

UCH-FC
Doc-B
S/6L

**ESTUDIOS SOBRE LA REGULACION DE LA EXPRESION DE UN GEN DE
TYROSIL tRNA SINTETASA DE *Thiobacillus ferrooxidans***

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

María Oriana Salazar Aguirre

Octubre, 1996

Director de Tesis: Dr. Omar Orellana Orellana



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

MARIA ORIANA SALAZAR AGUIRRE

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 26 de Agosto de 1996

Director de Tesis

Dr. Omar Orellana



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Rosalba Lagos.....


.....

.....

Dra. Catherine Connelly.....

Dr. Alejandro Venegas.....

.....

A mis amados padres, Ariel y Oriana
A mis queridos hermanos, Gonzalo y Laura

AGRADECIMIENTOS

Al momento de finalizar esta tesis no puedo dejar de manifestar mis agradecimientos sinceros a las personas que de una u otra manera contribuyeron a que este trabajo se concretara felizmente.

Agradezco al Dr Omar Orellana por la oportunidad que me brindó de realizar esta tesis en su laboratorio y por el compromiso asumido en la dirección de este trabajo. Más que nada quisiera agradecer el apoyo y la confianza que el Dr. Orellana me demostrara permanentemente en estos años, que fueron esenciales para enfrentar los momentos más difíciles de la investigación.

Agradezco a Raúl Aguirre, Eugenia Jedlicki y a David Holmes por su interés y amistad personal, y por sus valiosas críticas científicas, siempre acertadas y constructivas.

Gracias a todos mis amigos del laboratorio, que fueron pacientes compañeros de jornadas a veces interminables, con quienes he compartido la ambiciosa ilusión de querer comprender la vida que nos rodea.

Finalmente, agradezco al grupo humano del laboratorio del Dr. Carlos Jerez por las facilidades que me brindó para la utilización de sus equipos, sin los cuales muchos de los experimentos de esta tesis no habrían sido posibles.

INDICE DE MATERIAS

	Pág.
INDICE DE MATERIAS	iv
LISTA DE TABLAS	ix
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE ABREVIATURAS	xiii
RESUMEN	xiv
SUMMARY	xvi
INTRODUCCIÓN	1
I.- AMINOACIL tRNA SINTETASAS DE BACTERIAS	1
1. - Función de las aminoacil tRNA sintetetasas (aaRS).	1
2.- Número de genes para cada aaRS	2
3.- Clasificación de las aaRS	3
4.- Regulación de la expresión de aaRS en bacterias	7
4.1.- Control dependiente de la velocidad de crecimiento	8
4.1.1.- rRNA	9
4.1.2.- Proteínas ribosomales	9
4.1.3.- tRNA	10
4.1.4.- Aminoacil tRNA sintetetasas	11
4.2.- Control dependiente de la concentración de aminoácidos	11
5.- Mecanismos de regulación de la expresión de aaRS de <i>E. coli</i>	12
6.- Regulación de la expresión de aaRS de bacterias Gram (+)	19
6.1.- Regiones regulatorias	20
6. 2.- Mecanismo de regulación	24
CARACTERISTICAS DE <i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	29
1.- Fisiología de <i>T. ferrooxidans</i>	30
2.- Metabolismo de <i>T. ferrooxidans</i>	31

III.- OBJETIVO GENERAL DE LA TESIS	31
MATERIALES Y METODOS	38
I.- MATERIALES	38
1.- Bacterias y fagos	38
2.- Reactivos	39
3.- Medios de cultivo	40
II.- METODOS	41
1.- Métodos generales	41
1.1.- Digestión de DNA con enzimas de restricción	41
1.2.- Extracción de proteínas con fenol/cloroformo	42
1.3.- Precipitación de ácidos nucleicos con etanol	42
1.4.- Cuantificación de DNA y RNA	42
1.5.- Cuantificación de proteínas	43
1.6.- Determinación de radiactividad incorporada en ácidos nucleicos	43
1.7.- Electroforesis en geles de agarosa	44
1.8.- Electroforesis en geles de poliacrilamida	44
1.9.- Secuenciación en M13	45
1.9.1.- Infección de <i>E. coli</i> por bacteriófagos M13 recombinantes	45
1.9.2.- Preparación del DNA de hebra simple del bacteriófago M13	45
1.9.3.- Reacción de marcación del DNA	45
2.- Preparación de DNA	46
2.1.-Preparación de DNA plasmidial en pequeña escala	46
2.2.- Preparación de DNA plasmidial en gran escala	46
2.3.- Preparación de DNA cromosomal de <i>T. ferrooxidans</i>	47
3.- Preparación de RNA	48
3.1.- Preparación de RNA total de <i>T. ferrooxidans</i>	48

3.2.- Preparación de RNA ribosomal de <i>T. ferrooxidans</i>	49
4.- Preparación de sondas radiactivas	50
4.1.- Preparación de sondas de DNA	50
4.1.1.- Purificación del fragmento BamHI-PstI	50
4.1.2.- Obtención de un fragmento de DNA de la región 5' no codificante de <i>tyrZ</i>	50
4.1.3.- Marcación del fragmento de DNA	52
4.2.- Preparación de una sonda de RNA	53
4.2.1.- Transcripción <i>in vitro</i>	53
4.3.- Marcación de oligodesoxirribonucleótidos	54
5.- Transformación de <i>E. coli</i>	54
5.1.- Preparación de <i>E. coli</i> competentes	54
5.2.- Transformación	55
6.- Preparación de extractos libres de células	55
7.- Ensayo de la actividad tirosil tRNA sintetasa	56
8.- Ensayos de complementación de la mutación termosensible	56
9.- Determinación de la actividad tirosil tRNA sintetasa del producto del gen <i>tyrZ</i> de <i>T. ferrooxidans</i> en extractos de <i>E. coli</i> HB2109 (ts)	57
10.- Hibridación tipo Southern	57
11.- Hibridación tipo Northern	58
12.- PCR reverso	59
12.1.- Tratamiento de las preparaciones de RNA con DNasa I libre de Rnasa	59
12.2.- Síntesis de cDNA	60
12.3.- Amplificación de cDNA mediante la Reacción de Polimerización en Cadena (PCR).	60
13.- Extensión del partidior	61
14.- Adaptación de <i>T. ferrooxidans</i> a la presencia de tirosina en el medio de cultivo	62

15.- Análisis del efecto de hidroxamato de tirosina en el crecimiento de <i>T. ferrooxidans</i>	63
16.-Efecto de tirosina hidroxamato en la actividad de la tirosil tRNA sintetasa de <i>T. ferrooxidans</i>	63
RESULTADOS	64
1. - Identidad del gen <i>tyrZ</i>	64
2. - Determinación del número de copias del gen <i>tyrZ</i> en el genoma de <i>T.</i> <i>ferrooxidans</i>	69
3. - Funcionalidad del gen <i>tyrZ</i>	71
3.4.- Detección del mRNA de <i>tyrZ</i>	71
3.5.- Determinación del extremo 5' del mRNA de <i>tyrZ</i>	77
3.6.- Cotranscripción de <i>tyrZ</i> y el operón <i>rrnT2</i>	79
4.- Efecto del nivel de aminoácidos en la expresión del gen <i>tyrZ</i>	85
4.1.- Efecto de hidroxamato de tirosina en la actividad enzimática <i>in vitro</i> de la tirosil tRNA sintetasa de <i>T. ferrooxidans</i>	86
4.2.- Adaptación de <i>T. ferrooxidans</i> a la presencia de tirosina en el medio de cultivo	86
4.3.- Efecto de hidroxamato de tirosina en la proliferación de <i>T. ferrooxidans</i>	90
4.4.- Efecto de la presencia de hidroxamato de tirosina en el medio de cultivo sobre la actividad de la tirosil tRNA sintetasa en <i>T. ferrooxidans</i>	91
5.- Un mecanismo posible de regulación de la expresión del gen <i>tyrZ</i>	94
5.1.- Análisis de la región líder del gen <i>tyrZ</i> de <i>T. ferrooxidans</i>	96
DISCUSION	102
Identidad del gen <i>tyrZ</i>	103
Expresión de <i>tyrZ</i> en <i>T. ferrooxidans</i>	104

