición al 1x era: 20 mM Tris/HCl pH 8, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 % glicerol, 0,05 mg/ml BSA, 10 mM DTT, 200 μ M EDTA. Carriles (-): corresponden al control negativo para cada promotor (sin proteína). Carriles (+): proteína *CdFur* 700 nM. La electroforesis se desarrolló en un tampón de composición 25 mM Tris/HCl pH 8, 190 mM glicina y 10 mM EDTA durante 2 horas y 15 minutos a 95 V.

Como muestra la figura 54, *CdFur* se unía a todos los promotores ensayados. Esto podría sugerir que *CdFur* actúa como regulador transcripcional directo de los genes correspondientes. En todos los casos, al igual que ocurría para el promotor del gen *fur*, la presencia de condiciones reductoras en el ensayo y la ausencia de metal fueron necesarias para el óptimo funcionamiento de la proteína. Además, se observó que la afinidad de *CdFur* por su propio promotor fue mayor que para el resto de promotores ya que se observó, para la misma concentración de proteína, mayor retardo del DNA específico comparado con el resto de promotores.

4.1.6. Complementación funcional de *CdFur* en *E. coli*

Se realizó un ensayo de complementación con el fin de estudiar si la proteína *CdFur* era capaz de sustituir al homólogo Fur de *E. coli* con el que comparte un 62 % de similitud de secuencia aunque sólo un 35 % de identidad (tabla 15). Para ello, se utilizó la cepa de *E. coli* Δfur H1780 (cedida por el Dr. Klaus Hantke) que contiene una mutación indeterminada en el

gen *fur*. Esta cepa, posee además en su genoma la fusión del promotor del gen *fiu* con el gen reportero *lacZ*. El gen *fiu* codifica una proteína de membrana externa de captación de iones Fe^{3+} que está reprimida por Fur y por hierro. Cuando no hay proteína Fur que pueda unirse a la región operadora *fiu* se produce expresión del gen *lacZ*, es decir la cepa posee actividad β -galactosidasa.

Para introducir la proteína *CdFur* en la cepa de *E. coli* H1780 primero se clonó el gen *fur* de *C. difficile*, precedido de un promotor de *E. coli* inducible por IPTG, en el plásmido de bajo-medio número de copias pACYCT2, con resistencia a cloranfenicol. La correcta secuencia del gen se verificó por secuenciación en el servicio de Secuenciación de Sistemas Genómicos (Valencia). A continuación, células termocompetentes de la cepa H1780 se transformaron mediante choque térmico con el plásmido pACYC-*furCd*. Los transformantes se sembraron en placas de agar MacConkey suplementadas, bien con $100 \mu\text{M}$ FeCl_3 para un medio rico en hierro, o con $200 \mu\text{M}$ 2,2'-dipiridilo para un medio deficiente en hierro. El agar MacConkey es un medio selectivo que permite distinguir bacterias capaces de fermentar la lactosa. Bacterias Lac(+), es decir, que poseen actividad β -galactosidasa, fermentan la lactosa del medio y producen acidez lo que resulta en un descenso del pH del medio y colonias de color rojo o rosa. Bacterias Lac(-), que no fermentan la lactosa, utilizan en su lugar peptona formándose amoníaco, lo que aumenta el pH del medio y la aparición de colonias blancas o incoloras.

Como se observa en la figura 55, la cepa H1780 con el gen *fur* mutado, permitió la producción de β -galactosidasa observándose colonias bacterianas rojas sobre las placas de agar MacConkey. Esto se produjo en las placas con y sin hierro puesto que la ausencia de la proteína *EcFur* no afectó a la transcripción del gen *lacZ*. Sin embargo, cuando se introdujo en la cepa H1780 el plásmido pACYC-*furCd* que contenía el gen *fur* de *C. difficile*, las células mostraron una actividad reducida de β -galactosidasa en presencia de hierro, presentando un fenotipo de colonias color blanco. Esto fue debido a la represión del gen *fiu* por parte de la proteína *CdFur* unida a hierro, tal como ocurriría con el homólogo *EcFur*. En ausencia de hierro, se observaron colonias rojas lo que indicaría que se había expresado el gen *lacZ* y por tanto, la proteína *CdFur* no se unía a la región promotora *fiu*. Este resultado demostraba que *CdFur* es capaz de reconocer promotores de *EcFur* *in vivo* e inhibir su transcripción. Así pues, a pesar de la divergencia en la secuencia, el homólogo *CdFur* es capaz de complementar un mutante *EcFur* *in vivo* y funcionar como un holo-represor.

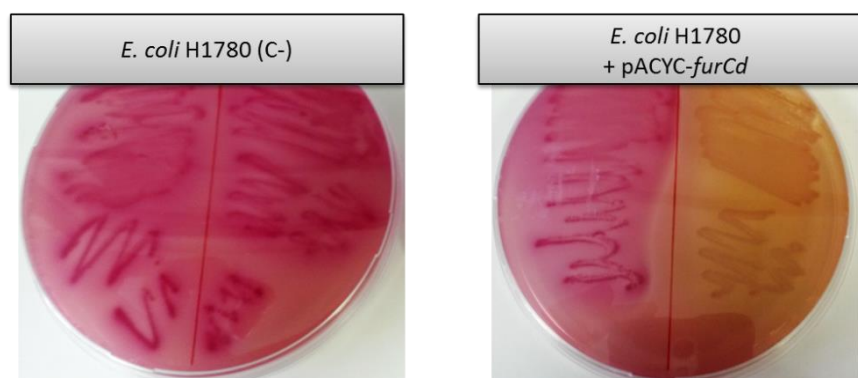


Figura 55. Ensayo de complementación de Fur de *E. coli* *in vivo*.

Ya que se disponía de anticuerpos contra el homólogo Fur de *E. coli* se realizó un Western blot para ver si estos eran capaces de reconocer a la proteína purificada CdFur (figura 56).

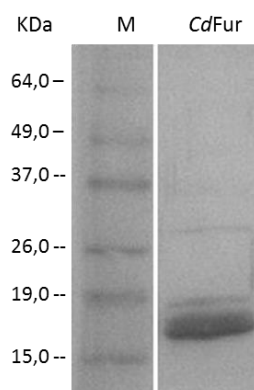


Figura 56. Western blot para comprobar la reactividad cruzada entre los anticuerpos de EcFur con la proteína CdFur. Carril 1: marcador de masas moleculares. Carril 2: 5 µg de proteína CdFur. Carril 3: 5 µg de proteína CdFur incubada con DTT 10 mM.

Como se observa en la figura 56, los anticuerpos contra el homólogo Fur de *E. coli* sí reconocieron a la proteína CdFur lo que indicaría que ambas proteínas presentan epítomos comunes y por tanto zonas de la cadena polipeptídica que se pliegan del mismo modo. Este resultado vendría a apoyar el hecho de que a pesar de ser homólogos diferentes, CdFur puede poseer rasgos estructurales similares a EcFur y, por tanto, sustituir al homólogo EcFur tal como se vio en el ensayo de complementación funcional.

4.1.7. Regulación de promotores diana de CdFur en *E. coli*

4.1.7.1. Diseño experimental

Como se ha descrito, los ensayos de unión al DNA de CdFur *in vitro* sugerían que la proteína funcionaba como apo-regulador. Sin embargo, también era capaz de complementar la función del homólogo Fur de *E. coli in vivo* funcionando como holo-regulador. Por tanto, para estudiar el carácter regulador de CdFur, se analizó su actividad frente a dos de sus promotores diana en un sistema heterólogo *in vivo*. Para ello, se siguió la estrategia definida en la figura 57.

Por un lado, se utilizó una cepa mutante $\Delta fur\Delta lacZ$ de *E. coli* no patógena generada mediante el sistema de un solo paso (*One-Step*) desarrollado por Datsenko y Wanner (Datsenko and Wanner, 2000). Se escogió una cepa $\Delta lacZ$ para generar el mutante *knockout* de *fur*. Este método, se basa en la utilización de productos de PCR para alterar genes cromosómicos en un solo paso. Para ello, se generó un producto de PCR utilizando unos cebadores con extensiones homólogas a las regiones adyacentes al gen *fur* de *E. coli* (regiones H1 y H2) usando como molde el plásmido pKD4 que portaba el gen de resistencia a kanamicina. A continuación, se transformó la cepa de *E. coli* $\Delta lacZ$ con el vector termosensible

pKD46 que expresaba la recombinasa λ Red bajo un promotor inducible por arabinosa. El siguiente paso, consistió en introducir el producto de PCR en la cepa de *E. coli* pKD46 por electroporación para que se produjera la recombinación homóloga gracias al sistema λ Red, y la consecuente sustitución del gen *fur* de *E. coli* por el *cassette* Km. Los transformantes se seleccionaron por su resistencia a kanamicina y se comprobó por PCR la delección del gen *fur* (figura 32) (Materiales y Métodos, apartado 3.3.3.).

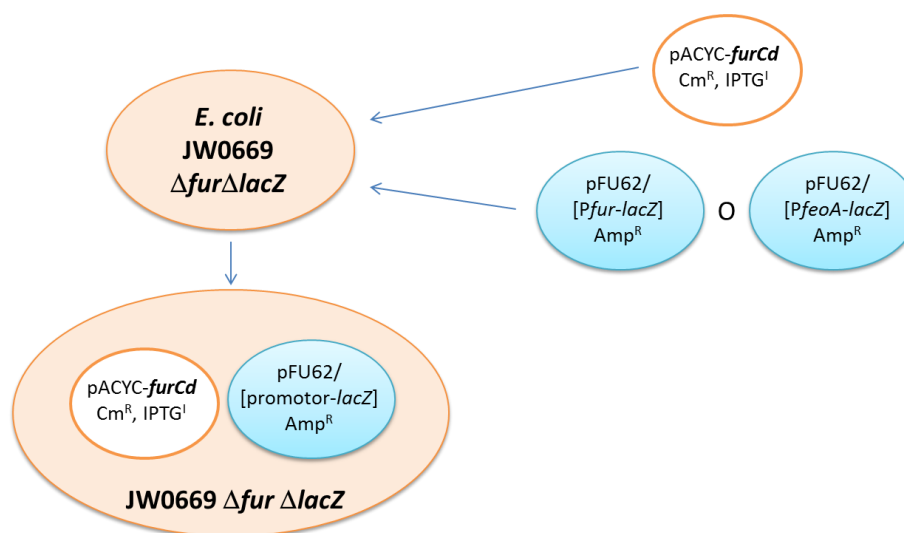


Figura 57. Estrategia seguida para construir un sistema heterólogo para el estudio de la actividad de *CdFur* frente a un promotor diana mediante la medida de la actividad β -galactosidasa. La estrategia consiste en primer lugar en crear una cepa de *E. coli* Δfur que además debe ser $\Delta lacZ$. El siguiente paso consiste en clonar el gen *fur* en un plásmido de bajo-medio número de copias, en este caso pACYCT2, e introducirlo en la cepa de *E. coli* Δfur . Por último, clonar en el plásmido pFU62 el promotor diana de *CdFur* delante del gen reportero *lacZ*, e introducirlo en la cepa de *E. coli* Δfur / pACYC-*furCd*.

Por otro lado, se realizó el clonaje en el vector de alto número de copias pFU62 (Uliczka *et al.*, 2011) de los promotores diana de la proteína *CdFur*, delante de la secuencia codificadora del gen reportero *lacZ*. En concreto, se clonaron los promotores *Pfur* y *PfeoA* ya que en los ensayos de actividad de unión al DNA de *CdFur* *in vitro* se observó buena interacción proteína-promotor (figura 53). Los plásmidos pFU62[*Pfur-lacZ*] y pFU62[*PfeoA-lacZ*], se secuenciaron para verificar que el clonaje se había realizado correctamente. Estos plásmidos, con las fusiones transcripcionales, se introdujeron en células competentes de la cepa de *E. coli* $\Delta fur \Delta lacZ$ (JW0669).

El último paso, consistió en la introducción del plásmido pACYC-*furCd* en células competentes JW0669 que ya contenían uno de los plásmidos con las fusiones transcripcionales. Con este plásmido, la expresión de la proteína *CdFur* era inducible por IPTG.

4.1.7.2. Curvas de crecimiento

Una vez construido este sistema, se realizaron las curvas de crecimiento en medio mínimo M9 de la cepa control JW0669 ($\Delta fur\Delta lacZ$), la cepa JW0669 conteniendo el plásmido pACYC-*furCd*, la cepa JW0669 con el plásmido pFU62 vacío, la cepa JW0669 con el plásmido pFU62[*Pfur/lacZ*] y la cepa JW0669 con los plásmidos pACYC-*furCd* y pFU62[*Pfur/lacZ*]. Para ello, las células se cultivaron durante toda la noche en 10 ml de medio LB. A partir de este cultivo, se hizo un inóculo del 1-2 % en 10 ml de medio mínimo M9 y se dejó crecer también durante toda la noche. Este pre-inóculo se realizó para que las células se adaptaran al medio mínimo. Al día siguiente, se volvió a realizar un inóculo del 1-2 % en medio mínimo M9 con IPTG 1 mM y los antibióticos correspondientes en frascos Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml de medio y se incubaron a 37 °C y 200 rpm. La evolución de la densidad óptica de cada cultivo a lo largo del tiempo se muestra en la figura 58.

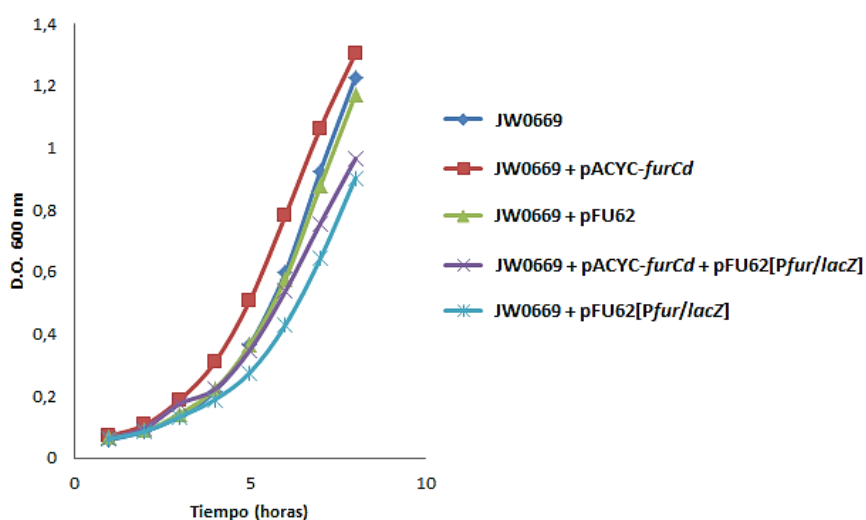


Figura 58. Curvas de crecimiento de las cepas empleadas en el ensayo de actividad β -galactosidasa. Los valores corresponden a la media de tres determinaciones procedentes de cultivos de tres ensayos independientes. Se representa la desviación estándar con las barras de error verticales.

Los valores de velocidad de crecimiento específico (μ) y tiempo de generación (τ) obtenidos se muestran en la tabla 17 y se calcularon de acuerdo a las fórmulas:

$$\mu = \frac{\ln(Abs600_2/Abs600_1)}{t_2 - t_1}$$

$$\tau = \frac{\ln 2}{\mu}$$

Tabla 17. Parámetros de crecimiento de las cepas empleadas en el ensayo de actividad β -galactosidasa. Las unidades se indican entre paréntesis.

	JW0669	JW0669 + pACYC- <i>furCd</i>	JW0669 + pFU62	JW0669 + pACYC- <i>furCd</i> + pFU62[P <i>fur/lacZ</i>]	pFU62[P <i>fur/lacZ</i>]
μ (horas ⁻¹)	0,49	0,43	0,46	0,43	0,44
τ (horas)	1,42	1,62	1,52	1,61	1,58

Como se aprecia en la figura 58, la presencia de la proteína *CdFur* mejoró ligeramente el crecimiento de la cepa JW0669 $\Delta fur\Delta lacZ$. Este resultado está en concordancia con el hecho de que *CdFur* pueda complementar al homólogo *EcFur* ya que a pesar de que el gen *fur* no es un gen esencial para *E. coli*, dado que es un regulador global de la transcripción, su ausencia sí afecta a un numeroso grupo de procesos celulares (cepas Δfur pueden tener comprometido su crecimiento). La presencia de los dos plásmidos, provocó un retardo en el crecimiento al igual que ocurría con la cepa que sólo contenía el plásmido con la fusión transcripcional. Esto podría deberse a que al estar el gen *lacZ* en un plásmido de alto número de copias (sistema pFU), parte de la maquinaria celular se dedica a la producción de dicho gen en detrimento del crecimiento celular.

4.1.7.3. Medidas de actividad β -galactosidasa

La actividad de *CdFur in vivo* se determinó a partir de la expresión del gen reportero *lacZ* en distintas condiciones de disponibilidad de hierro. Para ello, los cultivos anteriores crecidos a una D.O. a 600 nm en torno a 0,2 se dividieron en dos y se suplementaron con 100 μ M de $FeCl_3$ (medio rico en hierro) o 200 μ M *o*-fenantrolina (medio deficiente en hierro). Los cultivos se dejaron crecer durante tres horas más, momento en el que se midió la actividad β -galactosidasa siguiendo el protocolo descrito en el apartado 3.9.2. Dicha actividad se determinó espectrofotométricamente a 420 nm, usando ONPG (*o*-nitrofenil- β -D-galactopiranosido) como sustrato y se expresó calculada en unidades Miller (Miller, 1972). Como controles negativos, se usaron las cepas JW0669 ($\Delta fur\Delta lacZ$) y JW0669 con el plásmido pFU62 vacío o con el plásmido pACYC-*furCd*, todas carentes de gen *lacZ*. Como control positivo, se empleó la cepa JW0669 conteniendo bien el plásmido pFU62[P*fur/lacZ*] o bien pFU62[P*feoA/lacZ*], que sí contenían el gen *lacZ* y por tanto actividad β -galactosidasa.

De acuerdo con este ensayo, la expresión del gen *lacZ* y por tanto actividad β -galactosidasa, en ausencia de *CdFur*, no se vio condicionada por la presencia de metal puesto que se obtuvieron valores de actividad similares en los cultivos con y sin hierro (figura 59). En presencia de la proteína *CdFur* (la cepa en este caso contenía además del plásmido con la fusión transcripcional, el plásmido pACYC-*furCd*) se observó menor actividad β -galactosidasa. Esto significaría represión del gen *lacZ* por parte de *CdFur*. Además, dicha represión fue mayor en los cultivos con hierro, por lo que los genes *fur* y *feo* serían reprimidos por *CdFur* y por Fe. Estos resultados sugieren que *CdFur in vivo* se comporta como un holo-represor, tal como ocurría con los ensayos de complementación en *E. coli*.

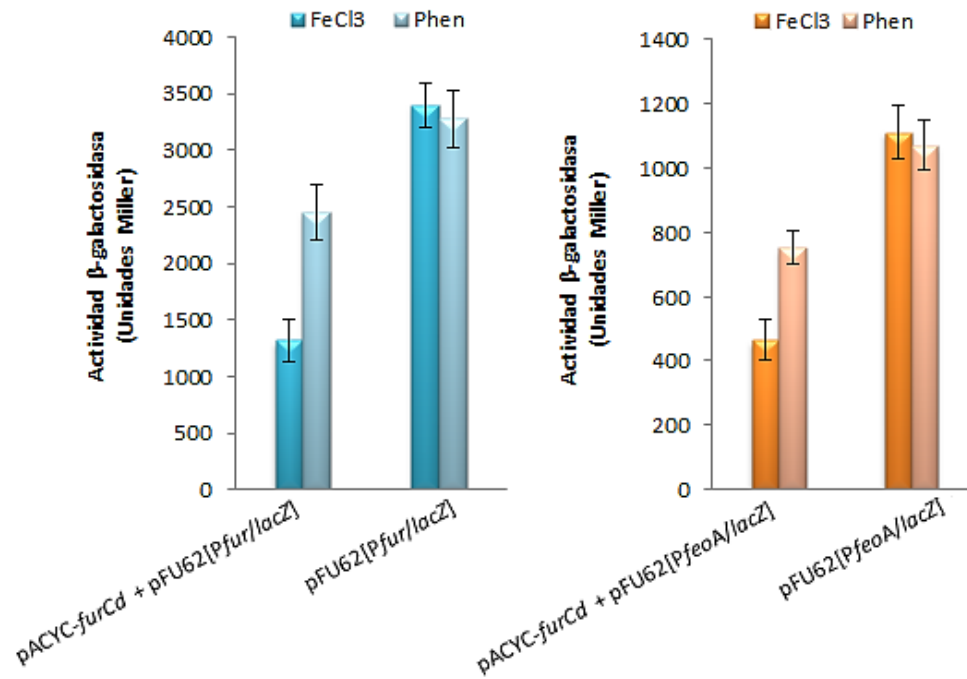


Figura 59. Influencia de *CdFur* y la disponibilidad de hierro en la expresión de genes regulados por *CdFur*. Las fusiones transcripcionales entre las regiones promotoras de los genes *fur* (izquierda) o *feoA* (derecha) y el gen reportero *lacZ* se introdujeron en la cepa de *E. coli* $\Delta fur\Delta lacZ$ JW0669 que contenía el plásmido *pACYC-furCd*. Las células crecieron en medio mínimo M9 suplementado con 100 μ M $FeCl_3$ para el medio rico en hierro (barras oscuras) o con 200 μ M *o*-fenantrolina para medio sin hierro (barras claras). Como control se utilizó la cepa JW0669 que sólo contenía el plásmido con la fusión transcripcional. Las barras representan la media de los valores de actividad β -galactosidasa (Unidades Miller) obtenidos en tres experimentos independientes con las desviaciones estándar expresadas como barras de error.

4.2. Caracterización bioquímica de CdFur y estudio de sus residuos de cisteína

4.2.1. Motivación del trabajo

Las proteínas de la familia FUR son metaloproteínas de unión a DNA que actúan como reguladores transcripcionales y poseen características bioquímicas comunes, como son la capacidad de interactuar con metales o la tendencia a la oligomerización (Fillat, 2014). En estos procesos, los residuos de cisteína pueden desempeñar un papel importante. En concreto, pueden coordinar metal, ser responsables de la oligomerización así como de la conformación de la proteína por su implicación en la formación/destrucción de puentes disulfuro o intervenir en la interacción de la proteína con el DNA (Green and Paget, 2004).

La proteína Fur de *C. difficile* posee siete residuos de cisteína. De estos siete residuos, C₅₁ y C₈₁ se sitúan en el extremo N-terminal y C₉₃ está localizada en la región bisagra entre los extremos N-terminal y C-terminal, y las otras cuatro cisteínas pertenecen a dos motivos CXXC situados en el extremo C-terminal: C₁₀₁KNC₁₀₄ y C₁₄₁DEC₁₄₄ (figura 60).

MANTMDLLKDKLKETGFKITPQRRRAIVEILLKHDHSHLSSEEIYDLVRVDCPEIG	55
LATVYRTMQLLDEIGLISKLNLDGCRIRYEISLHKEDCHNHHLICKNCGKIMEA	110
KEDLLDNIEKEIQSLYKFKILDHDVKFYGLCDECNGVSDSEE	152

Figura 60. Secuencia de aminoácidos de Fur de *C. difficile* 630. Se resaltan en rojo las cisteínas. El recuadro verde muestra el motivo rico en histidinas y los recuadros rojos los dos motivos CXXC.

El hecho de que la actividad de la proteína necesite poder reductor y que la presencia de metal influya en ésta, sugiere que una o varias cisteínas son importantes en su actividad. Uno de los objetivos de este trabajo fue conocer la contribución de las cisteínas de CdFur en cada uno de estos procesos. Para ello, el primer paso fue la obtención de todos los mutantes simples de cisteína (C51A, C81A, C93A, C101A, C104A, C141A y C144A) y de los mutantes dobles de los dos motivos CXXC (C101/104A y C141/144A). Posteriormente, se realizó la caracterización bioquímica tanto de la proteína nativa como de todos los mutantes con el fin de poder asignar una posible función a cada una de las cisteínas. Por último y, en base a un modelo estructural obtenido para CdFur se interpretaron los resultados experimentales y se propuso un posible mecanismo de acción para este regulador.

4.2.2. Sobreexpresión y purificación de los mutantes de cisteína

Para la preparación de todos los mutantes, se obtuvieron los plásmidos de sobreexpresión mediante mutagénesis dirigida a partir del plásmido pET-*furCd* (Materiales y Métodos,

apartado 3.2.1.2.). De los mutantes simples, los que contenían la mutación C51A, C81A y C93A se produjeron en el laboratorio mientras que los mutantes sencillos de los dos motivos CXXC (C101A, C104A, C141A y C144A) fueron suministrados por la empresa GenSript. Los plásmidos con las mutaciones dobles C101/104A y C141/144A se obtuvieron en el laboratorio a partir de los plásmidos que contenían la mutación simple C101A y C144A, respectivamente. En todos los casos se utilizaron oligonucleótidos diseñados específicamente (detallados en la tabla 7) que contenían la mutación para el cambio de aminoácido cisteína por alanina. Cada plásmido producido en el laboratorio se envió a un servicio de secuenciación para verificar que contenía la secuencia del gen *fur* con la mutación concreta. Posteriormente, todos los mutantes se sobreexpresaron en las mismas condiciones que la proteína silvestre (figura 61).

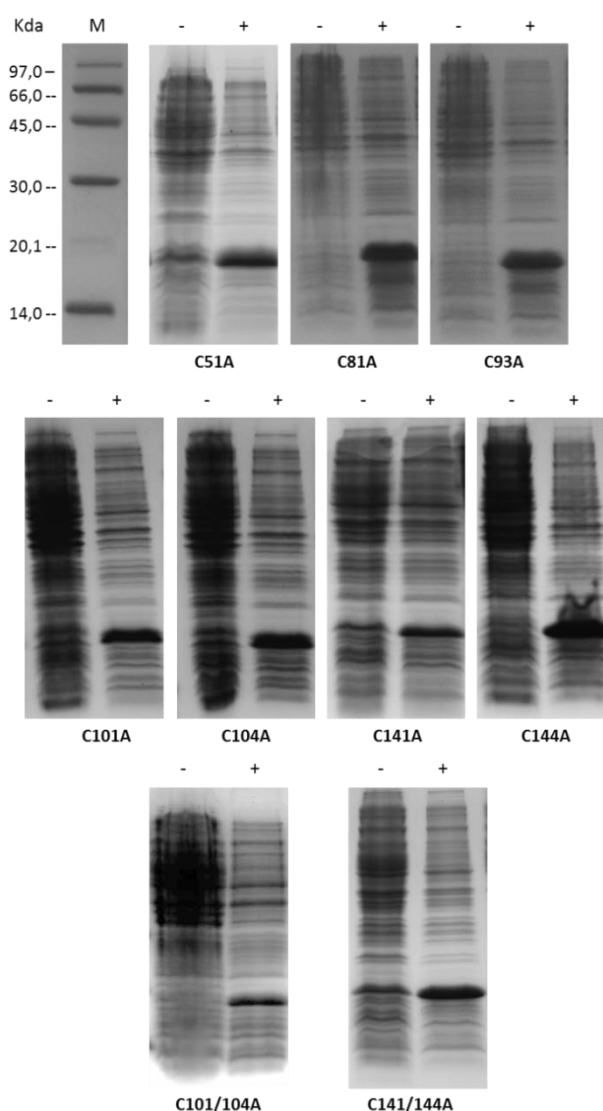


Figura 61. Análisis de la sobreexpresión de los mutantes de cisteína mediante geles de SDS-PAGE al 15 %. Se cargaron lisados celulares de cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) transformados con el plásmido de sobreexpresión obtenido mediante mutagénesis dirigida. Se muestra para cada mutante el extracto total proteico del cultivo con (+) o sin (-) la adición de 1 mM IPTG como inductor de la expresión de los mutantes. Tampón de carga con agentes reductores.

Como se observa en la figura 61, ninguna de las mutaciones afectaba significativamente a la producción de las proteínas mutantes en *E. coli* ya que todas se sobreexpresaron satisfactoriamente. Únicamente en la sobreexpresión del mutante C141A se observó una menor cantidad de proteína inducida. Para la sobreexpresión del mutante doble C101/104A se variaron las condiciones de sobreexpresión ya que con las condiciones estándar se observaba muy poca cantidad de proteína. Las condiciones que se emplearon para este mutante, una vez optimizadas, fueron inducción con 1 mM IPTG durante 6 horas a 37 °C.

La purificación de todos los mutantes se realizó de acuerdo con el protocolo descrito para la proteína CdFur mediante cromatografía de afinidad a metales (IMAC) utilizando Ni²⁺ como ligando (Materiales y Métodos, apartado 3.4.). Las sustituciones de los residuos de cisteína por alanina no afectaron a la unión de las proteínas en la cromatografía, ya que todos los mutantes de cisteína se fijaron a la columna. En general, todos los mutantes mostraron un patrón de elución similar a la proteína nativa saliendo al inicio del gradiente de imidazol y repartidos en varias fracciones (figuras 62 y 63).

Todas las proteínas mutantes se mantuvieron solubles después de la eliminación del imidazol mediante diálisis frente al tampón de conservación 50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 10 % glicerol. Esto podría indicar que ninguna cisteína afectaba de manera significativa a la estabilidad de la proteína. En la siguiente tabla se muestra el rendimiento obtenido en cada purificación.

Tabla 18. Cuantificación y rendimiento de la purificación de la proteína nativa CdFur y de todos los mutantes de cisteína.

	WTHis	C51A	C81A	C93A	C101A	C104	C141	C144	C101_104	C141_144
Bradford (μM)	440	369	240	380	22	32	40	90	37	171
Bradford (mg/ml)	8,7	7,3	4,8	7,5	0,43	0,6	0,78	1,76	0,7	3,4
Rendimiento mg prot / litro cultivo	15,7	15,0	16,3	30,0	3,0	2,0	1,4	7,0	1,4	10,2

Las soluciones de proteína final se cuantificaron tanto por espectroscopía de absorción UV-Vis como por Bradford. En el caso de la cuantificación por espectroscopía UV-Vis, se usaron los coeficientes de extinción molar teóricos (ϵ) a 280 nm: 7825 M⁻¹ cm⁻¹ para los mutantes simples y 7700 M⁻¹ cm⁻¹ para los mutantes dobles (datos obtenidos utilizando la herramienta ProtParam del servidor Expasy: <http://web.expasy.org/protparam/>). Por ambos métodos se obtuvieron valores similares para los mutantes de los residuos C₅₁, C₈₁ y C₉₃. En las preparaciones de los mutantes C₁₀₁, C₁₀₄, C₁₄₁ y C₁₄₄ sólo se tuvo en cuenta la cuantificación por Bradford ya que los espectros de absorbancia no daban un pico bien definido a 280 nm. Las diferencias de rendimiento, observables principalmente en los mutantes C101A, C104A, C141A y el mutante doble C101/104A, podrían deberse a que durante el proceso de purificación parte de la proteína formaba cuerpos de inclusión. De esta forma, gran parte de la proteína se quedaría en el precipitado obtenido tras la centrifugación del lisado celular. A pesar de ello, la fracción de proteína purificada fue suficiente para realizar los ensayos de caracterización.

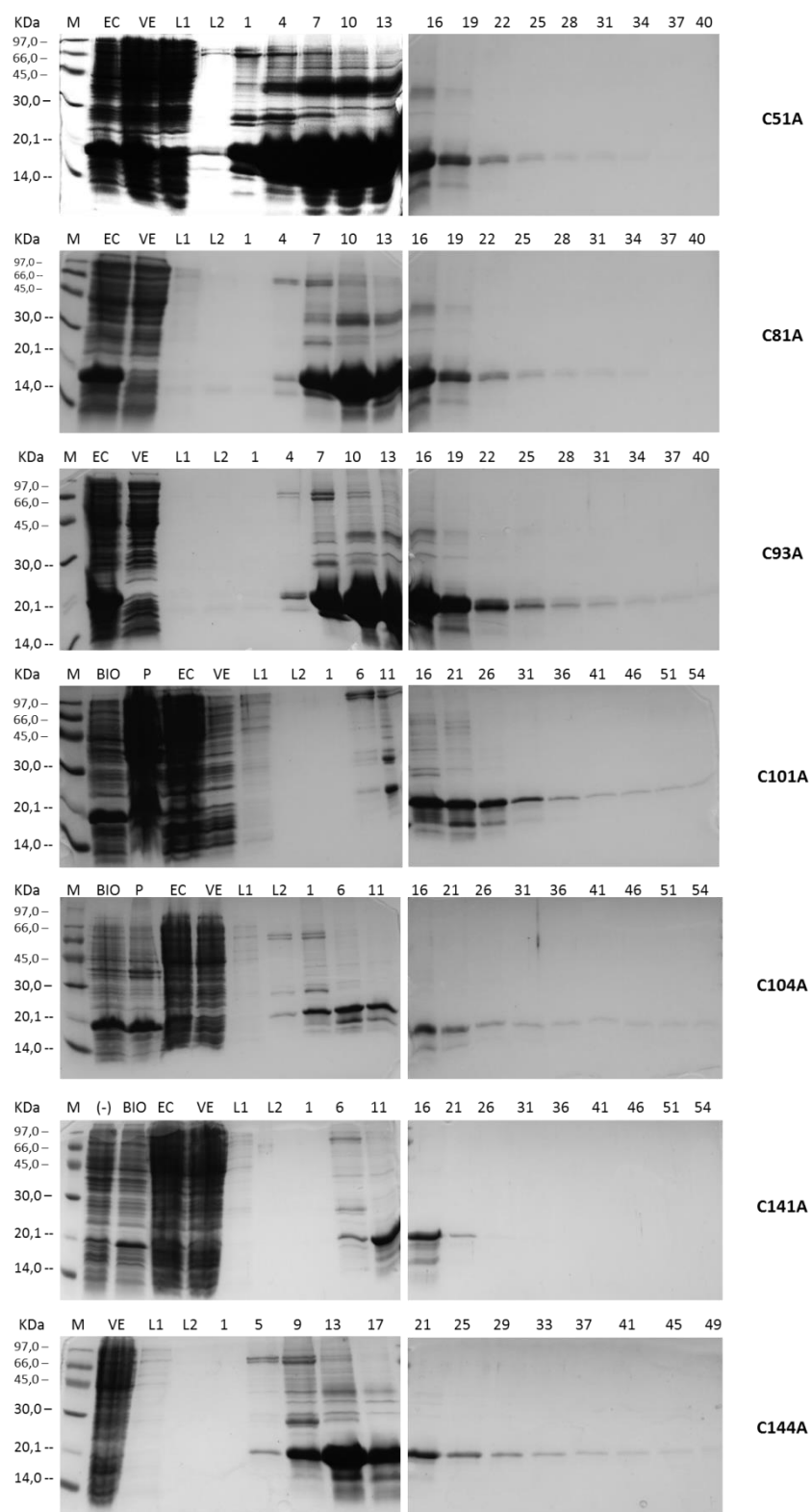


Figura 62. Análisis por SDS-PAGE al 15 % de la purificación de los mutantes sencillos de cisteína de *CdFur* por IMAC-Ni. M: marcadores de masa molecular, BIO: muestra de biomasa, P: precipitado obtenido tras la sonicación y posterior centrifugación, EC: extracto crudo, VE: volumen escurrido (material no fijado a la columna tras cargar el extracto crudo), L1: primer lavado, L2: segundo lavado, 1 - 50: distintas fracciones recogidas durante el gradiente con imidazol. Tampón de carga con agentes reductores.

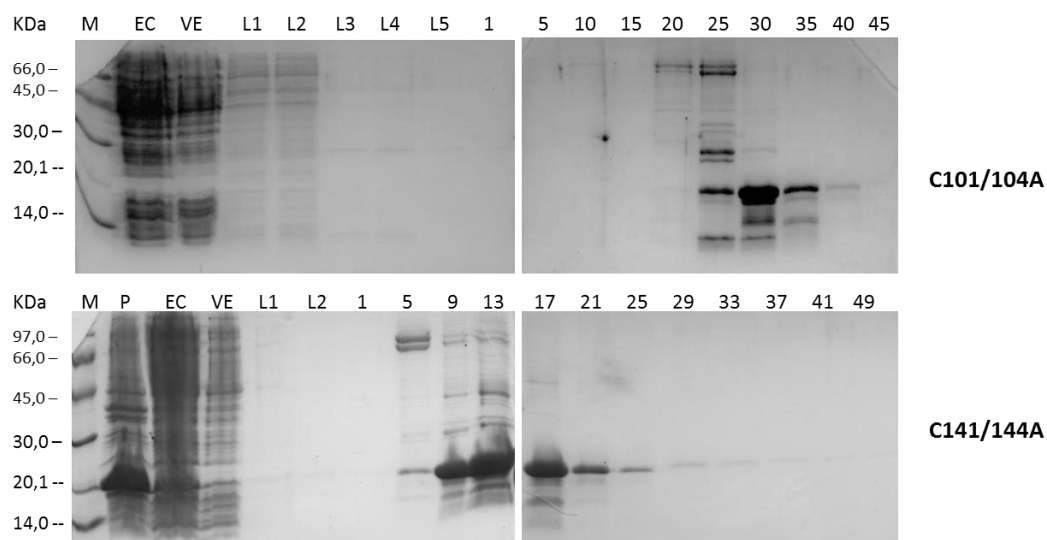


Figura 63. Análisis por SDS-PAGE al 15 % de la purificación de los mutantes dobles de cisteína de *CdFur* por IMAC-Ni. M: marcadores de masa molecular, BIO: muestra de biomasa, P: precipitado obtenido tras la sonicación y posterior centrifugación, EC: extracto crudo, VE: volumen escurrido (material no fijado a la columna tras cargar el extracto crudo), L1: primer lavado, L2: segundo lavado, 1 - 50: distintas fracciones recogidas durante el gradiente con imidazol. Tampón de carga con agentes reductores.

4.2.3. Análisis de la estructura secundaria

4.2.3.1. Predicción de estructura secundaria

Como no se dispone de la estructura cristalográfica de la proteína *CdFur*, se utilizó el servidor PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) para predecir su estructura secundaria. Según dicho servidor, la proteína *CdFur* presenta en su dominio N-terminal cuatro hélices alfa. El dominio C-terminal aparece constituido tanto por hojas beta como hélices alfa. La zona entre ambos dominios, se muestra como una región desplegada con mayor contenido en hojas beta lo que conllevaría gran flexibilidad para esta zona. El par de cisteínas $C_{101}KNC_{104}$ se situaría entre dos hebras mientras que el par $C_{141}DEC_{144}$ está situado en el extremo N-terminal de una hélice alfa (figura 64). Este plegamiento coincidiría con la distribución de elementos de estructura secundaria que presentan otros homólogos *Fur* ya cristalizados (Pohl *et al.*, 2003; Dian *et al.*, 2011).

