

INDICE

RESUMEN.	7
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	8
Capítulo 1: INTRODUCCIÓN.	9
<hr/>	
A) IMPORTANCIA BIOLÓGICA DEL HIERRO.	10
B) MECANISMOS DE ADQUISICIÓN DE HIERRO EN BACTERIAS.	11
1) REDUCCIÓN DEL IÓN FÉRRICO A LA FORMA FERROSA MÁS SOLUBLE.	11
2) ADQUISICIÓN DE HIERRO MEDIADA POR SIDERÓFOROS.	11
3) UTILIZACIÓN DEL HIERRO LIGADO A DIFERENTES COMPUESTOS Y PROTEÍNAS COMÚNMENTE PRESENTES EN EL HOSPEDERO.	12
a) Lactoferrina y transferrina.	12
b) Compuestos hemínicos.	13
C) REGULACION DE LOS SISTEMAS DE ADQUISICIÓN DE HIERRO.	21
D) MECANISMOS DE ADQUISICIÓN DE HIERRO PRESENTES EN RIZOBIO.	23
1) ADQUISICIÓN DE HIERRO MEDIADA POR SIDERÓFOROS.	23
2) ADQUISICIÓN DE HIERRO A PARTIR DE COMPUESTOS HEMÍNICOS.	24
Capítulo 2: ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LA L-METIONINA EN LA ADQUISICIÓN DE HIERRO A PARTIR DE COMPUESTOS HEMÍNICOS.	26
<hr/>	
A) MATERIALES Y METODOS.	27
1) CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO.	27
2) DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE L-METIONINA A AGREGAR A LOS MEDIOS DE CULTIVO.	27
3) ESTUDIO DEL POSIBLE "EFECTO INDUCTOR" DE DIFERENTES PRECURSORES O DERIVADOS DE LA L-METIONINA.	27
4) DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE SIDERÓFOROS EN LOS MEDIOS DE CULTIVO.	28
5) REQUERIMIENTO DE METIONINA EN MEDIOS CONTENIENDO DIFERENTES FUENTES NITROGENADAS.	28
B) RESULTADOS	28
1) DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE L-METIONINA A AGREGAR A LOS MEDIOS DE CULTIVO.	28
2) ESTUDIO DEL POSIBLE "EFECTO INDUCTOR" DE DIFERENTES PRECURSORES O DERIVADOS DE LA L-METIONINA	30
3) REQUERIMIENTO DE METIONINA EN MEDIOS CONTENIENDO DIFERENTES FUENTES NITROGENADAS.	31
C) DISCUSIÓN.	32

Capítulo 3: PURIFICACIÓN DE LEGHEMOGLOBINA. OBTENCIÓN Y PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-LEGHEMOGLOBINA. 36

A) MATERIALES Y MÉTODOS.	37
1) CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO.	37
2) PURIFICACIÓN DE LEGHEMOGLOBINA	37
3) PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-LEGHEMOGLOBINA.	37
a) Obtención de antisueros anti-leghemoglobina, purificación de la fracción gamaglobulina.	37
b) Determinación de la dilución de trabajo por ELISA.	38
c) Western blot.	38
d) Biotinización de los anticuerpos anti-leghemoglobina, determinación de la dilución de trabajo por ELISA.	39
B) RESULTADOS.	39
1) PURIFICACIÓN DE LEGHEMOGLOBINA.	39
2) PURIFICACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-LEGHEMOGLOBINA.	40
C) DISCUSIÓN.	42

Capítulo 4: BÚSQUEDA DE RECEPTORES DE MEMBRANA EXTERNA PARA COMPUESTOS HEMÍNICOS. 44

A) MATERIALES Y METODOS.	45
1) CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO.	45
2) SDS-PAGE.	45
3) EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA.	45
4) ESTUDIO DE LA INDUCCIÓN DE LAS PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA REGULADAS POR HIERRO.	45
5) CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD CON HEMINA Y HEMOGLOBINA INMOVILIZADAS.	46
a) Ensayos de inhibición	46
6) ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS MALDI-TOF.	46
a) Obtención y preparación de la muestra.	46
b) Reducción y alquilación.	47
c) Digestión y extracción de los péptidos.	47
d) Análisis de las muestras por EM MALDI-TOF.	48
e) Análisis de los espectros obtenidos.	48

B) RESULTADOS	48
1) ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA REGULADAS POR HIERRO.	48
2) ESTUDIO DE LA INDUCCIÓN DE PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA REGULADAS POR HIERRO.	49
3) CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD CON HEMINA Y HEMOGLOBINA INMOVILIZADAS.	50
4) ANÁLISIS PEPTÍDICO POR ESPECTROMETRÍA DE MASAS: EM- MALDI-TOF.	51
C) DISCUSIÓN.	53
<u>Capítulo 5: CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS.</u>	<u>60</u>
APÉNDICE	64
BIBLIOGRAFÍA.	65

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS.

<u>Capítulo 1: INTRODUCCIÓN.</u>	<u>9</u>
Tabla 1: Resumen de los diferentes tipos de receptores para compuestos hemínicos en bacterias.	20
Figura 1: Sistemas de transporte de hierro presentes en <i>E. coli</i> para enterobactinaférica (Ent), aerobactinaférica (Aer), dicitratoférico (Cit) y sideróforos del tipo hidroxamato: ferricromo (Fc), ferrioxamina B (FOB) y coprógeno (Cop).	12
Figura 2: Sistemas de adquisición de hierro mediados por compuestos hemínicos presentes en bacterias Gram-negativas.	14
Figura 3: Modelo hipotético para la función del receptor HemR de <i>Yersinia enterocolitica</i> .	16
Figura 4: Regulación de los sistemas de adquisición de hierro mediados por sideróforos en <i>E.coli</i> .	22
<u>Capítulo 2: ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LA L-METIONINA EN LA ADQUISICIÓN DE HIERRO A PARTIR DE COMPUESTOS HEMÍNICOS.</u>	<u>26</u>
Tabla 1: Principales características y referencias de las cepas utilizadas.	27