Posible cotranscripción del gen <i>tyrZ</i> y el operón <i>rrnT2</i> de <i>T. ferrooxidans</i>	107
Análisis de los promotores de la transcripción del operón ribosomal <i>rrnT2</i>	110
Inhibición del crecimiento de <i>T. ferrooxidans</i> por tirosina.	112
Regulación de la actividad de la tirosil tRNA sintetasa de <i>T. ferrooxidans</i> .	113
Un mecanismo posible para la regulación de la expresión del gen <i>tyrZ</i> de <i>T. ferrooxidans</i>	118
Proyecciones del trabajo realizado en esta tesis	124
 CONCLUSIONES	 128
REFERENCIAS	130

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1.- Características de aminoacil tRNA sintetasas de bacterias.	5
Tabla 2.- Complementación de una mutación termosensible en el gen <i>tyrS</i> de <i>E. coli</i> HB2109 por el gen <i>tyrZ</i> de <i>T. ferrooxidans</i> .	66
Tabla 3.- Actividad <i>in vitro</i> de tirosil tRNA sintetasa en extractos de <i>E. coli</i> HB2109 que expresa el gen <i>tyrZ</i> de <i>T. ferrooxidans</i> .	68
Tabla 4.- Inhibición de la actividad tirosil tRNA sintetasa por hidroxamato de tirosina.	87
Tabla 5.- Efecto de tirosina sobre la velocidad de proliferación de <i>T. ferrooxidans</i>	89
Tabla 6.- Efecto de hidroxamato de tirosina en la velocidad de proliferación de <i>T. ferrooxidans</i> .	93
Tabla 7.- Efecto de hidroxamato de tirosina sobre la actividad de la tirosil tRNA sintetasa de <i>T. ferrooxidans</i> cultivados en presencia del análogo.	95

LISTA DE FIGURAS

	Pág.	
Fig 1	Secuencias regulatorias conservadas de la región 5' no codificante de genes de aminoacil tRNA sintetetasas y de enzimas de la biosíntesis de aminoácidos de bacterias del género <i>Bacillus</i> , <i>Lactobacillus</i> y <i>Lactococcus</i> .	22
Fig. 2	Modelo estructural para la región líder del mRNA del gen <i>tyrS</i> de <i>B. subtilis</i>	23
Fig 3	Representación esquemática del modelo de regulación de la expresión por terminación/antiterminación de la transcripción del gen <i>tyrS</i> de <i>subtilis</i> .	28
Fig. 4	Secuencia del gen <i>tyrZ</i> de <i>T. ferrooxidans</i> y secuencia predicha de la proteína	34
Fig. 5	Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de tirosil tRNA sintetetasas bacterianas.	35
Fig. 6	Lista de oligonucleótidos utilizados en el estudio de la expresión del gen <i>tyrZ</i>	51
Fig. 7	Representación esquemática del plasmidio pTR-1	65

Fig. 8	Análisis tipo Southern del DNA genómico de <i>T. ferrooxidans</i>	70
Fig. 9	Análisis tipo Northern blot del RNA de <i>tyrZ</i>	72
Fig. 10	Oligonucleótidos utilizados en el estudio de la expresión del gen <i>tyrZ</i>	74
Fig.11	PCR de cDNA de <i>T. ferrooxidans</i> .	76
Fig.12	Determinación del extremo 5' del mRNA del gen <i>tyrZ</i>	78
Fig.13	PCR de cDNA de la región espaciadora de los genes <i>tyrZ</i> y del rRNA <i>16S</i>	81
Fig.14	Determinación del extremo 5' del mRNA del precursor del rRNA del operón <i>rmt2</i>	83
Fig.15	Cotranscripción del gen <i>tyrZ</i> y del gen de rRNA <i>16S</i> .	84
Fig.16	Efecto de tirosina en el crecimiento de <i>T. ferrooxidans</i> .	88
Fig.17	Inhibición de la proliferación de <i>T. ferrooxidans</i> por hidroxamato de tirosina	92
Fig. 18	Secuencia del extremo 5' no codificante del gen <i>tyrZ</i>	97
Fig. 19	Comparación de la secuencia de cajas T de bacterias Gram (+) con la caja T descrita en el gen <i>tyrZ</i> .	98

Fig. 20 Estructura secundaria predicha para la región líder del
mRNA de *tyrZ*.

100

LISTA DE ABREVIATURAS

aaRS : aminoacil tRNA sintetasa
amp : ampicilina
ATP : Adenisina 5' trifosfato
BSA : Albúmina sérica de bovino
cpm : cuentas por minuto
dATP : desoxiadenosina 5' trifosfato
dCTP : desoxicitidina 5' trifosfato
dGTP : desoxiguanosina 5' trifosfato
DNA : Acido desoxirribonucléico
dTTP : desoxitimidina 5' trifosfato
EDTA : etilén diamiotetracético
HT : hidroxamato de tirosina
kb : kilobases
mRNA : RNA mensajero
pb : pares de base
PCR : reacción de polimerización en cadena
POPOP: 1,4-bis[2-(5 feniloxazolil)] benceno
PPO: 2,5-difeniloxazol.
rRNA : RNA ribosomal
SDS : dodecil sulfato de sodio
TCA : ácido tricloroacético
Tris : Tris (hidroximetil) aminometano
tRNA : RNA de transferencia
tyr : tirosina
UTP : uridina 5' trifosfato
Vel: velocidad

RESUMEN

...En bacterias, la expresión de las aminoacil tRNA sintetetasas se regula dependiendo de la velocidad de proliferación de las células y de la disponibilidad del aminoácido sustrato de cada sintetasa. En *E. coli* la expresión de cada una de estas enzimas se regula en forma independiente, existiendo una variedad de mecanismos de control. En bacilos Gram (+) por el contrario, se ha descrito la existencia de un mecanismo de regulación por terminación/antiterminación de la transcripción, común para la mayoría de los genes de aminoacil tRNA sintetetasas, pero que permite la respuesta específica a la limitación del aminoácido correspondiente.

En este laboratorio se inició el estudio de los mecanismos de control de la expresión de genes cuyos productos participan en la biosíntesis de proteínas en la bacteria quimiolitotrófica *Thiobacillus ferrooxidans*. En trabajos anteriores se clonó y secuenció el gen *tyrZ*, que codifica para una tirosil tRNA sintetasa de esta bacteria, y que es similar al producto del gen *tyrZ* de *B. subtilis*. Para analizar la posibilidad que la similitud estructural entre los productos de los genes *tyrZ* de *B. subtilis* y de *T. ferrooxidans* se extienda al mecanismo de regulación de su expresión, se planteó el estudio de los mecanismos que regulan la expresión del gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans*.

Por experimentos de complementación de una mutación termosensible en el gen *tyrS* de *E. coli* se demostró que el gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans* codifica para una tirosil tRNA sintetasa funcional. Se determinó la existencia de una copia de *tyrZ* en el cromosoma de *T. ferrooxidans*. La transcripción de *tyrZ in vivo* se demostró por PCR de cDNA de *T. ferrooxidans*. Los experimentos de extensión de un partidador complementario a la región 5' no codificante de *tyrZ* sugieren que el líder del mRNA es de aproximadamente 350 pb.

El gen *tyrZ* se encuentra río arriba del operón de rRNA *rrnT2*, separado del rRNA 16S por aproximadamente 100 pb. Ya que en la región espaciadora entre ambos genes no se identificó un terminador de la transcripción independiente del factor rho, se estudió la posible cotranscripción de *tyrZ* y *rrnT2*. Aunque parece existir transcripción del gen de rRNA 16S desde una región interna en *tyrZ*, no se detectó la existencia de un mRNA que abarque ambos genes, posiblemente por la inestabilidad del RNA precursor.

Para estudiar la expresión de *tyrZ* dependiente de la disponibilidad de tirosina se analizó la actividad de la tirosil tRNA sintetasa en una condición de carencia artificial de tirosina, inducida por un inhibidor de la enzima, hidroxamato de tirosina. La actividad específica de la enzima de bacterias tratadas con este compuesto aumentó 6 a 7 veces con respecto a las cultivadas en un exceso de tirosina. Es posible que este efecto sea causado por el aumento de la síntesis de la tirosil tRNA sintetasa en carencia de tirosina. La inducción de la síntesis puede ser el resultado del control de la traducción o de la transcripción, a nivel de la iniciación o de la elongación del mRNA. Se requiere experimentos adicionales para comprobar el origen de la regulación de la actividad específica de la tirosil tRNA sintetasa de *T. ferrooxidans* en limitación de tirosina.