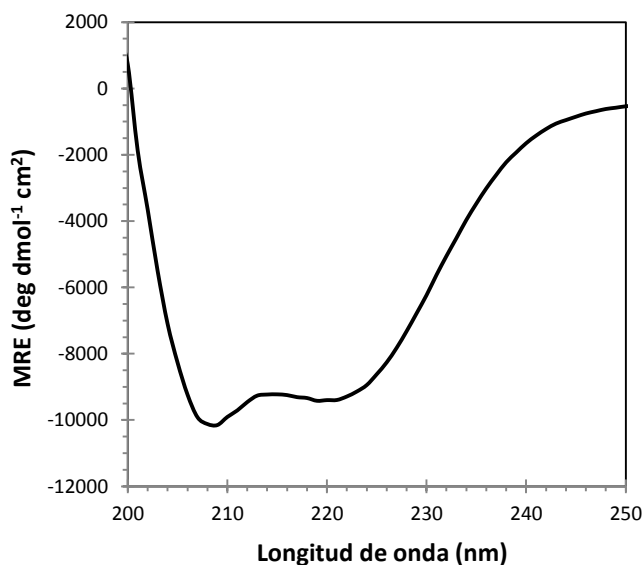


Figura 65. Espectro de dicroísmo circular de la proteína recombinante CdFur. En la figura se muestra el espectro de DC en el ultravioleta lejano (200-250 nm) de la proteína CdFur WT a una concentración de 20 μ M. Los ensayos se realizaron utilizando una cubeta de cuarzo de 0,1 cm a 25 $^{\circ}$ C y un espectropolarímetro Chirascan de Applied Photophysics.

Las medidas en el ultravioleta lejano de los diversos mutantes (200-250 nm), mostraron sendos mínimos a 209 nm y 222 nm y forma semejante a la de la proteína nativa (figura 66). Se podría concluir que las mutaciones introducidas no afectaban de forma relevante al plegamiento de la proteína.

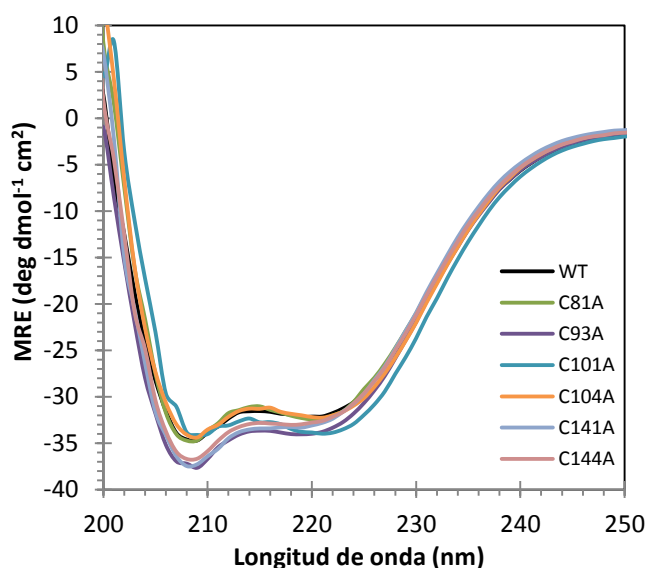


Figura 66. Espectros de dicroísmo circular en el UV lejano de la proteína CdFur WT y sus mutantes de cisteína. En la figura se muestran los espectros de DC en el ultravioleta lejano (200-250 nm) realizados en una cubeta de 0,1 cm a una concentración final de 20-25 μ M en tampón 50 mM Tris/HCl pH 8 a 25 $^{\circ}$ C. Para la realización de los espectros se utilizó un espectropolarímetro Chirascan de Applied Photophysics.

4.2.4. Residuos de cisteína responsables de la actividad de CdFur

Puesto que los mutantes no parecían mostrar plegamiento significativamente diferente a la especie silvestre, se analizó la actividad de todos ellos mediante ensayos de retardo en gel

con el fin de determinar si alguna de las cisteínas era importante en la interacción de la proteína con el DNA, dada la necesidad de poder reductor.

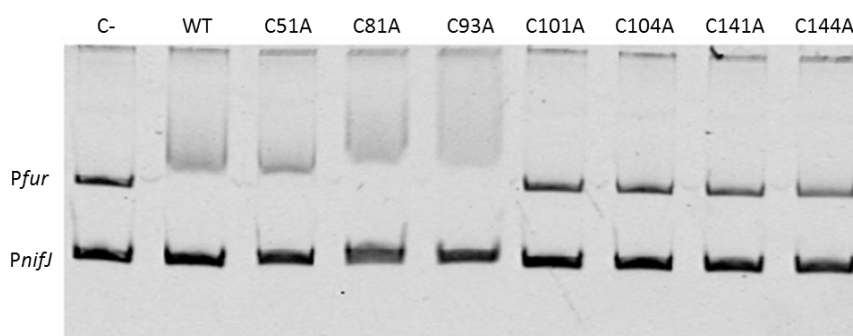


Figura 67. Análisis de la actividad de unión al DNA de los mutantes de cisteína de *CdFur* mediante ensayos de retardo en gel de poliacrilamida al 8 %. Se incubaron 700 nM de cada proteína con 50 ng del promotor *Pfur* junto a 50 ng del promotor inespecífico *PnifJ* en un tampón de unión cuya composición al 1x era: 20 mM Tris/HCl pH 8, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 % glicerol, 0,05 mg/ml BSA, 10 mM DTT, 200 μM EDTA. C-: corresponde al control negativo (sin proteína). Sobre cada carril se indica qué proteína se ensayó. La electroforesis se desarrolló en un tampón de composición 25 mM Tris/HCl pH 8, 190 mM glicina, 10 mM EDTA durante 2 horas y 15 minutos a 95 V.

Tal como se muestra en la figura 67, en las condiciones estándar de actividad determinadas para la proteína nativa, ninguno de los mutantes de las cisteínas pertenecientes a los dos motivos CXXC presentaron actividad. El resto de mutantes (los de los residuos C₅₁, C₈₁ y C₉₃) mostraron actividad comparable a la proteína nativa. C₅₁ se localiza en el extremo N-terminal que es el dominio de unión al DNA por lo que aparentemente, esta cisteína no estaría implicada directamente en la interacción con el DNA ya que su ausencia no afecta a la actividad de la proteína. Los residuos C₈₁ y C₉₃, que se localizan, uno cerca y otro en la región bisagra entre los extremos N-terminal y C-terminal, tampoco parecen estar implicados directamente en la unión con el DNA.

Por otro lado, se analizó la actividad de todas las proteínas mutantes variando las condiciones óptimas de unión al DNA y ensayando aquellas en las que la proteína nativa no presentó actividad *in vitro*. Esto es, la ausencia de poder reductor o la presencia de metal. De esta forma, era posible valorar si alguno de estos residuos estaba implicado en la inactivación de la proteína.

4.2.4.1. Residuos importantes para el estado redox de *CdFur*

Como se observa en la figura 68, la ausencia de DTT afectó a la actividad de la proteína *CdFur* nativa que mostraba sólo un ligero retardo lo que indicaba cierta actividad residual (carril WT) en comparación con la actividad mostrada en presencia de DTT (figura 67, carril WT). La ausencia de poder reductor también afectó a la actividad de los mutantes C51A y C93A, que habían resultado ser activos en las mismas condiciones que la proteína nativa. Sin embargo, el mutante del residuo C₈₁ resultó ser activo. Esto sugiere que para que la proteína

sea activa, algún puente disulfuro debe reducirse y en su formación está implicada esta cisteína ya que en ausencia de este aminoácido no se precisa la adición de DTT para detectar actividad.

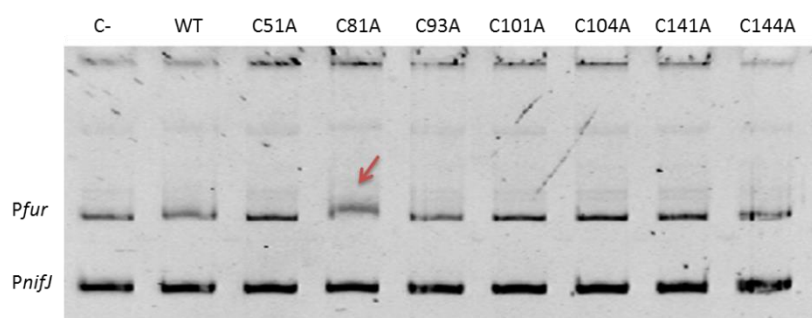


Figura 68. Identificación de residuos de cisteína importantes para el estado redox de *CdFur* mediante ensayos de retardo en gel de poliacrilamida al 8 % en ausencia de DTT. Se incubaron 700 nM de cada proteína con 50 ng del promotor *Pfur* junto a 50 ng del promotor inespecífico *PnifJ* en un tampón de unión cuya composición al 1x era: 20 mM Tris/HCl pH 8, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 % glicerol, 0,05 mg/ml BSA, 200 μM EDTA. C-: corresponde al control negativo (sin proteína). Sobre cada carril se indica la proteína ensayada. La electroforesis se desarrolló en un tampón de composición 25 mM Tris/HCl pH 8, 190 mM glicina, 10 mM EDTA durante 2 horas y 15 minutos a 95 V.

4.2.4.2. Residuos importantes para la unión al metal regulador

Como se ha descrito en el capítulo anterior, la presencia de metal inhibía la actividad de unión al DNA de *CdFur in vitro* (figura 52). Para estudiar si alguno de los residuos de cisteína estaba implicado en la unión al metal regulador, se realizó un ensayo de retardo en gel con todos los mutantes añadiendo a la mezcla de reacción Mn²⁺.

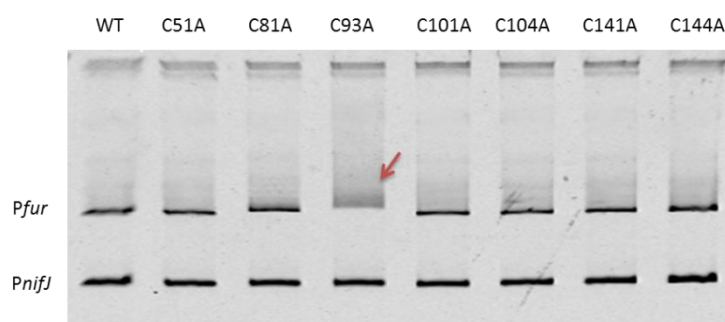


Figura 69. Identificación de residuos de cisteína de *CdFur* importantes para la unión a metal mediante ensayos de retardo en gel de poliacrilamida al 8 % en presencia de metal regulador. Se incubaron 700 nM de cada proteína con 50 ng del promotor *Pfur* junto a 50 ng del promotor inespecífico *PnifJ* en un tampón de unión cuya composición al 1x era: 20 mM Tris/HCl pH 8, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 % glicerol, 0,05 mg/ml BSA, 10 mM DTT, 1 mM Mn²⁺. Sobre cada carril se indica la proteína ensayada. La electroforesis se desarrolló en un tampón de composición 25 mM Tris/HCl pH 8, 190 mM glicina (sin EDTA) durante 2 horas y 15 minutos a 95 V.

Como se observa en la figura 69, el mutante C93A presentó actividad de unión al DNA en presencia de Mn^{2+} , lo que no ocurrió con ninguno de los demás mutantes. Esto sugiere que C_{93} está implicada en la coordinación del metal regulador. En el mutante, al faltar ese residuo, el metal no podría unirse correctamente en el sitio regulador y la proteína sería activa. El residuo C_{93} se localiza en la región bisagra entre los dominios N-terminal y C-terminal y se encuentra justo delante del motivo rico en histidinas. Ese motivo, altamente conservado en las proteínas Fur, es un potencial sitio de unión a metal (figura 40). Este resultado sugiere que o bien el residuo C_{93} está directamente implicado en la unión del metal regulador o su presencia facilita la coordinación del metal en el sitio regulador.

4.2.5. Análisis de la oligomerización en *CdFur*

La tendencia a la oligomerización es un aspecto relevante de las proteínas de unión a DNA (Funnell and Crossley, 2012) y el estado de oxidación de los residuos de cisteína de una proteína puede determinar su estado de oligomerización a través de la formación de puentes disulfuro. Dado que *CdFur* posee siete cisteínas y parece evidente que éstas juegan un importante papel al menos en su actividad, se analizó primero cómo afectaba los distintos estados de oxidación de *CdFur* nativa en la oligomerización y, posteriormente, se analizaron los mutantes de cisteína con el fin de identificar los posibles residuos directamente implicados en dicho proceso.

4.2.5.1. Efecto del estado redox de *CdFur* en la oligomerización

Mediante electroforesis desnaturizante se estudió la participación de puentes disulfuro intermoleculares en el proceso de oligomerización *in vitro*, tratando la proteína con el agente reductor de puentes disulfuro DTT para obtener el estado reducido o con el agente oxidante H_2O_2 para obtener el estado totalmente oxidado (figura 70).

En el carril 2 de la figura 70 se observa que en ausencia de agente reductor, la proteína *CdFur* está constituida por una mezcla heterogénea de especies proteicas. En esta mezcla, predomina la forma monomérica con una pequeña cantidad de dímero. La especie monomérica se resuelve en dos bandas aproximadamente de la misma intensidad (banda 1 y banda 2) con distinta movilidad electroforética. La masa molecular de ambas bandas está en torno a 19,5 kDa y se corresponde con el valor teórico calculado para el monómero de la proteína *CdFur* con la cola de histidinas (19750 Da).

Con el fin de cuantificar la relación monómero-dímero, se utilizó el programa Multi-Analyst del equipo de captura de imágenes GelDoc 2000 (Bio-Rad). Este programa hace una aproximación ponderando mediante densitometría, las bandas teñidas con azul de Coomassie presentes en el gel de poliacrilamida. Se estimó que la solución de proteína en condiciones reductoras estaba formada por un 90 % de especie monomérica y un 10 % de dímero (figura 70, carril 2). En la solución de proteína purificada, apenas se observan especies oligoméricas de mayor masa molecular.

Cuando la proteína se trató con DTT (carril 3), se transformó prácticamente en su totalidad en una única banda correspondiente al monómero con mayor movilidad electroforética (banda 2). Esto indicaría por un lado, que la existencia de dos especies monoméricas se debe a la presencia de uno o varios puentes disulfuro intramoleculares en una de ellas: la banda 1, correspondiente a la de menor movilidad electroforética, sería la forma más oxidada mientras que la banda 2, correspondería a la forma reducida. Y por otro lado, que los dímeros presentes en la solución se producen por uniones entre monómeros de los que son responsables puentes disulfuro intermoleculares.

En cambio, cuando *CdFur* se expuso a un agente oxidante como el H_2O_2 (carril 4) se observó un aumento tanto en la formación de dímeros como de especies moleculares discretas de mayor masa molecular: trímeros, tetrámeros, etc. Además se observó la formación de un oligómero de alta masa molecular y la desaparición de la forma monomérica reducida (banda 2) quedando una única banda en el monómero (banda 3). Este proceso de oxidación resultó ser reversible, puesto que al reducir con DTT la proteína oxidada previamente con H_2O_2 , se produjo la transformación de gran parte de las especies oxidadas en principalmente la forma monomérica de mayor movilidad electroforética (carril 5).

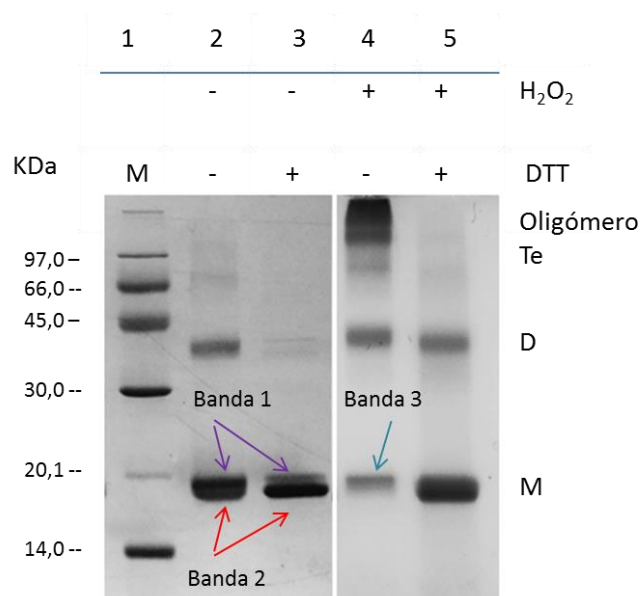


Figura 70. Efecto de la oxidación-reducción en el estado de oligomerización de *CdFur*. En cada carril se cargaron 4 μg de proteína *CdFur* en un volumen final de 10 μl . Carril 2: control negativo (proteína *CdFur* sin tratar). Carril 3: *CdFur* incubada con 10 mM DTT durante 10 minutos. Carril 4: proteína incubada con 10 mM H_2O_2 durante 10 minutos. Carril 5: la proteína tratada con H_2O_2 incubada posteriormente con 10 mM DTT durante 10 minutos. Todas las muestras se sometieron a hervido durante 5 minutos en un tampón de carga sin agentes reductores antes de ser cargadas en el gel. A la izquierda se muestran las masas moleculares del marcador. A la derecha se indica el tamaño correspondiente al monómero, dímero, trímero, tetrámero y oligómero de alta masa molecular.

4.2.5.2. Efecto de la oxidación-reducción de *CdFur* en la actividad

Con el fin de estudiar si la reversibilidad del proceso de oxidación-reducción afectaba a la actividad de la proteína, se trató *CdFur* con DTT y/o H_2O_2 , analizando en este caso su capacidad de unión al DNA mediante ensayos de retardo en gel (figura 71).

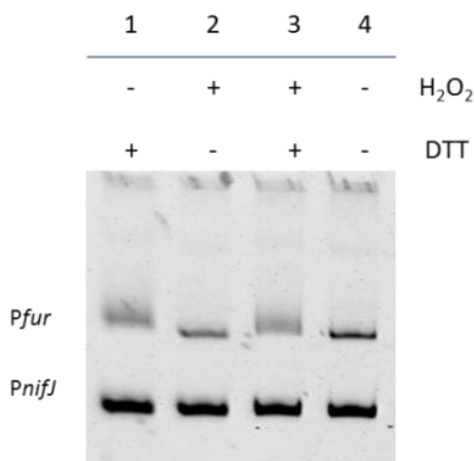


Figura 71. Efecto de la oxidación-reducción en la actividad de unión al DNA de *CdFur* mediante ensayo de retardo en gel de poliacrilamida al 8 %. Se incubó la proteína *CdFur* a una concentración final de 700 nM con 50 ng de *Pfur* y 50 ng del promotor inespecífico *Pnifl*. Se utilizó un tampón de unión cuya composición al 1x era: 20 mM Tris/HCl pH 8, 5 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 5 % glicerol, 0,05 mg/ml BSA, 200 μ M EDTA. Carril 1: corresponde al control positivo incubando la proteína con 10 mM DTT. Carril 2: proteína incubada con 10 mM H_2O_2 durante 10 minutos. Carril 3: la proteína tratada con H_2O_2 incubada posteriormente con 10 mM DTT durante 10 minutos. Carril 4: control negativo (sin proteína). La electroforesis se desarrolló en un tampón de composición 25 mM Tris/HCl pH 8, 190 mM glicina y 10 mM EDTA durante 2 horas y 15 minutos a 95 V.

Como ya se ha mostrado, para que la proteína sea activa es indispensable la presencia de poder reductor (figuras 51 y 67). Además, como se observa en la figura 71, la oxidación inactivó la proteína (carril 2) pero al igual que pasaba con la oligomerización, es un proceso reversible puesto que el posterior tratamiento con DTT hizo que *CdFur* recuperara parcialmente su actividad (carril 3). Esto confirmaría que la actividad de *CdFur* responde a cambios redox en el entorno.

En base a estos resultados y a los de oligomerización descritos anteriormente se deduce que: 1) el tratamiento con DTT es necesario para convertir toda la proteína en una única forma y coincide que es la condición necesaria para que la proteína sea activa; 2) la actividad residual que muestra la proteína en ausencia de DTT puede deberse a la isoforma reducida que está presente en la mezcla heterogénea de proteína; 3) la proteína es inactiva en estado completamente oxidado puesto que se forma un oligómero de gran masa molecular cuya constitución está mediada por la formación de puentes disulfuro intermoleculares; 4) la proteína responde a un proceso redox que modula su actividad.

4.2.5.3. Estudio de la oligomerización en los mutantes de *CdFur*

Puesto que la proteína formaba oligómeros al oxidarse, se llevaron a cabo ensayos homólogos a los realizados con la proteína nativa con todos los mutantes de cisteína con el propósito de determinar el papel que podrían tener estos residuos en el proceso de oligomerización (figura 72).

En ausencia de poder reductor (figura 72A), los mutantes de las cisteínas C_{51} , C_{81} y C_{93} mostraron un comportamiento similar al de la proteína nativa *CdFur*: mezcla heterogénea de proteína constituida principalmente por dos isoformas y una pequeña fracción de dímero. En cambio, las soluciones de proteína de los mutantes de cisteína de los dos motivos CXXC, parecían estar constituidas mayoritariamente por una especie oligomérica de alta masa molecular y una cantidad muy pequeña de monómero. Además, esta cantidad de monómero parecía estar formada por una única especie.

En la figura 72B se observa que para todos los mutantes, al igual que ocurría con la proteína nativa, el monómero fue la forma mayoritaria detectada cuando el agente reductor DTT se encontraba en suficiente exceso. Puesto que el DTT es un agente reductor de puentes disulfuro, los oligómeros observados en ausencia de poder reductor para los mutantes C_{101A} , C_{104A} , C_{141A} y C_{144A} (figura 72A) son debidos a la formación de puentes disulfuro intermoleculares. Sin embargo, como se ha descrito en el apartado 4.2.4. estos mutantes no eran activos en presencia de poder reductor (figura 67) por lo que es probable que hayan experimentado algún cambio conformacional responsable de la inactividad.

La adición de peróxido de hidrógeno en concentración 10 mM como agente oxidante provocó en los mutantes C_{51A} , C_{81A} y C_{93A} la aparición de múltiples bandas correspondientes a monómeros, dímeros, trímeros, tetrámeros y especies de mayor masa molecular (figura 72C). Es lo mismo que ocurría en la proteína *CdFur* nativa (figura 70). Sin embargo, en los mutantes de las cisteínas C_{101} , C_{104} , C_{141} y C_{144} apenas hubo cambio con respecto a las proteínas sin tratar salvo que la pequeña fracción de monómero desapareció casi por completo y que no se detectó presencia de dímero. Esto confirmaría que estas proteínas se obtienen en un estado oxidado y que por tanto estos residuos son importantes para mantener la estructura nativa de la proteína. Cabe destacar que en el mutante del residuo C_{141} sigue habiendo monómero por lo que este mutante parece tener una conformación distinta que hace que migre de forma diferente en la electroforesis con respecto al resto de mutantes de los motivos CXXC. Por último, al igual que ocurría con la proteína nativa, el proceso de oxidación también resultó ser reversible para todos los mutantes (figura 72D).

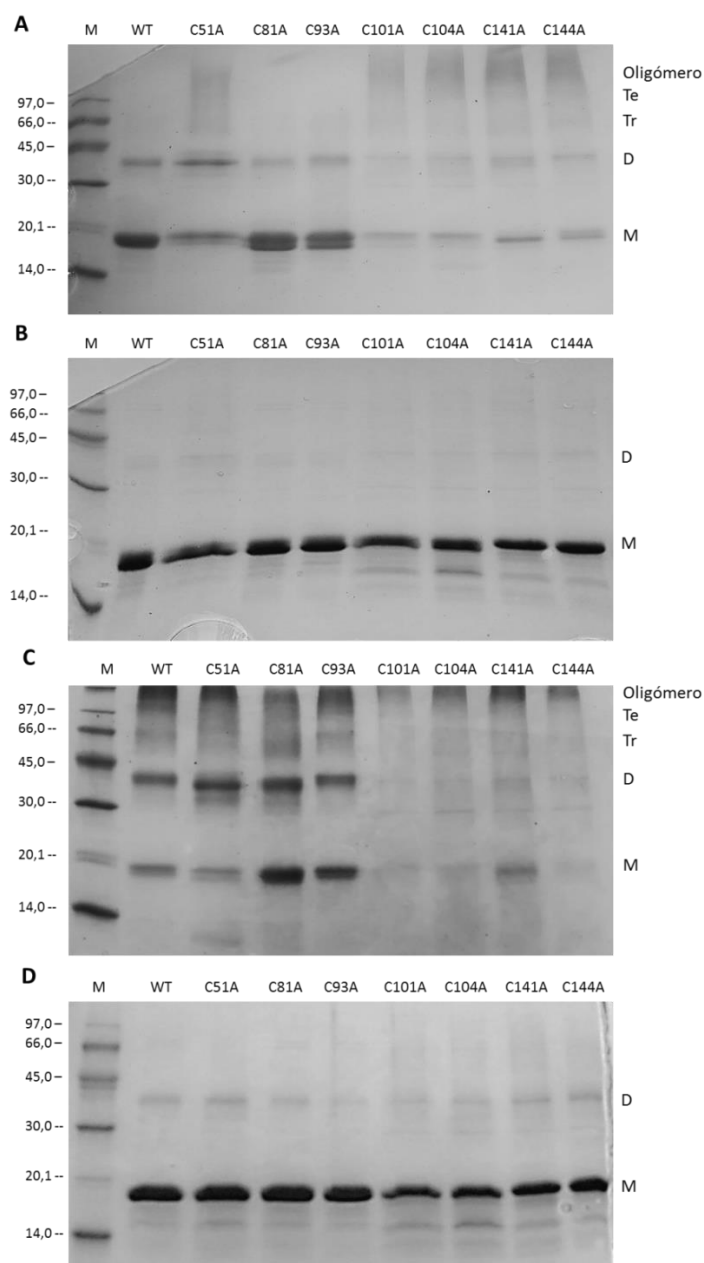


Figura 72. Efecto de la oxidación-reducción en el estado de oligomerización de los mutantes simples de cisteína de *CdFur*. Se especifica sobre cada carril qué proteína se ha ensayado. En cada gel se cargaron 4 μg de cada proteína en un volumen final de 10 μl y las muestras fueron sometidas a los siguientes tratamientos: A) Proteínas sin agentes reductores ni oxidantes. B) Tratamiento con 10 mM DTT durante 10 minutos. C) Tratamiento con 10 mM H_2O_2 durante 10 minutos. D) Tratamiento con 10 mM H_2O_2 y posteriormente con 10 mM DTT. Todas las muestras se sometieron a hervido durante 5 minutos en un tampón de carga sin agentes reductores antes de ser cargadas en el gel. A la izquierda se muestran las masas moleculares del marcador. A la derecha se indica el tamaño correspondiente al monómero, dímero, trímero, tetrámero y oligómero de alta masa molecular.

Puesto que las cisteínas C_{101} , C_{104} , C_{141} y C_{144} forman parte de sendos motivos CXXC, se analizó el efecto del proceso de oxidación-reducción en los mutantes dobles $\text{C}_{101}/104\text{A}$ y $\text{C}_{141}/144\text{A}$ (figura 73).

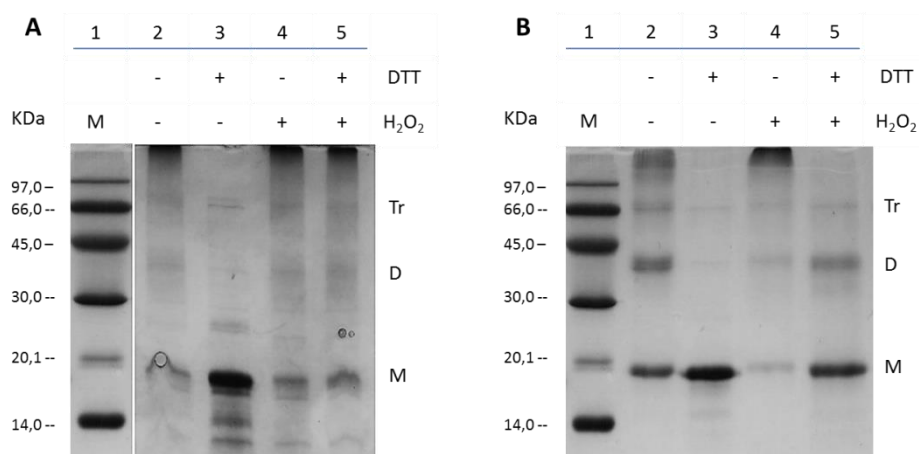


Figura 73. Efecto de la oxidación-reducción en el estado de oligomerización de los mutantes dobles de cisteína de CdFur. A) Mutante C101/104A. B) Mutante C141/144A. En cada carril se cargaron 4 μg del mutante de CdFur correspondiente en un volumen final de 10 μl . Carril 1: control negativo (proteína sin tratar). Carril 2: proteína incubada con 10 mM DTT durante 10 minutos. Carril 3: proteína incubada con 10 mM H_2O_2 durante 10 minutos. Carril 4: la proteína tratada con H_2O_2 incubada posteriormente con 10 mM DTT durante 10 minutos. Todas las muestras se sometieron a hervido durante 5 minutos en un tampón de carga sin agentes reductores antes de ser cargadas en el gel. A la izquierda se muestran las masas moleculares del marcador. A la derecha se indica el tamaño correspondiente al monómero, dímero, trímero y tetrámero.

Curiosamente, tal como se observa en la electroforesis de la figura 73A, al quitar el primer motivo CXXC, la proteína presentó la misma tendencia a oligomerizar que previamente se había observado para los mutantes simples de los residuos C_{101} y C_{104} (figura 72A) mostrando una mezcla de oligómeros solubles de alta masa molecular. En cambio, el mutante doble C141/144A presentó un comportamiento diferente y más parecido a la proteína nativa (figura 73B). En este caso, la muestra era una mezcla heterogénea de proteína constituida por monómero, dímero y oligómeros de mayor tamaño (carril 2). Este resultado sugiere que una o ambas cisteínas del primer motivo CXXC (C_{101} y C_{104}) son necesarias para que la proteína nativa pueda formar dímeros *in vitro*, ya sea por su implicación en la formación de los mismos o porque de algún modo contribuyan en la conformación de la proteína que dimeriza.

4.2.6. Análisis del estado redox de las cisteínas de CdFur

4.2.6.1. Determinación del número de cisteínas libres

Dado que el estado redox de las cisteínas de CdFur parece ser importante tanto para la oligomerización de la proteína como para su actividad, se cuantificaron las cisteínas libres mediante el método de Ellman (Materiales y Métodos, apartado 3.5.3.). En este ensayo, el reactivo DTNB reacciona con los residuos de cisteína reducidos, produciendo un derivado cuya formación puede seguirse espectrofotométricamente. Este protocolo se aplicó tanto con la proteína CdFur recombinante como con los distintos mutantes de cisteína.

El número de cisteínas libres en la especie nativa era $2,26 \pm 0,09$. Después de desnaturalizar la proteína con cloruro de guanidinio 6 M, quedaron libres $4,35 \pm 0,11$ cisteínas (figura 74). Este comportamiento sugiere que dos cisteínas se encuentran enterradas en el interior de la estructura de la proteína o implicadas en algún tipo de interacción que se destruye en presencia del agente desnaturalizante, por lo que no pueden reaccionar con el DTNB. Teniendo en cuenta que la proteína nativa posee un número impar de residuos de cisteína (7), y que como se ha descrito en el apartado 4.2.5.1. en solución, es fundamentalmente monomérica con dos tipos de monómero (prácticamente al 50 %) que difieren entre sí por la presencia de uno o más puentes disulfuro, es probable que las cuatro cisteínas libres que se valoran con el reactivo de Ellman sean consecuencia de un diferente contenido en el número de puentes disulfuro presentes en las dos especies de monómero. Así pues, una de las isoformas del monómero tendría 5 cisteínas libres y la otra tres, dando un promedio de cuatro cisteínas libres.

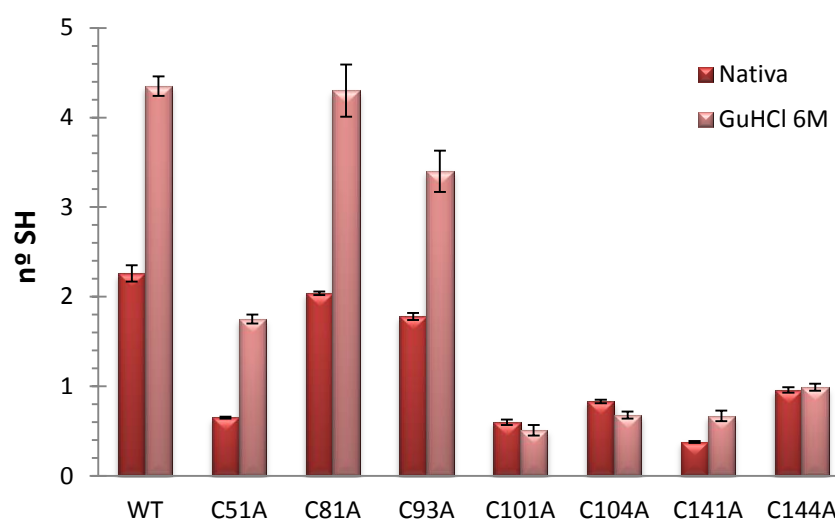


Figura 74. Medida del contenido en cisteínas libres de la proteína *CdFur* y los mutantes de cisteína. Cada proteína se ensayó a una concentración final de 10-20 μ M en tampón 100 mM Tris/HCl pH 8 o 100 mM Tris/HCl pH 8, 6 M GuHCl junto con 100 μ M del reactivo DTNB. Tras dejar la mezcla 20 minutos se midió la absorbancia a 412 nm. Las barras representan la media de tres experimentos y las desviaciones estándar se muestran con las barras de error.

El resultado de la determinación de cisteínas libres por este método para los mutantes indica que la ausencia de cualquiera de las cisteínas de los motivos CXXC deja libres un número de cisteínas < 1 en condiciones desnaturalizantes. Esto concuerda con el resultado mostrado en la figura 72 que indicaba que las soluciones de los mutantes C101A, C104A, C141A, C144A estaban compuestas por una mezcla de oligómeros solubles de alta masa molecular. Además, este comportamiento sugiere que en la proteína nativa estos residuos desempeñan funciones importantes en el mantenimiento de la forma monomérica y en cierto modo están relacionados entre ellos. El resto de mutantes presentó un comportamiento más próximo al de la proteína nativa.

4.2.6.2. Ensayos de alquilación

La modificación de grupos tiol libres *in vitro* mediante alquilación con el compuesto AMS se realizó para intentar identificar las cisteínas implicadas en la formación de puentes disulfuro en la proteína CdFur recombinante. Cuando el agente alquilante AMS reacciona con residuos de cisteína libres presentes en una proteína, la masa molecular de ésta aumenta en 540 Da por molécula de AMS incorporada (figura 75) (Denoncin *et al.*, 2013). La cuantificación se realiza en base a la migración de las especies modificadas en un gel desnaturalizante. Las proteínas recombinantes se incubaron en un tampón redox con diferentes cantidades de DTT reducido para obtener proteínas completamente oxidadas o reducidas (figura 76).

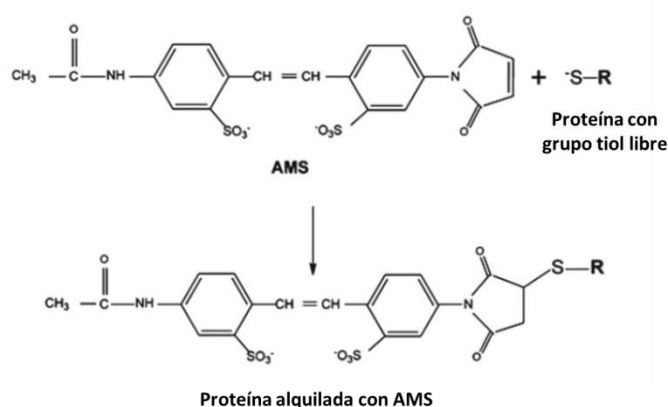


Figura 75. Reacción entre el AMS y cisteínas libres. El agente alquilante AMS reacciona con los grupos tiol de cisteínas reducidas para formar un aducto. Imagen tomada de Denoncin *et al.*, 2013.

Para obtener la masa molecular exacta de cada banda, se representó el Rf correspondiente a cada una de las bandas de los patrones de masa molecular con respecto a su masa. Así, se obtuvo una recta que permitió determinar el desplazamiento de las bandas de proteína alquiladas con AMS y en consecuencia su peso. Teniendo en cuenta que cada molécula de AMS incrementa la masa molecular de la proteína en aproximadamente 0,5 kDa, se calculó el número de moléculas de AMS que fue capaz de incorporar cada especie de proteína.

En la figura 76 se muestra el resultado de la electroforesis en la que se resolvieron las muestras tras el ensayo de alquilación. Cuando la proteína CdFur control se trató con el agente alquilante se observó un cambio en la movilidad electroforética correspondiente a 2,7 kDa. Esto indicaba que era capaz de unir 5 moléculas de AMS, es decir, presentaría 5 cisteínas libres. Este resultado indicaría que en el monómero hay dos cisteínas que estarían formando un puente disulfuro como reveló la determinación de cisteínas libres con el reactivo DTNB (figura 74). En estado reducido, CdFur unía el mismo número de moléculas por lo que este resultado indicaría que hay un puente disulfuro que permanece formado aun en condiciones reductoras. En estado oxidado, la proteína sólo incorporaba una molécula de AMS

observándose un aumento de aproximadamente 0,5 kDa lo que indicaría que se pueden llegar a formar hasta 3 puentes disulfuro intramoleculares.

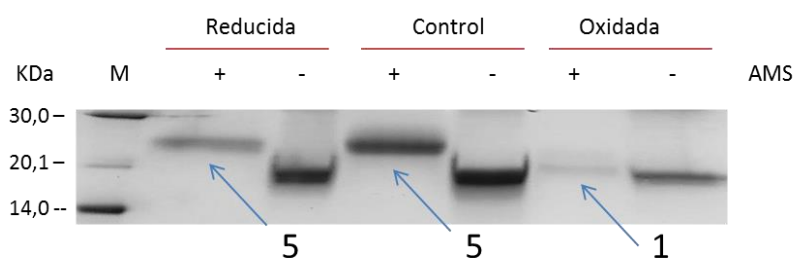


Figura 76. Análisis del estado redox de las cisteínas mediante ensayos de alquilación con AMS. Las proteínas *CdFur* reducida y oxidada se obtuvieron por incubación en un tampón redox con DTT_{red} o DTT_{ox}, respectivamente. A la proteína control no se le añadió nada. A continuación, las proteínas precipitadas se alquilaron con AMS antes de ser resueltas en un gel de SDS-PAGE al 12,5 % y posterior tinción con azul de Coomassie. Los números con flechas indican la cantidad de moléculas de AMS añadidas a cada fracción de las proteínas y, en consecuencia, el número de residuos de cisteína libres.

Con el fin de determinar qué residuos de cisteína eran los responsables del puente disulfuro presente en la proteína nativa, se realizó el ensayo de alquilación con los mutantes de cisteína. Para simplificar, se muestra el resultado de los mutantes simples pertenecientes a los motivos CXXC ya que el resto de mutantes simples mostraron un comportamiento similar a la proteína nativa (figura 77).