En la región correspondiente al líder del mRNA de *tyrZ* se identificó los siguientes elementos estructurales: (1) un terminador de la transcripción independiente del factor rho (2), una secuencia de 12 nucleótidos similar a la caja T de genes de aminoacil tRNA sintetatas de bacterias Gram (+), localizada río arriba del terminador y (3) una estructura secundaria que presenta un codón para tirosina único en esta región. Estos elementos están presentes en la región líder del mRNA de genes de aminoacil tRNA sintetatas de bacterias Gram (+) y se ha observado que participan en la regulación de la expresión de estos genes en respuesta a la disponibilidad del aminoácido correspondiente, mediante un mecanismo de terminación/antiterminación de la transcripción. Considerando estos antecedentes es posible suponer que la regulación de la expresión del gen *tyrZ*, dependiente del nivel de tirosina interno, se produce por un mecanismo de terminación/antiterminación de la transcripción, similar al descrito en bacterias Gram (+).

SUMMARY

In bacteria aminoacyl tRNA synthetase expression is regulated in relation to growth rate and on the cognate amino acid level. In *E. coli* the expression of each synthetase gene is regulated independently and a variety of regulation mechanisms exist. In contrast, in Gram (+) bacilli one regulation termination/antitermination mechanism has been described, which is common for the majority of the aminoacyl tRNA synthetase genes, but that provides a specific response to starvation for each amino acid.

This laboratory has been studying the study of control mechanisms of gene expression of products taking part in the protein biosynthesis in the chemolithotrophic bacterium *T. ferrooxidans*. In previous work this group has cloned and sequenced the *tyrZ* gene from this bacterium, which encodes for a tyrosyl-tRNA synthetase similar to the *tyrZ* gene product from *B. subtilis*. In order to analyze the possibility that the structural similarity between the products of the *tyrZ* genes from *B. subtilis* and *T. ferrooxidans* extends to the mechanism of regulation of their expression, we undertook the study of the mechanism that regulates the expression of *tyrZ* gene from *T. ferrooxidans*.

Using complementation experiments of a thermosensitive mutation of the *tyrS* gene from *E. coli* it was possible to confirm that *tyrZ* encodes for a functional tyrosyl tRNA synthetase. This gene is present in one copy per chromosome in *T. ferrooxidans*. *In vivo* transcription of *tyrZ* was shown by means of PCR amplification of *T. ferrooxidans* cDNA. Primer extension experiments of a primer complementary to the 5' noncoding region of *tyrZ* suggest that the leader mRNA is about 350 bp.

The *tyrZ* gene is located upstream the *rrnT2* rRNA operon and is approximately 100 bp from the 16S rRNA gene, the first gene of the operon. In view of the fact that no rho independent transcription terminator was found between both genes, the possibility of

cotranscription has been studied. The rRNA operon is transcribed from two promoters: one of them is near the 16S rRNA, and the other one seems to be in an internal region of *tyrZ*. We failed to detect a mRNA that comprises both genes. One possibility for this result is the instability of an hypothetical RNA precursor.

To study the effect of the tyrosine level on *tyrZ* expression, the tyrosyl tRNA synthetase activity was studied under an artificial starvation condition induced by the enzyme inhibitor tyrosine hydroxamate. The specific activity of the enzyme from bacteria treated with this chemical increased 6 to 7 times when compared with cells grown at high tyrosine concentration. It is possible that this increase in activity is produced by an increase in the rate of synthesis of the enzyme induced by the lack of tyrosine. Induction of the synthesis may be the result of the control of the mRNA translation or of the transcription, at the level of the initiation or of mRNA elongation. Additional experiments are required in order to check the origin of the regulation of the specific activity of the TyrRZ in tyrosine starvation.

In the leader region of the *tyrZ* mRNA we have identified the following structural elements: (1) a rho independent transcription terminator, (2) a 12 nucleotides sequence similar to the T box of the aminoacyl tRNA synthetase genes of Gram (+) microorganisms, found upstream of the terminator and (3) a secondary structure that includes a codon for tyrosine, unique in this region. These are conserved elements present in the leader mRNA of Gram (+) aminoacyl tRNA synthetase genes, and have been related with the operation of an expression control mechanism by termination/antitermination of transcription, and depend on the level of the cognate amino acid in the cell. Considering these facts, it is postulated that the regulation of *T. ferrooxidans tyrZ* gene expression is a consequence of the presence of a control mechanism involving termination/ antitermination of the transcription similar to the one found in Gram (+) bacteria.

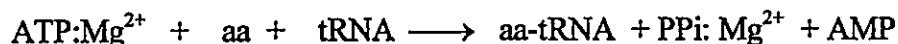
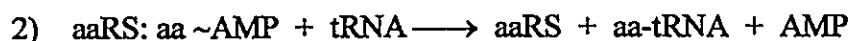
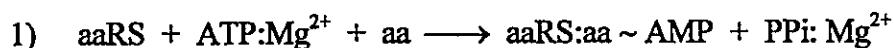
INTRODUCCION

I.- AMINOACIL tRNA SINTETASAS DE BACTERIAS.

1. - Función de las aminoacil tRNA sintetetasas.

La traducción del mensaje genético en proteínas implica la correspondencia perfecta entre cada uno de los 64 codones que se pueden encontrar en un mRNA y su aminoácido correspondiente. En este proceso, el tRNA es el encargado de proveer el aminoácido, para que éste sea luego incorporado al polipéptido naciente. La especificidad de este aminoacil tRNA está determinada por el reconocimiento del codón en el mRNA por el anticodón del tRNA. El apareamiento del codón al anticodón del tRNA ocurre en forma independiente de la naturaleza del aminoácido que esté unido a él, por lo tanto, la aminoacilación del tRNA con un aminoácido inadecuado necesariamente acarrea la incorporación de un aminoácido erróneo en la proteína. En consecuencia, la especificidad con que se lleva a cabo la etapa de síntesis del aminoacil tRNA, catalizada por las aminoacil tRNA sintetetasas (aaRS), es de importancia fundamental y recae sobre estas enzimas la responsabilidad de asegurar la fidelidad del proceso de traducción.

La reacción de aminoacilación del tRNA es un proceso que ocurre en dos etapas:



2.- Número de genes para cada aaRS.

En *E. coli* existe una aaRS por cada uno de los 20 aminoácidos conocidos, con la excepción de lisil tRNA sintetasa, ya que dos genes codifican para esta enzima: *lysS* y *lysU*. Las dos especies de LysRS tienen 505 residuos de aminoácido y presentan un 88 % de identidad (Levêque y cols. 1990). La razón de la existencia de dos LysRS es desconocida, aunque se sabe que la expresión de *lysU* se induce por aumentos de temperatura, por anaerobiosis y por adición de leucina al medio de cultivo (Clark y Neidhardt, 1990).

En el bacilo Gram (+) *Bacillus subtilis* se han descrito dos genes distintos que codifican para treonil tRNA sintetetas (*thrS/thrZ*), y dos genes para tirosil tRNA sintetasa (*tyrS/tyrZ*) (Glaser y cols., 1991; Henkin y cols., 1992; Putzer y cols., 1990). En el caso de treonil tRNA sintetetas, ambos productos génicos comparten solamente el 51,5 % de los residuos idénticos, lo que las hace tan distintas entre sí como de la treonil tRNA sintetasa de *E. coli*. La divergencia de secuencia es aún mayor entre las dos tirosil tRNA sintetetas (27 % de residuos idénticos), siendo TyrRS un 55 % y TyrRZ un 27,7 % idénticas a la enzima correspondiente de *E. coli* (Glaser y cols., 1991, Henkin y cols., 1992). En cada caso, ambos genes exhiben patrones de expresión diferentes: en

condiciones de crecimiento vegetativo se expresan *thrS* y *tyrS*, permaneciendo *thrZ* y *tyrZ* inactivos (Putzer y cols., 1992).