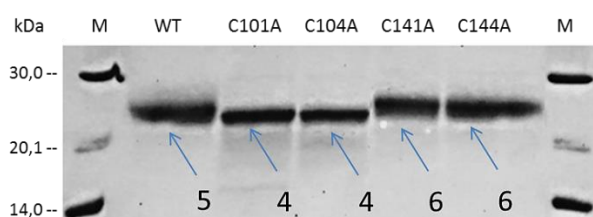


Figura 77. Análisis del ensayo de alquilación con AMS en diversos mutantes simples de cisteína. M: marcador de masas moleculares, Las proteínas *CdFur* WT, C101A, C104A, C141A y C144A se incubaron en un tampón redox con 10 mM DTT_{red} para obtenerlas en estado reducido. A continuación, las proteínas precipitadas con TCA se alquilaron con AMS antes de ser resueltas en un gel de SDS-PAGE al 12,5 % y posterior tinción con azul de Coomassie. Los números con flechas indican la cantidad de moléculas de AMS añadidas a cada fracción de las proteínas y, en consecuencia, el número de residuos de cisteína libres.

Como se observa en la figura 77 los mutantes C101A y C104A presentaron una masa molecular ligeramente inferior a la que se observó en la proteína nativa. La diferencia de masa corresponde a 0,5 kDa, es decir, ambos mutantes sólo unirían 4 moléculas de AMS. Teniendo en cuenta que la proteína nativa en estado reducido presentaba 5 cisteínas

libres y un puente disulfuro, con este ensayo se podría descartar que los residuos C₁₀₁ y C₁₀₄ fueran los que intervienen en la formación de ese puente disulfuro. En cambio, los mutantes C141A y C144A presentaron una masa molecular con respecto a la proteína nativa incrementada en 0,5 kDa. Este resultado sugiere que serían los residuos C₁₄₁ y C₁₄₄ los que están formando un puente disulfuro en la proteína CdFur nativa ya que al faltar uno de ellos, la proteína es capaz de incorporar 6 moléculas de AMS, 1 molécula más que la proteína nativa. En la siguiente tabla se muestra, a modo de resumen, el número de cisteínas libres presente en cada una de las proteínas analizadas.

Tabla 19. Resumen del número de cisteína totales, libres y formando puente disulfuro tras el análisis de los ensayos de alquilación.

Proteína	nº cisteínas totales	nº -SH	nº S-S
WT	7	5	1
C101A	6	4	1
C104A	6	4	1
C141A	6	6	-
C144A	6	6	-

Analizando conjuntamente los resultados obtenidos sobre la oligomerización de los mutantes de cisteína y el estado redox de estos residuos se puede deducir que: 1) las dos isoformas de la proteína nativa se diferencian en un puente disulfuro (reducida-activa y oxidada-inactiva); 2) ambas formas poseen un puente disulfuro que no se deshace en condiciones reductoras y que puede estar formado por los residuos C₁₄₁ y C₁₄₄; 3) C₈₁ parece formar parte del puente disulfuro responsable de la inactivación de la proteína (apartado 4.2.4.1); 4) la otra cisteína responsable de la formación de ese puente disulfuro podría pertenecer al motivo C₁₀₁XXC₁₀₄ ya que los mutantes de los residuos C₅₁ y C₉₃ presentan el mismo comportamiento que la proteína nativa; 5) además, las cisteínas del primer motivo parecen ser importantes para la conformación activa de la proteína ya que si falta alguna de ellas se produce algún cambio conformacional importante que hace que aún en presencia de DTT, y por tanto estado monomérico, el mutante no presente actividad.

4.2.7. Análisis de la presencia de zinc en la proteína CdFur

Una de las características de las proteínas Fur es su capacidad para coordinar metal. Algunos homólogos pueden incluso coordinar tres átomos de zinc (Dian *et al.*, 2011). En varios casos, uno de esos átomos de zinc, al que se le ha asignado un papel estructural, está coordinado por las cisteínas de motivos CXXC homólogos a los que presenta la proteína CdFur (Vitale *et al.*, 2009). En otros sin embargo, la coordinación del zinc se produce además de por residuos de cisteína, por residuos de tipo aspártico, glutámico o histidina (Pohl *et al.*, 2003). Dado que la proteína Fur de *C. difficile* posee siete residuos de cisteína, cuatro de ellos dispuestos en sendos motivos CXXC, se analizó si dicho homólogo poseía zinc y, en caso afirmativo, si alguna de las cisteínas participaba en su coordinación.

4.2.7.1. Detección cualitativa de zinc en *CdFur*

Para detectar la presencia de zinc en la proteína nativa recombinante *CdFur*, como primera aproximación, se utilizó el compuesto PAR [4-(2-pyridylazo) resorcinol], un agente que reacciona de forma específica con los iones de zinc. La proteína se sometió a una electroforesis desnaturizante y el gel se tiñó con una solución de este compuesto. Tras la oxidación del complejo zinc-PAR con peróxido de hidrógeno se reveló la presencia de zinc en la proteína *CdFur* a través de la aparición de una banda de color anaranjado (figura 78) (Lee and Helmann, 2006a).

En la figura 78 se muestra el mismo gel SDS-PAGE de la figura 70 (tinción con azul de Coomassie) teñido previamente con una solución de PAR. La aparición de bandas anaranjadas indicó la presencia de zinc en la proteína *CdFur* monomérica. En la proteína control (carril 2), se observaron dos bandas que corresponderían a las dos isoformas monoméricas redox de la proteína y por tanto, ambas contienen zinc (bandas 1 y 2). La proteína en estado reducido mostró una sola banda también con zinc (carril 3, banda 2). Sin embargo, el tratamiento con H_2O_2 hizo que la proteína perdiera el zinc (carril 4). En el gel teñido con Coomassie se observó que la proteína oxidada mostraba una única banda en el monómero (figura 70, carril 4 banda 3). Por último, al reducir la proteína oxidada previamente (carril 5), se observó la aparición de una única banda naranja indicando que *CdFur* era capaz de unir de nuevo zinc. De este ensayo se deduce que la forma reducida (figura 70, banda 2) de la proteína contiene zinc (figura 78, banda 2) mientras que la forma oxidada (figura 70, bandas 1 y 3) podría, en realidad, corresponder a dos isoformas que se diferencian en el contenido en zinc: la isoforma con zinc presente en la solución de proteína recombinante obtenida tras la purificación (banda 1) y la isoforma sin zinc que se obtiene tras oxidar la proteína (banda 3).

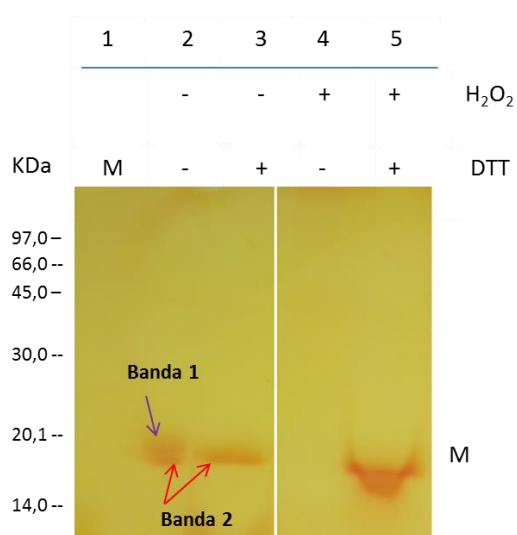


Figura 78. Detección de zinc por tinción con PAR mediante electroforesis desnaturizante. Se muestra el mismo gel SDS-PAGE al 15 % de la figura 70 (tinción con azul de Coomassie) teñido previamente con una solución de 25 mM Tris/HCl pH 8, 75 mM NaCl, 5 % glicerol, 500 μ M PAR durante 2 min en agitación suave y a temperatura ambiente. Para revelar la presencia de zinc se añadió a la tinción 50 mM H_2O_2 .

4.2.7.2. Determinación cuantitativa de zinc en CdFur

Una vez constatada la presencia de zinc en la proteína nativa CdFur, se determinó de forma cuantitativa su contenido mediante ICP-OES (*Inductively Coupled Plasma – Optical Emission Spectrometry*). Estos ensayos fueron realizados por el Servicio de Ionómica del CEBAS-CSIC (Murcia). Se analizaron muestras de la proteína nativa CdFur purificada con cola de histidinas y de la preparación donde se había eliminado. Además, se analizó proteína tratada durante toda la noche con 10 mM EDTA con el fin de determinar si el EDTA era capaz de eliminar el zinc. Hay que recordar que la presencia de EDTA, tanto en el tampón de unión como en el de electroforesis, es una de las condiciones indispensables para que la proteína CdFur mostrara actividad de unión al DNA *in vitro* (figura 51).

En la tabla 20 se muestran los resultados obtenidos. El análisis confirmó la presencia de zinc en la proteína CdFur en una proporción de $0,73 \pm 0,06$ moles de zinc por mol de proteína. El contenido en zinc de la proteína CdFur en la que se eliminó la cola de histidinas fue de $0,69 \pm 0,02$ moles de zinc por mol de proteína. Según estos datos, la cola de histidinas no afectaría al contenido en zinc. Por otro lado, tampoco el tratamiento con EDTA afectó a la presencia de zinc dando $0,65 \pm 0,05$ moles de zinc por mol de proteína. Esto vendría a confirmar que la forma activa de la proteína posee zinc y que se trataría de un zinc de tipo estructural ya que la necesidad de añadir un quelante para que la proteína muestre actividad de unión al DNA *in vitro* se debería a la necesidad de quelar el metal regulador.

Tabla 20. Determinación del contenido en metal mediante ICP-OES. En la tabla se muestra la concentración en mg/l (ppm) de zinc detectado en las diferentes soluciones de proteína analizadas. Esta técnica tiene un límite de detección de 0,01 ppm. Las muestras de proteína se enviaron disueltas en una solución comercial de ácido nítrico al 5 % en un volumen final de 10 ml. Teniendo en cuenta el volumen de muestra analizado, la masa molecular del metal y de la proteína, se calcula el número de moles de metal por mol de proteína. El resultado mostrado en la tabla es la media de tres medidas independientes junto con la desviación estándar.

	Análisis mediante ICP-OES		
	CdFur	CdFur(His)	CdFur + EDTA
mol Zn / mol proteína	$0,73 \pm 0,06$	$0,69 \pm 0,02$	$0,65 \pm 0,05$

Considerando los resultados de la determinación de zinc y teniendo en cuenta que tras la purificación se obtiene una mezcla heterogénea de proteína constituida por un 90 % monómero (dos isoformas) y un 10 % dímero que no presenta zinc, se puede concluir que: 1) las dos isoformas que componen el monómero y que se obtienen tras la purificación de CdFur contienen zinc en una relación de 1 átomo de zinc por monómero; 2) existe una isoforma oxidada que no presenta zinc ya que lo pierde tras la oxidación completa de la proteína; 3) puesto que tras la purificación no se obtiene una mezcla homogénea de proteína, esto explicaría el hecho de que el contenido en zinc tras la determinación sea <1 mol de zinc por mol de proteína.

4.2.7.3. Identificación de cisteínas implicadas en la coordinación del zinc

Con el propósito de determinar si alguno de los residuos de cisteína estaba implicado en la coordinación del zinc, y en concreto si se trataba de los residuos pertenecientes a los dos motivos CXXC, se analizó la presencia de zinc en todos los mutantes por ICP-OES (tabla 21). Además, con este propósito se analizaron los mutantes dobles de los dos motivos CXXC para asegurar que si el metal estaba coordinado por uno o los dos motivos, al quitar el motivo completo, el zinc carecería del entorno adecuado para poder unirse a la proteína.

En la tabla 21 se muestran los resultados obtenidos. La eliminación de los residuos C₅₁, C₈₁ y C₉₃ no afectó significativamente al contenido en zinc por lo que puede descartarse la implicación de estas cisteínas en la coordinación del metal. Al comparar el contenido en zinc de los mutantes de cisteína de los motivos CXXC, los mutantes C141A y C144A presentaron Zn y en el caso del mutante C141A la cantidad determinada fue próxima a la que contenía la proteína nativa. Teniendo en cuenta que, de acuerdo con los resultados descritos en el apartado 4.2.6.2., estos dos aminoácidos formarían un puente disulfuro intramolecular en la especie nativa, no es de extrañar que la ausencia de cada uno de estos aminoácidos de forma individual o simultánea no impida la unión de zinc. Sin embargo, en el caso de los mutantes C101A y C104A, el segundo mostró el menor contenido en zinc de todos los mutantes. La eliminación de ambos residuos simultáneamente indicó que la proteína no podía coordinar zinc. Así pues, estos resultados indican que *CdFur* une zinc pero a pesar de tener dos motivos CXXC el sitio de unión no es del tipo Cys₄Zn. Además, los resultados sugieren que los residuos C₁₀₁ y/o C₁₀₄ están implicados en la coordinación del zinc estructural.

Tabla 21. Determinación mediante ICP-OES del contenido en zinc de cada uno de los mutantes de cisteína de *CdFur*. Todas las muestras de proteína se enviaron disueltas en una solución comercial de ácido nítrico al 5 % en un volumen final de 10 ml. Teniendo en cuenta el volumen de muestra analizado, la masa molecular del metal y de la proteína, se calcula el número de moles de metal por mol de proteína. Cada muestra se analizó por duplicado en diferentes días. En la tabla se muestra la media de las dos determinaciones junto con la desviación estándar.

	mol Zn / mol proteína	
	MEDIA	SD
<i>CdFur</i> (His)	0,73	0,06
<i>CdFur</i>	0,69	0,02
C51A	0,45	0,01
C81A	0,81	0,07
C93A	0,67	0,05
C101A	0,29	0,02
C104A	0,11	0,03
C141A	0,51	0,00
C144A	0,37	0,02
C101/104A	0,09	0,00
C141/144A	0,27	0,01

4.2.7.4. La pérdida de zinc provoca oligomerización

Dado que la proteína *CdFur* contenía zinc y que los mutantes C101A y C104A tenían gran tendencia a oligomerizar (apartado 4.2.5.3.), se estudió el efecto que la pérdida de zinc causaba en la proteína nativa. Para ello se utilizó TPEN, un agente quelante de metales divalentes con mayor especificidad para el zinc ($K_D = 2,6 \times 10^{-16}$ M). Tras tratar la proteína con TPEN, se analizó mediante electroforesis desnaturalizante el estado oligomérico de *CdFur* utilizando un agente de entrecruzamiento químico. Esta técnica permite visualizar la tendencia que tienen a interaccionar entre sí moléculas que se encuentran en solución, ya que en presencia de un agente de entrecruzamiento se forma un enlace covalente entre ellas sólo si estas se encuentran muy próximas.

Para estos ensayos se probaron dos agentes de entrecruzamiento: glutaraldehído y EDC (1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida). El glutaraldehído reacciona con los grupos amino de moléculas de proteína adyacentes formando un enlace covalente y funciona a pH ácido (Migneault *et al.*, 2004). La carbodiimida EDC forma un enlace amida entre grupos carboxilo (-COOH) y aminas primarias (-NH₂) y es adecuado para soluciones de tampón neutro-básico. Puesto que ninguna parte de su estructura química interviene en la formación del enlace final entre las moléculas conjugadas, las carbodiimidias se consideran agentes de reticulación carboxilo-amina de longitud cero. A menudo se incluye NHS (N-hidroxisuccinimida) en los protocolos de acoplamiento con EDC para mejorar la eficiencia o para crear un intermedio reactivo con aminas más estable (ThermoFischer Scientific).

Las reacciones de entrecruzamiento finalmente se realizaron con EDC y NHS ya que con glutaraldehído no se obtuvieron buenos resultados al encontrarse la proteína en un tampón a pH 8. Para ello, muestras de proteína control y proteína tratada con TPEN se incubaron con EDC y NHS, y después se sometieron a una electroforesis desnaturalizante en presencia o ausencia de agentes reductores (figura 79).

En los carriles 2 y 3 de la figura 79 se muestra el ensayo de entrecruzamiento de la proteína *CdFur* con y sin agente reductor. Cuando no había agente reductor (carril 3), aparecieron especies oligoméricas discretas: dímeros, trímeros y tetrámeros y estas especies coexistían en la solución de proteína junto con el monómero. En principio, la naturaleza de estas interacciones podría ser de tipo hidrofóbico, electrostático o por puentes disulfuro. Sin embargo, cuando se redujo previamente la proteína con DTT, el monómero fue la especie mayoritaria observándose una fracción muy pequeña de dímero y tetrámero (carril 2). Estos resultados indicarían que dichos oligómeros son originados por la formación de puentes disulfuro intermoleculares y que la moléculas de monómero en estado reducido apenas son capaces de interaccionar entre sí. En los carriles 4 y 5 se muestra el resultado del ensayo de entrecruzamiento al tratar la proteína con el quelante TPEN en ausencia o presencia de DTT, respectivamente. Al eliminar el zinc tras el tratamiento con TPEN (carril 4) se observó la aparición de oligómeros de alta masa molecular. De nuevo, la formación de esa especie se debía a la formación de puentes disulfuro intermoleculares ya que el tratamiento con DTT hizo que la proteína no oligomerizara (carril 5). De este ensayo se deduce que la pérdida de zinc induce la formación de especies oligoméricas de alta masa molecular del tipo de las observadas en los mutantes de cisteína C101A y C104A (figura 72A).

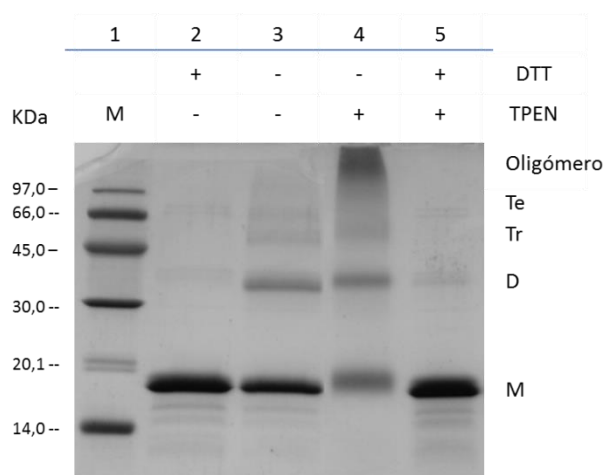


Figura 79. Análisis del efecto de la pérdida de zinc en CdFur mediante ensayos de entrecruzamiento químico. En un volumen final de 10 μ l se analizó la proteína CdFur a una concentración de 30 μ M. Carril 1: marcadores de masa molecular. Carril 2: CdFur con 10 mM DTT. Carril 3: proteína CdFur control. Carril 4: CdFur tratada con 2 mM TPEN. Carril 5: CdFur tratada con 2mM TPEN y 10 mM DTT. Todas las muestras fueron tratadas con NHS y EDC a una concentración final de 2 mM durante 30 minutos, en oscuridad y a temperatura ambiente. Posteriormente, se sometieron a hervido en un tampón de carga sin agentes reductores durante 5 minutos antes de ser cargadas en el gel. A la izquierda se muestran los pesos moleculares del marcador. A la derecha se indica el tamaño correspondiente al monómero, dímero, trímero y tetramero.

Dado que el zinc se coordina por una o las dos cisteínas del primer motivo CXXC (C_{101} y/o C_{104}), y que la ausencia de zinc hace que aumente de forma significativa la formación de oligómeros de alta masa molecular tanto en los mutantes simples C_{101A} , C_{104A} como en el mutante doble $C_{101/104A}$, podría pensarse que el zinc tiene un papel estructural y que su ausencia es responsable de la inactividad de la proteína. Sin embargo, como se observa en la figura 80, el mutante doble $C_{101/104A}$ presentó actividad de unión al DNA *in vitro* en las condiciones óptimas descritas para la proteína nativa a pesar de que carece de zinc (tabla 21). Así pues, aparentemente la función de este metal en la proteína es mantener modificadas a una de las cisteínas (C_{101} o C_{104}) evitando de este modo la formación de un posible puente disulfuro intramolecular observado en otros homólogos de Fur (Botello-Morte *et al.*, 2016). De esta forma, la otra cisteína del primer motivo CXXC queda libre para poder ejercer su función. En el mutante doble, al estar ausentes ambas cisteínas no es necesaria la presencia del zinc.

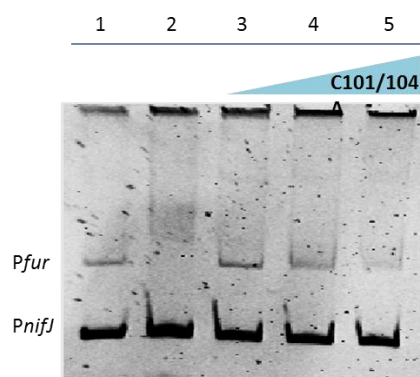


Figura 80. Prueba de actividad del mutante doble C101/104A mediante ensayos de retardo en gel de poliacrilamida al 8 %. Carril 1: control negativo (sin proteína). Carril 2: control positivo que corresponde a 700 nM de la proteína *CdFur* nativa. Carriles 3-5: cantidades crecientes de proteína C101/104A (100, 400 y 700 nM, respectivamente). Todas las muestras de proteína se incubaron con 50 ng del promotor *Pfur* junto a 50 ng del promotor inespecífico *PnifJ* en un tampón de unión cuya composición al 1x era: 20 mM Tris/HCl pH 8, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 % glicerol, 0,05 mg/ml BSA, 10 mM DTT. La electroforesis se desarrolló en un tampón de composición 25 mM Tris/HCl pH 8, 190 mM glicina y 10 mM EDTA durante 2 horas y 15 minutos a 95 V.

4.2.8. Modelos tridimensionales

Con el fin de interpretar los diferentes resultados experimentales obtenidos en la caracterización bioquímica de la proteína nativa *CdFur* y de los mutantes de cisteína y tratar de establecer un modelo de funcionamiento para la proteína nativa, se obtuvieron varios modelos tridimensionales de *CdFur* elaborados en base a estructuras ya resueltas de otros homólogos Fur. Concretamente, en colaboración con la Dra. Inmaculada Iruela (Estación Experimental de Aula Dei - CSIC) se obtuvieron modelos de *CdFur* a partir de las estructuras de Fur de *H. pylori* (figura 81), Fur de *V. cholerae* (figura 82), Zur de *E. coli* (figura 83) y Fur de *C. jejuni* (figura 84).

En la figura 81 se muestra el modelo de estructura de *CdFur* obtenido a partir de la estructura de *HpFur*. En él se observa que el residuo C₈₁ se encuentra próximo al residuo C₁₀₁. En este modelo la distancia entre ambos residuos es de 9 Å aunque en la estructura real de *CdFur* podría estar más cerca puesto que el residuo C₈₁ está en una región flexible y por tanto con cierta libertad de movimiento. Además, ambos residuos están situados en diferentes dominios estructurales que pueden aproximarse. De hecho, la zona interdominios pertenece a un giro y parece bastante flexible. Teniendo en cuenta que los datos bioquímicos sugieren que el residuo C₈₁ forma parte de un puente disulfuro que debe estar reducido para que la proteína sea activa, la propuesta es que los residuos C₈₁ y C₁₀₁ estarían en la estructura de *CdFur* a una distancia que permite la formación del puente disulfuro (~3-4 Å). Este puente disulfuro intramolecular sería responsable de mantener a la proteína en su conformación inactiva, es decir, incapaz de unirse al DNA. En este modelo también se muestra la localización del residuo C₉₃ para el que los datos bioquímicos atribuyen un papel relevante en el sitio regulador, ya sea porque interviene directamente en la coordinación del metal regulador o porque facilita la unión del mismo.

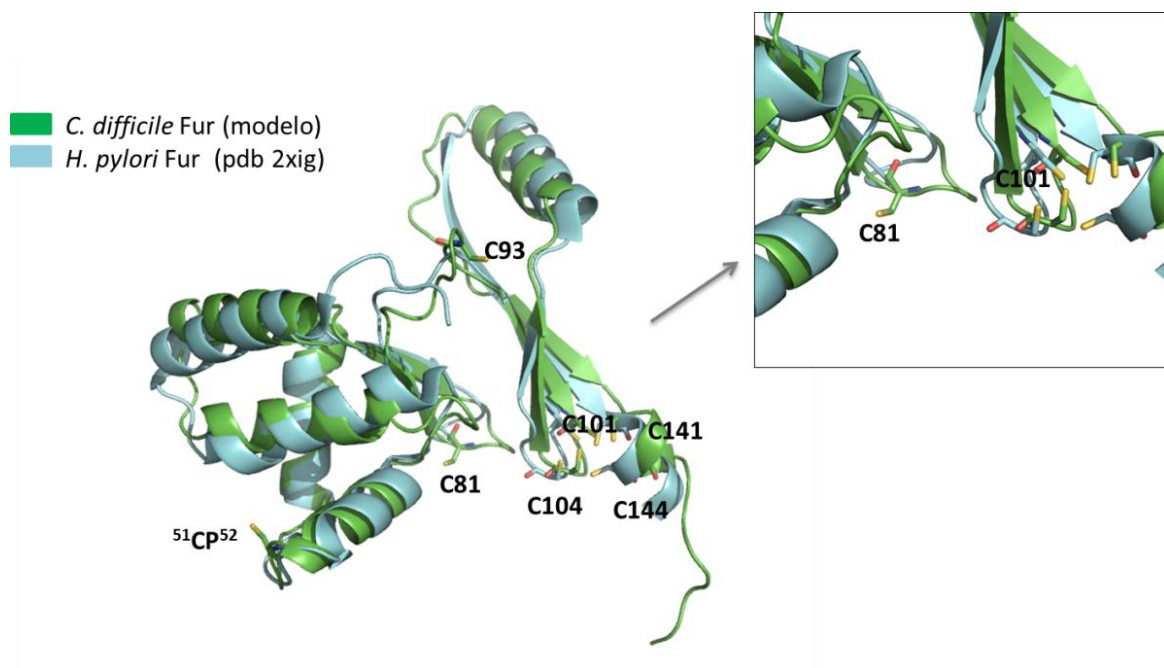


Figura 81. Comparación del modelo de Fur de *C. difficile* con Fur de *H. pylori*. Se muestra la superposición del modelo de CdFur (realizado con MODELLER) con la estructura ya resuelta de Fur de *H. pylori* (pdb 2xig). El modelo de CdFur se muestra en verde, mientras que la estructura de HpFur se muestra en azul. Se han señalado la posición de todas las cisteínas demostrando la proximidad entre C₈₁ y las cisteínas de los dos motivos CXXC.

Para modelar el sitio de unión del metal regulador se utilizaron las estructuras de Fur de *V. cholerae* (figura 82) y Zur de *E. coli* (figura 83). Según el primer modelo (figura 82), los residuos H₃₇ y H₉₈ (altamente conservados en las secuencias de todos los homólogos Fur, figura 40) junto con los residuos con afinidad por hierro E₈₅ y E₁₀₉ conformarían el sitio de unión del metal regulador, aunque en este modelo no está clara la participación directa del residuo C₉₃ en la coordinación del metal, sí podría facilitar su unión. Por el contrario, en el modelo obtenido a partir de Zur de *E. coli* (figura 83) el sitio de unión permite la participación directa de C₉₃ en la coordinación del metal regulador junto con los residuos E₈₅, H₈₉ y H₉₄.

■ *C. difficile* Fur (modelo)
■ *V. cholerae* Fur (pdb 2w57)

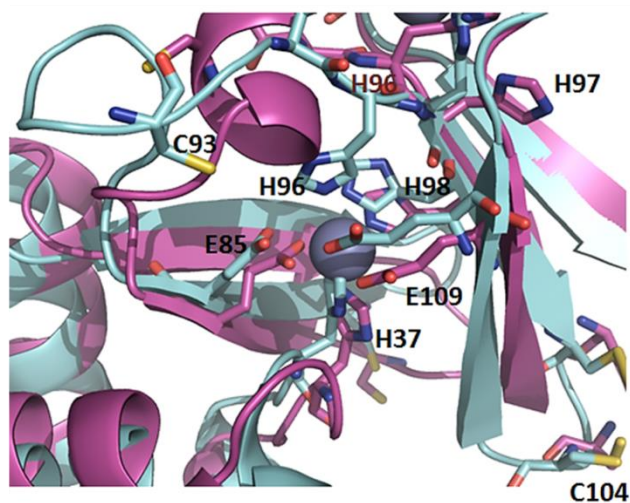


Figura 82. Comparación del modelo de Fur de *C. difficile* con Fur de *V. cholerae*. Se muestra la superposición del modelo de CdFur (realizado con MODELLER) con la estructura ya resuelta de Fur de *V. cholerae* (pdb 2w57). El modelo de CdFur se muestra en rosa, mientras que la estructura de VcFur se muestra en azul. Se han señalado únicamente los residuos implicados en la posible coordinación de un átomo de metal regulador. Se resalta además la posición de C₉₃.

■ *C. difficile* Fur (modelo)
■ *E. coli* Zur (pdb 4mtd)

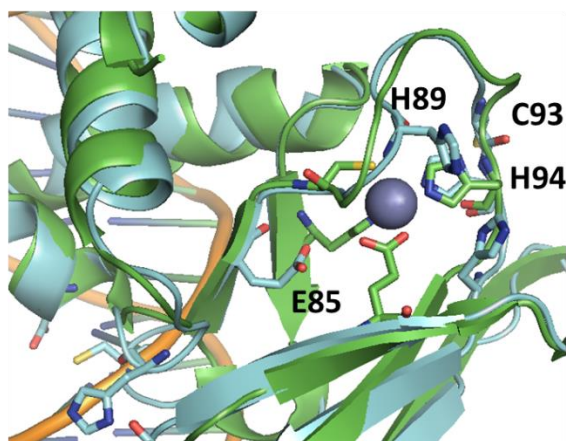


Figura 83. Comparación del modelo de Fur de *C. difficile* con Zur de *E. coli*. Se muestra la superposición del modelo de CdFur (realizado con MODELLER) con la estructura ya resuelta de Zur de *E. coli* (pdb 4mtd). El modelo de CdFur se muestra en azul, mientras que la estructura de EcZur se muestra en verde. Se han señalado únicamente los residuos implicados en la posible coordinación de un átomo de metal regulador en el que participaría C₉₃.

En la figura 84 se muestra el modelo de la proteína *CdFur* basado en la estructura de Fur de *C. jejuni* que se obtuvo en su forma apo (Butcher *et al.*, 2012). En este modelo, los dos dominios estructurales de la proteína están dispuestos en una conformación abierta en comparación con el modelo basado en *HpFur* (figura 81). En concreto, el residuo C₈₁ no se encuentra en posición adecuada para formar un puente disulfuro con cisteínas del dominio C-terminal por lo que este modelo correspondería a la forma de la proteína con el puente disulfuro C₈₁-C₁₀₁/C₁₀₄ reducido.

Tanto la estructura holo como la estructura apo serían posibles puesto que el motivo K₉₀EDCH₉₄ es un segmento IDR (intrínsecamente desordenado) de acuerdo con la predicción de desorden obtenida con el servidor MODELLER. En particular, los segmentos IDR suelen ser elementos reguladores.

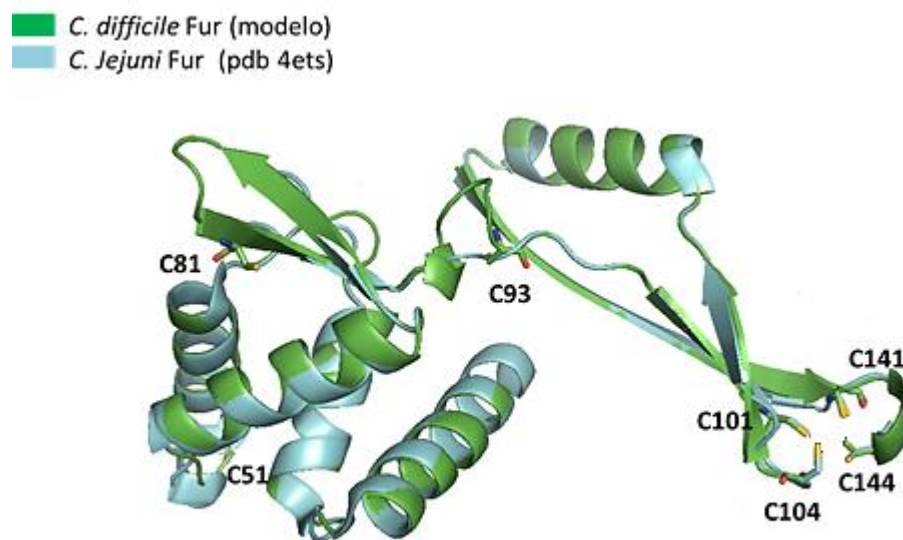


Figura 84. Comparación del modelo de Fur de *C. difficile* con Fur de *C. jejuni*. Se muestra la superposición del modelo de *CdFur* (realizado con MODELLER) con la estructura ya resuelta de Fur de *C. jejuni* (pdb 4ets). El modelo de *CdFur* se muestra en verde, mientras que la estructura de *CjFur* se muestra en azul. Se han señalado la posición de todas las cisteínas demostrando la lejanía entre C₈₁ y las cisteínas de los dos motivos CXXC.

4.3. Estudio de la interacción de CdFur con el grupo hemo

4.3.1. Motivación del trabajo

Distintos estudios sugieren que Fur podría actuar como un factor de transcripción de respuesta a hemo, alterando su capacidad de unirse al DNA en respuesta a la concentración intracelular de hemo libre. En este sentido, en el grupo de trabajo donde se ha realizado esta tesis, se ha demostrado que la proteína FurA recombinante de la cianobacteria *Anabaena* sp. PCC 7120 es capaz de unirse al grupo hemo *in vitro* con una constante de disociación del orden micromolar y que esta asociación afecta a la capacidad de la proteína de unirse al DNA (Hernández *et al.*, 2004b). La unión entre este homólogo y el grupo hemo se produce a través de un motivo cisteína-prolina (motivo regulador de hemo, HRM) (Pellicer *et al.*, 2012). El motivo CP también se encuentra en CdFur implicando a C₅₁ (figura 60). Teniendo en cuenta que este tipo de secuencia, ausente en homólogos de organismos heterótrofos, es una característica propia de las secuencias de homólogos Fur de cianobacterias y clostridiales, en esta parte del trabajo se analizó si la proteína CdFur une hemo a través del motivo CP. Para ello, se comparó el comportamiento de CdFur nativa y el de los mutantes generados por sustitución de los residuos de cisteína por alanina.

4.3.2. Interacción con el grupo hemo

El espectro de absorción del grupo hemo libre presenta una banda ancha con máximo a 385 nm (banda *Soret*) (figura 85).

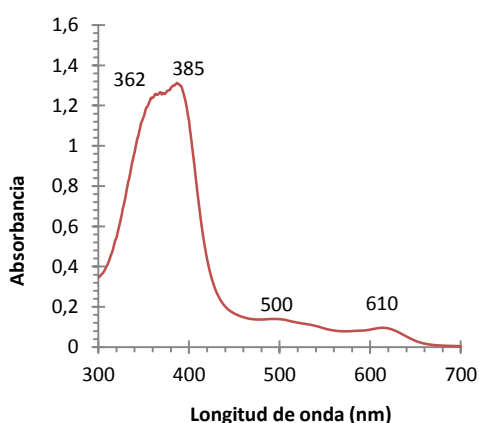


Figura 85. Espectro de absorción en el UV-Vis del grupo hemo libre.

Cuando el grupo hemo forma complejo con una proteína, su espectro cambia y el máximo de absorción experimenta un desplazamiento batocrómico o hipsocrómico (desplazamiento hacia longitud de onda mayor o menor, respectivamente). Además, se suele producir un estrechamiento de las bandas y aumenta su intensidad. La capacidad de CdFur de unir hemo se

analizó mediante una titulación de hemo sobre la proteína. La titulación se siguió por espectroscopía UV-Vis (figura 86).

Como se observa en la figura 86, la adición de cantidades crecientes de una solución de hemo a una de *CdFur* dio como resultado la aparición de una banda *Soret* con máximo a 419 nm, consecuencia de la formación de un complejo *CdFur*-hemo, además de un estrechamiento de la misma e incremento de su intensidad respecto al hemo libre (figura 87A).

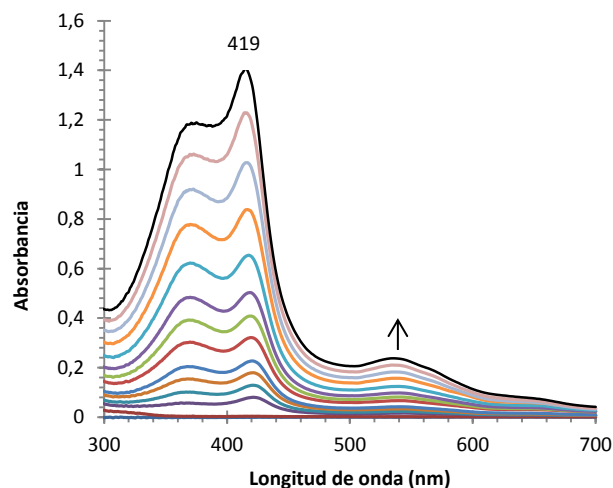


Figura 86. Formación del complejo *CdFur*-hemo mediante espectroscopía. Se muestran los espectros directos de absorción en el UV-Vis resultado de una titulación que se realizó haciendo adiciones de pequeño volumen (desde 2 a 60 μ l) de una disolución 250 μ M de hemo a una solución de proteína *CdFur* 16 μ M en tampón 50 mM Tris/HCl pH 8.

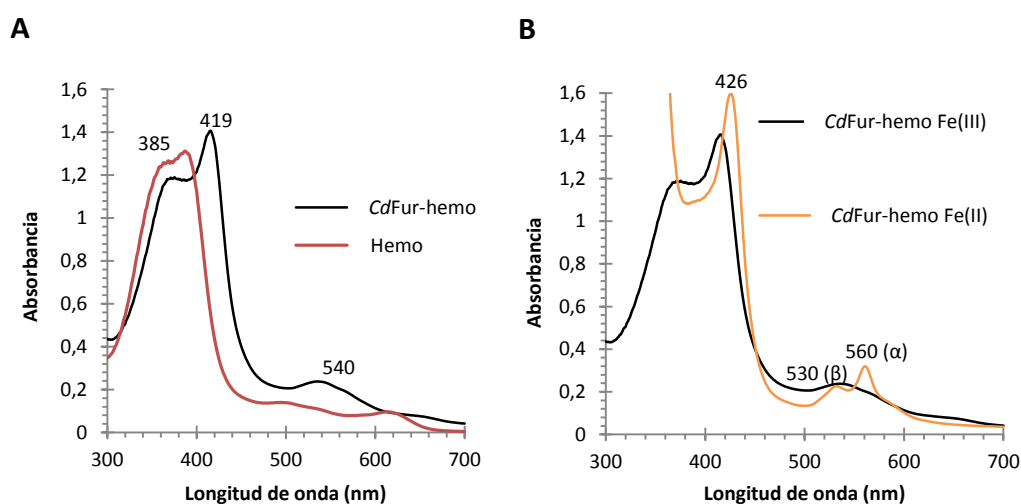


Figura 87. Espectros de absorción en el UV-Vis de la interacción de *CdFur* con el hemo. A) Superposición de los espectros de absorción UV-Vis del grupo hemo libre (rojo) y del complejo *CdFur*-hemo (negro). B) Reducción del complejo *CdFur*-hemo con 5 mM ditionito sódico (DTH) (naranja). Se muestran los máximos de la banda *Soret* y de las bandas α y β , características del complejo proteína-hemo reducido.

La reducción con ditionito sódico (DTH) del complejo proteína-hemo provocó un cambio en el espectro (figura 87B). El máximo de absorción se desplazó de 419 nm a 426 nm y aparecieron dos nuevas bandas bien resueltas, α (560 nm) y β (530 nm). Estos cambios en el espectro indicaban que se había producido la reducción del hierro hemínico dando lugar a un espectro de absorción similar al que muestran proteínas con hemo ferroso de bajo espín (tabla 22). Esto sugería que ligandos fuertes (en el sentido de provocar una configuración de bajo espín para el hierro) estaban unidos al hierro del hemo en el complejo *CdFur*-hemo Fe(II).

Tabla 22. Posición de los picos de absorción en los espectros de proteínas de unión a hemo.

Proteína	Hemo Fe(III)		Hemo Fe(II)		
	Coordinación	Soret (nm)	Coordinación	Soret (nm)	Visible (nm)
(eIF2 α)HRI	Cys/His	423	Cys?/His?	425	559 (α) 530 (β)
<i>RrCooA</i>	Cys/Pro	428	His/Pro	425	559 530
PAS-AMPer2	Cys/OH ⁻	421	?/?	425	558 529
<i>EcDOS</i>	His/H ₂ O	416	His/Met	427	563 532
E75	Cys/His	423	His/?	425	558 530
IRP2	Cys/His	420	His/?	424	n.d. n.d.
DHR51	Cys/His	424	?/?	424	560 531
RcoM-2	Cys/His	423	Met/His	425	562 532
Citocromo P450	Cys/H ₂ O	417	Cys/Py	444	566 538
CBS	Cys/His	428	Cys/His	450	571 540

4.3.3. Cálculo de la K_D

Como se ha visto, el complejo formado entre *CdFur* y hemo se puede detectar a partir de los cambios espectrales que se producen en el espectro de absorción de la mezcla en la región del visible. Cuando el complejo proteína-hemo tiene una estequiometría bien definida, se pueden usar los espectros diferenciales obtenidos tras cada adición para calcular la constante de unión del complejo. En este caso, se realizó una titulación de proteína sobre una disolución 2 μ M de hemo en 50 mM Tris/HCl pH 8 (Materiales y Métodos, apartado 3.7.1.). Al registrar los espectros diferenciales, se observó la aparición del pico en torno a 419 nm (máximo del grupo hemo interaccionando con *CdFur* y la disminución del pico a 385 nm (máximo del hemo libre) (figura 88A).

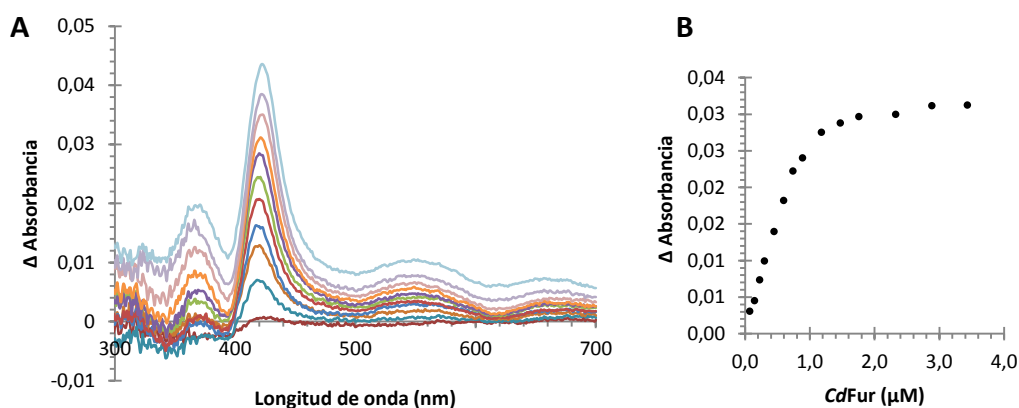


Figura 88. Estudio por espectroscopía diferencial de la unión del grupo hemo a CdFur. A) Espectro diferencial de la formación del complejo CdFur-hemo por adición de cantidades crecientes de proteína a una disolución 2 μ M de hemo en 50 mM Tris/HCl pH 8. El ensayo se llevó a cabo a 25 $^{\circ}$ C. Se representa la diferencia de absorbancia ($Abs_{414nm} - Abs_{385nm}$) frente a la longitud de onda. B) Curva de saturación del grupo hemo con CdFur, que corresponde a un complejo de estequiometría 1:1. Se representa la diferencia de absorbancia ($Abs_{414nm} - Abs_{385nm}$) frente a la concentración de proteína en la cubeta.

La titulación finalizó al alcanzar la condición de saturación que se produjo cuando no hubo variación de absorbancia tras tres nuevas adiciones. La representación de la variación de absorbancia producida como consecuencia de la formación de dicho complejo ($Abs_{414nm} - Abs_{385nm}$) frente a la concentración de proteína añadida dio como resultado una curva hiperbólica indicativa de un proceso de saturación para un complejo de tipo 1:1 (figura 88B). En este caso, el valor numérico de la K_D correspondía a la concentración de proteína que hace que la ΔAbs sea la mitad de la ΔAbs_{max} por lo que su valor estaba en el rango de concentración micromolar.

4.3.4. Influencia del hemo en la actividad de CdFur *in vitro*

En base al complejo que se forma entre la proteína CdFur y el grupo hemo, se estudió el efecto de esta unión en la actividad de la proteína *in vitro*. Para ello se realizó un ensayo de retardo en gel en el que se incubó la proteína CdFur con cantidades crecientes de hemo (figura 89). El estudio se realizó en las condiciones óptimas de actividad determinadas, esto es 700 nM de proteína, ausencia de metal y presencia de agentes reductores.

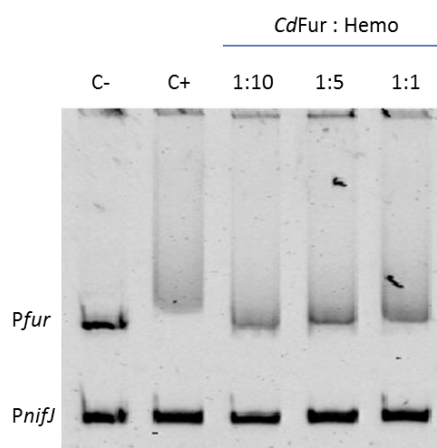


Figura 89. Estudio del efecto del grupo hemo en la actividad de *CdFur in vitro* mediante ensayos de retardo en gel de poliacrilamida al 8 %. Se incubaron 700 nM de *CdFur* con 50 ng de *Pfur* y 50 ng de *PnifJ*. Carril 1: corresponde al control negativo (sin proteína). Carril 2: corresponde al control positivo (proteína sin hemo). Carriles 3-5: proteína incubada con cantidades crecientes de hemo (a una relación proteína:hemo de 1:10, 1:5 y 1:1, respectivamente). En todos los casos, la proteína se incubó en un tampón de unión cuya composición al 1x era: 20 mM Tris/HCl pH 8, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 % glicerol, 0,05 mg/ml BSA, 10 mM DTT, 200 μM EDTA. La electroforesis se desarrolló en un tampón de composición 25 mM Tris/HCl pH 8, 190 mM glicina y 10 mM EDTA durante 2 horas y 15 minutos a 95 V.

Como se observa en la figura 89, en los carriles que contenían hemo el retardo del DNA causado por el complejo proteína-hemo fue menor y además esta disminución era proporcional a la cantidad de hemo presente, indicando que la capacidad de unión de la proteína al DNA estaba inhibida por la unión del hemo a la misma.

4.3.5. Determinación de la constante de disociación del complejo *CdFur*-hemo en función del estado de oxidación de la proteína

Teniendo en cuenta que el estado de oxidación de las cisteínas de *CdFur* afectaba a la actividad de la proteína (apartado 4.2.5.2), se determinó la constante de unión de la proteína a hemo tanto en estado oxidado como reducido. En estos ensayos se utilizó proteína a la que previamente se le había eliminado la cola de histidinas.

La técnica utilizada fue calorimetría isotérmica de titulación, ITC (*Isothermal Titration Calorimetry*) que es una herramienta analítica mayoritariamente usada en el estudio de la interacción proteína-ligando. La técnica se basa en el principio de que cualquier reacción libera o absorbe calor que el instrumento es capaz de medir directamente a presión y temperatura constantes. A partir del valor de la verdadera entalpía de la reacción se puede obtener una caracterización completa de la estequiometría y los parámetros termodinámicos de la interacción molecular.

Los ensayos de ITC se realizaron en colaboración con el Dr. Adrián Velázquez Campoy del Instituto de Biocomputación y Física de Sistemas Complejos de la Universidad de Zaragoza.

Para ello, se colocó en la célula de muestra la proteína *CdFur* a una concentración 20 μM . La disolución de ligando, en este caso hemo, se preparó a una concentración final 400 μM según el protocolo descrito en el apartado 3.5.6.1. La titulación se realizó añadiendo pequeñas cantidades de hemo a la célula de muestra (figura 90). Tanto la proteína *CdFur* como la disolución de hemo debían estar disueltos en el mismo tampón cuya composición fue 50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 10 % glicerol, presente en la célula de referencia. El efecto del DTT se probó a una concentración final 2 mM por lo que tanto la disolución de proteína como la del ligando debían contener el agente reductor.

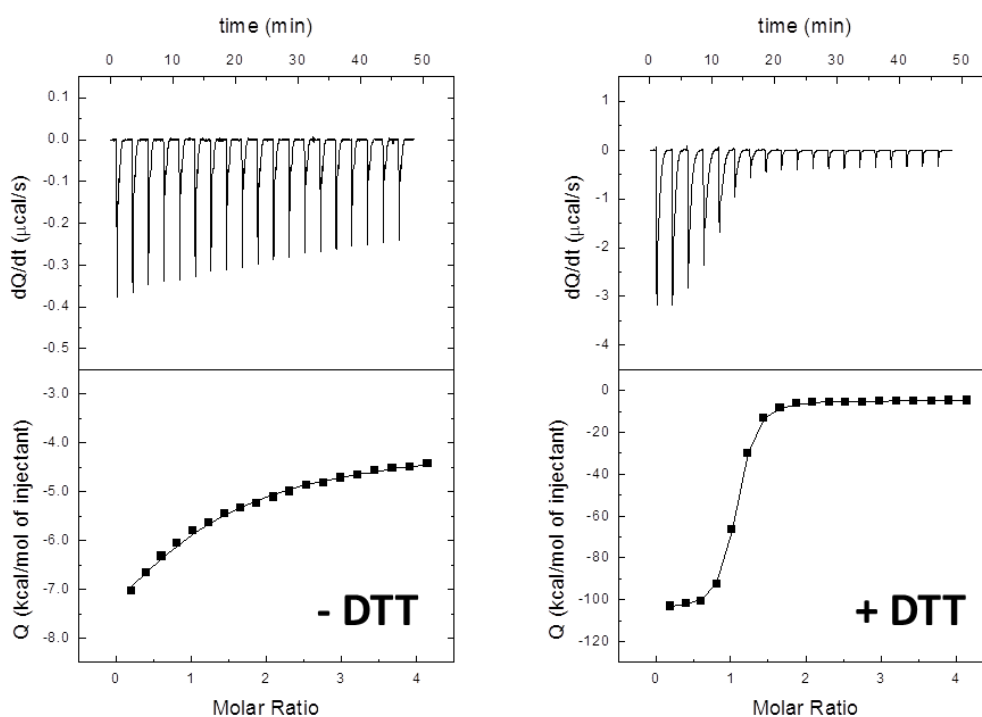


Figura 90. Estudio de la interacción entre *CdFur* y hemo por ITC. A) Interacción en ausencia de agente reductor. B) Interacción en presencia de 2 mM DTT. Las medidas se realizaron al añadir sobre una disolución de *CdFur* 20 μM alícuotas de una disolución 400 μM hemo preparada en el mismo tampón en el que se encontraba la proteína (50 mM Tris/HCl pH8, 150 mM NaCl, 10 % glicerol). Se muestran las representaciones (dQ/dt vs. tiempo y Q vs. Ratio molar proteína/ligando) de las medidas realizadas a 25 $^{\circ}\text{C}$ en el calorímetro Microcal Auto-iTC200 (Malvern).

El análisis de los resultados de ITC permitió obtener información acerca del número de sitios de unión a hemo y los parámetros de la interacción en ausencia y presencia de agente reductor (tabla 23). *CdFur* mostró un único sitio de unión a hemo tanto en presencia como ausencia de DTT. A pesar de mostrar un único sitio de unión con y sin DTT, la afinidad entre *CdFur* y hemo fue mucho mayor cuando la proteína se encontraba en estado reducido.

Tabla 23. Valores de los parámetros de la interacción entre CdFur y hemo. Se muestran los valores de: K_a (constante de afinidad), K_D (constante de disociación), ΔH (entalpía de la reacción) y n (número de sitios de unión).

	K_a (M^{-1})	K_D (μM)	ΔH (kcal/mol)	n
CdFur + hemo	$3,2 \cdot 10^4$	32	-8,0	1
CdFur (DTT) + hemo	$3,8 \cdot 10^6$	0,26	-101	1

4.3.6. Residuos implicados en la unión de CdFur con el grupo hemo

El hecho de que la unión entre CdFur y hemo estuviera afectada por el estado redox de la proteína, sugería la implicación de algún residuo de cisteína en dicha interacción. Por ello, se estudió la interacción de los mutantes de cisteína con el hemo mediante espectroscopía diferencial e ITC siguiendo el mismo protocolo que con la proteína nativa.

La superposición de los espectros obtenidos al realizar la titulación de cada mutante sobre una disolución 2 μM de hemo se muestra en la figura 91 y en la tabla 24 se recoge la posición del máximo de la banda *Soret* para cada caso. La aparición de un pico alrededor de 414-419 nm indicaba la formación de un complejo entre ambas especies en todos los casos (figura 91). Como se ha descrito para la proteína nativa, este pico correspondía a la banda *Soret* del hemo que experimenta un desplazamiento batocrómico con respecto al hemo libre. Aunque ninguno de los mutantes de cisteína perdió el pico correspondiente a la banda *Soret* del hierro hemínico observado en la especie nativa, algunos de ellos mostraron pequeñas desviaciones de la posición del máximo y de la intensidad (tabla 24). Un desplazamiento hacia el rojo del espectro de absorción del hemo es característico de hemoproteínas con metionina/histidina o bis-histidina como ligandos en las posiciones quinta y sexta de coordinación del hemo.

Tabla 24. Posición de los picos de absorción (nm) en los espectros diferenciales de los complejos entre los mutantes de cisteína y el grupo hemo.

Proteína	Hemo Fe(III)	Hemo Fe(II)		
	<i>Soret</i> (nm)	<i>Soret</i> (nm)	α (nm)	β (nm)
CdFur WT	419	426	560	530
C51A	414	425	559	528
C81A	418	426	555	526
C93A	419	426	560	531
C101A	416	427	n.d.	n.d.
C104A	416	428	n.d.	n.d.
C141A	416	428	555	532
C144A	415	427	553	525

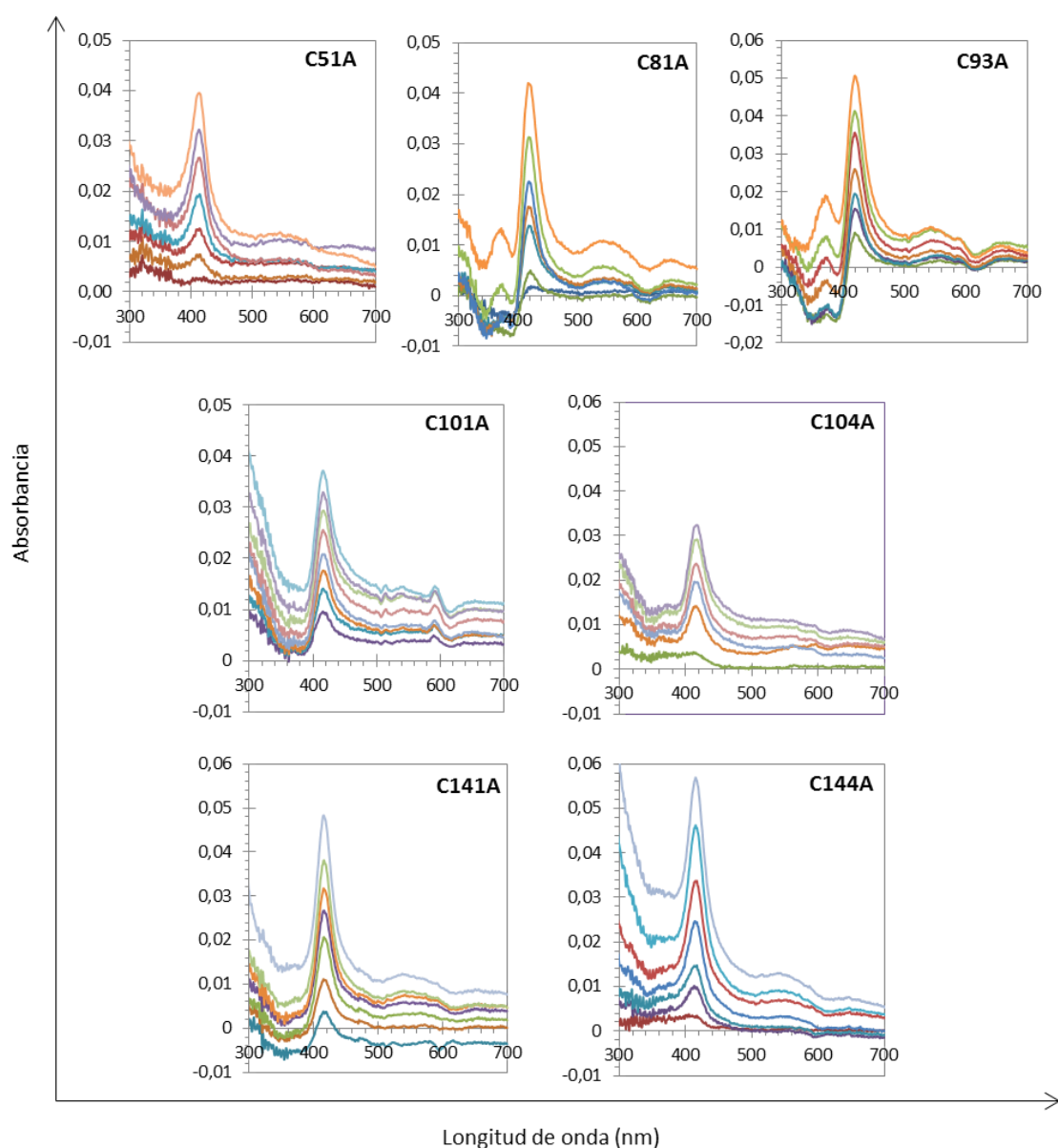


Figura 91. Espectros diferenciales de los mutantes de cisteína de la proteína CdFur interaccionando con el grupo hemo. Se muestra el cambio en el espectro de absorción provocado por la adición de concentraciones crecientes de los mutantes de cisteína de CdFur sobre una disolución 2 μ M de hemo. El ensayo se llevó a cabo a 25 $^{\circ}$ C en tampón 50 mM Tris/HCl pH 8. En todas las gráficas se representa la diferencia de absorbancia ($Abs_{414}-Abs_{385}$) frente a la longitud de onda (nm).

Tras la reducción con DTH de los complejos para todos los mutantes de cisteína, la banda *Soret* experimentó un desplazamiento batocrómico a 425-428 nm junto con la aparición de las bandas α y β bien resueltas (553-560 nm y 525-532 nm, respectivamente) (tabla 24). Estos cambios espectroscópicos indicaban reducción del hierro hemínico dando como resultado un hierro de bajo espín que mostraba valores en el espectro compatibles con un hemo hexacoordinado siendo histidinas los ligandos axiales (tabla 22).

Los espectros de absorción diferenciales obtenidos para cada mutante se utilizaron para hallar los valores de la constante de disociación, representando para cada mutante los cambios de absorbancia entre el máximo de la banda *Soret* y 385 nm frente a la concentración de proteína. En todos los casos, se observó una curva de saturación de tipo hiperbólico (figura 92) y los datos se pudieron ajustar a un complejo con estequiometría 1:1.

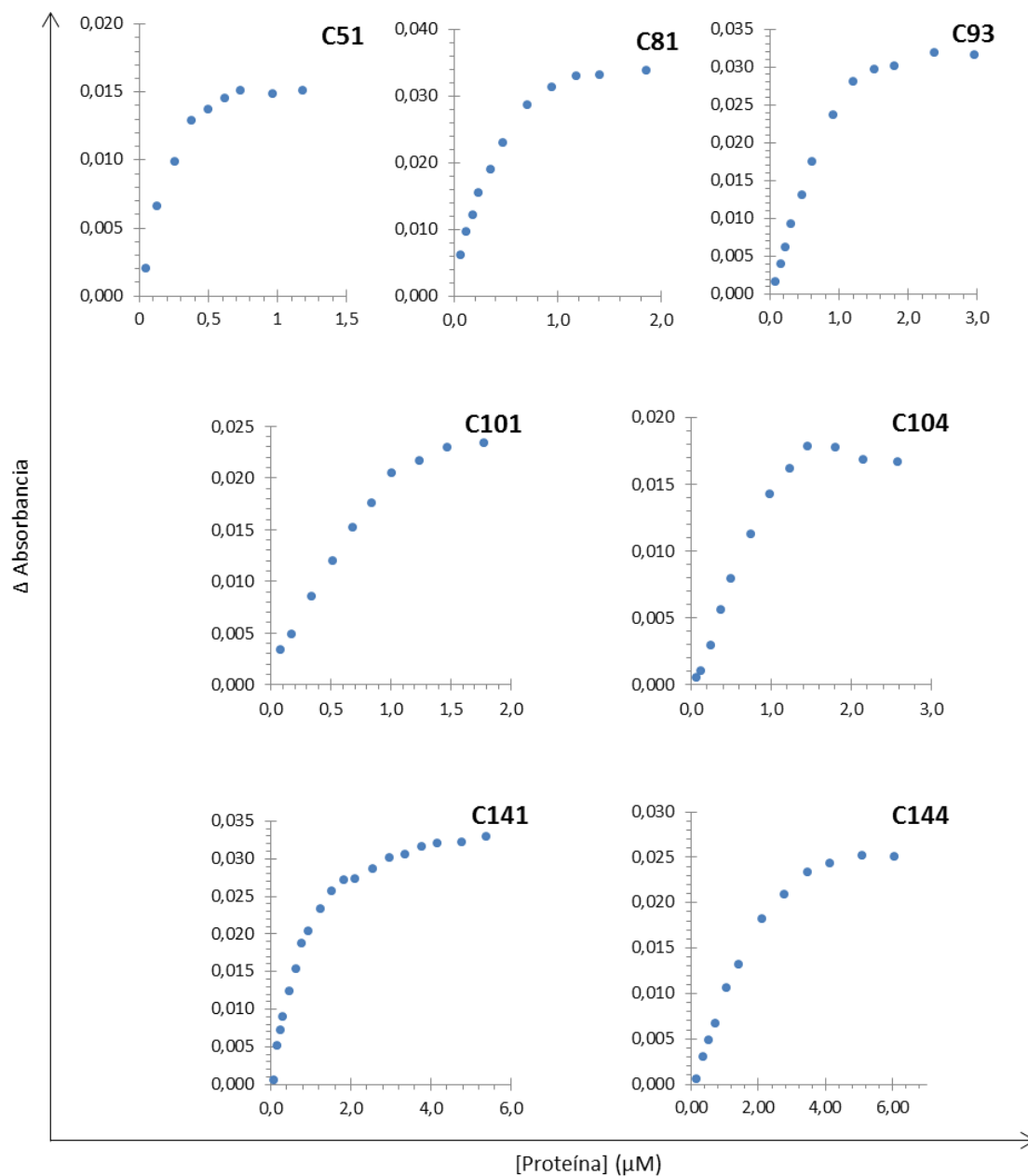


Figura 92. Curva de saturación del grupo hemo con los mutantes de cisteína de *CdFur*. En todos los casos se representó la diferencia de absorbancia ($Abs_{419}-Abs_{385}$) frente a la concentración de proteína en la cubeta. Las curvas corresponden a un complejo de estequiometría 1:1.

Aparentemente, los datos obtenidos indicaban que ninguna de las cisteínas de *CdFur* estaba implicada en la coordinación del hemo.

Al igual que para la proteína nativa se calculó la constante de disociación para la interacción de los mutantes de cisteína con hemo mediante ITC. Los datos obtenidos se recogen en la tabla 25.

Tabla 25. Valores de la constante de disociación entre los mutantes simples de *CdFur* y el grupo hemo. Los valores de K_D se obtuvieron tras analizar los resultados de ITC para cada mutante. En cada caso, sobre una disolución de proteína 20 μM se añadieron pequeñas alícuotas de una disolución 400 μM de hemo preparada en el mismo tampón en el que se encontraba la proteína (50 mM Tris/HCl pH8, 150 mM NaCl, 10 % glicerol).

	K_D (μM)
WT	32
C51A	31
C81A	3,7
C93A	4,8
C101A	53
C104A	52
C141A	n.d.
C144A	60

En esta ocasión y en ausencia de poder reductor, sí que se observaron diferencias entre los distintos mutantes. En el caso de los mutantes C81A y C93A se obtuvieron valores de K_D un orden de magnitud inferior al obtenido para la especie nativa, a diferencia de lo que ocurría con el resto de los mutantes para los que los valores obtenidos eran del orden calculado para *CdFur* nativa. Es decir, que en dichos mutantes la unión del grupo hemo se ve favorecida. De acuerdo con el modelo de la figura 81, correspondiente a la conformación que tendría la proteína en ausencia de poder reductor y por tanto con el residuo C₈₁ formando parte de un puente disulfuro y el residuo C₉₃ implicado en la unión al metal regulador, esta conformación dificultaría la unión a hemo. Por tanto, este resultado sugiere que la afinidad entre *CdFur* y el hemo podría estar controlada por el puente disulfuro intramolecular que actuaría como un interruptor redox.

4.3.7. Estudio de *CdFur* reconstituida con hemo

Una vez analizada la interacción entre *CdFur* y hemo se procedió a obtener el regulador reconstituido con hemo con el objetivo de realizar medidas de EPR que proporcionaran más información sobre el entorno del grupo prostético en la proteína. Para ello, se incubó la proteína durante toda la noche con un exceso doble de hemo en el tampón de conservación de la proteína (50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 10 % glicerol). A continuación, se eliminó el exceso de hemo pasando la solución por una columna PD10 (GE Healthcare) equilibrada con el tampón de conservación. Como se observa en la figura 93, la solución de proteína obtenida presentaba un intenso color rojizo típico de hemoproteínas.

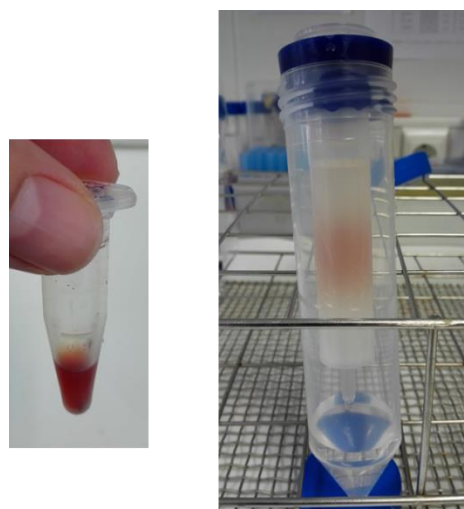
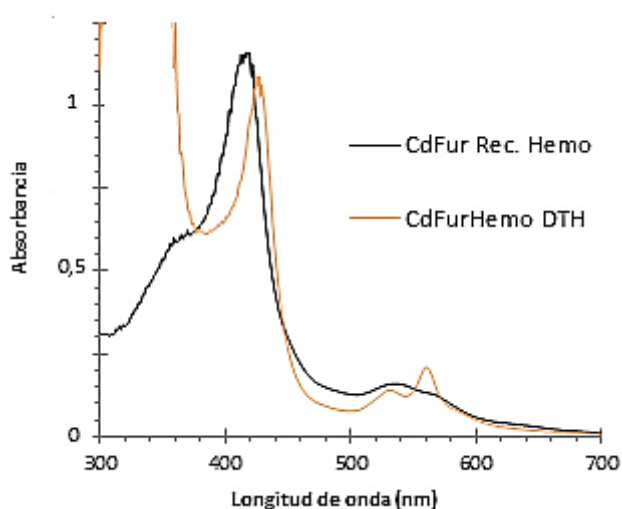


Figura 93. Proceso de reconstitución de CdFur con hemo. Tratamiento de la proteína con hemo (izquierda). Eliminación del exceso de hemo mediante una columna PD10 (derecha).

El espectro UV-Vis de la proteína reconstituida mostró los mismos máximos que cuando se realizó la titulación entre la proteína y el grupo prostético (figura 94). Además, la reducción del complejo con ditionito mostró el desplazamiento batocrómico de la banda *Soret* y la aparición de las bandas α y β , típicas del complejo proteína-hemo reducido (figura 94).



	<i>CdFur-hemo</i>	<i>CdFur-hemo DTH</i>
<i>Soret</i>	416	425
β		530
α		560

Figura 94. Espectros de absorción UV-Vis de la proteína CdFur reconstituida con hemo. Se muestran el espectro de absorción en el UV-Vis de la proteína una vez reconstituida con hemo (negro) y el de la proteína tras la reducción con 5mM ditionito sódico (naranja).

Como el EPR es sensible a los ligandos en el entorno del hemo Fe (III) (oxidado), se midió el espectro de EPR de la muestra reconstituida con hemo. Sorprendentemente no se obtuvo señal de EPR. Este resultado podría deberse al hecho de que en el complejo *CdFur-hemo* reconstituido, el hemo se encontrara como Fe (II) el cual no da señal en EPR.

4.4. Identificación de compuestos moduladores de la actividad de CdFur

4.4.1. Motivación del trabajo

Tras llevar a cabo una caracterización bioquímica de la proteína Fur de *C. difficile* para proponer un posible mecanismo de funcionamiento, el siguiente paso para valorar la idoneidad de CdFur como diana terapéutica fue la identificación, mediante un sistema de cribado de alto rendimiento, de compuestos de una quimioteca capaces de interactuar con la proteína. Este método consiste en ensayar, de forma masiva, la capacidad de unión de un gran número de compuestos a una diana específica mediante la medida de alguna propiedad de ésta. En este caso se midió la temperatura de desnaturalización térmica seguida por fluorescencia, utilizando una sonda específica. Una vez identificados compuestos que se unían a CdFur, se analizó el efecto de estos sobre la actividad de unión al DNA *in vitro* y se analizaron los parámetros de la interacción proteína-compuesto mediante ITC.

4.4.2. Cribado de alto rendimiento

Para realizar el proceso de cribado de la quimioteca, se comparó la temperatura media de desnaturalización (T_m) de la proteína CdFur con la que manifestaba en presencia de los distintos compuestos. Como la unión de un compuesto cualquiera a la proteína aumenta la estabilidad conformacional de ésta (el complejo es más estable que la proteína individual), se identificaron los compuestos que se unían a la proteína por el aumento que provocaban en la temperatura media de desnaturalización de la misma.

Para determinar la T_m se utilizó un fluorímetro de placas termostatzado FluoDia T70 programado para que realizara una rampa de temperatura de 20 a 70 °C. Se probaron distintas condiciones de ensayo (concentración de proteína, sonda fluorescente, relación proteína/sonda, tampón) con el fin de obtener unas curvas de desnaturalización térmica reproducibles (Materiales y Métodos, apartado 3.8.2.).

Como se muestra en la figura 95, las curvas de desnaturalización térmica donde se distinguía mejor la transición entre el estado nativo y el desplegado fueron aquellas en las que la proteína CdFur se encontraba en las siguientes condiciones: 5 μ M de proteína en tampón 50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 10 % glicerol y 10 mM DTT, con una concentración de la sonda SyPro Orange 10x. No se muestran los resultados obtenidos con la sonda ANS ya que apenas se detectó señal de fluorescencia. En todos los casos, la presencia de DTT mejoró la señal de la curva de desnaturalización y la transición entre ambos estados fue mayor a la concentración más alta de sonda, esto es, a una concentración final de 10x.

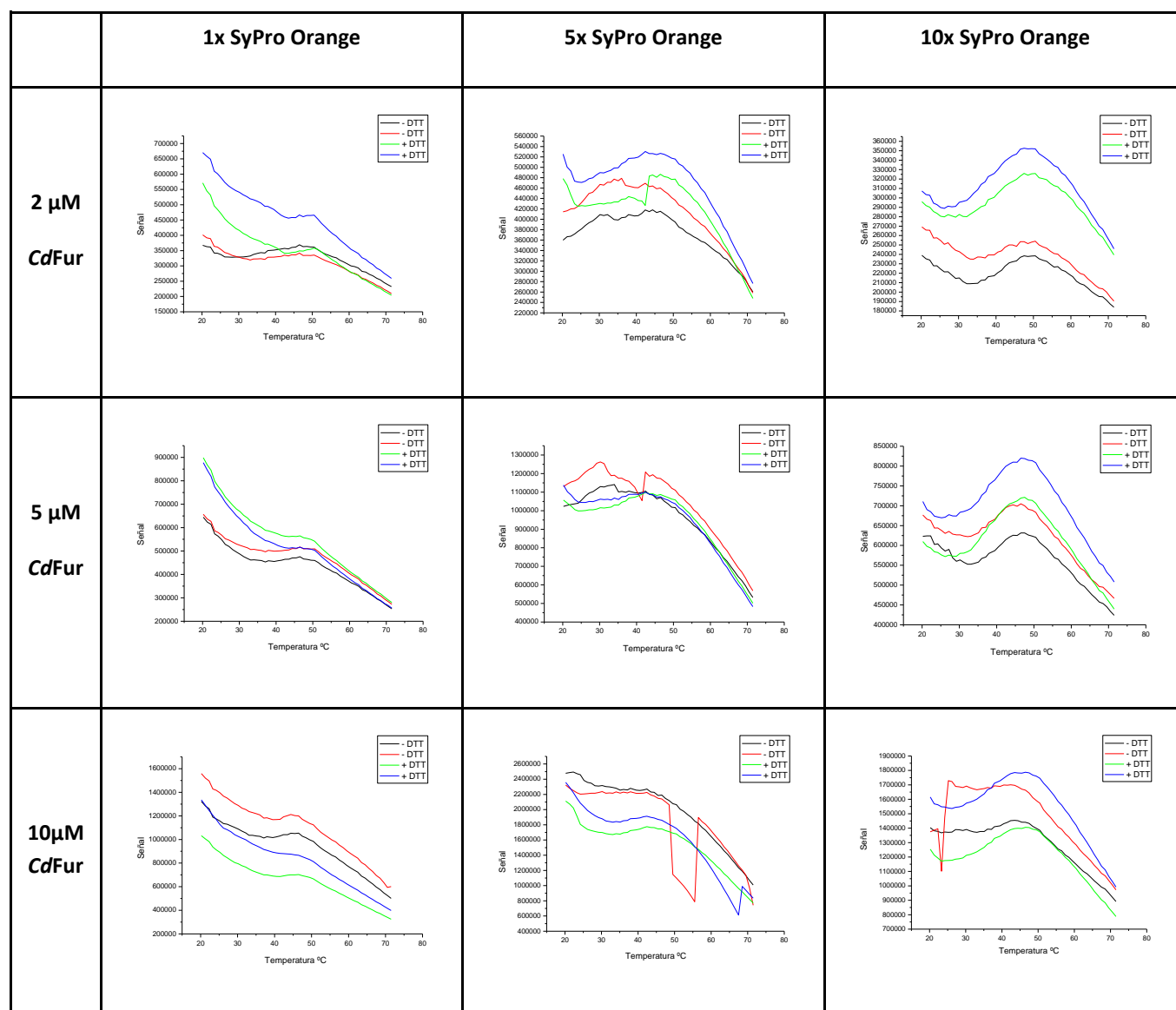


Figura 95. Curvas de desnaturación térmica seguida por fluorescencia de la proteína CdFur en diferentes condiciones. En cada caso se realizó una rampa de temperatura para desnaturar la proteína CdFur a tres concentraciones diferentes (2, 5 o 10 μ M) en el tampón cuya composición era 50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 10 % glicerol y utilizando la sonda SyPro Orange a distintas concentraciones (1x, 5x y 10x). Se probó para cada caso el efecto del DTT a una concentración final de 10 mM. Cada experimento se realizó por duplicado.

A continuación, se comprobó el efecto de la concentración de DMSO en la estabilidad de la proteína puesto que los compuestos de la quimioteca comercial estaban disueltos en DMSO al 100 %. Tal como se observa en la figura 96, fue posible añadir a la mezcla de reacción DMSO al 7,5 % sin que la T_m de la proteína se viera afectada, lo que significaba poder añadir hasta 3 compuestos en un mismo pocillo. A concentraciones mayores de DMSO, la transición entre el estado nativo y el desplegado era muy pequeña (apenas había variación de señal). En estas condiciones la T_m de la proteína era 38,4 °C.