3.- Clasificación de las aminoacil tRNA sintetetasas.

El número creciente de secuencias de aminoacil tRNA sintetetasas ha facilitado su comparación y el descubrimiento de elementos comunes que permiten la clasificación de estas enzimas en dos clases (resumido en Miennel y cols., 1995). Las enzimas reunidas en la clase I tienen en común la presencia de dos secuencias de consenso cortas, que corresponden a los aminoácidos HIGH (en la región amino terminal de la proteína) y KMSKS (localizada en la región media de la proteína). La importancia de los residuos que forman parte de estas secuencias de consenso se ha estudiado mediante mutagénesis, principalmente en MetRS y TyrRS, encontrándose que cumplen funciones fundamentales en la activación de los aminoácidos respectivos (Fersht y cols., 1988; Leatherbarrow y Fersht, 1987; Leatherbarrow y cols., 1985; Mechulam y cols., 1991; Schmitt y cols., 1995).

Las aminoacil tRNA sintetetasas de clase II no poseen las secuencias HIGH y KMSKS, pero se ha observado en estas enzimas la presencia de segmentos homólogos diferentes a los que existen en las sintetetasas de clase I. Ellos han sido llamados "segmento 1" (en la región amino terminal de la proteína), "segmento 2" (en la región central), "segmento 3" (en la región carboxilo terminal). Cada segmento contiene un núcleo central conservado con al menos un residuo de aminoácido que no varía (Eriani y cols.,

1990). Se observó que las sintetetasas de clase I corresponden a enzimas que aminoacilan preferencialmente el grupo 2'-OH de la adenosina terminal del tRNA, mientras que las de clase II pueden aminoacilar principalmente el grupo 3'-OH, lo que sugiere un ancestro común para las enzimas que pertenecen a la misma clase (Eriani y cols., 1990). En la tabla 1 se muestra un listado de las aminoacil tRNA sintetetasas de *E. coli* ordenadas según esta clasificación.

La comparación de la estructura tridimensional de algunas aaRS obtenida por cristalografía de rayos X ha permitido observar similitudes estructurales que refuerzan la clasificación anterior. Por ejemplo, el análisis de la estructura cristalina del complejo formado por la MetRS de *E. coli* y ATP, había demostrado con anterioridad que esta enzima presentaba un sitio de unión al nucleótido, con una estructura denominada "bolsillo de Rossman" (Rossman y cols., 1974), similar a la observada en deshidrogenasas (Risler y cols., 1981), presente también en la TyrRS de *B. stearothermophilus* (Bhat y cols., 1982) y en la GlnRS de *E. coli* (Rould y cols., 1989). En los modelos de la estructura de TyrRS y de MetRS, los dos residuos de histidina de la secuencia HIGH están ubicados en posiciones relativas similares, y ambos se encuentran cercanos al sitio activo (Blow y cols., 1983). En las tres aaRS mencionadas los aminoácidos de la secuencia KMSKS se localizan en la vecindad del bolsillo de Rossman.

Por otro lado, al analizar la estructura de SerRS, una sintetetasa del grupo II, no se observó la presencia del bolsillo de Rossman, sino que en el sitio activo se observó la existencia de una estructura de hoja β antiparalela, de siete hebras (Cusack y cols., 1990).

Tabla 1

Aminoácido	Estructura cuaternaria *	Número de residuos por monómero	Sitio de activación preferencial	Secuencias señal		
				HIGH	KMSKS	
Clase I						
Cys	α	461	-	+	+	
Met	α_2	676	2', 3'	+	+	
Val	α	951	2'	+	+	
Ile	α	939	2', 3'	+	+	
Leu	α	860	2'	+	+	
Arg	α	577	2', 3'	+	+	
Glu	α	471	2'	+	+	
Gln	α	551	2'	+	+	
Tyr	α_2	424	2'	+	+	
Trp	α_2	325	2', 3'	+	+	
Clase II				Segmento 1	Segmento 2	Segmento 3
Ala	α_4	875	3'		+	+
Gly	$\alpha_2\beta_2$	303/689	3'			+
Ser	α_2	430	2', 3'	+	+	+
Thr	α_2	642	3'	+	+	+
Pro	α_2	572	2', 3'	+	+	+
His	α_2	424	3'	+	+	+
ASp	α_2	590	3'	+	+	+
ASn	α_2	467	3'	+	+	+
Lys	α_2	505	3'	+	+	+
Phe	$\alpha_2\beta_2$	327	2'		+	+

Características de aminoacil tRNA sintetasa de bacterias. * α o β corresponde a la nomenclatura utilizada para indicar la diferencia estructural entre los monómeros que forman cada aminoacil tRNA sintetasa.

Otra aaRS del grupo II, AspRS contiene una hoja β antiparalela rodeada de α -hélices, formando una estructura que es topológicamente similar a la del sitio activo de SerRS (Ruff y cols., 1988). En ambos casos los segmentos 1, 2 y 3 se localizan en estas estructuras de hoja β (Leberman y cols., 1991; Moras, 1992). De estos estudios se puede deducir que la clasificación de aminoacil tRNA sintetasas en enzimas de clase I y II se correlaciona con las similitudes en la estructura tridimensional de estas enzimas. La dilucidación de la estructura cristalina de otras aminoacil tRNA sintetasas permitirá conocer si éste es un fenómeno más general o sólo una coincidencia.

Además de la capacidad de discriminación exhibida por cada una de las aminoacil tRNA sintetasas a través de su mecanismo de acción, la concentración relativa de tRNAs y de aminoacil tRNA sintetasas también puede contribuir a la especificidad de la reacción de aminoacilación *in vivo*. En consecuencia, el problema de la fidelidad en la incorporación del aminoácido adecuado está también relacionado con la regulación de la expresión y de los niveles de aaRS en una célula. Este hecho se ilustra bien por experimentos que indican que la naturaleza del aminoácido incorporado en una proteína en una posición determinada puede cambiarse variando la concentración de la aaRS correspondiente o la concentración de un tRNA que sea capaz de competir con el tRNA correspondiente. Por ejemplo, el tRNA supresor ámbar derivado del tRNA^{Tyr} de *E. coli*, que normalmente es aminoacilado con tirosina *in vivo*, se esterifica con glutamina cuando se eleva la concentración intracelular de GlnRS; este efecto se revierte por la sobreexpresión simultánea de TyrRS o de tRNA^{Gln} (Sherman y cols, 1992; Swanson y

cols., 1988). En efecto, el estudio de la regulación de la expresión de varias aaRS (Putzer y cols., 1995) y de tRNAs de *E. coli* (Jinks-Robertson y Nomura, 1987), muestra que las concentraciones intracelulares de estas macromoléculas están sometidas a rigurosos controles. Estos mecanismos regulatorios son útiles en la adaptación de los niveles intracelulares de cada tRNA aminoacilado a las condiciones de proliferación. Estos controles probablemente contribuyen a la especificidad total del proceso de aminoacilación del tRNA *in vivo*.

4.- Regulación de la expresión de aaRS en bacterias.

En bacterias los niveles de aaRS se regulan de acuerdo a la concentración intracelular de aminoácidos y a la velocidad de proliferación (Putzer y cols., 1995) En ambos casos la regulación de las sintetasas se produce en un contexto general de regulación de la síntesis de varios componentes celulares, principalmente de los que constituyen la maquinaria biosintética de proteínas.

4.1.- Control dependiente de la velocidad de crecimiento.

La composición macromolecular de la célula bacteriana está estrechamente relacionada con su actividad metabólica. Cuando la velocidad de proliferación aumenta las células incrementan su tamaño, contienen más DNA, RNA y proteínas (Bremer y Dennis, 1987) . El incremento relativo de RNA es mucho mayor que el de proteínas, que a su vez es mayor que el de DNA. A 2, 5 duplicaciones por hora, una célula de *E. coli*

contiene diez veces más RNA total que a 0,6 duplicaciones por hora (Bremer y Dennis, 1987). A mayor velocidad de crecimiento, mayor es la proporción de RNA estable (rRNA y tRNA) en el RNA total. Responsable del aumento de la velocidad de síntesis de los componentes celulares es la maquinaria traduccional, cuyos principales componentes, los ribosomas, varían desde 7.000 por célula a baja velocidad de crecimiento hasta 70.000 a velocidades de crecimiento altas. En estas condiciones, los ribosomas pueden llegar a constituir hasta el 45 % de la masa celular, invirtiéndose gran cantidad de la energía celular en su síntesis.