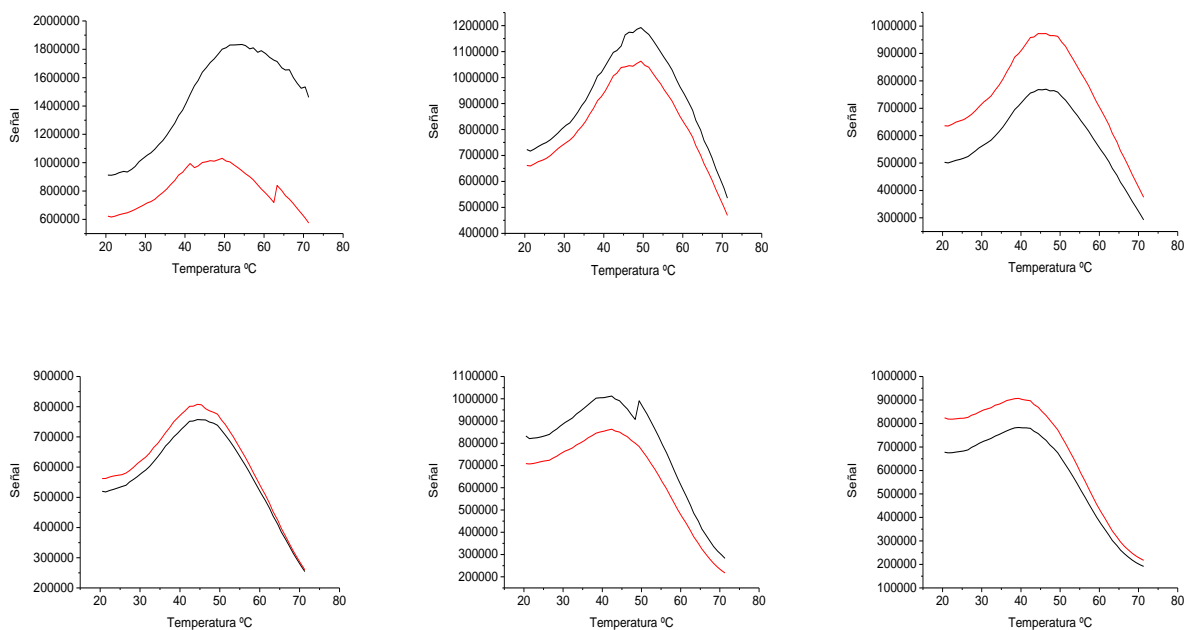


Figura 96. Curvas de desnaturalización térmica seguida por fluorescencia de la proteína *CdFur* con diferentes concentraciones de DMSO. En cada caso se realizó una rampa de temperatura para desnaturalizar la proteína *CdFur* a una concentración de 5 μM en tampón 50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 10 % glicerol, 10 mM DTT con una concentración final de sonda SyPro 10x. Las condiciones de DMSO ensayadas fueron (de izquierda a derecha y de arriba abajo): 0 %, 2,5 %, 5 %, 7,5 %, 10 % y 12,5 %. Cada experimento se realizó por duplicado.

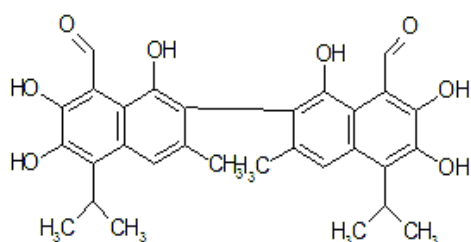
Una vez determinadas las condiciones del ensayo, en una primera ronda, en cada pocillo de la placa de medida se ensayó una mezcla que contenía la proteína *CdFur* junto con 3 compuestos de la quimioteca Prestwick®, en concentración 250 μM . De esta manera se pudieron ensayar 240 compuestos en una misma placa, respetando siempre la primera y última columna de cada placa para los controles (proteína con DMSO al 7,5 %). Los pocillos que se identificaron como positivos fueron aquellos cuya temperatura de desnaturalización cumplía la siguiente relación: $T_{\text{pocillo}} \geq T_m \pm 2 \cdot \text{SD}$, siendo “SD” la desviación estándar calculada a partir de la T_m obtenida de todas las curvas control de la placa. De los pocillos identificados como positivos, se realizó una segunda ronda de cribado con un único compuesto por pocillo en idéntica concentración en la que los controles contenían proteína con DMSO al 2,5 %. De esta ronda se identificaron como compuestos positivos aquellos que dieron una temperatura de desnaturalización $T_{\text{compuesto}} \geq T_m \pm 2 \cdot \text{SD}$.

4.4.2.1. Compuestos positivos

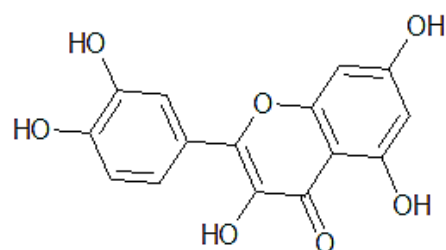
Una vez realizado el cribado de todos los compuestos de la quimioteca Prestwick Chemical Library®, resultaron positivos 6 de ellos con una ΔT_m significativa. Los compuestos seleccionados se recogen en la tabla 26 y su estructura química se muestra en la figura 97. El compuesto Chicago Sky Blue 6B se descartó puesto que en ausencia de proteína presentaba fluorescencia y, a pesar de mostrar una ΔT_m muy grande con respecto al control, la señal de fluorescencia que mostró era muy baja.

Tabla 26. Valores de la diferencia de temperatura (ΔT_m) causada por la unión de cada compuesto a CdFur.

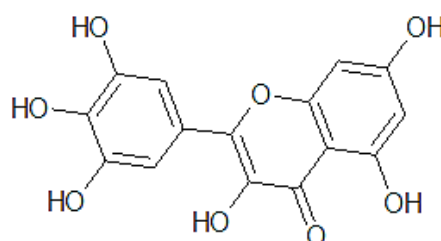
Compuesto	ΔT_m (C°)
Chicago Sky Blue 6B	27
Gossypol	3
Quercetina	9
Miricetina	10
Pamoato de Oxantel	3
Felodipina	3



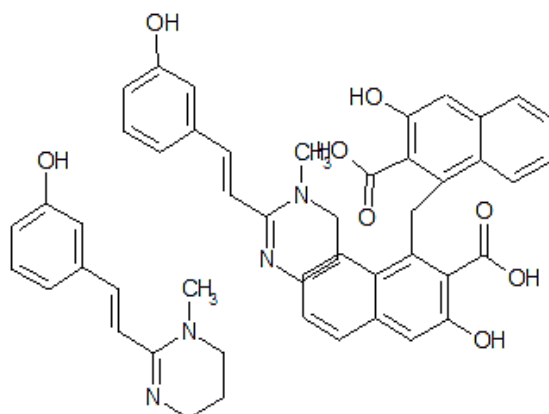
Gossypol



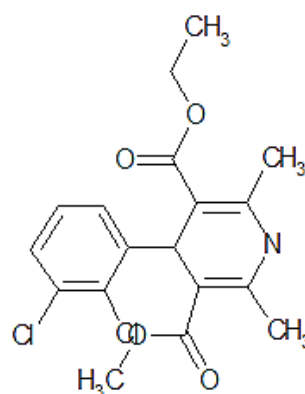
Quercetina



Miricetina



Pamoato de Oxantel



Felodipina

Figura 97. Estructura química de los compuestos pertenecientes a la librería química Prestwick® identificados como positivos.

4.4.3. Efecto de los compuestos sobre la actividad de *CdFur* *in vitro*

Para estudiar el efecto de los compuestos seleccionados sobre la actividad de la proteína *CdFur*, se realizaron ensayos de retardo en gel en las condiciones óptimas de unión de la proteína al DNA. En todos los casos se utilizó el promotor del gen *fur* de *C. difficile* como DNA específico y el promotor del gen *nifJ* de *Anabaena* como DNA competidor.

En primer lugar se estudió el efecto del DMSO, solvente en el que estaban disueltos los compuestos, para determinar si éste podía interferir en la interacción de la proteína con el DNA. Se analizaron distintas concentraciones de DMSO (1,25, 2,5, 3,75 y 5 %) (figura 98). Como se muestra en la figura 98 en ningún caso se observó cambio en la formación del complejo proteína-DNA indicando que el solvente no afectaba a la actividad de *CdFur*. De este modo, si se producía algún efecto de los compuestos sobre la actividad de la proteína se podría atribuir directamente a la presencia de estos.

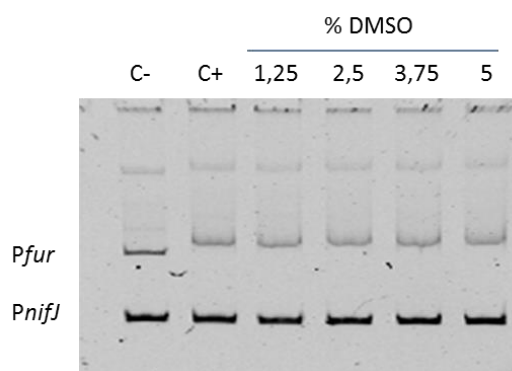


Figura 98. Análisis del efecto del DMSO sobre la actividad de *CdFur* mediante ensayos de retardo en gel de poliacrilamida al 8 %. Se incubó la proteína *CdFur* a una concentración final de 800 nM con 50 ng de *Pfur* y 50 ng del promotor inespecífico *PnifJ*. Se utilizó un tampón de unión cuya composición al 1x era: 20 mM Tris/HCl pH 8, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 % glicerol, 0,05 mg/ml BSA, 10 mM DTT, 200 μM EDTA. Carril 1: corresponde al control negativo (sin proteína). Carril 2: control positivo. Carriles 3-6: proteína incubada con DMSO a distintas concentraciones durante 15 minutos a temperatura ambiente. La electroforesis se desarrolló en un tampón de composición 25 mM Tris/HCl pH 8, 190 mM glicina y 10 mM EDTA durante 2 horas y 15 minutos a 95 V.

Los ensayos de retardo en gel con los diferentes compuestos se realizaron incubando la proteína *CdFur* con el compuesto objeto de estudio a tres concentraciones diferentes (ratio proteína:compuesto 1:125, 1:10, 1:1) y analizando el efecto mediante ensayos de retardo en gel de poliacrilamida al 8 % (figura 99). Cada compuesto se disolvió inicialmente en DMSO al 100 % y posteriormente se realizaron diluciones en un tampón de composición 50 mM Tris/HCl pH 8, de forma que la concentración final de DMSO final fuera siempre inferior al 5 %.

Como se observa en la figura 99, de los cinco compuestos ensayados, el Gossypol inhibió la actividad de unión a DNA de la proteína de manera dependiente de la concentración, inactivándola completamente a la mayor concentración ensayada (100 μM). Sin embargo, con

el compuesto Quercetina se observó cierta inactivación a concentraciones bajas de compuesto. Por otro lado, con el compuesto Miricetina se observó, a concentraciones bajas, mayor retardo en el gel de poliacrilamida del complejo proteína-DNA lo que se puede traducir como un incremento de la actividad de *CdFur*. Con el resto de compuestos no se observó ningún cambio respecto al control positivo (proteína y DNA).

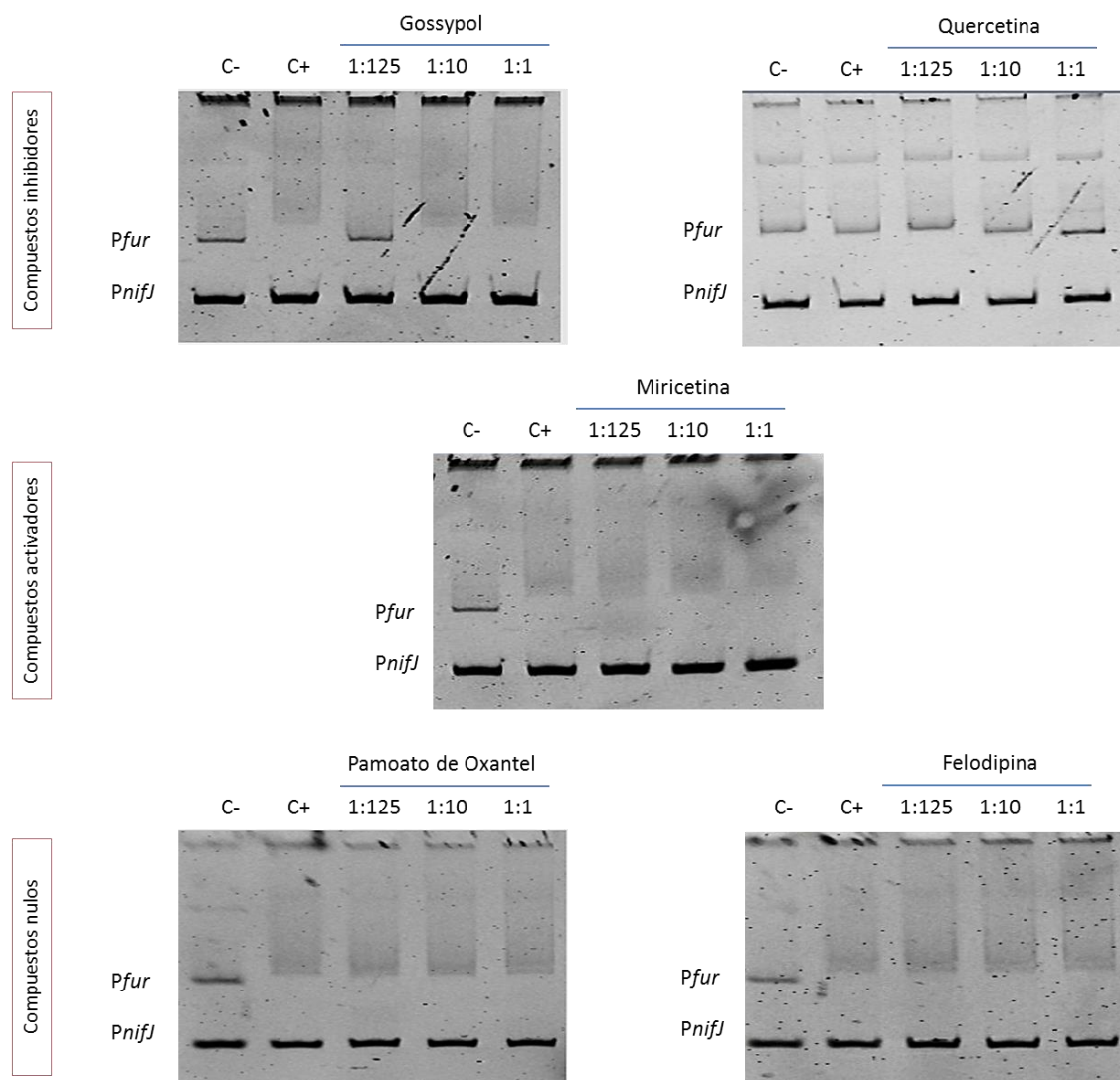


Figura 99. Análisis del efecto de los cinco compuestos sobre la actividad de *CdFur* mediante ensayos de retardo en gel de poliacrilamida al 8 %. En todos los casos, se incubó la proteína *CdFur* a una concentración final de 800 nM con 50 ng de *Pfur* y 50 ng del promotor inespecífico *PnifJ*. Se utilizó un tampón de unión cuya composición al 1x era: 20 mM Tris/HCl pH 8, 5 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 5 % glicerol, 0,05 mg/ml BSA, 10 mM DTT, 200 μM EDTA. Carril 1: corresponde al control negativo (sin proteína). Carril 2: control positivo. Carril 3: compuesto a 100 μM (relación proteína compuesto 1:125). Carril 4: compuesto a 8 μM (relación proteína compuesto 1:10). Carril 5: compuesto a 0,8 μM (relación proteína compuesto a 0,8 μM (relación proteína compuesto 1:1)). La proteína *CdFur* se incubó con cada compuesto y concentración durante 15 minutos a temperatura ambiente. La electroforesis se desarrolló en un tampón de composición 25 mM Tris/HCl pH 8, 190 mM glicina y 10 mM EDTA durante 2 horas y 15 minutos a 95 V.

4.4.4. Caracterización de la interacción proteína-compuesto por ITC

Para conocer los parámetros de la unión entre la proteína *CdFur* y los compuestos que interferían en su actividad de unión al DNA (Quercetina, Miricetina y Gossypol), se realizaron ensayos de ITC. El objetivo era analizar la constante de afinidad entre la proteína y el compuesto y conocer el número de sitios de unión presentes en esta (figura 100).

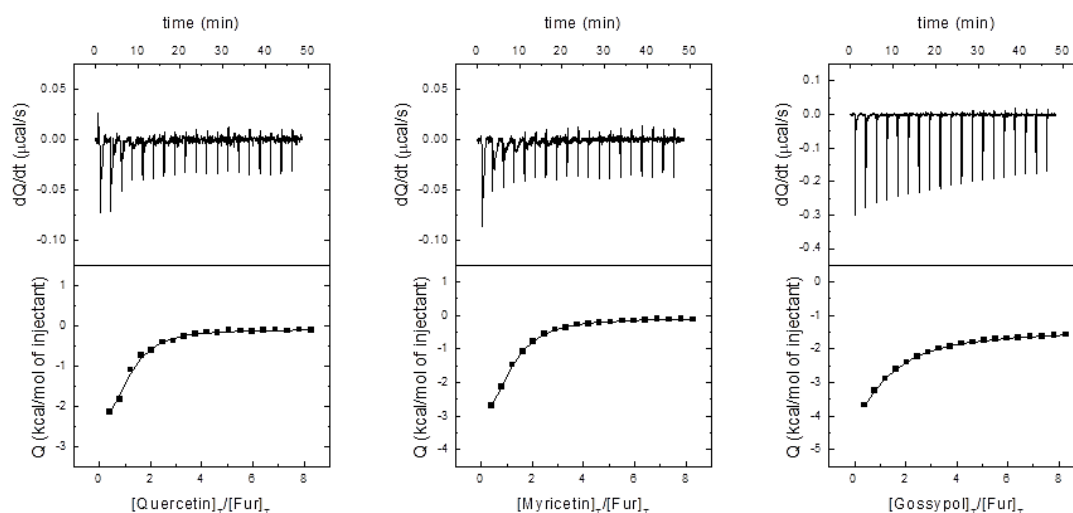


Figura 100. Interacción entre *CdFur* y los compuestos seleccionados. Las medidas se realizaron al añadir sobre una disolución de *CdFur* 20 μM alícuotas de una disolución 400 μM de cada compuesto preparada en el mismo tampón en el que se encontraba la proteína (50 mM Tris/HCl pH8). Se muestran las representaciones (dQ/dt vs. tiempo y Q vs. Ratio molar proteína/ligando) de las medidas realizadas a 25 $^{\circ}\text{C}$ en el calorímetro Microcal Auto-iTC200 (Malvern).

Tal como se muestra en la figura 100 los tres compuestos se unían a la proteína *CdFur* ya que en todos los casos se alcanzó la condición de saturación. Los parámetros de la interacción se recogen en la tabla 27. En los tres casos la proteína presentó un único sitio de unión. Sin embargo, para poder realizar un buen ajuste, fue necesario considerar la concentración de proteína como dímero ya que como monómero se obtenían valores de n cercanos a 0,5 y como dímero cercanos a 1. Este resultado sugiere que los compuestos se podrían unir con una estequiometría de 1:1 compuesto:dímero.

Tabla 27. Valores de los parámetros de la interacción entre *CdFur* y los compuestos. Se muestran los valores de: K_a (constante de afinidad), K_D (constante de disociación), ΔH (entalpía de la reacción) y n (número de sitios de unión).

Compuesto	K_a (M^{-1})	K_D (μM)	ΔH (kcal/mol)	n
Quercetina	$2,8 \cdot 10^5$	3,6	-3,2	1,01
Miricetina	$2,0 \cdot 10^5$	5,1	-4,4	1,01
Gossypol	$6,0 \cdot 10^4$	17	-6,9	0,93

DISCUSIÓN

5. DISCUSIÓN

Este trabajo describe la caracterización bioquímica de una forma activa de Fur de *C. difficile* y de varios de sus mutantes de cisteína que ha permitido establecer un modelo de funcionamiento de esta proteína en condiciones aeróbicas. Si bien, *C. difficile* es considerado un organismo anaerobio estricto, los resultados obtenidos sugieren que existe un estado activo de Fur en aerobiosis que conserva la capacidad de unirse de forma específica al DNA. Además, se ha estudiado la interacción de la proteína con el grupo hemo, fuente de hierro para la bacteria dentro del hospedador y agente causante de estrés oxidativo en su forma libre. Se ha determinado que existe unión específica entre CdFur y el hemo y que dicha unión afecta a la actividad de la proteína y está controlada por el estado redox de la misma. Finalmente, el cribado de una librería química basado en la desnaturalización térmica de la proteína en presencia de los compuestos que la integran ha permitido identificar varios compuestos que interactúan con la proteína afectando a su actividad.

Las diferentes estrategias empleadas han proporcionado valiosa información acerca de la proteína CdFur de la que apenas existen datos bibliográficos.

5.1. Obtención de la proteína Fur de *C. difficile* y caracterización funcional

Al inicio de este trabajo, no existía ningún dato bibliográfico acerca del regulador global del metabolismo del hierro Fur en el patógeno *C. difficile*. De los dos loci presentes en el genoma de esta bacteria pertenecientes a la familia de proteínas Fur (CD630_12870 y CD630_08260), en este trabajo se identificó el homólogo Fur como aquel codificado por el gen CD630_12870 (UAB_RS0207325 en *C. difficile* ATCC 43255). La proteína era homóloga a Fur de otras especies bacterianas tal como se muestra en el alineamiento realizado (figura 40), mostrando una identidad del 48 % con el homólogo Fur de *B. subtilis*. La proteína CdFur presenta en su secuencia de aminoácidos una serie de características típicas de este tipo de reguladores como son un motivo rico en histidinas altamente conservado, el cual es un potencial sitio de unión a metal regulador. Las cisteínas que componen los motivos CXXC presentes en el dominio de dimerización, también se encuentran altamente conservadas en las secuencias de otras proteínas Fur. Además, durante el transcurso de este trabajo, se publicó un estudio que describe a este gen como el gen *fur*, regulando la expresión de varios sistemas de captación y almacenamiento de hierro en *C. difficile* (Ho and Ellermeier, 2015).

Respecto al homólogo codificado por el gen CD630_08260, es muy posible que sea la proteína PerR. En el genoma de *C. difficile*, este gen se encuentra localizado entre una rubreritina (Rbr) y una rubredoxina oxidorreductasa (Rbo) pudiendo formar parte de un operón, tal como ocurre en otros microorganismos (Lumppio *et al.*, 1997). Estos son genes de defensa frente a estrés oxidativo muy importantes en organismos anaerobios (Lumppio *et al.*, 2001b). Además, en un trabajo publicado sobre las estrategias adaptativas y patogénesis de *C. difficile* basado en estudios de transcriptómica *in vivo* (Janoir *et al.*, 2013), identificaron al gen CD630_08260 como *perR* por su implicación en la respuesta a dicho estrés. Aunque el

homólogo Fur es ubicuo en la mayoría de procariotas como regulador global de la homeostasis del hierro, PerR se encuentra principalmente en bacterias Gram-positivas (como es el caso de *C. difficile*). En este tipo de bacterias, PerR ejerce el papel que haría OxyR en organismos Gram-negativos (Dubbs and Mongkolsuk, 2012).

Como paso previo a la caracterización bioquímica de la proteína CdFur, se realizó el clonaje del gen *fur* de *C. difficile* en el plásmido de sobreexpresión pET-28a(+) generándose el plásmido pET-*furCd*. Este vector permitió, posteriormente, la sobreexpresión por inducción con IPTG de la proteína recombinante CdFur en *E. coli* de manera satisfactoria, tal como ocurría con otros homólogos Fur (Hernández *et al.*, 2002). El sistema utilizado expresó la proteína con una cola de histidinas en el extremo N-terminal.

Los procesos de purificación que pueden resultar triviales con proteínas altamente solubles presentan dificultades añadidas al trabajar con proteínas de unión al DNA como las pertenecientes a la familia Fur. Estas proteínas tienden a precipitar y se suelen obtener poblaciones heterogéneas, con diferente grado de oligomerización o presencia de metal. Además, el empleo de unas condiciones de purificación inadecuadas puede dar lugar no sólo a una población heterogénea de proteína, sino también inactiva en cuanto a su capacidad de unión al DNA. Por lo tanto, resulta esencial adecuar las condiciones de pH y fuerza iónica del tampón a lo largo de todo el proceso de purificación para obtener una proteína soluble, pura, homogénea y activa; con capacidad de unirse al DNA y a los distintos cofactores que puedan modular su actividad. Además, es útil obtener la proteína en un tampón de trabajo con un pH próximo al fisiológico y a una concentración suficiente ya que ello facilita los estudios de caracterización bioquímica posteriores.

Como primera opción para la purificación de CdFur, se escogió la cromatografía de afinidad a metal (IMAC) y un gradiente de imidazol para su elución. Este método había ofrecido buenos resultados en estudios anteriores con otras proteínas Fur (Pellicer *et al.*, 2010). Tras realizar la purificación con la matriz cromatográfica activada con Ni²⁺ y Co²⁺, se eligió el Ni²⁺ por proporcionar una proteína con mayor grado de pureza. Otro motivo por el que se descartó el Co²⁺ como metal para la purificación, fue que la proteína obtenida contenía una cantidad relevante de este metal unido, que se manifestó por la aparición de una serie de picos en el espectro UV-Vis con máximos a 600-750 nm. Este tipo de espectro se había observado en otros homólogos Fur reconstituidos con cobalto (Dian *et al.*, 2011). Esto no ocurrió con el Ni²⁺. Al contrario de lo que sucedía con otras proteínas Fur con las que se había trabajado previamente en el grupo de investigación, el tampón empleado en la purificación con un pH próximo al fisiológico (50 mM Tris/HCl pH 8, 150 mM NaCl, 10 % glicerol), no provocó la precipitación de la proteína por agregación en la diálisis, facilitando además los ensayos posteriores. Estas características de cantidad y ausencia de impurezas permitieron utilizar este método de purificación y, sin realizar ningún paso adicional, llevar a cabo la caracterización bioquímica deseada.

Únicamente se realizó un paso adicional en el proceso de purificación cuando el objetivo fue obtener la proteína sin cola de histidinas. Para ello, se sometió la proteína obtenida previamente a un proceso de digestión con trombina y posterior cromatografía de unión a metales. De esta forma, se obtuvo CdFur sin la secuencia de histidinas y con un alto grado de

pureza, si bien el rendimiento no fue muy elevado. En consecuencia, se realizó este paso adicional sólo cuando la caracterización bioquímica requería una proteína sin cola de histidinas. El análisis por MALDI-TOF confirmó que la proteína purificada era el homólogo Fur de *C. difficile* cuyo peso molecular estaba en concordancia con el calculado de forma teórica.

Tras la purificación en las condiciones estándar de laboratorio, la proteína presentó una coloración rojiza que posteriormente fue cambiando de marrón a, finalmente, un tono amarillento. Esta coloración en principio se atribuyó a la presencia de una población de moléculas de CdFur asociadas a algún grupo prostético, lo que se verificó tras realizar un espectro en el UV-Vis. La hipótesis inicial fue que se trataba de un grupo hemo, puesto que habitualmente el máximo del complejo proteína-hemo se sitúa en torno a 410-420 nm (tabla 22). Además, esta interacción ha sido caracterizada para otros homólogos Fur (Hernández *et al.*, 2004b). Sin embargo, la forma del espectro difería de los clásicos espectros de hemoproteínas.

La presencia de bandas en el rango de 340-420 nm en el espectro UV-Vis de otras proteínas también se ha asociado con la existencia de grupos Fe-S de tipo [4Fe-4S] (Green *et al.*, 1991). Por otro lado, bandas a mayores longitudes de onda son características de proteínas con grupos de tipo [2Fe-2S] (Orme-Johnson and Orme-Johnson, 1982). Así pues, teniendo en cuenta el espectro realizado tras la purificación, no se podía descartar que CdFur se obtuviera con un grupo de este tipo.

Es conocido que los grupos Fe-S son inestables frente a compuestos oxidantes. Sin embargo, su sensibilidad frente al O₂ cubre un amplio rango, desde alta estabilidad en proteínas Fe-S de alto potencial (Maskiewicz *et al.*, 1975) hasta alta sensibilidad en proteínas tales como Fnr de *E. coli* con un grupo [4Fe-4S] extremadamente lábil (Lazizzera *et al.*, 1996). La degradación de un grupo Fe-S por exposición al aire se relaciona con una disminución en la absorbancia a 420 nm en los espectros de estas proteínas (Khoroshilova *et al.*, 1997; Scott *et al.*, 2000). Además, si el grupo [4Fe-4S] se degrada a uno de tipo [2Fe-2S], además del descenso en la absorbancia a 420 nm, se observa un aumento de absorbancia a mayores longitudes de onda. Esto se ha observado en proteínas como las WhiB de *Mycobacterium tuberculosis*. En este caso, en condiciones anaeróbicas se obtenían con un grupo [4Fe-4S], pero en presencia de oxígeno algunas se podían obtener con un grupo [2Fe-2S] cuyo espectro característico presentaba, además del pico a 280 nm, dos picos adicionales en torno a ~333-340 nm y ~420-424 nm junto con dos hombros anchos a ~460 y ~560-580 nm. Las diferencias en los espectros de las siete proteínas WhiB, en cuanto al patrón que presentaban los picos, se atribuía a diferencias en el entorno electrónico del grupo Fe-S (Alam *et al.*, 2009). Situación distinta era la que tenía lugar en el caso de Fnr de *E. coli* que cuando se purificaba en condiciones aeróbicas carecía de grupo Fe-S. A pesar de ello, la preparación sí contenía una cantidad de hierro en proporción subestequiométrica de 1 mol de hierro por mol de proteína monomérica (Green *et al.*, 1991). Estudios posteriores confirmaron la presencia de un grupo de tipo [4Fe-4S] en Fnr tras purificar en condiciones estrictamente anaeróbicas concluyendo que el hierro detectado en la preparación aeróbica podía ser un remanente del grupo Fe-S extremadamente lábil (Khoroshilova *et al.*, 1995). La proteína obtenida en anaerobiosis con el grupo [4Fe-4S] presentaba coloración verde-amarillenta mientras que la transición de este color a tonos rojizos se asociaba a la conversión del grupo [4Fe-4S] en uno de tipo [2Fe-2S] por

exposición al oxígeno (Khoroshilova *et al.*, 1997). La apo-proteína que resultaba de una exposición prolongada al oxígeno era incolora, consecuencia de perder completamente el grupo Fe-S.

Tras la purificación en anaerobiosis de CdFur, la preparación tenía color verdoso y se detectó la presencia de hierro aunque no en cantidad estequiométrica por lo que no pudo asociarse a ningún grupo prostético en particular. Sin embargo, teniendo en cuenta los antecedentes que se acaban de comentar, había indicios que apuntaban a un grupo Fe-S. El contenido en hierro subestequiométrico de las proteínas sulfo-férricas se debe generalmente a la incompleta incorporación del grupo Fe-S en la proteína durante la sobreexpresión en *E. coli* y/o a la pérdida de éste durante la purificación cuando las condiciones no son estrictamente anaeróbicas (Paraskevopoulou *et al.*, 2006). Además, la ausencia de hierro en la preparación obtenida en presencia de oxígeno podía deberse a que se analizó proteína obtenida en condiciones aeróbicas y dializada varias veces tras la purificación, por lo que el hierro podría haberse perdido casi por completo en este paso. El espectro de EPR de la preparación obtenida en anaerobiosis también confirmó la presencia de hierro rómbico no perteneciente a ningún tipo de grupo prostético en particular, pero sí asociado a la proteína. El hecho de que no se pudiera obtener una población de proteína suficientemente grande con el grupo prostético unido pudo deberse a la extrema labilidad de éste y a problemas técnicos que surgieron durante la purificación en anaerobiosis, ya que no se pudo alcanzar una concentración de O₂ < 2 ppm en la cámara anaeróbica. Sería necesario mejorar la purificación en anaerobiosis así como realizar ensayos de reconstitución del grupo prostético y de retardo en gel, también en ausencia de oxígeno, para estudiar la actividad de la holo-proteína *in vitro*.

Dado que existen diversos reguladores transcripcionales que unen cofactores y, dependiendo de las condiciones intra- y/o extracelulares, pueden unirse al DNA tanto en su forma apo como holo (Green and Paget, 2004), se decidió hacer un estudio funcional de la proteína obtenida en aerobiosis en su forma apo. Una forma de estudiar la actividad de unión al DNA *in vitro* de las proteínas Fur es mediante ensayos de tipo EMSA. En concreto, se estudió la actividad de la proteína CdFur usando su propio promotor ya que se ha descrito la autorregulación de Fur en varios microorganismos (Carpenter *et al.*, 2009). La proteína recombinante fue capaz de unirse específicamente a su región promotora y las condiciones en las que mostró mayor actividad fueron en presencia de agente reductor y ausencia de metal. El reductor utilizado fue DTT, reactivo específico para reducir puentes disulfuro, y el quelante EDTA. La necesidad de poder reductor en el ensayo de actividad de estas proteínas se ha descrito anteriormente en diversos homólogos (González *et al.*, 2010). Normalmente el DTT garantiza la reducción de las cisteínas, residuos especialmente frecuentes en las proteínas Fur y que suelen desempeñar un papel importante tanto en su oligomerización como en su unión a metales.

Por otro lado, el hecho de que la proteína recombinante obtenida no necesitase metal para desarrollar su actividad *in vitro* se ha observado en otros homólogos como Fur de *B. subtilis* y *L. monocytogenes* (Bsat and Helmann, 1999; Ledala *et al.*, 2007). Con ambas proteínas CdFur presenta un alto porcentaje de identidad y similitud (tabla 15). Habitualmente, las proteínas Fur responden a la presencia de metales divalentes en el medio, especialmente Fe(II) por ser el metal correpressor. En el caso de BsFur, Bsat y Helmann observaron que la

proteína era activa *in vitro* sin la necesidad de añadir metal y el tratamiento de la proteína con EDTA, no afectaba a su actividad. De hecho, la adición de Mn(II), en sustitución de Fe(II), mejoraba sólo ligeramente la interacción de la proteína con el promotor diana. Con *LmFur* se observó que la proteína estaba regulada positivamente en condiciones limitantes de hierro, sin embargo, el análisis *in vitro* mediante *footprinting* mostró que *LmFur* era capaz de unirse y proteger la región de la caja Fur de su propio promotor en ausencia del metal como cofactor (Ledala *et al.*, 2007). En ambos estudios, los autores sugirieron que la unión de Fur al DNA podía depender de otro cofactor aún no identificado. Del mismo modo, en *V. vulnificus* se ha demostrado que Fur se autorregula uniéndose y activando la expresión de su propio gen en ausencia de hierro (Lee *et al.*, 2007). En el caso de *CdFur*, la proteína no se unía al DNA si no se añadía EDTA al ensayo demostrando que, no sólo no necesitaba metal sino que su presencia impedía la unión de esta al promotor. No está claro por qué el metal impedía la unión de *CdFur* al DNA *in vitro*. Se ha descrito para otras proteínas que la purificación por medio de una cromatografía de afinidad a iones metálicos puede dejar cierta cantidad del metal utilizado para activar la matriz IMAC. Este comportamiento se observó en el homólogo Fur de *V. cholerae* cuya preparación de proteína obtenida mediante una cromatografía de afinidad a níquel contenía 0,04 moles de Ni por mol proteína (Sheikh and Taylor, 2009). En ocasiones este contenido en metal puede afectar a la función de la proteína. En el caso de *CdFur*, el EDTA podía estar ayudando a eliminar ese metal además de las trazas de metales divalentes presentes en los tampones. Los otros autores que habían trabajado con la proteína Fur de *C. difficile* no consiguieron obtener una proteína activa para validar por EMSA la unión de la proteína a los promotores de genes de su regulón identificados por transcriptómica. Sin embargo, consiguieron demostrar que *CdFur* se unía a algunos de los genes reprimidos *in vivo* utilizando un kit de síntesis de proteínas *in vitro* (PURExpress®, New England BioLabs Inc.) y realizando ensayos de EMSA en presencia de DTT y EDTA en el tampón de electroforesis (Ho and Ellermeier, 2015). Esto apoyaba los resultados obtenidos en esta tesis.

Además de comprobar la actividad de la proteína *CdFur* recombinante con su propio promotor, se estudió la actividad frente a otros promotores de genes implicados en el metabolismo del hierro. En el momento de encontrar las condiciones de ensayo de la proteína purificada no se conocía el regulón de la misma. En concreto, se analizó la interacción de *CdFur* con cinco promotores de genes que codifican proteínas transportadoras de hierro y sideróforos, además del promotor del gen de la flavodoxina cuya regulación por Fur se ha descrito en diversos microorganismos (Vasileva *et al.*, 2012). Tras realizar los ensayos, se comprobó que la proteína se unía a todos los promotores seleccionados en las mismas condiciones en que lo hacía con su propio promotor (presencia de poder reductor y ausencia de metal).

Una vez establecidas las condiciones de ensayo y comprobado que la proteína se unía a diversos promotores, se intentó determinar la secuencia consenso que reconoce *CdFur*. La caja Fur determinada en este trabajo, y en concordancia con la obtenida para esta proteína por Ho and Ellermeier (Ho and Ellermeier, 2015), presentó homología con la descrita para *B. subtilis* (Baichoo and Helmann, 2002). Se trataba de una secuencia de 18 pares de bases rica en A/T. A pesar de haberse definido en algunos microorganismos unas secuencias consenso donde la proteína Fur se une en la región operadora (cajas Fur), existe una gran diversidad en cuanto al número de cajas que presenta cada promotor y la posición de estas respecto al inicio de la

transcripción. También hay variedad en cuanto a la secuencia de las cajas Fur descritas, difiriendo de una especie a otra como la de *E. coli* o *B. subtilis* (Escolar *et al.*, 1998; Baichoo and Helmann, 2002). En un futuro, sería interesante realizar ensayos de *footprinting* ya que es una forma útil de conocer con exactitud a qué secuencia de la zona operadora se una proteína reguladora.

Dada la imposibilidad de trabajar con el patógeno *C. difficile* en un laboratorio de bioseguridad P1, el análisis funcional *in vivo* de Fur de *C. difficile* se realizó mediante dos tipos de ensayos adaptados a los medios disponibles. El objetivo principal era comprobar cuál era el efecto del hierro en la actividad del homólogo CdFur *in vivo*, ya que los resultados *in vitro* parecían demostrar que la proteína actuaba en forma apo. En uno de ellos se realizó un ensayo de complementación funcional analizando si CdFur era capaz de sustituir al homólogo Fur de *E. coli*, homólogo con el que comparte un 35 % de identidad y un 62 % de similitud (tabla 15). EcFur actúa habitualmente como un holo-represor clásico (Seo *et al.*, 2014). Para el ensayo era necesario disponer de una cepa Δfur con el fin de que la proteína Fur endógena no interfiriera en los resultados. Por ello, se escogió la cepa de *E. coli* H1780, que ha sido utilizada en varias ocasiones para ensayos de complementación (Bereswill *et al.*, 1999; Quatrini *et al.*, 2005). Esta cepa presenta en su genoma una construcción donde el promotor del gen *fiu*, gen que es fuertemente reprimido por EcFur, se encuentra fusionado al gen *lacZ*, de modo que la actividad del promotor puede medirse determinando la actividad β -galactosidasa (Hantke, 1987). Tras el ensayo se comprobó que CdFur era capaz de reconocer de forma eficiente el promotor de *E. coli* en presencia de hierro pero no en su ausencia por lo que complementaba la función de su homólogo EcFur actuando como un holo-represor *in vivo*.

Puesto que CdFur era capaz de sustituir a EcFur, se realizó un ensayo de Western blot para ver si los anticuerpos contra Fur de *E. coli* disponibles en el laboratorio podían reaccionar con el homólogo Fur de *C. difficile*. La fuerte reacción cruzada inmunológica de CdFur con un antisuero contra Fur de *E. coli* demostró que las proteínas Fur de ambas especies comparten semejanza estructural. Este mismo efecto se ha observado en otros homólogos como Fur de *H. pylori* (Bereswill *et al.*, 1999). Esta herramienta permitirá en un futuro medir los niveles de sobreexpresión de la proteína CdFur en una cepa de *C. difficile* cultivada en diferentes condiciones, aún sin disponer de anticuerpos específicos contra la proteína.

En el segundo ensayo que se realizó para definir el carácter regulador del homólogo CdFur *in vivo*, se analizó la actividad de la proteína frente a dos de sus promotores diana, empleando el gen reportero *lacZ* en el sistema heterólogo *E. coli*. Las regiones promotoras que se escogieron para el ensayo fueron las de los genes *fur* y *feoA* ya que ambos presentaron una buena interacción con la proteína CdFur en los ensayos de EMSA y el primero, al tratarse del propio promotor, permitía estudiar al mismo tiempo el modo de autorregulación. El segundo es un gen representativo de un sistema de captación de hierro presente en la mayoría de bacterias (Lau *et al.*, 2016). Para crear el sistema heterólogo, se generó una cepa de *E. coli* Δfur partiendo de una cepa $\Delta lacZ$. Un mutante de delección Δfur en *E. coli* se considera una herramienta muy valiosa para evaluar el efecto de la proteína exógena (en este caso CdFur) sobre la expresión del gen reportero cuando la bacteria crece en diferentes condiciones nutricionales. Como el objetivo era analizar el modo de actuación de la proteína, la introducción del gen *fur* de *C. difficile* en esta cepa se realizó mediante transformación con el

plásmido de bajo-medio número de copias pACYC-*furCd* (el mismo que se había empleado en el ensayo de complementación en *E. coli*). Se escogió un plásmido de bajo-medio número de copias con el fin de simular el nivel intracelular de proteína que puede tener la bacteria en condiciones normales. Por último, se introdujeron plásmidos de alto número de copias con las fusiones transcripcionales entre las zonas promotoras a estudiar y el gen reportero *lacZ*: pFU62[P*fur*/*lacZ*] o pFU62[P*feoA*/*lacZ*]. El sistema pFU constituye una herramienta útil para el estudio de la actividad de un determinado promotor a partir de las medidas de actividad β -galactosidasa (Uliczka *et al.*, 2011).

Con el fin de ver si el sistema heterólogo diseñado era válido y no tenía el crecimiento celular afectado de manera significativa, se realizaron curvas de crecimiento, tanto para la cepa $\Delta fur\Delta lacZ$ (JW0669) como para la cepa conteniendo uno o los dos plásmidos generados para el estudio: pACYC-*furCd* y/o el sistema pFU62 con las fusiones transcripcionales. El ensayo se realizó en medio mínimo M9 ya que de esta forma se podía controlar la presencia de hierro en el medio de cultivo. Para ello, primero fue necesario adaptar el crecimiento de las células en dicho medio escalando cultivos desde medio LB a medio mínimo M9. Aunque *fur* no es un gen esencial para *E. coli*, sí es un regulador global de la transcripción y afecta a muchísimos procesos celulares (Fillat, 2014). Sin embargo, todas las cepas mostraron una tasa de crecimiento similar en el medio de cultivo M9 con ligeras variaciones. De este modo, cuando estuvo presente el plásmido portador del gen *fur* de *C. difficile* se observó un ligero aumento del crecimiento. Esto indicó que CdFur podía estar sustituyendo al homólogo EcFur y que a pesar de no ser un gen esencial, su ausencia sí influía directa o indirectamente en el crecimiento de la bacteria. Y por otro lado, cuando estuvieron presentes los dos plásmidos o sólo el plásmido pFU62, se ralentizó ligeramente el crecimiento. Esto probablemente fuese debido a que este sistema se trataba de un plásmido de alto número de copias por lo que parte de la maquinaria celular se dedicaba a la producción del gen reportero en detrimento del crecimiento celular.

Una vez comprobado que las cepas del ensayo no presentaron alteraciones significativas en el crecimiento, se estudió el efecto del hierro en la actividad de unión al DNA del homólogo CdFur *in vivo*. Para ello, se midió la actividad β -galactosidasa en cada cepa cuando se cultivaron en presencia de hierro o bien de un quelante con el fin de conseguir un medio de cultivo sin metal. En ausencia de la proteína CdFur, se produjo la transcripción del gen *lacZ* pero a distinto nivel en ambos promotores. Sin embargo, en ambos casos apenas hubo diferencias en el nivel de actividad β -galactosidasa en cuanto a la presencia de hierro, indicando que la transcripción no dependía del metal. Cuando el sistema expresaba la proteína CdFur se observó una disminución de la expresión del gen *lacZ* en ambos casos. Esto indicó que CdFur impedía la unión de la RNA polimerasa a la región operadora tanto del promotor del gen *fur* como del gen *feoA*. Además, la represión fue mayor en presencia de hierro confirmando que CdFur actúa como un holo-represor *in vivo* en el sistema heterólogo *E. coli*. Con ambos promotores se observó el mismo nivel de represión lo que significaba que en las condiciones ensayadas, ambos genes son regulados por CdFur mediante un mecanismo semejante.

Hasta este punto, queda de manifiesto que la bacteria *C. difficile* dispone de un homólogo Fur que tiene diferentes formas asociadas a la presencia o ausencia de un grupo prostético sensible al O₂. Cuando el gen se expresa en un sistema heterólogo que crece en condiciones

aeróbicas, el producto es una proteína que carece de cofactor. Esta proteína es funcional *in vitro* en las condiciones típicas de ensayo de un homólogo Fur con la particularidad de que necesita estar reducida y en ausencia de metal regulador para unirse al DNA. Este comportamiento es típico de homólogos Fur que funcionan como apo-reguladores. Sin embargo, cuando se estudia su comportamiento *in vivo* en el mismo sistema heterólogo que se utiliza para su sobreexpresión, los resultados indican que funciona como un holo-represor típico. Esta diferencia de comportamiento parece estar asociada a la existencia *in vivo* de una forma de la proteína asociada a un cofactor, posiblemente diferente al que tiene en condiciones anaeróbicas. Esta situación apunta a que si bien *C. difficile* es un organismo anaerobio estricto parece poseer una forma de Fur que puede tener relevancia fisiológica en la respuesta ante el estrés oxidativo que pueda generar una eventual exposición de este organismo al O₂.

5.2. Caracterización bioquímica de CdFur y estudio de sus residuos de cisteína

Como se ha comentado en el apartado anterior, Fur de *C. difficile* podría modular su actividad frente a un proceso de estrés oxidativo. En esta parte de la memoria, y teniendo en cuenta que la proteína necesitaba de poder reductor para unirse al DNA, se investigó el papel que juegan los distintos residuos de cisteína, de forma individual y en conjunto, en los procesos de oligomerización y de unión a metal regulador/estructural. Ambos procesos parecen influir en la actividad de CdFur y su estudio ha permitido proponer un posible mecanismo de funcionamiento para este regulador transcripcional.

Las cisteínas son aminoácidos poco frecuentes, de modo que cuando se encuentran conservadas en una familia de proteínas suelen jugar un papel fundamental en la estructura, función o regulación de la misma. La familia de reguladores Fur suele presentar dos cisteínas en el motivo característico conservado H₃₋₅XXCXXC. Además, es habitual la existencia de otro motivo CXXC adicional como propio de la familia (Fillat, 2014). Atendiendo a la secuencia de aminoácidos de CdFur, aparte de los ya mencionados motivos CXXC que implican a los residuos C₁₀₁, C₁₀₄, C₁₄₁ y C₁₄₄, existen otras tres cisteínas más: dos en el extremo N-terminal (C₅₁ y C₈₁) y la tercera, C₉₃, en la región interdominios. De las secuencias de proteínas Fur analizadas (figura 40), únicamente los homólogos Fur de *V. cholerae*, *B. cereus* y *H. pylori* contienen una cisteína en el dominio de unión a DNA. Por tanto, la presencia de más de una cisteína tanto en el extremo N-terminal como en la región entre dominios no es habitual en otras secuencias de proteínas Fur. Además, estos residuos se encuentran altamente conservados en el género *Clostridium*, por lo que podían tener relevancia en el funcionamiento de la proteína.

Una forma de conocer el papel que un cierto residuo desempeña en la función de una proteína es realizar un mutante de sustitución de este aminoácido. En este trabajo se construyeron los mutantes simples de las siete cisteínas mas los mutantes dobles correspondientes a los dos motivos CXXC. En todos los casos, los residuos de cisteína se sustituyeron por residuos de alanina por ser un aminoácido pequeño y sin grupo funcional en la cadena lateral. Este proceso se realizó mediante mutagénesis dirigida utilizando como

molde el plásmido de sobreexpresión que contenía la secuencia nativa del gen *fur*. La sobreexpresión y purificación de todos los mutantes se realizó siguiendo el mismo protocolo que se utilizó con la proteína nativa. Únicamente se aumentó el tiempo de inducción con IPTG del mutante C101/104A por haberse observado menor cantidad de proteína sobreexpresada en las condiciones estándar. En ningún caso se observó que la mutación realizada afectara de forma significativa a la sobreexpresión en *E. coli*. El método de purificación estandarizado para la proteína nativa permitió en todos los casos obtener los mutantes en forma soluble, y con un grado de pureza elevado y apto para la caracterización bioquímica posterior. Sin embargo, el rendimiento obtenido en la purificación de algunos de los mutantes de los residuos de cisteína de los motivos CXXC fue menor que el obtenido con la proteína nativa y los mutantes de los residuos C₅₁, C₈₁ y C₉₃. La principal hipótesis fue que una cantidad relevante de estas proteínas formaba cuerpos de inclusión durante la sobreexpresión en *E. coli*, perdiéndose de esta manera gran cantidad de proteína al inicio de la purificación. Aun así, tras el proceso de purificación se obtuvo en cada caso cantidad de proteína suficiente para su caracterización bioquímica por lo que se decidió obtener todas las proteínas con el mismo método para poder hacer un estudio comparativo.

Puesto que la introducción de una mutación en una proteína puede dar lugar a alteraciones en la estructura secundaria de la misma, se comprobó mediante dicroísmo circular que los mutantes de cisteína conservaban el mismo plegamiento que la proteína nativa. En la predicción de estructura secundaria de la proteína nativa *CdFur*, se observó la misma distribución de elementos de estructura secundaria que presentan otros homólogos *Fur* ya cristalizados, mostrando un alto contenido en hélices alfa (Butcher *et al.*, 2012; Dian *et al.*, 2011). Todos los mutantes presentaron espectros de dicroísmo circular semejantes al de la proteína nativa por lo que el hecho de perder uno de estos residuos no afectaba de forma significativa al plegamiento global de *CdFur*. Este resultado se ha observado en otros homólogos *Fur* como el de *H. pylori* donde un mutante doble de cisteína mostró un espectro de dicroísmo circular superponible con el de la proteína nativa (Dian *et al.*, 2011) o con mutantes incluso triples realizados en el homólogo *FurA* de *Anabaena* sp. PCC 7120 (Botello-Morte, 2014).

A pesar de que una mutación no altere el plegamiento global de una proteína, ese residuo puede provocar cambios en la conformación activa de ésta, y como consecuencia en su funcionamiento. Los mutantes simples de cisteína pertenecientes a los motivos CXXC (C101A, C104A, C141A y C144A) no mostraron actividad de unión al DNA *in vitro* en las condiciones óptimas de unión descritas para la proteína nativa (presencia de poder reductor y ausencia de metal). Estudios sobre mutaciones en estos residuos realizadas en otros homólogos *Fur* describían casos de proteínas no activas: en el homólogo *Fur* de *E. coli*, estudiaron los mutantes de las cisteína del primer motivo CXXC (C92S y C95S) (Coy *et al.*, 1994); en el homólogo *BsFur* realizaron los cuatro mutantes simples de los dos motivos CXXC (Bsat and Helmann, 1999); y en el homólogo de *KoFur*, estudiaron la mutación de la segunda cisteína del primer motivo CXXC (C96S) (Oglevie and Hernández, 2015). Los efectos de estas mutaciones se estudiaron *in vivo* mediante ensayos de actividad β -galactosidasa en los que la cepa utilizada tenía el gen *lacZ* bajo el control de un promotor diana. En todos estos mutantes se observó una disminución significativa de los niveles de actividad de la proteína *in vivo* en comparación con la de la proteína nativa. Además, los ensayos *in vitro* realizados con los mutantes de

cisteína de los homólogos *EcFur* y *KoFur* confirmaron que estas proteínas no tenían capacidad para unirse al DNA (Coy *et al.*, 1994; Oglevie and Hernandez, 2015). Por ello, tanto en estos homólogos *Fur* descritos como en *CdFur*, se asume que las cisteínas de los motivos CXXC influyen de una manera u otra, en la actividad de este regulador transcripcional.

Por otro lado, el resto de mutantes (C51A, C81A y C93A) sí presentó actividad en los ensayos de EMSA en las mismas condiciones que la proteína nativa. Esto indicaba que la ausencia de estos residuos por separado no afectaba a la proteína y le permitía adoptar una conformación activa. Sin embargo, cuando se ensayaron aquellas condiciones en las que la proteína nativa *CdFur* no era activa *in vitro*, esto es, ausencia de poder reductor o presencia de metal, se observó que el mutante C81A era activo en el primer caso y el C93A en el segundo. Esto sugirió la implicación de estos residuos en los mecanismos de inactivación de la proteína nativa. En el caso del residuo C₈₁, se asume que participa en la formación de un puente disulfuro que es necesario que esté reducido para que la proteína sea activa; si C₈₁ se encuentra oxidada formando dicho puente disulfuro con otra cisteína, la proteína no es activa. La conformación de la proteína donde C₈₁ no está presente, sería por tanto la misma que aquella en la que el puente disulfuro donde interviene este residuo se encuentra reducido. En el caso del residuo C₉₃, parece estar implicado en la coordinación del metal regulador ya que la presencia de metal no influyó en la actividad *in vitro* de este mutante, al contrario de lo que sucedía con la proteína nativa.

Puesto que las cisteínas son residuos con propiedades redox y elevada reactividad, debido a la capacidad de los grupos tiol de estabilizar la estructura de las proteínas mediante la formación de puentes disulfuro y la coordinación de iones metálicos (Maret, 2006), también se abordó el estudio para *CdFur* de la oligomerización y la actividad en diferentes condiciones de óxido-reducción. La solución de proteína recombinante obtenida estaba formada mayoritariamente por dos isoformas de monómero con una pequeña fracción de dímero. Como ya se ha comentado, la actividad de la proteína dependía de la presencia de un agente reductor de puentes disulfuro y este poder reductor hacía que las dos isoformas se transformasen en una sola, tal como se observó en electroforesis desnaturizante (figura 70). Por tanto, la diferencia entre ellas se debía a la presencia de algún puente disulfuro intramolecular y, de esta manera, se asoció la isoforma reducida con aquella con actividad de unión al DNA y la isoforma oxidada como la inactiva. Así también se explicaba el hecho de que la proteína mostrase cierta actividad residual en ausencia de DTT. El desdoblamiento de bandas se ha observado en otras proteínas de la familia *Fur* como PerR de *B. subtilis* (Lee and Helmann, 2006a), *Fur* de *B. cereus* (Harvie and Ellar, 2005), *FurS* de *S. reticuli* (Ortiz de Orué Lucana and Schrempf, 2000) o de la familia de proteína LysR como OxyR de *E. coli* (Tao, 1999) y CatR de *S. coelicolor* (Hahn *et al.*, 2000). En todos estos casos la presencia de dos bandas se asoció a dos isoformas que diferían en un puente disulfuro intramolecular, cuya formación era reversible y regulaba la actividad de unión al DNA.

El proceso de oxidación de la proteína mediante la adición de peróxido de hidrógeno provocó la formación de un oligómero de gran masa molecular y asociado a este proceso, su inactivación. Además, en la electroforesis desnaturizante sólo se observó una especie monomérica. Esta especie no tendría por qué coincidir con la isoforma oxidada presente en la solución de proteína purificada que se diferencia de la isoforma activa-reducida en un puente

disulfuro intramolecular. La oxidación de residuos de cisteína por H_2O_2 implica un ataque nucleofílico del grupo tiol en el centro electrofílico del peróxido de hidrógeno. La desprotonación del grupo tiol de la cisteína para generar el anión tiolato aumenta su nucleofilicidad y, por tanto, su reactividad frente a H_2O_2 . Estas reacciones son químicamente muy complejas y pueden conducir a diferentes estados de oxidación del azufre, incluyendo tioles, ácidos sulfénicos y sulfínicos, radicales tiilo, disulfuro S-óxidos o disulfuros (Ortiz de Orué Lucana *et al.*, 2012). La especie oligomérica de alta masa molecular estaba constituida por puentes disulfuro intermoleculares ya que se rompían en presencia de agente reductor. Además, la posterior reducción de proteína oxidada llevaba a la recuperación de su actividad. En la tiorredoxina 2 de *E. coli* se ha descrito este mismo proceso. Trx2 forma un complejo de alta masa molecular bajo condiciones de estrés oxidativo y la formación de este complejo es reversible por DTT, lo que implica que se forma por puentes disulfuro intermoleculares (Hajjaji *et al.*, 2009). Los autores sugerían que este complejo no es un producto final de Trx2 sino que su formación parecía reflejar la función específica que tiene Trx2 bajo condiciones de estrés oxidativo.

La formación del oligómero de alta masa molecular tras la oxidación de la proteína, constituido por puentes disulfuro intermoleculares, podría estar relacionada con el estado oligomérico que se detectó en la electroforesis desnaturante de los mutantes C101A, C104A, C141A y C144A. Estos cuatro mutantes, a pesar de haberse podido sobreexpresar y purificar satisfactoriamente, tenían tendencia a la oligomerización mostrando en la electroforesis, un patrón diferente al de la proteína nativa y el resto de mutantes (figura 72). Esos oligómeros estaban formados por puentes disulfuro intermoleculares ya que en presencia de poder reductor, los mutantes se convertían en la forma monomérica. Sin embargo, en ningún caso mostraron capacidad de unión al DNA. Por tanto, la presencia de ese oligómero de alta masa molecular podría estar relacionada con la inactividad, al igual que la oxidación de la proteína nativa la incapacitaba para unirse al DNA. Esto podría significar que la ausencia de esos residuos provocaba un cambio conformacional importante en la proteína de modo que dichos mutantes se obtenían en un estado oxidado. La tendencia a la agregación podría explicar además el menor rendimiento obtenido en su purificación y refuerza la hipótesis de que pudiesen formar cuerpos de inclusión durante la sobreexpresión en *E. coli*. En los mutantes de cisteína de los homólogos Fur de *B. subtilis* o *E. coli* mencionados anteriormente, los autores sugerían que la inactividad y la tendencia a la oligomerización que presentaban dichas proteínas se debía a su inestabilidad, no detectándose en ensayos de inmunoprecipitación en el caso de *BsFur* o no pudiéndose sobreexpresar en el de *EcFur* (Bsat and Helmann, 1999; Coy *et al.*, 1994).

La oligomerización observada *in vitro* de la proteína no tiene por qué corresponder con el proceso que se produce *in vivo* sobre el DNA y que se ha relacionado con la actividad reguladora clásica de la proteína (Fillat, 2014). Parece poco probable que la interacción entre monómeros de proteína *in vivo* se produzca por la formación de puentes disulfuro, ya que en el citoplasma las proteínas se encuentran en un ambiente reductor y además se ha descrito que *in vitro* es necesaria la presencia de condiciones reductoras para que se produzca de forma óptima la interacción de *CdFur* con el DNA. Sin embargo, este proceso podría tener otro significado biológico fuera del contexto de la oligomerización sobre el DNA ya que podría

constituir la base de un mecanismo de inactivación de la proteína como respuesta al estrés oxidativo en la célula, tal como ocurre con Trx2 (Hajjaji *et al.*, 2009).

La reversibilidad del proceso de óxido-reducción de CdFur tanto en la oligomerización como en la actividad de unión al DNA sugería como ya se ha comentado, que la actividad de la proteína dependía de un proceso redox. Esta hipótesis, llevó a estudiar el estado de oxidación de los distintos residuos de cisteína ya que parecía esencial para la funcionalidad de la proteína tal como ocurría con otros homólogos como FurA de *Anabaena* o FurS de *S. reticuli* (Hernández *et al.*, 2006; Ortiz de Orué Lucana *et al.*, 2003). De este estudio se pudo obtener información relevante sobre el mecanismo de funcionamiento de CdFur. Con la determinación del número de cisteínas libres se pudo calcular que las dos isoformas monoméricas de la proteína nativa CdFur se diferenciaban sólo en un puente disulfuro intramolecular: la isoforma reducida tenía cinco cisteínas libres mientras que la oxidada disponía de tres. Complementando este resultado, con los ensayos de alquilación de cisteínas con el compuesto AMS se pudo deducir que ambas isoformas poseían un puente disulfuro entre los residuos C₁₄₁ y C₁₄₄ y que este enlace parecía no romperse ni en condiciones reductoras. El hecho de que los mutantes simples de estas cisteínas tuvieran una alta tendencia a oligomerizar y sin embargo, el doble mutante C141/144A tuviera un comportamiento más parecido a la proteína nativa, podía deberse a la reactividad de estos residuos. Las cisteínas C₁₄₁ y C₁₄₄ podrían ser muy reactivas y al faltar una de ellas en el motivo CXXC, la otra podría reaccionar con otras moléculas mediante la formación de puentes disulfuro dando como producto el oligómero de alta masa molecular. En el mutante doble no se produciría esta agregación. Aún así, el puente disulfuro entre C₁₄₁ y C₁₄₄ parece ser esencial para la conformación activa de la proteína ya que sin él, ni los mutantes simples ni el doble eran capaces de unirse al DNA. Además, es habitual la presencia de un puente disulfuro entre las cisteínas de un motivo CXXC cuando éste se encuentran al inicio de una hélice alfa (Iqbalsyah *et al.*, 2006). Éste sería el caso en la proteína CdFur según la predicción de estructura secundaria (figura 64). Por otro lado, en el puente disulfuro que permitía las dos isoformas en la proteína nativa y que por tanto era el responsable de la activación/inactivación de CdFur, participaría el residuo C₈₁ ya que el correspondiente mutante no precisaba de poder reductor para unirse al DNA. La otra cisteína responsable de la formación de ese puente disulfuro podría pertenecer al motivo C₁₀₁XXC₁₀₄, descartando los residuos C₅₁ y C₉₃ cuyos mutantes presentaban un comportamiento similar al de la proteína nativa. Otro dato significativo para suponer que uno de los residuos de cisteína del motivo C₁₀₁XXC₁₀₄ podía formar parte del puente disulfuro con C₈₁ era que ambos tenían relevancia en la funcionalidad de la proteína: sus mutantes no presentaban actividad de unión al DNA y las soluciones de proteína que se obtuvieron para ambos presentaban cierta inestabilidad y tendencia a la agregación. Todo ello indicaba que la ausencia de alguno de ellos provocaba un cambio conformacional importante para CdFur.

En cuanto a la capacidad de unión a zinc de la proteína recombinante, otro aspecto relevante donde suelen estar implicados residuos de cisteína, los ensayos de tinción con PAR revelaron la presencia de este metal en las dos isoformas que constituían el monómero en CdFur. El análisis posterior mediante ICP-OES permitió determinar que la proteína contenía aproximadamente un átomo de zinc por monómero. Este resultado se obtuvo tanto en el análisis de la proteína con y sin cola de histidinas lo que indicaba que la presencia de ésta no contribuía a la coordinación de metal de manera artefactual. El hecho de obtener un valor

inferior a 1 en el análisis del contenido en zinc y sin embargo, deducir que la proteína posee un átomo de zinc por monómero, suele ser habitual en otras proteínas Fur y se debe principalmente a la heterogeneidad de las muestras analizadas, tal como ocurre con *CdFur*. Por ejemplo en *EcFur*, se ha determinado que tanto la forma apo como la forma unida a cobalto, contienen 0,5-0,8 átomos de Zn por monómero (Gonzalez De Peredo *et al.*, 1999). Así pues, el metal presente en la solución de proteína debía corresponder necesariamente al zinc estructural, cuya presencia es característica en la mayoría de las proteínas Fur. Además, el tratamiento con el agente quelante de metales divalentes EDTA no provocó la pérdida del zinc por lo que esto reforzaba la hipótesis de que se trataba de un átomo de zinc estructural. Cabe recordar que en los ensayos de actividad *in vitro* era necesario el uso de EDTA por lo que la forma activa de la proteína contenía zinc. También se ha observado en otros homólogos Fur cómo el tratamiento con EDTA no eliminaba el zinc estructural que al estar coordinado a la proteína con alta afinidad no era fácilmente eliminable por este agente quelante (Bsat and Helmann, 1999; Collet *et al.*, 2003).

Con el fin de determinar si alguno de los residuos de cisteína estaba implicado en la coordinación al zinc y especialmente, si éste se encontraba coordinado en la proteína mediante un entorno de tipo $ZnCys_4$, se analizó el contenido en zinc de todos los mutantes de cisteína. Este tipo de coordinación es habitual en las proteínas Fur donde el metal se coordina a través de las cuatro cisteínas de los dos motivos CXXC, como ocurre con los homólogos *HpFur* y *CjFur*, entre otros (Vitale *et al.*, 2009; Butcher *et al.*, 2012). Cabe precisar que, aunque la presencia de un átomo de zinc estructural es un rasgo característico en la mayoría de las proteínas Fur, hay algunas que no lo contienen. Este es el caso del homólogo FurA de *Anabaena* sp. que, a pesar de que posee los cuatro residuos de cisteína altamente conservados y dispuestos en dos motivos CXXC, no contiene zinc estructural. Esas cisteínas están implicadas en la actividad disulfuro reductasa que se ha descrito para la proteína (Botello-Morte *et al.*, 2014). Tampoco se ha encontrado zinc estructural en Nur de *S. coelicolor* que, aunque ha sido cristalizada en presencia de agente reductor, no contiene zinc coordinado a sus cuatro residuos de cisteína (An *et al.*, 2009).

Tras el análisis del contenido en zinc en todos los mutantes de cisteínas se descartaron los residuos C_{51} , C_{81} y C_{93} como posibles ligandos de coordinación del metal, ya que su ausencia no afectó significativamente al contenido en zinc. Tampoco parecían participar en la coordinación al zinc los residuos del segundo motivo CXXC, las cisteínas C_{141} y C_{144} . Además, estos dos residuos, como se ha comentado anteriormente, parecían estar formando un puente disulfuro entre ellos. Sin embargo, la eliminación de los residuos C_{101} , C_{104} o los dos simultáneamente, sí afectó de manera significativa al contenido en zinc. De hecho, en el mutante doble C101/104A la proteína no podía coordinar el metal. Por consiguiente, se pudo descartar una coordinación de tipo $ZnCys_4$ para el zinc presente en la proteína nativa *CdFur* pero sí se dedujo que los residuos C_{101} y/o C_{104} estaban implicados en la coordinación de este metal. El homólogo Fur de *E. coli* también coordina el átomo de zinc estructural utilizando sólo el primer motivo CXXC. Este homólogo que no posee dos motivos CXXC puesto que el segundo es un motivo CXXXXC, contiene zinc en un entorno tetraédrico con dos ligandos donadores de azufre y dos ligandos donadores N / O, uno de los cuales al menos es una histidina (Jacquamet *et al.*, 1998).

La coordinación de zinc a través de cisteínas es habitual en proteínas sensoras del estado redox de la célula. Al contrario que otros metales de transición, el zinc contiene los orbitales *d* llenos y no participa en reacciones redox. Esta falta de actividad redox hace al zinc un cofactor metálico ideal para funcionar como metal estructural y mejorar la estabilidad de la proteína. Esto ocurre con las proteínas con dedos de zinc. Sin embargo los centros de cisteínas coordinados a zinc sí poseen propiedades redox. Esto se ha visto en proteínas como Trx2, OxyR y Hsp33 entre otras. La oxidación hace que se libere el zinc y se producen cambios conformacionales importantes. Esto sugiere que dichas proteínas tienen un papel importante en la defensa frente a estrés oxidativo (Ortiz de Orué Lucana *et al.*, 2012). Hay proteínas con actividad catalítica como Hsp33 que bajo condiciones reductoras une un átomo de zinc a través de cuatro de sus cisteínas presentes en el extremo C-terminal. Después de exponerse a estrés oxidativo, las cuatro cisteínas forman puentes disulfuro intramoleculares entre ellas, con la consecuente liberación del zinc y seguido de un cambio conformacional importante para su función (Vijayalakshmi *et al.*, 2001). En el caso del regulador transcripcional FurS, el peróxido de hidrógeno provoca la formación de un puente disulfuro entre las cisteínas 93 y 96 y la pérdida del zinc. Esto provoca cambios conformacionales en FurS lo que resulta en una pérdida de afinidad de FurS por el DNA y en la activación de la transcripción de los genes diana (Ortiz de Orué Lucana *et al.*, 2003). Dado que CdFur contenía zinc coordinado por uno o los dos residuos de cisteína del par C₁₀₁XXC₁₀₄, se estudió el efecto que la pérdida del metal provocaba en la proteína. El tratamiento de la proteína con TPEN, un agente quelante con mayor especificidad para el zinc ($K_D = 2,6 \times 10^{-16}$ M) que el EDTA, hizo que CdFur oligomerizara de la misma forma que se había observado tras la oxidación con peróxido de hidrógeno. Es decir, la pérdida de zinc provocaba la aparición de una especie de alta masa molecular. De esta forma se relacionaba la oxidación de la proteína con peróxido de hidrógeno con la pérdida del metal, tal como ocurría en las proteínas anteriormente mencionadas. Además, daba una explicación a por qué las soluciones de proteína de los mutantes C101A, C104A y C101/104A se obtenían en un estado oligomérico relacionado con la ausencia de zinc.

La hipótesis inicial fue que el zinc tenía un papel estructural en CdFur y que su ausencia era responsable de la inactividad de la proteína. Sin embargo, eso no explicaría por qué el mutante doble C101/104A que no contenía zinc, tuviera actividad de unión al DNA *in vitro* en las condiciones óptimas descritas para la proteína nativa. Por tanto, la segunda hipótesis que se barajaba era que la función del zinc en CdFur fuera mantener modificadas a una de las cisteínas (C₁₀₁ o C₁₀₄) evitando de este modo la formación de un posible puente disulfuro intramolecular observado en otros homólogos de Fur (Botello-Morte *et al.*, 2016). De esta forma, la otra cisteína del primer motivo CXXC quedaría libre para poder ejercer su función. En el mutante doble, al estar ausentes ambas cisteínas no sería necesaria la presencia del zinc.

Según los resultados experimentales obtenidos tras la caracterización de la proteína CdFur obtenida en condiciones aeróbicas y, en base a los modelos estructurales realizados a partir de estructuras ya resueltas, se ha propuesto el siguiente mecanismo de acción para la proteína Fur de *C. difficile*.

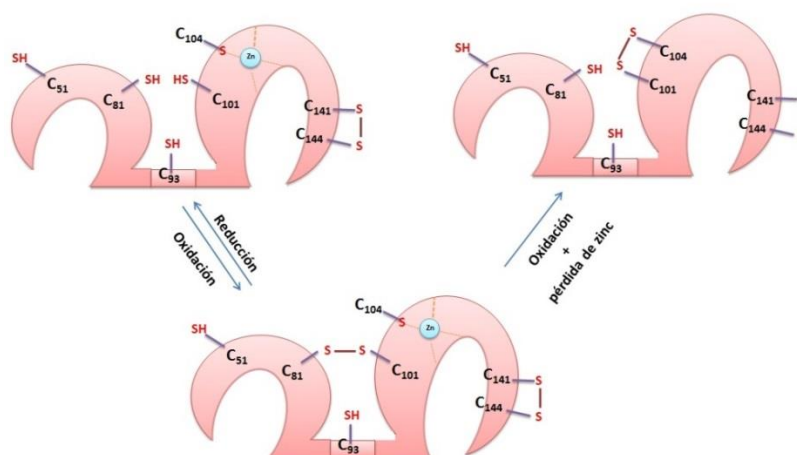


Figura 101. Propuesta de mecanismo de acción de *CdFur* basado en un interruptor redox.

En este mecanismo, la actividad de unión al DNA de la proteína depende del estado redox de sus cisteínas. De esta forma, cuando la proteína se encuentra en estado reducido (presenta cinco cisteínas en forma tiol y dos formando un puente disulfuro), es activa y es capaz de unirse al DNA (figura 105, conformación A). Los residuos C₈₁ y C₁₀₁ se encuentran reducidos lo que hace que la proteína adquiera una conformación más abierta. Esta conformación contiene un átomo de zinc estructural coordinado por C₁₀₄ y otros tres aminoácidos sin identificar. El zinc está protegiendo a C₁₀₄ de forma que ésta no pueda reaccionar con C₁₀₁. El enlace disulfuro que posee la proteína en estado reducido, es posible que sea entre C₁₄₁ y C₁₄₄ ya que se encuentran en un motivo CXXC que forma una hélice alfa y se ha descrito que en esta situación, esas cisteínas tienden a formar un enlace disulfuro entre ellas (Iqbalsyah *et al.*, 2006). Además, en los ensayos de alquilación se observó que dichos residuos podían formar un puente disulfuro entre ellos.

La proteína puede presentar otra conformación más oxidada y sin capacidad de unión al DNA (figura 105, conformación B). Esta conformación es más cerrada y presenta un enlace disulfuro entre C₈₁ y C₁₀₁. En el modelo obtenido en base a la estructura de *HpFur* se observó que estos residuos podrían situarse a una distancia de 9 Å, y aproximarse para la formación de dicho enlace. Este enlace es el que necesitaría romperse para que la proteína adquiriera la conformación A, de ahí la necesidad de poder reductor para que *CdFur* presente actividad de unión al DNA. Esta conformación podría también tener un átomo de zinc coordinado por C₁₀₄.

Por último, si la proteína se encontrase en un ambiente más oxidante, ésta se oxidaría y acabaría perdiendo el zinc. La reactividad de los residuos C₁₀₁ y C₁₀₄ provocaría la oligomerización de forma masiva a través de la formación de puentes disulfuro intra- e intermoleculares lo que acabaría con la inactivación de la proteína. Esto daría lugar a la formación del oligómero soluble de alta masa molecular (figura 105, conformación C). El zinc por tanto mantendría la estructura óptima para que pueda producirse el proceso redox en el que intervienen los residuos C₈₁ y C₁₀₁ y, por tanto, el cambio conformacional de B a A.

En todos los casos, C₅₁ podría no intervenir en el estado redox de la proteína ya que parece situarse hacia el exterior de la proteína, expuesto al solvente, y su mutante presentó un comportamiento similar a la proteína nativa en todo momento.

En resumen, en el modelo propuesto para el funcionamiento de *CdFur*, de las siete cisteínas que contiene *CdFur* los datos experimentales indican que estos residuos no interactúan de forma directa con el DNA sino que más bien están implicados en un cambio conformacional que parece experimentar la proteína y que desencadenado, bien por la unión del metal regulador o por cambios en el estado redox del entorno, provoca el cambio de afinidad de la misma por el DNA.

5.3. Estudio de la interacción de *CdFur* con el grupo hemo

El grupo hemo es un importante cofactor de muchas proteínas que intervienen en procesos fisiológicos tan importantes como la respiración celular, la fotosíntesis o la transferencia de electrones. Sin embargo, debido a su toxicidad en condiciones fisiológicas suele encontrarse asociado a proteínas en el interior celular, bien sea de manera transitoria o bien permanente, a través de uniones de tipo covalente. Este grupo prostético está presente en hemoglobinas, hidroxilasas, catalasas, peroxidasas y citocromos, tanto en organismos eucariotas como procariontes. Además, se le han atribuido las funciones de biosensor de gases diatómicos y de modulador de la actividad proteica (Zhang and Guarentel, 1995). En el grupo hemo el hierro se encuentra coordinado por cuatro átomos de nitrógeno pertenecientes a cada uno de los anillos pirrólicos que conforman el anillo de porfirina. El anillo de porfirina es altamente conjugado, lo cual le impone la forma aproximadamente plana que se encuentra en la mayor parte de las proteínas. Una porfirina puede tener enlazadas una gran variedad de cadenas laterales, que se llaman sustituyentes y dependiendo de cuales sean los sustituyentes del anillo de porfirina que coordina al hierro se puede encontrar los distintos tipos de hemo (hemo a, hemo b, etc.). En proteínas, el hierro del grupo hemo aparece, además, unido a uno o dos ligandos axiales que se coordinan en posición perpendicular al anillo de porfirina. Estos ligandos provienen de residuos de la proteína, frecuentemente histidinas y cisteínas, o de átomos o moléculas exógenas (H₂O, O₂...) (García Rubio, 2002). De este modo, el entorno del hierro es aproximadamente octaédrico.

En el grupo de trabajo donde se ha realizado esta tesis se demostró, mediante espectroscopía diferencial, que la proteína FurA de *Anabaena* sp. PCC 7120 era capaz de interactuar con el grupo hemo en el rango de concentración micromolar y que esta unión inhibía la capacidad de la proteína para interactuar con el DNA (Hernández *et al.*, 2004b). La caracterización del sitio de unión del grupo hemo en la proteína FurA sugería que esta proteína podía funcionar como un sensor de hemo en la célula (Pellicer *et al.*, 2012).

En el trabajo que se describe en este apartado se analizó la capacidad del homólogo Fur de *C. difficile* de interactuar con el grupo hemo dados los antecedentes comentados anteriormente y que en la preparación de proteína obtenida se detectó una pequeña señal por EPR que podía asociarse a hemo. Además, se investigaron las propiedades espectroscópicas de los complejos con hemo, tanto de la proteína nativa como de los mutantes simples de cisteína,

para determinar si alguno de estos residuos estaba implicado en la unión de *CdFur* a este grupo, como por ejemplo el residuo C₅₁ perteneciente a un motivo cisteína-prolina de características semejantes al motivo por el que se une el grupo hemo al homólogo FurA (Pellicer *et al.*, 2012).

Para el análisis de la interacción entre la proteína Fur de *C. difficile* y el grupo hemo se ha seguido la metodología descrita por Hernández *et al.* La interacción se verificó mediante espectroscopía UV-Vis donde el complejo *CdFur*-hemo presentó un máximo en el espectro en torno a 419 nm correspondiente al máximo de la banda *Soret*. Además, se produjo un estrechamiento de la misma e incremento de su intensidad respecto al espectro del hemo libre cuyo máximo se encuentra a 385 nm. Posteriormente se redujo el complejo proteína-hemo con ditionito sódico para analizar si este proceso afectaba al entorno del hemo. La reducción provocó un desplazamiento de la banda *Soret* de 419 nm a 426 nm y la aparición de dos nuevas bandas bien resueltas, α (560 nm) y β (530 nm). Esto indicó que se había reducido el hierro hemínico obteniéndose un espectro de absorción similar al que muestran proteínas con hemo ferroso de bajo espín (tabla 22).