Al aumento de la síntesis de RNA y proteínas con el aumento de la velocidad de crecimiento se denomina control dependiente de la velocidad de proliferación o regulación metabólica. Los mecanismos responsables del aumento de la síntesis de los ribosomas (rRNA y proteínas ribosomales) y de otros factores que participan en el proceso de traducción, con la velocidad de proliferación bacteriana se han investigado extensamente (Jinks-Robertson y Nomura, 1987, Grunberg-Manago, 1987, Putzer y cols. 1995).

4.1.1.- rRNA. Aunque se han propuestos muchos modelos para explicar este fenómeno, básicamente éstos pueden ser divididos en dos grupos: modelos asociados a guanosina 3'-difosfato 5'-difosfato (ppGpp) (Ryals y cols., 1982; Baracchini y Bremer, 1988; Baracchini y Bremer, 1991; Jensen y Pedersen, 1990), y modelos de regulación por retroalimentación negativa por ribosomas (Jinks-Robertson y cols., 1983). Basados en el

hecho que existe una correlación lineal inversa entre los niveles de ppGpp y la velocidad de crecimiento, el modelo del ppGpp propone que la concentración intracelular de este nucleótido regula directamente la síntesis de rRNA, al unirse a la RNA polimerasa, inactivándola y restringiendo el número de moléculas de RNA polimerasa disponibles para iniciar la transcripción en promotores de RNA estables (rRNA y tRNA). Por otro lado, el modelo de regulación por retroalimentación negativa por ribosomas propone que la velocidad de síntesis de rRNA es gobernada por un mecanismo de retroalimentación sensible a la capacidad traduccional de la célula. En este modelo, los ribosomas libres que no están involucrados en el proceso de traducción, participarían como efectores directos o indirectos, para reprimir la transcripción de los operones de rRNA. De esta manera se lograría que los niveles de rRNA (y por lo tanto de ribosomas) sintetizados por la célula correspondan a las necesidades metabólicas reales determinados por la velocidad de crecimiento. Estos modelos no necesariamente son mutuamente exclusivos y es posible que ambos coexistan, siendo incluso complementarios.

4.1.2.-Proteínas ribosomales. La expresión de la mayor parte de las proteínas ribosomales se regula por un mecanismo de retroalimentación negativa a nivel de la traducción (revisado por Jinks-Robertson y Nomura, 1987) Los genes de estas proteínas están organizados en operones; una proteína ribosomal específica codificada por el operón actúa como un represor de la expresión, ya que posee la capacidad de unirse a su propio mRNA policistrónico e inhibir la traducción (Cole y Nomura, 1986, Lindahl y

Zengel, 1986). Bajo condiciones en que existe exceso de rRNA, la proteína control se unirá preferentemente a su sitio en el rRNA y se ensamblará en el ribosoma, mientras que en condiciones en que la concentración del rRNA es limitante, el ligando preferencial no se encontrará disponible y la proteína ribosomal represora se unirá a su mRNA, lo que disminuirá la traducción de las proteínas codificadas en el operón. Mediante este mecanismo, los cambios producidos en la velocidad de síntesis del rRNA provocarán cambios concomitantes en la velocidad de síntesis de las proteínas ribosomales cuya expresión se regule por este sistema. La consecuencia de este mecanismo es que el rRNA se convierte en el verdadero efector de la regulación de la expresión de estas proteínas ribosomales por velocidad de crecimiento. Este modelo es válido para los operones L11, L10, S10, α y S20 (Jinks-Robertson y Nomura, 1987), pero no es suficiente en algunos casos (Lindahl y Zengel, 1990), por lo que se supone la existencia de mecanismos adicionales para la regulación de la síntesis de proteínas ribosomales.

4.1.3.- tRNA. La síntesis de tRNA también es un proceso sometido al control por velocidad de crecimiento. El número de moléculas de tRNA por célula aumenta desde 63.000 a 700.000 cuando los tiempos de duplicación varían desde 100 a 24 min, manteniéndose constante la relación de concentración entre rRNA y tRNA (Bremer y Dennis, 1987). Los genes de tRNA están sometidos a regulación por retroalimentación, al igual que la de los operones de rRNA (Gourse y cols., 1985, Jinks-Robertson y cols., 1983).

4.1.4.- Aminoacil tRNA sintetasas. Como otros componentes del aparato traduccional, los requerimientos de las aminoacil tRNA sintetasas por parte de la célula bacteriana varían dependiendo de las condiciones de proliferación. Es así como el control dependiente de la velocidad de proliferación afecta a la mayor parte de las aminoacil tRNA sintetasas estudiadas hasta la fecha. Mediante un análisis sistemático de la expresión de las aaRS en células de *E. coli* cultivadas en diferentes condiciones por la metódica de geles bidimensionales de O'Farrel se determinó que la concentración celular de casi todas las sintetasas aumenta con la velocidad de proliferación (Putzer y cols., 1995). La magnitud del aumento en el nivel de cada enzima varía entre 1,5 y 3 veces para un aumento de cinco veces en la velocidad de crecimiento.

4.2.- Control dependiente de la concentración de aminoácidos.

Además del control por velocidad de proliferación, en bacterias la expresión de las aminoacil tRNA sintetasas se regula de acuerdo a la disponibilidad de los aminoácidos específicos para cada enzima (Putzer y cols., 1995). La gran mayoría de las aaRS se sintetizan más rápidamente en células cultivadas en condiciones de carencia de su aminoácido respectivo (Nass y Neidhardt, 1967, Grunberg-Manago, 1987). Es posible suponer que al aumentar la concentración de la sintetasa existiría una utilización más eficiente del aminoácido residual, de manera que la célula pueda sobrevivir hasta recuperar los niveles apropiados del aminoácido mediante inducción de la vía biosintética correspondiente. Es posible que por esta razón el efecto de aumento de la expresión sea

más evidente en bacterias mutantes auxotróficas, o en presencia de análogos de aminoácidos (McGinnis y Williams, 1971, Nass y Neidhardt, 1967). La respuesta es específica, ya que la expresión se induce sólo por el aminoácido correspondiente, y no por carencia generalizada de aminoácidos. La inducción de la expresión generalmente es transitoria, en una magnitud que varía dependiendo de la especie bacteriana. En *E. coli* la inducción es de dos a cuatro veces, mientras en *B. subtilis* es de diez veces. En todos los casos estudiados la adición del aminoácido al medio de cultivo elimina la inducción. Los resultados de los estudios fisiológicos y genéticos realizados sobre la regulación de las sintetetasas, con frecuencia son difíciles de interpretar, pero al parecer en muchos casos la inducción se produce por desrepresión de la síntesis a nivel transcripcional o traduccional. En algunos casos se ha logrado identificar los elementos en el DNA o RNA que son importantes para el control, los factores involucrados en la regulación y los detalles moleculares del mecanismo de regulación.

5.- Mecanismos de regulación de la expresión de aminoacil tRNA sintetetasas de *E. coli*.

En *E. coli* se han clonado y secuenciado todos los genes de aaRS. En muchos casos se ha localizado el punto de inicio de la transcripción y la región donde se localizan las señales regulatorias de la expresión del gen. Todos los genes de aaRS tienen promotores acoplados al factor σ^{70} , incluso *lysU*, que se induce por shock térmico. Todos los promotores de genes de aaRS se analizaron por un algoritmo que clasifica a los

promotores bacterianos como fuertes o débiles, dependiendo de la distancia que separa a las regiones de consenso -10 y -35. Según este ordenamiento, los promotores de genes de sintetasas se consideran débiles. Esta afirmación es concordante con la observación de que los promotores de los genes de aminoacil tRNA sintetasas se alejan del consenso descrito para promotores bacterianos (Putzer y cols., 1995).