Dado que *CdFur* era capaz de interactuar con el hemo, se estudió la interacción por espectroscopía diferencial con el fin de obtener la constante de disociación del complejo. Esta técnica es especialmente atractiva en el estudio de proteínas que contienen hemo, puesto que el espectro de absorción de este compuesto depende de la carga del hierro hemínico, de los ligandos que tiene unidos e incluso de fenómenos de protonación y cambios estructurales que tengan lugar en su proximidad (Nienhaus and Nienhaus, 2005). Debido a los cambios espectrales que se producían en el espectro de absorción tras ir realizando una titulación de proteína sobre una disolución de hemo y tras alcanzar la condición de saturación, los datos de la titulación se pudieron ajustar a una curva hiperbólica para un complejo de tipo 1:1. La constante de disociación del complejo estaba en el rango de concentración micromolar lo que sugería una interacción transitoria entre la proteína y el grupo hemo.

El siguiente paso en el estudio de la interacción entre *CdFur* y el grupo hemo fue analizar el efecto de dicha interacción sobre la actividad de unión al DNA *in vitro*. Los ensayos de tipo EMSA se realizaron en las condiciones optimizadas para la actividad de *CdFur* (presencia de poder reductor y ausencia de metal) y demostraron que la interacción proteína-hemo inhibía la unión de la proteína al DNA en un modo dependiente de la concentración de hemo. Estos datos eran suficientes para sugerir que la unión del hemo a *CdFur* podría estar directamente relacionada con la función del regulador del mismo modo que ocurría con el homólogo FurA de *Anabaena* sp. o Fur de *Porphyromonas gingivalis* (Hernández *et al.*, 2004b; Butler *et al.*, 2014).

Teniendo en cuenta que los ensayos de actividad de la proteína *in vitro* requerían de la presencia de poder reductor y, bajo estas condiciones, el hemo inhibía la unión de *CdFur* al DNA, se determinó la constante de unión de la proteína a hemo tanto en presencia como ausencia de poder reductor mediante ITC. En ambas situaciones *CdFur* mostró un único sitio de unión a hemo, corroborando la estequiometría definida mediante espectroscopía diferencial. Sin embargo, la afinidad entre *CdFur* y hemo fue mucho mayor cuando la proteína

se encontraba en estado reducido lo que sugería que el estado de oxidación de las cisteínas de CdFur era relevante para la unión de la proteína al grupo hemo.

Por lo general, la naturaleza de los aminoácidos que coordinan el hemo en las hemoproteínas suele ser determinante en el tipo de función que desempeñan. De hecho, en la mayor parte de hemoproteínas que detectan gases el aminoácido axial en posición proximal suele ser histidina (Jain and Chan, 2003). Mientras que en el caso de determinados enzimas que llevan a cabo oxigenaciones, oxidaciones, reducciones, isomerizaciones y deshidrataciones, es la cisteína quien interviene en la coordinación axial del mismo (Omura, 2005). Teniendo en cuenta que la capacidad de unión de CdFur a hemo estaba condicionada por el estado redox de la misma, se estudió si alguno de los residuos de cisteína estaba implicado en dicha interacción siguiendo la misma metodología que se usó para la proteína nativa.

A partir de los espectros diferenciales se identificaron complejos entre el hemo y todos los mutantes individuales en cisteína de CdFur. Todos los espectros fueron similares al obtenido con la proteína nativa si bien algunos de ellos mostraron pequeñas desviaciones de la posición e intensidad de la banda *Soret*. La obtención de las curvas de la titulación para cada mutante hasta alcanzar la condición de saturación indicó que en todos los casos se obtenía un complejo proteína-hemo con estequiometría 1:1 y una constante de disociación en el rango micromolar. La posterior reducción con ditionito sódico de los complejos entre los mutantes de cisteína y el hemo provocó los mismos cambios espectroscópicos que se observaron con la proteína nativa: desplazamiento de la banda *Soret* hacia longitudes de onda mayores y aparición de las bandas α y β . Estos cambios espectroscópicos indicaban la reducción del hierro hemínico dando como resultado un hierro de bajo espín que mostraba valores en el espectro compatibles con un hemo hexacoordinado siendo histidinas los ligandos axiales (Zoppellaro *et al.*, 2009). Un desplazamiento batocrómico del máximo de absorción del hemo es típico de hemoproteínas con una coordinación del tipo metionina/histidina o bishistidina en las posiciones quinta y sexta del hierro hemínico (Zhang and Guarentel, 1995). Por tanto, se podría descartar la implicación de alguno de los residuos de cisteína de CdFur como ligando axial del hemo y en consecuencia, la participación del motivo C₅₁P₅₂ al contrario de lo que ocurría con otros homólogos Fur (Butler *et al.*, 2014). La proteína CdFur posee varios residuos de histidina que posiblemente sean los implicados en la unión del grupo hemo, como se propuso para el homólogo Fur de *E. coli* (Smith *et al.*, 1996).

Aunque se descartó que alguna de las cisteínas de CdFur actuara como ligando axial del hemo, se analizó la fuerza de la interacción entre éste y cada mutante mediante ITC, puesto que el estado redox de la proteína influía en la afinidad del hemo por la misma. En ausencia de poder reductor, los mutantes C81A y C93A mostraron constantes de disociación un orden de magnitud inferior a los valores obtenidos para la proteína nativa y para el resto de mutantes. En la conformación que tendría la proteína nativa en ausencia de poder reductor, esto es, con el residuo C₈₁ formando parte de un puente disulfuro y el residuo C₉₃ implicado en la unión al metal regulador, no sería favorable la unión a hemo. Es por ello que la ausencia de los residuos C₈₁ o C₉₃ favorecía la interacción entre el hemo y la proteína ya que CdFur adquiriría una conformación más favorable para la unión. Por tanto, este resultado sugiere que la afinidad

entre CdFur y el hemo podría estar controlada por el puente disulfuro intramolecular responsable de la activación/inactivación de la proteína.

5.4. Identificación de compuestos moduladores de la actividad de CdFur

En los últimos años se ha producido un aumento de la morbilidad y mortalidad asociada a *C. difficile* consecuencia de la aparición de cepas resistentes a los tratamientos habituales (Tsutsumi *et al.*, 2014). Para mantener la infección, casi todas las bacterias dependen de la captación de hierro proveniente del hospedador, ya que es necesario en muchos procesos metabólicos esenciales (Nairz *et al.*, 2010). Hay pruebas que sugieren que tanto la disponibilidad de hierro como la fuente de este metal son importantes para el crecimiento de *C. difficile in vitro* (Cernat and Scott, 2012). Por tanto, la posibilidad de modificar el acceso de este microbio al hierro alterando su capacidad de sintetizar los sistemas de adquisición y utilización de este metal, constituye una estrategia para prevenir y quizás tratar la infección por *C. difficile*. Dado que la proteína Fur es el regulador global de la homeostasis del hierro en este patógeno (Ho and Ellermeier, 2015) y que la desregulación de los genes controlados por Fur parece tener un impacto significativo en el desarrollo de la infección por *C. difficile* (Monaghan *et al.*, 2017), en el último apartado de esta memoria se han realizado una serie de estudios encaminados a valorar la idoneidad de la proteína Fur de *C. difficile* como diana terapéutica frente a este patógeno.

La estrategia empleada contemplaba la identificación de compuestos pertenecientes a una librería química que fueran capaces de interactuar con la proteína. Para ello se calculó la temperatura media de desnaturalización de CdFur (T_m , temperatura a la cual la mitad de las moléculas de proteína se encuentran en el estado nativo y la otra mitad en estado desplegado), seguida por fluorescencia, y se comparó con la que presentaba en presencia de los distintos compuestos. Un aumento de la T_m significaba que el complejo proteína-compuesto tenía mayor estabilidad conformacional y en consecuencia, se producía interacción entre ambos (Pantoliano *et al.*, 2001). El experimento se llevó a cabo utilizando un método de cribado de alto rendimiento mediante ensayos miniaturizados en un formato de microplaca de 96 pocillos, usando un fluorímetro de placa termostaticado. De este modo se analizó de forma masiva la interacción con la proteína de los 1120 compuestos pertenecientes a la librería química Prestwick®. Este tipo de ensayos se ha utilizado para valorar la idoneidad de otras proteínas como diana terapéutica. Un ejemplo es la identificación de inhibidores de la flavodoxina de *H. pylori* (Cremades *et al.*, 2009).

En el proceso de desnaturalización térmica para CdFur se obtenía una curva correspondiente al equilibrio entre dos estados: estado nativo y desplegado. La temperatura correspondiente al punto de inflexión de la curva es la T_m . El éxito del ensayo de cribado de alto rendimiento radicaba en obtener curvas de desnaturalización térmica de la proteína en las que hubiera una buena transición entre ambos estados. Además, el ensayo debía tener reproducibilidad lo que suponía que la proteína presentase una T_m constante. Para poner a punto las condiciones de ensayo se valoró la concentración óptima de proteína y la composición del tampón de trabajo. Dado que la proteína CdFur no tiene fluorescencia

intrínseca, se utilizó una sonda fluorescente por lo que también fue preciso definir el tipo de sonda fluorescente y la relación proteína/sonda. De las dos sondas ensayadas, ANS y SyPro Orange, se escogió la segunda ya que con el compuesto ANS no se observaba señal de fluorescencia. En el ensayo además se añadió DTT puesto que según se ha puesto de manifiesto a lo largo de esta memoria era necesario para que la proteína adquiriera la conformación activa, capaz de unirse al DNA.

Tras fijar las condiciones óptimas de ensayo para obtener unas curvas de desnaturalización térmica reproducibles, y dado que los compuestos a ensayar estaban disueltos en DMSO puro, se determinó la concentración de DMSO que era posible añadir al ensayo sin alterar la estabilidad conformacional de la proteína. De este modo se fijaba el número máximo de compuestos que podían ensayarse de manera simultánea. Puesto que la concentración máxima de DMSO en el ensayo era del 7,5 % se pudieron analizar hasta tres compuestos a la vez. Con este método, se cribaron 1120 compuestos, en su mayoría fármacos ya aprobados por varias agencias de medicamentos, de los cuales 5 provocaron un aumento de la $T_m \geq 3$ °C.

Una vez identificados los compuestos que interaccionaban con la proteína, se estudió el efecto que producían sobre la actividad biológica de la misma. Para ello se realizaron ensayos de tipo EMSA en las condiciones óptimas de actividad para *CdFur*, una vez comprobado que la presencia de DMSO (a una concentración inferior al 5 %) no modificaba su actividad. De los 5 compuestos identificados, dos presentaron un efecto inhibitorio mientras que uno mostró cierto efecto activador. De los compuestos con efecto inhibitorio, el compuesto Gossypol impidió la unión de la proteína al DNA a elevada concentración de compuesto mientras que con el compuesto Quercetina se observó cierta inactivación a concentraciones bajas de compuesto. Por otro lado, el compuesto Miricetina provocó, a concentraciones bajas, un incremento de la actividad de *CdFur*.

Desde el punto de vista químico, los tres compuestos identificados con efecto modulador sobre la actividad de *CdFur* eran polifenoles. El Gossypol es un compuesto amarillo derivado de la planta del algodón, con diferentes actividades demostradas como antimicrobiano, antifúngico, anticancerígeno, antivírico y anticonceptivo oral masculino (Yildirim-Aksoy *et al.*, 2004). En particular, tiene un potente efecto antimicrobiano contra patógenos digestivos como *Enterococcus faecium* o *E. faecalis* (Masila *et al.*, 2015). Los compuestos Miricetina y Quercetina son derivados flavonoides presentes en gran variedad de frutas y verduras conocidos por sus propiedades antioxidantes y con actividad anticancerígena (Yao *et al.*, 2014; Chobot and Hadacek, 2011; Young *et al.*, 1999).

La determinación de la estequiometría de los complejos proteína-ligando así como la fortaleza de dicha unión se llevó a cabo mediante ensayos de ITC. En todos los casos, se observaron complejos de estequiometría 1:1, cuyas constantes de disociación se encontraban en el rango de concentración micromolar (tabla 27).

Así pues, mediante una estrategia de cribado de alto rendimiento basada primero, en la identificación de compuestos que interaccionan con la proteína *CdFur* y segundo, en la determinación de cuáles de ellos modulaban la actividad de la misma *in vitro*, ha sido posible identificar tres compuestos con una afinidad por la proteína diana lo suficientemente alta

como para poder abordar en el futuro estudios que permitan valorar su efectividad en modelos *in vivo*.

CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. El gen CD630_12870 de la cepa *Clostridium difficile* 630 codifica la proteína Fur. Su secuencia de aminoácidos presenta las características típicas de los homólogos de la familia Fur: un motivo rico en histidinas y dos motivos CXXC.
2. La presencia de oxígeno durante la producción y purificación condiciona la incorporación de un grupo prostético en el regulador *CdFur*. Cuando la proteína se obtiene en condiciones anaeróbicas, *CdFur* contiene un grupo prostético de tipo Fe-S (holo-proteína). Este grupo es extremadamente lábil y se descompone en presencia de oxígeno. Cuando la purificación se realiza en presencia de oxígeno, se obtiene una forma de la proteína que es soluble a un pH próximo al fisiológico y que a pesar de carecer de grupo prostético (apo-proteína) es activa.
3. La proteína obtenida en presencia de oxígeno necesita poder reductor y ausencia de metal divalente para reconocer *in vitro* a promotores de genes del metabolismo del hierro, así como a su propio promotor. Este comportamiento difiere del funcionamiento como holo-represor (proteína + metal correpresor) descrito para la mayor parte de homólogos Fur.
4. La apo-proteína está compuesta principalmente por monómero y una pequeña fracción de dímero. La forma monomérica muestra dos isoformas: una reducida con actividad de unión al DNA y otra oxidada que es inactiva. La activación/inactivación depende de un puente disulfuro intramolecular en el que interviene el residuo C₈₁. Ambas isoformas contienen además un puente disulfuro intramolecular entre los residuos C₁₄₁ y C₁₄₄ que es estable aún en condiciones reductoras.
5. El residuo C₉₃, localizado en la región entre el dominio de unión al DNA y el dominio de dimerización y contiguo al motivo rico en histidinas, desempeña un papel importante en la actividad biológica de la proteína por su implicación en la unión del metal regulador.
6. *CdFur* contiene un átomo de zinc por monómero en cuya coordinación participa alguna de las cisteínas del motivo C₁₀₁XXC₁₀₄, pero no ambas simultáneamente. Se descarta una coordinación de tipo ZnCys₄ habitual en homólogos Fur que contienen zinc y dos motivos CXXC.
7. La proteína *CdFur* actúa como sensor redox. Cuando la proteína se somete a estrés oxidativo provocado por peróxido de hidrógeno se produce la pérdida de zinc y su oligomerización está mediada por puentes disulfuro, con la consecuente inactivación de la misma. El estado de óxido-reducción de los residuos de cisteína es responsable tanto de la oligomerización de *CdFur* como de su actividad biológica.

8. *CdFur* complementa funcionalmente al homólogo *Fur* de *E. coli in vivo* actuando como un holo-represor clásico. También funciona como holo-represor *in vivo* frente a dos de sus promotores diana (*Pfur* y *PfeoA* de *C. difficile*) en un sistema heterólogo en *E. coli*. Por tanto el regulador *CdFur* presenta un comportamiento dual siendo un holo-regulador *in vivo* o apo-regulador *in vitro*.
9. La proteína *CdFur* interacciona con el grupo hemo con una constante de disociación en el rango de concentración micromolar. La asociación de la proteína con hemo inhibe su capacidad de unión al DNA. Aunque ninguna de las cisteínas de *CdFur* es ligando axial del hemo, la afinidad de la proteína por hemo es mucho mayor cuando se encuentra en estado reducido, indicando la existencia de un control redox en la unión de ambas especies.
10. De los 1120 compuestos que componen la librería química Prestwick®, cinco interaccionan con la proteína *CdFur* y tres de éstos afectan a su capacidad de unión al DNA. Los complejos proteína-ligando responden a una estequiometría de tipo 1:1 y sus constantes de disociación se encuentran en el rango de concentración micromolar.

BILIOGRAFÍA

7. BIBLIOGRAFÍA

Ahn, B.-E., Cha, J., Lee, E.-J., Han, A.-R., Thompson, C. J. and Roe, J.-H. (2006) 'Nur, a nickel-responsive regulator of the Fur family, regulates superoxide dismutases and nickel transport in *Streptomyces coelicolor*.' , *Molecular microbiology*, 59(6), pp. 1848–58. doi: 10.1111/j.1365-2958.2006.05065.x.

Alam, M. S., Garg, S. K. and Agrawal, P. (2009) 'Studies on structural and functional divergence among seven WhiB proteins of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv', *FEBS Journal*, 276(1), pp. 76–93. doi: 10.1111/j.1742-4658.2008.06755.x.

Almeida, R. M., Turano, P., Moura, I., Moura, J. J. G. and Pauleta, S. R. (2013) 'Superoxide reductase: Different interaction modes with its two redox partners', *ChemBioChem*, 14(14), pp. 1858–1866. doi: 10.1002/cbic.201300196.

An, Y. J., Ahn, B. E., Han, A. R., Kim, H. M., Chung, K. M., Shin, J. H., Cho, Y. B., Roe, J. H. and Cha, S. S. (2009) 'Structural basis for the specialization of Nur, a nickel-specific Fur homolog, in metal sensing and DNA recognition', *Nucleic Acids Research*, 37(10), pp. 3442–3451. doi: 10.1093/nar/gkp198.

Ancker, E., Albenius, M., Heijbel, A. and Andersson, L. C. (2006) 'Effective purification of histidine-tagged proteins using various metal ions', pp. 22–23.

Andrews, S. C., Robinson, A. K. and Rodríguez-Quiñones, F. (2003) 'Bacterial iron homeostasis', *FEMS Microbiology Reviews*, 27(2–3), pp. 215–237. doi: 10.1016/S0168-6445(03)00055-X.

Bae, J. B., Park, J. H., Hahn, M. Y., Kim, M. S. and Roe, J. H. (2004) 'Redox-dependent Changes in RsrA, an Anti-sigma Factor in *Streptomyces coelicolor*: Zinc Release and Disulfide Bond Formation', *Journal of Molecular Biology*, 335(2), pp. 425–435. doi: 10.1016/j.jmb.2003.10.065.

Baichoo, N. and Helmann, J. D. (2002) 'Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence.', *Journal of bacteriology*. American Society for Microbiology (ASM), 184(21), pp. 5826–32. doi: 10.1128/jb.184.21.5826-5832.2002.

Bakken, J. S. (2009) 'Fecal bacteriotherapy for recurrent *Clostridium difficile* infection', *Anaerobe*, 15(6), pp. 285–289. doi: 10.1016/j.anaerobe.2009.09.007.

Ballouche, M., Cornelis, P. and Baysse, C. (2009) 'Iron metabolism: a promising target for antibacterial strategies.', *Recent patents on anti-infective drug discovery*, 4(3), pp. 190–205. doi: 10.2174/157489109789318514.

Bellini, P. and Hemmings, A. M. (2006) 'In vitro characterization of a bacterial manganese uptake regulator of the fur superfamily.', *Biochemistry*, 45(8), pp. 2686–98. doi: 10.1021/bi052081n.

Bender, K. S., Yen, H. C. B., Hemme, C. L., Yang, Z., He, Z., He, Q., Zhou, J., Huang, K. H., Alm, E. J., Hazen, T. C., Arkin, A. P. and Wall, J. D. (2007) 'Analysis of a ferric uptake regulator (Fur) mutant of *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough', *Applied and Environmental Microbiology*, 73(17), pp. 5389–5400. doi: 10.1128/AEM.00276-07.

Benoit, R. and Auer, M. (2011) 'A direct way of redox sensing.', *RNA biology*, 8(1), pp. 18–23. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21220941> (Accessed: 8 September 2017).

Bereswill, S., Greiner, S., van Vliet, A. H., Waidner, B., Fassbinder, F., Schiltz, E., Kusters, J. G. and Kist, M. (2000) 'Regulation of ferritin-mediated cytoplasmic iron storage by the ferric uptake regulator homolog (Fur) of *Helicobacter pylori*.', *Journal of bacteriology*, 182(21), pp. 5948–53. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11029412> (Accessed: 27 September 2017).

Bereswill, S., Lichte, F., Greiner, S., Waidner, B., Fassbinder, F. and Kist, M. (1999) 'The ferric uptake regulator (Fur) homologue of *Helicobacter pylori*: functional analysis of the coding gene and controlled production of the recombinant protein in *Escherichia coli*.', *Medical microbiology and immunology*, 188(1), pp. 31–40. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10691091> (Accessed: 28 September 2017).

Botello-Morte, L. (2014) *Redox properties of the global regulator FurA from the Anabaena sp. PCC 7120 and its functional implications*. University of Zaragoza.

Botello-Morte, L., Bes, M. T., Heras, B., Fernández-Otal, Á., Peleato, M. L. and Fillat, M. F. (2014) 'Unraveling the Redox Properties of the Global Regulator FurA from *Anabaena sp.* PCC 7120', *Antioxidants & redox signaling*, 20(9), pp. 1396–1406. doi: 10.1089/ars.2013.5376.

Botello-Morte, L., Pellicer, S., Sein-Echaluce, V. C., Contreras, L. M., Neira, J. L., Abián, O., Velázquez-Campoy, A., Peleato, M. L., Fillat, M. F. and Bes, M. T. (2016) 'Cysteine Mutational Studies Provide Insight into a Thiol-Based Redox Switch Mechanism of Metal', *Antioxidants & redox signaling*, 24(4), pp. 173–185. doi: 10.1089/ars.2014.6175.

Bowman, K. A., Broussard, E. K., Surawicz, C. M. and Surawicz, C. (2015) 'Fecal microbiota transplantation: current clinical efficacy and future prospects', *Clinical and Experimental Gastroenterology*, 8, pp. 285–291. doi: 10.2147/CEG.S61305.

Brown, S. A., Palmer, K. L. and Whiteley, M. (2008) 'Revisiting the host as a growth medium', *Nature Reviews Microbiology*, 6(9), pp. 657–666. doi: 10.1038/nrmicro1955.

Bsat, N. and Helmann, J. D. (1999) 'Interaction of Bacillus subtilis Fur (Ferric Uptake Repressor) with the dhb Operator In Vitro and In Vivo', *Journal of Bacteriology*, 181(14), pp. 4299–4307.

Bsat, N., Herbig, A., Casillas-Martinez, L., Setlow, P. and Helmann, J. D. (1998) 'Bacillus subtilis contains multiple Fur homologues: Identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors', *Molecular Microbiology*, 29(1), pp. 189–198. doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00921.x.

Bury-Moné, S., Thiberge, J.-M., Contreras, M., Maitournam, A., Labigne, A. and De Reuse, H. (2004) 'Responsiveness to acidity via metal ion regulators mediates virulence in the gastric pathogen Helicobacter pylori.', *Molecular microbiology*, 53(2), pp. 623–38. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04137.x.

Butcher, J., Sarvan, S., Brunzelle, J. S., Couture, J.-F. and Stintzi, a. (2012) 'Structure and regulon of Campylobacter jejuni ferric uptake regulator Fur define apo-Fur regulation', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(25), pp. 10047–10052. doi: 10.1073/pnas.1118321109.

Butler, C. A., Dashper, S. G., Zhang, L., Seers, C. A., Mitchell, H. L., Catmull, D. V., Glew, M. D., Heath, J. E., Tan, Y., Khan, H. S. G. and Reynolds, E. C. (2014) 'The Porphyromonas gingivalis ferric uptake regulator orthologue binds hemin and regulates hemin-responsive biofilm development', *PLoS ONE*, 9(11). doi: 10.1371/journal.pone.0111168.

Campoy, S., Jara, M., Busquets, N., Pérez De Rozas, A. M., Badiola, I. and Barbé, J. (2002) 'Role of the high-affinity zinc uptake znuABC system in Salmonella enterica serovar Typhimurium virulence', *Infection and Immunity*, 70(8), pp. 4721–4725. doi: 10.1128/IAI.70.8.4721-4725.2002.

Carpenter, B. M., Gancz, H., Gonzalez-Nieves, R. P., West, A. L., Whitmire, J. M., Michel, S. L. J. and Merrell, D. S. (2009) 'A single nucleotide change affects fur-dependent regulation of sodB in H. pylori', *PLoS ONE*, 4(4). doi: 10.1371/journal.pone.0005369.

Carpenter, B. M., Gilbreath, J. J., Pich, O. Q., McKelvey, A. M., Maynard, E. L., Li, Z. Z. and Scott Merrell, D. (2013) 'Identification and characterization of novel helicobacter pylori apo-Fur-Regulated target genes', *Journal of Bacteriology*, 195(24), pp. 5526–5539. doi: 10.1128/JB.01026-13.

Carpenter, B. M., Whitmire, J. M. and Merrell, D. S. (2009) 'This is not your mother's repressor: The complex role of fur in pathogenesis', *Infection and Immunity*, 77(7), pp. 2590–2601. doi: 10.1128/IAI.00116-09.

Carroll, K. C. and Bartlett, J. G. (2011) 'Biology of Clostridium difficile: implications for epidemiology and diagnosis.', *Annual review of microbiology*, 65, pp. 501–21. doi: 10.1146/annurev-micro-090110-102824.

- Carson, S. D., Thomas, C. E. and Elkins, C. (1996) 'Cloning and sequencing of a Haemophilus ducreyi fur homolog.', *Gene*, 176(1–2), pp. 125–9. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8918243> (Accessed: 14 October 2017).
- Carter, G. P., Lyras, D., Allen, D. L., Mackin, K. E., Howarth, P. M., O'Connor, J. R. and Rood, J. I. (2007) 'Binary toxin production in Clostridium difficile is regulated by CdtR, a LytTR family response regulator', *Journal of Bacteriology*, 189(20), pp. 7290–7301. doi: 10.1128/JB.00731-07.
- Cernat, R. C. and Scott, K. P. (2012) 'Evaluation of novel assays to assess the influence of different iron sources on the growth of Clostridium difficile', *Anaerobe*. Elsevier Ltd, 18(3), pp. 298–304. doi: 10.1016/j.anaerobe.2012.04.007.
- Chim, N., Iniguez, A., Nguyen, T. Q. and Goulding, C. W. (2010) 'Unusual diheme conformation of the heme-degrading protein from Mycobacterium tuberculosis.', *Journal of molecular biology*. NIH Public Access, 395(3), pp. 595–608. doi: 10.1016/j.jmb.2009.11.025.
- Chobot, V. and Hadacek, F. (2011) 'Exploration of pro-oxidant and antioxidant activities of the flavonoid myricetin', *Redox Report*, 16(6), pp. 242–247. doi: 10.1179/1351000211Y.0000000015.
- Chong, P. M., Lynch, T., (2014) 'Proteomic analysis of a NAP1 Clostridium difficile clinical isolate resistant to metronidazole', *PLoS ONE*, 9(1). doi: 10.1371/journal.pone.0082622.
- Collet, J. F., D'Souza, J. C., Jakob, U. and Bardwell, J. C. A. (2003) 'Thioredoxin 2, an Oxidative Stress-induced Protein, Contains a High Affinity Zinc Binding Site', *Journal of Biological Chemistry*, 278(46), pp. 45325–45332. doi: 10.1074/jbc.M307818200.
- Cornelis, P., Wei, Q., Andrews, S. C. and Vinckx, T. (2011) 'Iron homeostasis and management of oxidative stress response in bacteria.', *Metallomics: integrated biometal science*, 3(6), pp. 540–9. doi: 10.1039/c1mt00022e.
- Coy, M., Doyle, C., Besser, J. and Neilands, J. B. (1994) 'Site-directed mutagenesis of the ferric uptake regulation gene of Escherichia coli.', *Biometals: an international journal on the role of metal ions in biology, biochemistry, and medicine*, 7(4), pp. 292–8.
- Cremades, N., Velázquez-Campoy, A., Martínez-Júlvez, M., Neira, J. L., Pérez-Dorado, I., Hermoso, J., Jiménez, P., Lanas, A., Hoffman, P. S. and Sancho, J. (2009) 'Discovery of specific flavodoxin inhibitors as potential therapeutic agents against Helicobacter pylori infection', *ACS Chemical Biology*, 4(11), pp. 928–938. doi: 10.1021/cb900166q.
- D'Autreaux, B., Touati, D., Bersch, B., Latour, J.-M. and Michaud-Soret, I. (2002) 'Direct inhibition by nitric oxide of the transcriptional ferric uptake regulation protein via nitrosylation of the iron.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,

99(26), pp. 16619–24. doi: 10.1073/pnas.252591299.

Dalet, K., Gouin, E., Cenatiempo, Y., Cossart, P. and Héchard, Y. (1999) 'Characterisation of a new operon encoding a Zur-like protein and an associated ABC zinc permease in *Listeria monocytogenes*', *FEMS Microbiology Letters*, 174(1), pp. 111–116. doi: 10.1016/S0378-1097(99)00128-7.

Datsenko, K. A. and Wanner, B. L. (2000) 'One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products', 2000.

Delany, I., Grifantini, R., Bartolini, E., Rappuoli, R. and Scarlato, V. (2006) 'Effect of *Neisseria meningitidis* fur mutations on global control of gene transcription', *Journal of Bacteriology*, 188(7), pp. 2483–2492. doi: 10.1128/JB.188.7.2483-2492.2006.

Delany, I., Pacheco, A. B. F., Spohn, G., Rappuoli, R. and Scarlato, V. (2001) 'Iron-Dependent Transcription of the *frpB* Gene of *Helicobacter pylori* Is Controlled by the Fur Repressor Protein', *Journal of Bacteriology*, 183(16), pp. 4932–4937. doi: 10.1128/JB.183.16.4932-4937.2001.

Delany, I., Spohn, G., Pacheco, A. B. F., Ieva, R., Alaimo, C., Rappuoli, R. and Scarlato, V. (2002) 'Autoregulation of *Helicobacter pylori* Fur revealed by functional analysis of the iron-binding site', *Molecular Microbiology*, 46(4), pp. 1107–1122. doi: 10.1046/j.1365-2958.2002.03227.x.

Denoncin, K., Nicolaes, V., Cho, S.-H., Leverrier, P. and Collet, J.-F. (2013) 'Protein Disulfide Bond Formation in the Periplasm: Determination of the In Vivo Redox State of Cysteine Residues', in, pp. 325–336. doi: 10.1007/978-1-62703-245-2_20.

Dian, C., Vitale, S., Leonard, G. A., Bahlawane, C., Fauquant, C., Leduc, D., Muller, C., De Reuse, H., Michaud-Soret, I. and Terradot, L. (2011) 'The structure of the *Helicobacter pylori* ferric uptake regulator Fur reveals three functional metal binding sites', *Molecular Microbiology*, 79(5), pp. 1260–1275. doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07517.x.

Díaz-Mireles, E., Wexler, M., Sawers, G., Bellini, D., Todd, J. D. and Johnston, A. W. B. (2004) 'The Fur-like protein Mur of *Rhizobium leguminosarum* is a Mn²⁺ - responsive transcriptional regulator', *Microbiology*, 150(5), pp. 1447–1456. doi: 10.1099/mic.0.26961-0.

Dineen, S. S., Villapakkam, A. C., Nordman, J. T. and Sonenshein, A. L. (2007) 'Repression of *Clostridium difficile* toxin gene expression by CodY', *Molecular Microbiology*, 66(1), pp. 206–219. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05906.x.

Drake, H. L., Göbner, A. S. and Daniel, S. L. (2008) 'Old acetogens, new light', in *Annals of the New York Academy of Sciences*, pp. 100–128. doi: 10.1196/annals.1419.016.

- Dubbs, J. M. and Mongkolsuk, S. (2012) 'Peroxide-Sensing Transcriptional Regulators in Bacteria', *Journal of Bacteriology*, 194(20), pp. 5495–5503. doi: 10.1128/JB.00304-12.
- Edwards, A. N., Karim, S. T., Pascual, R. A., Jowhar, L. M., Anderson, S. E. and McBride, S. M. (2016) 'Chemical and Stress Resistances of *Clostridium difficile* Spores and Vegetative Cells', *Frontiers in Microbiology*, 7(October), p. 1698. doi: 10.3389/fmicb.2016.01698.
- Ernst, F. D., Homuth, G., Kuipers, E. J., Kist, M., Kusters, J. G., Bereswill, S. and Vliet, A. H. M. Van (2005) 'Iron-Responsive Regulation of the Helicobacter pylori Iron-Cofactored Superoxide Dismutase SodB Is Mediated by Fur', *Society*, 187(11), pp. 3687–3692. doi: 10.1128/JB.187.11.3687.
- Esbelin, J., Jouanneau, Y. and Duport, C. (2012) 'Bacillus cereus fnr binds a [4Fe-4 S] cluster and forms a ternary complex with ResD and PlcR.', *BMC microbiology*. BMC Microbiology, 12(1), p. 125. doi: 10.1186/1471-2180-12-125.
- Escolar, L., Pérez-Martín, J. and de Lorenzo, V. (1998) 'Binding of the fur (ferric uptake regulator) repressor of Escherichia coli to arrays of the GATAAT sequence.', *Journal of molecular biology*, 283(3), pp. 537–47. doi: 10.1006/jmbi.1998.2119.
- Fagan, R. P., Albesa-Jové, D., Qazi, O., Svergun, D. I., Brown, K. A. and Fairweather, N. F. (2009) 'Structural insights into the molecular organization of the S-layer from Clostridium difficile', *Molecular Microbiology*, 71(5), pp. 1308–1322. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06603.x.
- Farr, S. B. and Kogoma, T. (1991) 'Oxidative stress responses in Escherichia coli and Salmonella typhimurium.', *Microbiological reviews*, 55(4), pp. 561–85.
- Fillat, M. F. (2014) 'The FUR (ferric uptake regulator) superfamily : Diversity and versatility of key transcriptional regulators', 546, pp. 41–52. doi: 10.1016/j.abb.2014.01.029.
- Fink, R. C., Evans, M. R., Porwollik, S., Vazquez-Torres, A., Jones-Carson, J., Troxell, B., Libby, S. J., McClelland, M. and Hassan, H. M. (2007) 'FNR is a global regulator of virulence and anaerobic metabolism in Salmonella enterica serovar Typhimurium (ATCC 14028s).', *Journal of bacteriology*, 189(6), pp. 2262–73. doi: 10.1128/JB.00726-06.
- Fiorini, F., Stefanini, S., Valenti, P., Chiancone, E. and De Biase, D. (2008) 'Transcription of the Listeria monocytogenes fri gene is growth-phase dependent and is repressed directly by Fur, the ferric uptake regulator.', *Gene*, 410(1), pp. 113–21. doi: 10.1016/j.gene.2007.12.007.
- Francis, M. B., Allen, C. A., Shrestha, R. and Sorg, J. A. (2013) 'Bile Acid Recognition by the Clostridium difficile Germinant Receptor, CspC, Is Important for Establishing Infection', *PLoS Pathogens*, 9(5). doi: 10.1371/journal.ppat.1003356.

Francis, M. B., Allen, C. A. and Sorg, J. A. (2015) 'Spore Cortex Hydrolysis Precedes Dipicolinic Acid Release during *Clostridium difficile* Spore Germination', *Journal of Bacteriology*, 197(14), pp. 2276–2283. doi: 10.1128/JB.02575-14.

Friedman, Y. E. and O'Brian, M. R. (2004) 'The ferric uptake regulator (Fur) protein from *Bradyrhizobium japonicum* is an iron-responsive transcriptional repressor in vitro.', *Journal of Biological Chemistry*, 279(31), pp. 32100–32105. doi: 10.1074/jbc.M404924200.

Fukushima, T., Allred, B. E. and Raymond, K. N. (2014) 'Direct evidence of iron uptake without iron reduction in the Gram-positive siderophore-shuttle mechanism of *Bacillus cereus* YxeB.', *ACS chemical biology*, 9(Figure 1), pp. 2092–2100. doi: 10.1021/cb500319n.

Funnell, A. P. W. and Crossley, M. (2012) 'Homo- and Heterodimerization in Transcriptional Regulation', in: Springer New York, pp. 105–121. doi: 10.1007/978-1-4614-3229-6_7.

García Rubio, I. (2002) *Estudio de citocromos en configuración de bajo espín mediante espectroscopías de EPR y ESEEM*. Universidad de Zaragoza.

González, A., Bes, M. T., Barja, F., Peleato, M. L. and Fillat, M. F. (2010) 'Overexpression of FurA in *Anabaena* sp. PCC 7120 Reveals New Targets for This Regulator Involved in Photosynthesis, Iron Uptake and Cellular Morphology', *Plant & Cell Physiology*, 51(11), pp. 1900–1914. doi: 10.1093/pcp/pcq148.

Gonzalez De Peredo, A., Saint-Pierre, C., Adrait, A., Jacquamet, L., Latour, J. M., Michaud-Soret, I. and Forest, E. (1999) 'Identification of the two zinc-bound cysteines in the ferric uptake regulation protein from *Escherichia coli*: Chemical modification and mass spectrometry analysis', *Biochemistry*, 38(26), pp. 8582–8589. doi: 10.1021/bi9902283.

Green, J. and Paget, M. S. (2004) 'Bacterial redox sensors.', *Nature reviews. Microbiology*, 2(12), pp. 954–966. doi: 10.1038/nrmicro1022.

Green, J., Trageser, M., Six, S., Udden, G. and Guest, J. R. (1991) 'Characterization of the FNR Protein of *Escherichia coli*, an Iron-Binding Transcriptional Regulator', *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 244(1310), pp. 137–144. doi: 10.1098/rspb.1991.0062.

Hahn, J.-S., Oh, S.-Y., Chater, K. F., Cho, Y.-H. and Roe, J.-H. (2000) 'H₂O₂-sensitive Fur-like Repressor CatR Regulating the Major Catalase Gene in *Streptomyces coelicolor*', *Journal of Biological Chemistry*, 275(49), pp. 38254–38260. doi: 10.1074/jbc.M006079200.

Hajjaji, H. El, Dumoulin, M., Matagne, A., Colau, D., Roos, G., Messens, J. and Collet, J. F. (2009) 'The Zinc Center Influences the Redox and Thermodynamic Properties of *Escherichia coli* Thioredoxin 2', *Journal of Molecular Biology*, 386(1), pp. 60–71. doi: 10.1016/j.jmb.2008.11.046.