A pesar de la similitud de la función de las aaRS, en *E. coli* los mecanismos por los que se regula su expresión parecen ser diferentes en cada caso. Mediante la combinación de experimentos de tipo fisiológico, del análisis genético realizado en cepas mutantes, y de ensayos *in vitro*, se ha logrado identificar las secuencias reguladoras y los factores que participan en la regulación. Sin embargo, para la mayor parte de las aaRS estudiadas se conoce parcialmente el mecanismo de regulación de la expresión.

En el caso de la valil tRNA sintetasa de *E. coli*, la regulación por velocidad de proliferación al parecer ocurre a nivel transcripcional. Se observó que la síntesis de la enzima no aumentaba en bacterias traspasadas desde un medio que contenía acetato como fuente de carbono a otro con glucosa si se incluía rifampicina en el medio. Esto sugiere que el aumento de la síntesis de valRS por aumento de la velocidad de crecimiento requiere eventos de iniciación de la transcripción (Reeh y cols., 1977). Por otro lado, para estudiar la expresión de triptofanil tRNA sintetasa de *E. coli* se utilizó una fusión del gen *lacZ* a la región 5' de gen *trpS*, que incluía al promotor y el inicio de la región codificante del gen, integrada en el cromosoma (Hall y Yanofsky, 1982). La expresión de β -galactosidasa en la cepa cultivada en distintos medios varió con la

velocidad de proliferación, en forma paralela al aumento del mRNA de *trpS*. Resultados similares se obtuvieron al estudiar la expresión de glutaminil tRNA sintetasa (*glnRS*) de *E. coli*, bajo una variedad de condiciones de proliferación: en estos experimentos se cuantificó el mRNA de *glnS* de una cepa silvestre de *E. coli*, encontrándose que el nivel del mRNA aumentaba con el incremento de la velocidad de proliferación (Cheung y cols., 1985). En estos dos últimos casos los autores propusieron un mecanismo transcripcional para la regulación de la expresión de *trpS* y de *glnS*. Sin embargo, cambios en el nivel de mRNA en estado estacionario no son una prueba de un control transcripcional, ya que pueden deberse a alteraciones en la síntesis o en la estabilidad del mRNA.

El caso de alanil tRNA sintetasa fué el primero para el que se demostró un mecanismo molecular para la regulación de su expresión. En ensayos *in vitro* se observó que la alanil tRNA sintetasa es capaz de inhibir específicamente la transcripción de su propio gen, *alaS*, efecto que aumenta en presencia de alanina. La enzima se une a la región promotora de *alaS*, protegiendo frente a la digestión con DNasaI, una región del DNA que contiene dos secuencias repetidas invertidas (Putney y Schimmel, 1981). Lamentablemente hasta ahora no ha sido posible detectar un aumento de la expresión en *E. coli* cultivadas en carencia de alanina, por lo tanto, no se ha confirmado en experimentos *in vivo* el modelo de autorregulación transcripcional establecido *in vitro* para la regulación de la expresión de *alaS*.

Varias líneas de experimentos demuestran que la expresión de metionil RNA sintetasa se regula por la disponibilidad de metionina en *E. coli* y en *S. typhimurium* (Archibold y Williams, 1972; Archibold y Williams, 1973; Casio, 1975). El gen *metG* se expresa desde dos promotores, uno de ellos ubicado entre 30 y 40 nucleótidos río arriba del inicio de *metG*, y el otro dentro de la región codificante de *mrp*, el gen que precede a *metG* (Dardel y cols., 1990). Experimentos de protección a nucleasa S1 demuestran que la transcripción iniciada en este último promotor es atenuada en un terminador de la transcripción independiente de rho, localizado aproximadamente 220 nucleótidos río abajo del promotor. Entre el promotor y el terminador, la región líder presenta una secuencia que podría formar una estructura secundaria similar a la del tRNA. Basándose en estos antecedentes se propuso un modelo de control por autorregulación, en que un exceso de metionil tRNA sintetasa podría unirse al líder del mRNA y de alguna manera afectar la terminación de la transcripción en el terminador (Dardel y cols., 1990). Sin embargo, se requiere más experimentación para evaluar el modelo de autorregulación propuesto para la expresión de *metG*.

El mecanismo de regulación de la expresión del gen de la treonil tRNA sintetasa (*thrS*) de *E. coli* es uno de los mejor descritos hasta ahora. Inicialmente se demostró que al cultivar mutantes de *E. coli* auxotróficos para la síntesis de treonina en condiciones de limitación de este aminoácido, se producía un aumento transitorio en la actividad treonil tRNA sintetasa (Archibold y Williams, 1972). Posteriormente, una serie de experimentos realizados tanto *in vitro* como *in vivo*, demostraron que la expresión de la treonil tRNA

sintetasa se regulaba a nivel de la traducción, mediante un mecanismo de regulación autógeno (Lestienne y cols., 1984; Springer y cols., 1985). Mediante experimentos genéticos fué posible definir el sitio blanco de la regulación, que se denominó "operador traduccional". Este se localizó río abajo del sitio de inicio de la transcripción, pero río arriba del codón de inicio de la traducción del gen de *thrS* (Springer y cols., 1986). La participación directa de la treonil tRNA sintetasa en la autorregulación negativa se demostró mediante experimentos de protección a RNasa (Moine y cols, 1990); el sitio de unión de la sintetasa al mRNA corresponde a una región de la secuencia capaz de formar una estructura secundaria similar al brazo que contiene el anticodón en varios isoaceptores de tRNA^{Thr}. Previamente este sitio del mRNA había sido identificado como un elemento de la regulación de la expresión de *thrS* (Springer y cols., 1986). La unión de ThrRS al mRNA en el sitio operador inhibía su propia traducción al ocluir la unión del ribosoma al sitio de inicio de la traducción. Así mismo, se observó que el tRNA^{Thr} era capaz de desplazar al mRNA operador de su sitio de unión en la sintetasa, y de suprimir el efecto represor de la enzima, comportándose por lo tanto como un antirrepresor. Esto sugirió a los autores que *in vivo* la concentración intracelular de tRNA^{Thr} libre podría modular la actividad represora de la treonil tRNA sintetasa, y por lo tanto la expresión del gen *thrS*.

Estudios recientes demostraron que el control por retroalimentación negativa a nivel traduccional es esencial para la regulación por velocidad de proliferación de la expresión del gen *thrS*. Bacterias silvestres y mutantes que contenían alteraciones en la

secuencia de la región operadora de la copia cromosomal del gen *thrS* se cultivaron a diferentes velocidades de proliferación, observándose que las mutantes no eran capaces de controlar la expresión de ThrRS (Putzer y cols, 1995). Una explicación de los autores para estos resultados es que a una velocidad de proliferación alta, condición en que aumentan los niveles de tRNA^{Thr}, la mayor parte de la sintetasa está participando en la aminoacilación, lo que significa que poca sintetasa está libre para unirse a su mRNA; por lo tanto, la expresión de *thrS* se desreprime. En resumen, la regulación dependiente de la velocidad de crecimiento en el caso de ThrRS puede ser causada por cambios en la concentración celular de tRNA^{Thr}, de la misma manera que la velocidad de síntesis de rRNA modula la expresión de los operones que codifican para las proteínas ribosomales.