- Hamza, I., Chauhan, S., Hassett, R. and O'Brian, M. R. (1998) 'The bacterial irr protein is required for coordination of heme biosynthesis with iron availability.', *The Journal of biological chemistry*, 273(34), pp. 21669–74.
- Hamza, I., Hassett, R. and O'Brian, M. R. (1999) 'Identification of a functional fur gene in *Bradyrhizobium japonicum*', *Journal of Bacteriology*, 181(18), pp. 5843–5846.
- Hantke, K. (1987) 'Selection procedure for deregulated iron transport mutants (fur) in *Escherichia coli* K 12: fur not only affects iron metabolism.', *Molecular & general genetics : MGG*, 210(1), pp. 135–9.
- Hantke, K. (2001) 'Iron and metal regulation in bacteria', *Current Opinion in Microbiology*, 4(2), pp. 172–177. doi: 10.1016/S1369-5274(00)00184-3.
- Harvie, D. R. and Ellar, D. J. (2005) 'A ferric dicitrate uptake system is required for the full virulence of *Bacillus cereus*', *Current Microbiology*, 50(5), pp. 246–250. doi: 10.1007/s00284-004-4442-0.
- Hawe, A., Sutter, M. and Jiskoot, W. (2008) 'Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization.', *Pharmaceutical research*. Springer, 25(7), pp. 1487–99. doi: 10.1007/s11095-007-9516-9.
- Heidrich, C., Hantke, K., Bierbaum, G. and Sahl, H. (1996) 'Identification and analysis of a gene encoding a Fur-like protein of *Staphylococcus epidermidis*', *FEMS Microbiology Letters*, 140, pp. 253–259.
- Hernández, J. A., Bes, M. T., Fillat, M. F., Neira, J. L. and Peleato, M. L. (2002) 'Biochemical analysis of the recombinant Fur (ferric uptake regulator) protein from *Anabaena* PCC 7119: factors affecting its oligomerization state', *Biochem J.*, 322(Pt 1), pp. 315–322. doi: 10.1042/BJ20020135.
- Hernández, J. A., López-Gomollón, S., Bes, M. T., Fillat, M. F. and Peleato, M. L. (2004) 'Three fur homologues from *Anabaena* sp . PCC7120: exploring reciprocal protein-promoter recognition', *FEMS Microbiology Letters*, 236, pp. 275–282. doi: 10.1016/j.femsle.2004.05.050.
- Hernández, J. A., López-Gomollón, S., Muro-Pastor, A., Valladares, A., Bes, M. T., Peleato, M. L. and Fillat, M. F. (2006) 'Interaction of FurA from *Anabaena* sp . PCC 7120 with DNA : A reducing environment and the presence of Mn²⁺ are positive effectors in the binding to isiB and furA promoters *', *BioMetals*, 19, pp. 259–268. doi: 10.1007/s10534-005-7750-3.
- Hernández, J. A., Peleato, M. L., Fillat, M. F. and Bes, M. T. (2004) 'Heme binds to and inhibits the DNA-binding activity of the global regulator FurA from *Anabaena* sp . PCC 7120', *FEBS Letters*, 577, pp. 35–41. doi: 10.1016/j.febslet.2004.09.060.

Ho, T. D. and Ellermeier, C. D. (2015) 'Ferric Uptake Regulator Fur Control of Putative Iron Acquisition Systems in *Clostridium difficile*', *Journal of Bacteriology*, 197(18), pp. 2930–2940. doi: 10.1128/JB.00098-15.

Holmgren, A. (1995) 'Thioredoxin structure and mechanism: conformational changes on oxidation of the active-site sulfhydryls to a disulfide.', *Structure (London, England : 1993)*, 3(3), pp. 239–43.

Holmgren, A., Johansson, C., Berndt, C., Lönn, M. E., Hudemann, C. and Lillig, C. H. (2005) 'Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems', *Biochemical Society Transactions*, 33(6), p. 1375. doi: 10.1042/BST20051375.

Horsburgh, M. J., Ingham, E. and Foster, S. J. (2001) 'In *Staphylococcus aureus*, Fur is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis', *Journal of Bacteriology*, 183(2), pp. 468–475. doi: 10.1128/JB.183.2.468-475.2001.

Huang, D. L., Tang, D. J., Liao, Q., Li, H. C., Chen, Q., He, Y. Q., Feng, J. X., Jiang, B. Le, Lu, G. T., Chen, B. and Tang, J. L. (2008) 'The Zur of *Xanthomonas campestris* functions as a repressor and an activator of putative zinc homeostasis genes via recognizing two distinct sequences within its target promoters', *Nucleic Acids Research*, 36(13), pp. 4295–4309. doi: 10.1093/nar/gkn328.

Imlay, J. A. (2003) 'Pathways of Oxidative Damage', *Annual Review of Microbiology*, 57(1), pp. 395–418. doi: 10.1146/annurev.micro.57.030502.090938.

Imlay, J. A. (2008a) 'Cellular Defenses against Superoxide and Hydrogen Peroxide', *Annual Review of Biochemistry*, 77(1), pp. 755–776. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.061606.161055.

Imlay, J. A. (2008b) 'How obligatory is anaerobiosis?', *Molecular Microbiology*, 68(4), pp. 801–804. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06213.x.

Imlay, J. A. (2011) 'Cellular defenses against superoxide and hydrogen peroxide', *Annu. Rev. Biochem.*, (217), pp. 755–776. doi: 10.1146/annurev.biochem.77.061606.161055.Cellular.

Imlay, J. A. (2013) 'The molecular mechanisms and physiological consequences of oxidative stress: lessons from a model bacterium', *Nature Reviews Microbiology*, 11(7), pp. 443–454. doi: 10.1038/nrmicro3032.

Iqbalsyah, T. M., Moutevelis, E., Warwicker, J., Errington, N. and Doig, A. J. (2006) 'The CXXC motif at the N terminus of an alpha-helical peptide', *Protein science : a publication of the Protein Society*, 15(8), pp. 1945–1950. doi: 10.1110/ps.062271506.

- Jacquamet, L., Aberdam, D., Adrait, A., Hazemann, J., Latour, J. and Michaud-soret, I. (1998) 'X-ray Absorption Spectroscopy of a New Zinc Site in the Fur Protein from *Escherichia coli*', *Biochemistry*, 1(97), pp. 2564–2571. doi: 10.1021/bi9721344.
- Jacquamet, L., Traoré, D. A. K., Ferrer, J. L., Proux, O., Testemale, D., Hazemann, J. L., Nazarenko, E., El Ghazouani, A., Caux-Thang, C., Duarte, V. and Latour, J. M. (2009) 'Structural characterization of the active form of PerR: Insights into the metal-induced activation of PerR and fur proteins for DNA binding', *Molecular Microbiology*, 73(1), pp. 20–31. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06753.x.
- Jain, R. and Chan, M. K. (2003) 'Mechanisms of ligand discrimination by heme proteins', *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, pp. 1–11. doi: 10.1007/s00775-002-0405-8.
- Janoir, C., Denève, C., Bouttier, S., Barbut, F., Hoys, S., Caleechum, L., Chapetón-Montes, D., Pereira, F. C., Henriques, A. O., Collignon, A., Monot, M. and Dupuy, B. (2013) 'Adaptive strategies and pathogenesis of *Clostridium difficile* from In vivo transcriptomics', *Infection and Immunity*, 81(10), pp. 3757–3769. doi: 10.1128/IAI.00515-13.
- Jenney, F. E., Verhagen, M. F., Cui, X., *et al.* (1999) 'Anaerobic microbes: oxygen detoxification without superoxide dismutase.', *Science (New York, N.Y.)*, 286(5438), pp. 306–9. doi: 10.1126/science.286.5438.306.
- Johnson, S. (2009) 'Recurrent *Clostridium difficile* infection: a review of risk factors, treatments, and outcomes.', *The Journal of infection*, 58(6), pp. 403–10. doi: 10.1016/j.jinf.2009.03.010.
- Kammler, M., Schön, C. and Hantke, K. (1993) 'Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*.', *Journal of bacteriology*, 175(19), pp. 6212–6219.
- Khoroshilova, N., Beinert, H. and Kiley, P. J. (1995) 'Association of a polynuclear iron-sulfur center with a mutant FNR protein enhances DNA binding.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(7), pp. 2499–503.
- Khoroshilova, N., Popescu, C., Munck, E., Beinert, H. and Kiley, P. J. (1997) 'Iron-sulfur cluster disassembly in the FNR protein of *Escherichia coli* by O₂: [4Fe-4S] to [2Fe-2S] conversion with loss of biological activity', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(12), pp. 6087–6092. doi: 10.1073/pnas.94.12.6087.
- Köpke, M., Straub, M. and Dürre, P. (2013) '*Clostridium difficile* Is an Autotrophic Bacterial Pathogen', *PLoS ONE*, 8(4), pp. 1–7. doi: 10.1371/journal.pone.0062157.
- Ladbury, J. E. and Chowdhry, B. Z. (1996) 'Sensing the heat: the application of isothermal titration calorimetry to thermodynamic studies of biomolecular interactions', *Chemistry & Biology*, 3(10), pp. 791–801. doi: 10.1016/S1074-5521(96)90063-0.

- Laitaoja, M., Valjakka, J. and Jänis, J. (2013) 'Zinc Coordination Spheres in Protein Structures', *Inorganic Chemistry*, 52(19), pp. 10983–10991. doi: 10.1021/ic401072d.
- LaMattina, J. W., Nix, D. B. and Lanzilotta, W. N. (2016) 'Radical new paradigm for heme degradation in Escherichia coli O157:H7', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(43), pp. 12138–12143. doi: 10.1073/pnas.1603209113.
- Latifi, A., Ruiz, M. and Zhang, C. C. (2009) 'Oxidative stress in cyanobacteria', *FEMS Microbiology Reviews*, pp. 258–278. doi: 10.1111/j.1574-6976.2008.00134.x.
- Lau, C. K. Y., Krewulak, K. D. and Vogel, H. J. (2016) 'Bacterial ferrous iron transport: the Feo system', *FEMS Microbiology Reviews*. Edited by W. Bitter, 40(2), pp. 273–298. doi: 10.1093/femsre/fuv049.
- Lawley, T. D., Croucher, N. J., Yu, L., Clare, S., Sebahia, M., Goulding, D., Pickard, D. J., Parkhill, J., Choudhary, J. and Dougan, G. (2009) 'Proteomic and genomic characterization of highly infectious Clostridium difficile 630 spores', *Journal of Bacteriology*, 191(17), pp. 5377–5386. doi: 10.1128/JB.00597-09.
- Lawson, P. A., Citron, D. M., Tyrrell, K. L. and Finegold, S. M. (2016) 'Reclassification of Clostridium difficile as Clostridioides difficile (Hall and O'Toole 1935) Prévot 1938', *Anaerobe*, 40, pp. 95–99. doi: 10.1016/j.anaerobe.2016.06.008.
- Lazizzera, B. A., Beinert, H., Khoroshilova, N., Kennedy, M. C. and Kiley, P. J. (1996) 'DNA binding and dimerization of the Fe-S-containing FNR protein from Escherichia coli are regulated by oxygen.', *The Journal of biological chemistry*, 271(5), pp. 2762–8.
- Ledala, N., Pearson, S. L., Wilkinson, B. J. and Jayaswal, R. K. (2007) 'Molecular characterization of the Fur protein of Listeria monocytogenes', *Microbiology*, 153(4), pp. 1103–1111. doi: 10.1099/mic.0.2006/000620-0.
- Lee, C., Lee, S. M., Mukhopadhyay, P., Kim, S. J., Lee, S. C., Ahn, W.-S., Yu, M.-H., Storz, G. and Ryu, S. E. (2004) 'Redox regulation of OxyR requires specific disulfide bond formation involving a rapid kinetic reaction path', *Nature Structural & Molecular Biology*, 11(12), pp. 1179–1185. doi: 10.1038/nsmb856.
- Lee, H. J., Bang, S. H., Lee, K. H. and Park, S. J. (2007) 'Positive regulation of fur gene expression via direct interaction of Fur in a pathogenic bacterium, Vibrio vulnificus', *Journal of Bacteriology*, 189(7), pp. 2629–2636. doi: 10.1128/JB.01791-06.
- Lee, J. W. and Helmann, J. D. (2006a) 'Biochemical characterization of the structural Zn²⁺ site in the Bacillus subtilis peroxide sensor PerR', *Journal of Biological Chemistry*, 281(33), pp. 23567–23578. doi: 10.1074/jbc.M603968200.

Lee, J. W. and Helmann, J. D. (2006b) 'The PerR transcription factor senses H₂O₂ by metal-catalysed histidine oxidation', *Nature*, 440(7082), pp. 363–367. doi: nature04537 [pii]\r10.1038/nature04537.

Lee, J. W. and Helmann, J. D. (2007) 'Functional specialization within the fur family of metalloregulators', *BioMetals*, 20(3–4), pp. 485–499. doi: 10.1007/s10534-006-9070-7.

Li, W., Wang, H., Lei, C., Ying, T. and Tan, X. (2015) 'Manganese superoxide dismutase from human pathogen *Clostridium difficile*', *Amino acids*, 47, pp. 987–995. doi: 10.1007/s00726-015-1927-z.

Lindsay, J. A. and Foster, S. J. (2001) 'Zur: A Zn²⁺-responsive regulatory element of *Staphylococcus aureus*', *Microbiology*, 147(5), pp. 1259–1266. doi: 10.1099/00221287-147-5-1259.

Lombard, M., Fontecave, M., Touati, D. and Nivière, V. (2000) 'Reaction of the Desulfoferodoxin from *Desulfoarculus baarsii* with superoxid anion (Evidence for a superoxide reductase activity)', *J. Biol. Chem.*, 275(1), pp. 115–121.

López-Gomollón, S., Hernández, J. A., Pellicer, S., Angarica, V. E., Peleato, M. L. and Fillat, M. F. (2007) 'Cross-talk Between Iron and Nitrogen Regulatory Networks in *Anabaena* (Nostoc) sp. PCC 7120: Identification of Overlapping Genes in FurA and NtcA Regulons', *Journal of Molecular Biology*, 374(1), pp. 267–281. doi: 10.1016/j.jmb.2007.09.010.

de Lorenzo, V., Wee, S., Herrero, M. and Neilands, J. B. (1987) 'Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (fur) repressor.', *Journal of bacteriology*, 169(6), pp. 2624–30.

Lucarelli, D., Russo, S., Garman, E., Milano, A., Meyer-Klaucke, W. and Pohl, E. (2007) 'Crystal structure and function of the zinc uptake regulator FurB from *Mycobacterium tuberculosis*.', *The Journal of biological chemistry*, 282(13), pp. 9914–22. doi: 10.1074/jbc.M609974200.

Lumppio, H. L., Shenvi, N. V., Summers, A. O., Voordouw, G. and Kurtz, D. M. (2001a) 'Rubrerythrin and Rubredoxin Oxidoreductase in *Desulfovibrio vulgaris*: a Novel Oxidative Stress Protection System', *Journal of Bacteriology*, 183(1), pp. 101–108. doi: 10.1128/JB.183.1.101-108.2001.

Lumppio, H. L., Shenvi, N. V., Summers, A. O., Voordouw, G. and Kurtz, D. M. (2001b) 'Rubrerythrin and Rubredoxin Oxidoreductase in *Desulfovibrio vulgaris*: a Novel Oxidative Stress Protection System', *Journal of Bacteriology*, 183(1), pp. 101–108. doi: 10.1128/JB.183.1.101-108.2001.

Lumppio, H. L., Shenvi, N. V., Garg, R. P., Summers, A. O. and Kurtz, D. M. (1997) 'A rubrerythrin operon and nigerythrin gene in *Desulfovibrio vulgaris* (Hildenborough).', *Journal of*

bacteriology. American Society for Microbiology, 179(14), pp. 4607–15. doi: 10.1128/JB.179.14.4607-4615.1997.

Maret, W. (2006) 'Zinc Coordination Environments in Proteins as Redox Sensors and Signal Transducers', *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(9–10), pp. 1419–1441. doi: 10.1089/ars.2006.8.1419.

Marvin, K. A., Kerby, R. L., Youn, H., Roberts, G. P. and Burstyn, J. N. (2008) 'The transcription regulator RcoM-2 from *Burkholderia xenovorans* is a cysteine-ligated hemoprotein that undergoes a redox-mediated ligand switch.', *Biochemistry*, 47(34), pp. 9016–9028. doi: 10.1021/bi800486x.

Masila, V. M., Midiwo, J. O., Zhang, J., Gisacho, B. M., Munayi, R., Omosa, L. K., Wiggers, F. T., Jacob, M. R., Walker, L. A. and Muhammad, I. (2015) 'Anti-vancomycin-resistant enterococcus faecium and *E. faecalis* activities of (-)-gossypol and derivatives from *thespesia garckeana*', *Natural Product Communications*, 10(4), pp. 613–616. doi: 10.1055/s-0035-1545204.

Maskiewicz, R., Bruice, T. C. and Bartsch, R. G. (1975) 'The acid-base properties and kinetics of dissolution of the Fe₄S₄ cores of Chromatin ferredoxin and high potential iron protein.', *Biochemical and biophysical research communications*, 65(1), pp. 407–12.

Massé, E., Escorcia, F. E. and Gottesman, S. (2003) 'Coupled degradation of a small regulatory RNA and its mRNA targets in *Escherichia coli*.', *Genes & development*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 17(19), pp. 2374–83. doi: 10.1101/gad.1127103.

McCord, J. M., Keele, B. B. and Fridovich, I. (1971) 'An enzyme-based theory of obligate anaerobiosis: the physiological function of superoxide dismutase.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 68(5), pp. 1024–7. doi: 10.1073/pnas.68.5.1024.

Migneault, I., Dartiguenave, C., Bertrand, M. J. and Waldron, K. C. (2004) 'Glutaraldehyde: Behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking', *BioTechniques*, pp. 790–802. doi: 10.2144/3705A0790.

Miller, J. H. (1972) 'Experiments in molecular genetics', *Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY*, 433, pp. 352–355. doi: papers2://publication/uuid/28F839D6-A272-4D50-9114-D2769DE72B38.

Mishra, S. and Imlay, J. (2012) 'Why do bacteria use so many enzymes to scavenge hydrogen peroxide?', *Archives of Biochemistry and Biophysics*, pp. 145–160. doi: 10.1016/j.abb.2012.04.014.

Monaghan, T., Chilton, C., Fit, M., Buckley, A., Kuehne, S., Wilcox, M. and Cockayne, A. (2017) 'Mutation of the Ferric Uptake Regulator (Fur) Severely Impairs Toxin Production in a Human

In Vitro Gut Model of Clostridium difficile Infection', *Gastroenterology*. Nottingham, UK, 152(5).

Monot, M., Boursaux-Eude, C., Thibonnier, M., Vallenet, D., Moszer, I., Medigue, C., Martin-Verstraete, I. and Dupuy, B. (2011) 'Reannotation of the genome sequence of Clostridium difficile strain 630', *Journal of Medical Microbiology*, 60(8), pp. 1193–1199. doi: 10.1099/jmm.0.030452-0.

Mullane, K. (2014) 'Fidaxomicin in Clostridium difficile infection: latest evidence and clinical guidance', *Therapeutic Advances in Chronic Disease*, 5(2), pp. 69–84. doi: 10.1177/2040622313511285.

Nairz, M., Schroll, A., Sonnweber, T. and Weiss, G. (2010) 'The struggle for iron: a metal at the host – pathogen interface', *Cellular Microbiology*, 12, pp. 1691–1702. doi: 10.1111/j.1462-5822.2010.01529.x.

Nienhaus, K. and Nienhaus, G. U. (2005) 'Probing heme protein-ligand interactions by UV/visible absorption spectroscopy.', *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)*, 305, pp. 215–242. doi: 10.1385/1-59259-912-5:215.

Oglevie, B. and Hernández, J. A. (2015) 'Site-Directed Mutagenesis of the Ferric Uptake Regulator (Fur) from Klebsiella oxytoca: in vitro and in vivo Effects on Protein Function', *The FASEB Journal*, 29(1 Supplement).

Omura, T. (2005) 'Heme-thiolate proteins', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, pp. 404–409. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.08.267.

Orme-Johnson, W. H. and Orme-Johnson, N. R. (1982) *Iron-Sulfur Proteins*. John Wiley & Sons, Inc., New York.

Ortiz de Orué Lucana, D. (2012) 'Redox Sensing: Novel Avenues and Paradigms', *Antioxidants & Redox Signaling*, 16(7), pp. 636–638. doi: 10.1089/ars.2011.4466.

Ortiz de Orué Lucana, D. and Schrempf, H. (2000) 'The DNA-binding characteristics of the Streptomyces reticuli regulator FurS depend on the redox state of its cysteine residues', *Molecular & general genetics : MGG*, 264(3), pp. 341–353. doi: 10.1007/s004380000328.

Ortiz de Orué Lucana, D., Troller, M. and Schrempf, H. (2003) 'Amino acid residues involved in reversible thiol formation and zinc ion binding in the Streptomyces reticuli redox regulator FurS', *Mol Genet Genomics*, 268(5), pp. 618–627. doi: 10.1007/s00438-002-0776-0.

Ortiz de Orué Lucana, D., Wedderhoff, I. and Groves, M. R. (2012) 'ROS-Mediated Signalling in Bacteria: Zinc-Containing Cys-X-X-Cys Redox Centres and Iron-Based Oxidative Stress.', *Journal of signal transduction*, 2012, p. 605905. doi: 10.1155/2012/605905.

Ouyang, Z., Deka, R. K. and Norgard, M. V. (2011) 'BosR (BB0647) controls the RpoN-RpoS regulatory pathway and virulence expression in *Borrelia burgdorferi* by a novel DNA-binding mechanism', *PLoS Pathogens*, 7(2). doi: 10.1371/journal.ppat.1001272.

Pandey, A., Bringel, F. and Meyer, J. M. (1994) 'Iron requirement and search for siderophores in lactic acid bacteria', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 40(5), pp. 735–739. doi: 10.1007/BF00173337.

Pantoliano, M. W., Petrella, E. C., Kwasnoski, J. D., Lobanov, V. S., Myslik, J., Graf, E., Carver, T., Asel, E., Springer, B. A., Lane, P. and Salemme, F. R. (2001) 'High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery', *Journal of Biomolecular Screening*, 6(6), pp. 429–440. doi: 10.1177/108705710100600609.

Paraskevopoulou, C., Fairhurst, S. A., Lowe, D. J., Brick, P. and Onesti, S. (2006) 'The Elongator subunit Etp3 contains a Fe₄S₄ cluster and binds S-adenosylmethionine', *Molecular Microbiology*, 59(3), pp. 795–806. doi: 10.1111/j.1365-2958.2005.04989.x.

Park, S. Y., Kelminson, K. L., Lee, A. K., Zhang, P., Warner, R. E., Rehkopf, D. H., Calderwood, S. B. and Koehler, J. E. (2001) 'Identification, characterization, and functional analysis of a gene encoding the ferric uptake regulation protein in *Bartonella* species', *J Bacteriol*, 183(19), pp. 5751–5755. doi: 10.1128/JB.183.19.5751-5755.2001.

Pecqueur, L., D'Autréaux, B., Dupuy, J., Nicolet, Y., Jacquamet, L., Brutscher, B., Michaud-Soret, I. and Bersch, B. (2006) 'Structural changes of *Escherichia coli* ferric uptake regulator during metal-dependent dimerization and activation explored by NMR and x-ray crystallography', *Journal of Biological Chemistry*, 281(30), pp. 21286–21295. doi: 10.1074/jbc.M601278200.

Pellicer, S., Bes, M. T., González, A., Neira, J. L., Peleato, M. L. and Fillat, M. F. (2010) 'High-recovery one-step purification of the DNA-binding protein Fur by mild guanidinium chloride treatment', *Process Biochemistry*, 45(2), pp. 292–296. doi: 10.1016/j.procbio.2009.09.019.

Pellicer, S., González, A., M. Luisa, P., Jesús I, M., María F, F. and Bes, M. T. (2012) 'Site-directed mutagenesis and spectral studies suggest a putative role of FurA from *Anabaena* sp. PCC 7120 as a heme sensor protein', *The Febs Journal*, 279, pp. 2231–2246. doi: 10.1111/j.1742-4658.2012.08606.x.

Pellicciari, S., Vannini, A., Roncarati, D. and Danielli, A. (2015) 'The allosteric behavior of Fur mediates oxidative stress signal transduction in *Helicobacter pylori*', *Frontiers in Microbiology*, 6(JUL), pp. 1–10. doi: 10.3389/fmicb.2015.00840.

- Permpoonpattana, P., Phetcharaburanin, J., Mikelson, A., Dembek, M., Tan, S., Brisson, M. C., La Ragione, R., Brisson, A. R., Fairweather, N., Hong, H. A. and Cutting, S. M. (2013) 'Functional characterization of *Clostridium difficile* spore coat proteins', *Journal of Bacteriology*, 195(7), pp. 1492–1503. doi: 10.1128/JB.02104-12.
- Pettit, L. J., Browne, H. P., Yu, L., Smits, W. K., Fagan, R. P., Barquist, L., Martin, M. J., Goulding, D., Duncan, S. H., Flint, H. J., Dougan, G., Choudhary, J. S. and Lawley, T. D. (2014) 'Functional genomics reveals that *Clostridium difficile* Spo0A coordinates sporulation, virulence and metabolism.', *BMC genomics*, 15(1), p. 160. doi: 10.1186/1471-2164-15-160.
- Pieulle, L., Magro, V. and Hatchikian, E. C. (1997) 'Isolation and analysis of the gene encoding the pyruvate-ferredoxin oxidoreductase of *Desulfovibrio africanus*, production of the recombinant enzyme in *Escherichia coli*, and effect of carboxy-terminal deletions on its stability.', *Journal of bacteriology*, 179(18), pp. 5684–92.
- Pohl, E., Haller, J. C., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., Garman, E. and Vasil, M. L. (2003) 'Architecture of a protein central to iron homeostasis: Crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator', *Molecular Microbiology*, 47(4), pp. 903–915. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03337.x.
- Prince, R. W., Cox, C. D. and Vasil, M. L. (1993) 'Coordinate regulation of siderophore and exotoxin A production: molecular cloning and sequencing of the *Pseudomonas aeruginosa* fur gene.', *Journal of bacteriology*, 175(9), pp. 2589–98.
- Pym, A. S., Domenech, P., Honoré, N., Song, J., Deretic, V. and Cole, S. T. (2001) 'Regulation of catalase-peroxidase (KatG) expression, isoniazid sensitivity and virulence by furA of *Mycobacterium tuberculosis*', *Molecular Microbiology*, 40(4), pp. 879–889. doi: 10.1046/j.1365-2958.2001.02427.x.
- Qi, Z. and O'Brian, M. R. (2002) 'Interaction between the bacterial iron response regulator and ferrochelatase mediates genetic control of heme biosynthesis.', *Molecular cell*, 9(1), pp. 155–62.
- Quan, S., Schneider, I., Pan, J., Von Hacht, A. and Bardwell, J. C. A. (2007) 'The CXXC motif is more than a redox rheostat.', *The Journal of biological chemistry*, 282(39), pp. 28823–33. doi: 10.1074/jbc.M705291200.
- Quatrini, R., Lefimil, C., Holmes, D. S. and Jedlicki, E. (2005) 'The ferric iron uptake regulator (Fur) from the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*.', *Microbiology (Reading, England)*, 151(Pt 6), pp. 2005–15. doi: 10.1099/mic.0.27581-0.
- Rao CV, S. and Anné, J. (2011) 'Bacterial type I signal peptidases as antibiotic targets', *Future Microbiology*, 6(11), pp. 1279–1296. doi: 10.2217/fmb.11.109.

- Rea, R. B., Gahan, C. G. M. and Hill, C. (2004) 'Disruption of Putative Regulatory Loci in *Listeria monocytogenes* Demonstrates a Significant Role for Fur and PerR in Virulence', *Infection and Immunity*, 72(2), pp. 717–727. doi: 10.1128/IAI.72.2.717-727.2004.
- Ritz, D. and Beckwith, J. (2002) 'Redox state of cytoplasmic thioredoxin.', *Methods in enzymology*, 347, pp. 360–70.
- Rodríguez-Pardo, D., Mirelis, B. and Navarro, F. (2013) 'Infecciones producidas por *Clostridium difficile*', *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. SEGO, 31(4), pp. 254–263. doi: 10.1016/j.eimc.2012.12.010.
- Sali, A. and Blundell, T. L. (1993) 'Comparative protein modelling by satisfaction of spatial restraints.', *Journal of molecular biology*, 234(3), pp. 779–815. doi: 10.1006/jmbi.1993.1626.
- Sawers, G. and Watson, G. (1998) 'A glycyl radical solution: oxygen-dependent interconversion of pyruvate formate-lyase.', *Molecular microbiology*, 29(4), pp. 945–54.
- Schröder, J., Jochmann, N., Rodionov, D. A. and Tauch, A. (2010) 'The Zur regulon of *Corynebacterium glutamicum* ATCC 13032', *BMC Genomics*, 11(1), p. 12. doi: 10.1186/1471-2164-11-12.
- Schwan, C., Stecher, B., Tzivelekidis, T., Van Ham, M., Rohde, M., Hardt, W. D., Wehland, J. and Aktories, K. (2009) 'Clostridium difficile toxin CDT induces formation of microtubule-based protrusions and increases adherence of bacteria', *PLoS Pathogens*, 5(10). doi: 10.1371/journal.ppat.1000626.
- Scott, C., Guest, J. R. and Green, J. (2000) 'Characterization of the *Lactococcus lactis* transcription factor FlpA and demonstration of an in vitro switch.', *Molecular microbiology*, 35(6), pp. 1383–93.
- Sebahia, M., Wren, B. W., *et al.* (2006) 'The multidrug-resistant human pathogen *Clostridium difficile* has a highly mobile, mosaic genome.', *Nature genetics*, 38(7), pp. 779–786. doi: 10.1038/ng1830.
- Seo, S. W., Kim, D., Latif, H., O'Brien, E. J., Szubin, R. and Palsson, B. O. (2014) 'Deciphering Fur transcriptional regulatory network highlights its complex role beyond iron metabolism in *Escherichia coli*', *Nature Communications*, 5, p. 4910. doi: 10.1038/ncomms5910.
- Sheikh, M. A. and Taylor, G. L. (2009) 'Crystal structure of the *Vibrio cholerae* ferric uptake regulator (Fur) reveals insights into metal co-ordination', *Molecular Microbiology*, 72(5), pp. 1208–1220. doi: 10.1111/j.1365-2958.2009.06718.x.

Shin, J.-H., Jung, H. J., An, Y. J., Cho, Y.-B., Cha, S.-S. and Roe, J.-H. (2011) 'Graded expression of zinc-responsive genes through two regulatory zinc-binding sites in Zur', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(12), pp. 5045–5050. doi: 10.1073/pnas.1017744108.

Singleton, C., White, G. F., Todd, J. D., Marritt, S. J., Cheesman, M. R., Johnston, A. W. B. and Le Brun, N. E. (2010) 'Heme-responsive DNA binding by the global iron regulator Irr from *Rhizobium leguminosarum*.' , *The Journal of biological chemistry*, 285(21), pp. 16023–31. doi: 10.1074/jbc.M109.067215.

Smith, A., Hooper, N. I., Shipulina, N. and Morgan, W. T. (1996) 'Heme binding by a bacterial repressor protein, the gene product of the ferric uptake regulation (fur) gene of *Escherichia coli*' , *Journal of Protein Chemistry*, 15(6), pp.

Smith, K. F., Bibb, L. A., Schmitt, M. P. and Oram, D. M. (2009) 'Regulation and activity of a zinc uptake regulator, zur, in *Corynebacterium diphtheriae*' , *Journal of Bacteriology*, 191(5), pp. 1595–1603. doi: 10.1128/JB.01392-08.

Sorg, J. A. and Sonenshein, A. L. (2008) 'Bile salts and glycine as cogerminants for *Clostridium difficile* spores' , *Journal of Bacteriology*, 190(7), pp. 2505–2512. doi: 10.1128/JB.01765-07.

Stabler, R., He, M., Dawson, L., Martin, M., Valiente, E., Corton, C., Lawley, T., Sebahia, M., Quail, M., Rose, G., Gerding, D., Gibert, M., Popoff, M., Parkhill, J., Dougan, G. and Wren, B. (2009) 'Comparative genome and phenotypic analysis of *Clostridium difficile* O27 strains provides insight into the evolution of a hypervirulent bacterium' , *Genome Biology*, 10(9), p. R102. doi: 10.1186/gb-2009-10-9-r102.

Swick, M. C., Koehler, T. M. and Driks, A. (2016) 'Surviving Between Hosts : Sporulation and Transmission' , *Microbiology Spectr.*, 4(4). doi: 10.1128/microbiolspec.VMBF-0029-2015.Surviving.

Tao, K. (1999) 'In vivo oxidation-reduction kinetics of OxyR, the transcriptional activator for an oxidative stress-inducible regulon in *Escherichia coli*.' , *FEBS letters*, 457(1), pp. 90–2. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10486570> (Accessed: 5 October 2017).

Theriot, C. M., Koenigsnecht, M. J., Jr, P. E. C., Hatton, G. E., Nelson, A. M., Li, B., Huffnagle, G. B., Li, J. and Young, V. B. (2014) 'Antibiotic-induced shifts in the mouse gut microbiome and metabolome increase susceptibility to *Clostridium difficile* infection'. doi: 10.1038/ncomms4114.Antibiotic-induced.

Touati, D. (2000) 'Iron and oxidative stress in bacteria.' , *Archives of biochemistry and biophysics*, 373(1), pp. 1–6. doi: 10.1006/abbi.1999.1518.

Trachootham, D., Lu, W., Ogasawara, M. A., Nilsa, R.-D. V. and Huang, P. (2008) 'Redox regulation of cell survival.', *Antioxidants & redox signaling*, 10(8), pp. 1343–74. doi: 10.1089/ars.2007.1957.

Troxell, B. and Hassan, H. M. (2013) 'Transcriptional regulation by Ferric Uptake Regulator (Fur) in pathogenic bacteria.', *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3(October), p. 59. doi: 10.3389/fcimb.2013.00059.

Tsutsumi, L. S., Owusu, Y. B., Hurdle, J. G. and Sun, D. (2014) 'Progress in the discovery of treatments for *C. difficile* infection: A clinical and medicinal chemistry review.', *Current topics in medicinal chemistry*, pp. 152–75. doi: 10.2174/1568026613666131113154753\r10. 1016/j. anaerobe.

Uliczka, F., Pisano, F., Kochut, A., Opitz, W., Herbst, K., Stolz, T. and Dersch, P. (2011) 'Monitoring of gene expression in bacteria during infections using an adaptable set of bioluminescent, fluorescent and colorigenic fusion vectors', *PLoS ONE*, 6(6). doi: 10.1371/journal.pone.0020425.

Underwood, S., Guan, S., Vijayasubhash, V., Baines, S. D., Graham, L., Lewis, R. J., Wilcox, M. H. and Stephenson, K. (2009) 'Characterization of the sporulation initiation pathway of *Clostridium difficile* and its role in toxin production', *Journal of Bacteriology*, 191(23), pp. 7296–7305. doi: 10.1128/JB.00882-09.

Vasileva, D., Janssen, H., Hönicke, D., Ehrenreich, A. and Bahl, H. (2012) 'Effect of iron limitation and fur gene inactivation on the transcriptional profile of the strict anaerobe *Clostridium acetobutylicum*', *Microbiology (United Kingdom)*, 158(7), pp. 1918–1929. doi: 10.1099/mic.0.056978-0.

Vijayalakshmi, J., Mukherjee, M. K., Graumann, J., Jakob, U. and Saper, M. A. (2001) 'The 2.2 Å crystal structure of Hsp33: A heat shock protein with redox-regulated chaperone activity', *Structure*, 9(5), pp. 367–375. doi: 10.1016/S0969-2126(01)00597-4.

Vitale, S., Fauquant, C., Lascoux, D., Schauer, K., Saint-Pierre, C. and Michaud-Soret, I. (2009) 'A ZnS 4 Structural Zinc Site in the *Helicobacter pylori* Ferric Uptake Regulator', *Biochemistry*, 48, pp. 5582–5591. doi: 10.1021/bi9004396.

Wood, H. G., Ragsdale, S. W. and Pezacka, E. (1986) 'The acetyl-CoA pathway: a newly discovered pathway of autotrophic growth', *Trends in Biochemical Sciences*, 11(1), pp. 14–18. doi: 10.1016/0968-0004(86)90223-9.

Woodmansee, A. N. and Imlay, J. A. (2002) 'Reduced flavins promote oxidative DNA damage in non-respiring *Escherichia coli* by delivering electrons to intracellular free iron', *Journal of Biological Chemistry*, 277(37), pp. 34055–34066. doi: 10.1074/jbc.M203977200.

- Yao, Y., Lin, G., Xie, Y., Ma, P., Li, G., Meng, Q. and Wu, T. (2014) 'Preformulation studies of myricetin: a natural antioxidant flavonoid.', *Die Pharmazie*, 69(1), pp. 19–26.
- Yildirim-Aksoy, P., Lim, C., Dowd, M. K., Wan, P. J., Klesius, P. H. and Shoemaker, C. (2004) 'In vitro inhibitory effect of gossypol from gossypol-acetic acid, and (+)- and (-)-isomers of gossypol on the growth of *Edwardsiella ictaluri*', *Journal of Applied Microbiology*, 97(1), pp. 87–92. doi: 10.1111/j.1365-2672.2004.02273.x.
- Yoch, D. C. and Valentine, R. C. (1972) 'Ferredoxins and Flavodoxins of Bacteria', *Annual Review of Microbiology*, 26(1), pp. 139–162. doi: 10.1146/annurev.mi.26.100172.001035.
- Young, J. F., Nielsen, S. E., Haraldsdóttir, J., Daneshvar, B., Lauridsen, S. T., Knuthsen, P., Crozier, A., Sandström, B. and Dragsted, L. O. (1999) 'Effect of fruit juice intake on urinary quercetin excretion and biomarkers of antioxidative status.', *The American journal of clinical nutrition*, 69(1), pp. 87–94.
- Yutin, N. and Galperin, M. Y. (2013) 'A genomic update on clostridial phylogeny: Gram-negative spore formers and other misplaced clostridia', *Environmental Microbiology*, 15(10), pp. 2631–2641. doi: 10.1111/1462-2920.12173.
- Zhang, L. and Guarentel, L. (1995) 'Heme binds to a short sequence that serves a regulatory function in diverse proteins', *The EMBO Journal*, 14(2), pp. 313–320.
- Zhao, G., Ceci, P., Ilari, A., Giangiacomo, L., Laue, T. M., Chiancone, E. and Chasteen, N. D. (2002) 'Iron and Hydrogen Peroxide Detoxification Properties of DNA-binding Protein from Starved Cells. A FERRITIN-LIKE DNA-BINDING PROTEIN OF *ESCHERICHIA COLI*', *Journal of Biological Chemistry*, 277(31), pp. 27689–27696. doi: 10.1074/jbc.M202094200.
- Zheng, M., Aslund, F. and Storz, G. (1998) 'Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation.', *Science (New York, N.Y.)*, 279(5357), pp. 1718–21.
- Zheng, M., Doan, B., Schneider, T. D. and Storz, G. (1999) 'OxyR and SoxRS regulation of fur', *Journal of Bacteriology*, 181(15), pp. 4639–4643. doi: 10.1073/PNAS.0403423101.
- Zoppellaro, G., Bren, K. L., Ensign, A. A., Harbitz, E., Kaur, R., Hersleth, H.-P., Ryde, U., Hederstedt, L. and Andersson, K. K. (2009) 'Review: Studies of ferric heme proteins with highly anisotropic/highly axial low spin ($S = 1/2$) electron paramagnetic resonance signals with bis-Histidine and histidine-methionine axial iron coordination', *Biopolymers*, 91(12), pp. 1064–1082. doi: 10.1002/bip.21267.