Otro sistema de *E. coli* que se conoce con bastante detalle es el de fenilalanil tRNA sintetasa. Esta enzima es un tetrámero compuesto por dos tipos de subunidades, codificadas por los genes *pheS* y *pheT*, que corresponden a la subunidades pequeña y grande, respectivamente (Fayat y cols., 1974). Ambos genes son contiguos en el genoma de *E. coli* y se encuentran formando un operón. Estudios fisiológicos demostraron que la expresión de fenilalanil tRNA sintetasa se induce alrededor de 2,5 veces en un mutante auxotrófico para fenilalanina cultivado en carencia del aminoácido (Nass y Neidhardt, 1967). La regulación del operón *pheST* se ha estudiado con detalle *in vitro* y también *in vivo*. Mediante secuenciación y ensayos de transcripción *in vitro* se identificó el promotor de la transcripción, que se encuentra localizado aproximadamente 400 pb. río arriba de *pheS*. Entre el promotor y el inicio del gen *pheS* existe un marco de lectura potencial que

codifica para un péptido de 14 residuos de aminoácido, con cinco residuos de fenilalanina, tres de las cuales son contiguos (Fayat y cols., 1983). Esta región del mRNA tiene el potencial para plegarse en varias estructuras secundarias alternativas, una de las cuales es similar a la adoptada por terminadores de la transcripción independientes del factor rho. Alternativamente, la formación de otra estructura podría impedir la formación del terminador (Landick y Yanofsky, 1987). Estos rasgos son característicos del modelo de atenuación de la transcripción que regula la expresión de algunos operones cuyos productos están involucrados en la biosíntesis de aminoácidos en *E. coli*. El modelo, inicialmente propuesto por Lee y Yanofsky (1977) para el operón *trp* de *E. coli*, establece que la velocidad de traducción de un pequeño péptido codificado en la región líder del mRNA, que depende de la disponibilidad de tripofanil tRNA^{Trp}, determina cuál de las dos posibles estructuras se formará en el mRNA. En el caso del operón *pheST*, la factibilidad de este mecanismo ha sido probada mediante experimentos *in vivo* (Springer y cols., 1983). La expresión del operón *pheST* aumenta si la concentración intracelular de tRNA^{Phe} aminoacilado disminuye, o si las propiedades traduccionales de este tRNA se alteran, probablemente debido a que la traducción del péptido líder se vuelve más lenta. Se postula que la traducción lenta favorecería la formación de la estructura antiterminadora e inhibiría la terminación de la transcripción en el terminador. La participación de las estructuras del atenuador presentes en la región líder del mRNA de *pheST* se demostraron mediante un análisis mutacional detallado de la región líder (Springer y cols., 1985; Mayaux y cols., 1985).

6.- Regulación de la expresión de aminoacil tRNA sintetetas de bacterias Gram (+).

Se han clonado y secuenciado los genes de las aminoacil tRNA sintetetas para 11 aminoácidos de distintas especies de *Bacillus* (ref. en Putzer y cols., 1995), principalmente de *Bacillus subtilis* y de *B. stearothermophilus*, encontrándose que son estructuralmente similares a las de *E. coli* y otras bacterias Gram (-). En la mayor parte de ellas las secuencias de aminoácidos son esencialmente conservadas; sin embargo, aún en aquellos casos en que el grado de similitud de secuencia es bajo, los rasgos de la estructura terciaria que son fundamentales para la función de la enzima son muy similares. Es así como muchas sintetetas de *Bacillus spp* son capaces de complementar mutaciones en aaRS de *E. coli*. No hay diferencias significativas de tamaño entre las sintetetas de ambas especies, e incluso la estructura cuaternaria de las enzimas que aminoacilan el mismo tRNA es muy conservada. Sin embargo, los genes de las aminoacil tRNA sintetetas de *Bacillus* presentan algunos aspectos diferentes de los homólogos de bacterias Gram (-). Como se mencionó anteriormente, en *E. coli* las sintetetas son codificadas por genes únicos, con la única excepción de lisil tRNA sintetasa que es codificada por dos genes muy similares entre sí (85 % de similitud). En cambio, en *B. subtilis* se han descrito dos ejemplos de aaRS que son codificadas cada una por dos genes distintos: treonil tRNA sintetasa es codificada por los genes *thrS* y *thrZ* (Putzer y cols., 1990), y tirosil tRNA sintetasa por los genes *tyrS* y *tyrZ* (Glaser y cols., 1991; Henkin y cols., 1992). En ambos casos, los dos genes se expresan diferencialmente. *thrS* y *tyrS* se

expresan normalmente en condiciones de proliferación vegetativa y generan la actividad basal de carga de los tRNA respectivos. En cambio, *thrZ* y *tyrZ* no se expresan en esas condiciones. Ambos genes pueden complementar una mutación termosensible en los genes respectivos en *E. coli* (Glaser y cols., 1991; Putzer y cols., 1990). En *B. subtilis* la inducción de *thrZ* se logra bajo dos condiciones: en carencia de treonina o en casos de inactivación del gen *thrS*. Por lo tanto, la inactivación de este gen no es letal para la célula, ya que puede ser compensada por la expresión de *thrZ*.

Una diferencia fundamental entre las aaRS de *E. coli* y de *B. subtilis* se relaciona con la regulación de la expresión de estas enzimas. En *E. coli*, y también en *S. typhimurium*, existen diversos mecanismos destinados al control de la expresión, encontrándose una estrategia diferente para cada sintetasa. En bacterias Gram (+) por el contrario, la expresión de la mayor parte de los genes de sintetasas descritos aparentemente se regula por un mecanismo de terminación/antiterminación de la transcripción que es común para todas ellas. Este mecanismo se extiende a la regulación de la expresión de algunos operones biosintéticos de aminoácidos (Grandoni y cols., 1992).

6.1.- Regiones regulatorias.

Actualmente se conoce la secuencia de 21 genes de aminoacil tRNA sintetasas de diferentes especies de bacterias Gram (+). Estudios recientes relacionados con la expresión de genes de aaRS y de genes de proteínas que participan en la biosíntesis de

aminoácidos han permitido conocer la existencia de elementos regulatorios conservados, localizados en la región líder del mRNA (Grundy y Henkin, 1994; Putzer y cols., 1995). Estos elementos regulatorios consisten en un terminador de la transcripción independiente del factor rho, precedida de una secuencia conservada de aproximadamente 18 nucleótidos, denominada "caja T". En la figura 1 se muestra una comparación de la secuencia de la región líder de los mRNA de varios genes de sintetasa y de algunos operones de la biosíntesis de aminoácidos de bacterias Gram (+).

Otro de los elementos característicos de la región líder de los mRNAs de sintetasa de bacterias Gram (+) es la estructura secundaria que se ha predicho se formaría entre el sitio de inicio de la transcripción y el terminador. Esta estructura, muy conservada a pesar del grado de divergencia en la secuencia (Grundy y Henkin, 1993), está formada esencialmente por tres horquillas (I, II, III en la Fig 2), en una de las cuales se observa un codón para un aminoácido que corresponde a la sintetasa codificada por el gen. En el caso de *tyrS* se ha demostrado que este triplete es fundamental para especificar el aminoácido apropiado por el cuál se induce la regulación, por lo que se ha llamado "secuencia especificadora" (Grundy y Henkin, 1993).

En prácticamente todas las secuencias de *Bacillus* hay tres residuos de citosina localizadas en el terminador que pueden aparearse con tres guanosinas de la caja T. En el único caso en que la secuencia de la caja T es diferente, en la secuencia del terminador se observa el cambio necesario para conservar la complementariedad de bases (Putzer y cols., 1995).

5' desde el promotor

3'

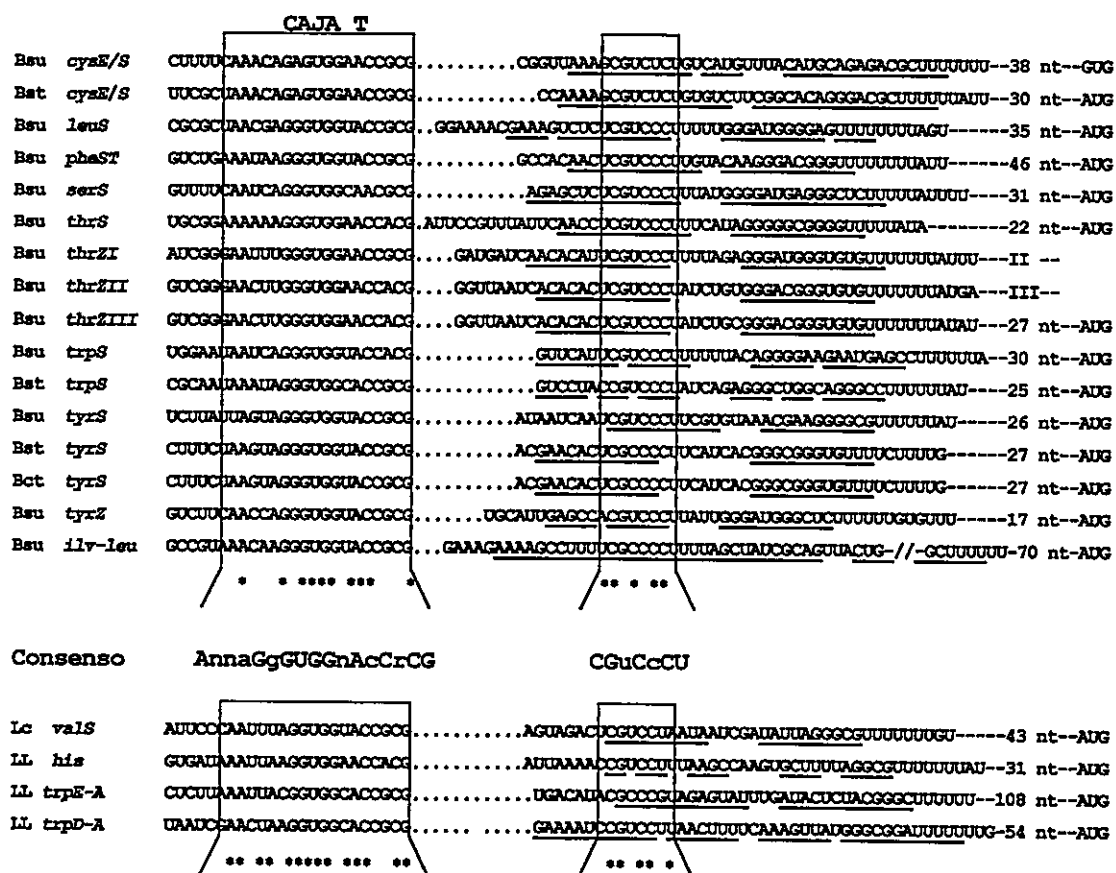


Fig. 1.- Secuencias regulatorias conservadas de la región 5' no codificante de genes de aminoacil tRNA sintetetas y de enzimas de la biosíntesis de aminoácidos de bacterias del género *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Lactococcus*. Las secuencias que se muestran están localizadas a distancias variables río arriba del codón de iniciación. Para un operón, se muestra el codón de iniciación del primer gen, señalado a la derecha de la figura. Las secuencias repetidas invertidas similares a un terminador de la transcripción están subrayadas con una flecha. La caja T (T box), y la secuencias conservadas del terminador se muestran enmarcadas en un recuadro. Se usa "r" para indicar la presencia de nucleótidos de purina. Con asteriscos se señalan los nucleótidos que se repiten en todas las secuencias mostradas. Bsu, *Bacillus subtilis*; Bst, *Bacillus stearothermophilus*; Bct, *Bacillus caldotenax*; LL, *Lactococcus lactis*; Lc, *Lactobacillus casei*. (Adaptado de Putzer y cols., 1995)

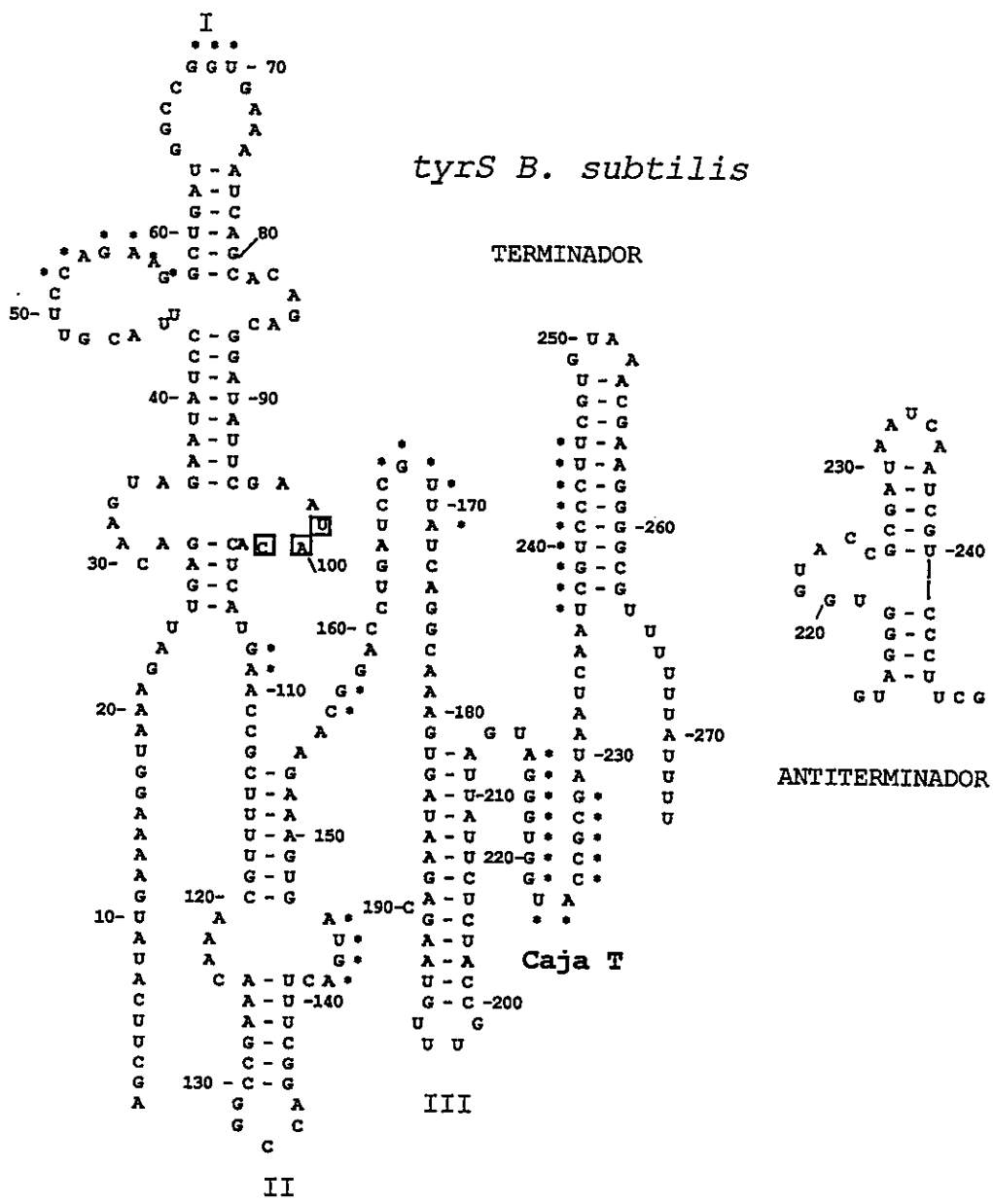


Fig. 2.- Modelo estructural para la región líder del mRNA del gen *tyrS* de *B. subtilis*. Se muestran las estructuras alternativas de terminación y de antiterminación de la transcripción. Los números indican la posición en relación al sitio de inicio de la transcripción. Los números romanos I, II y III indican las horquillas principales de la estructura secundaria. Los nucleótidos del codón de tirosina (secuencia especificadora) se muestran encuadrados. Los nucleótidos de la caja T y de otros regiones conservadas se identifican con asteriscos. (Adaptado de Henkin y cols.,1994).

6. 2.- Mecanismo de regulación.

La expresión de las aaRS no ha sido estudiada en forma tan sistemática en *Bacillus spp* como en *E.coli*. Los casos más estudiados son los de tirosil tRNA sintetasa y treonil tRNA sintetasa de *B. subtilis*. Se sabe que la expresión de ambas sintetetas aumenta en condiciones de carencia de sus aminoácidos respectivos (Dale y Nester, 1971; Putzer y cols., 1992). Para estudiar la expresión del gen *tyrS*, una construcción que contenía la región correspondiente al líder de *tyrS* fusionado al gen *lacZ* se introdujo en el cromosoma de una cepa mutante de *B. subtilis*, auxotrófica para tirosina. Se midió la actividad de β -galactosidasa en estas bacterias cultivadas en exceso o carencia de tirosina. Se observó que la expresión de β -galactosidasa aumentaba en carencia de tirosina, lo que sugirió que la regulación ocurría a nivel transcripcional (Putzer y cols., 1992). Se realizaron experimentos similares para estudiar la regulación de treonil tRNA sintetasa de *B. subtilis*, encontrándose resultados parecidos (Putzer y cols., 1992).

La transcripción del gen *tyrS* comienza en forma constitutiva en un promotor asociado al factor σ^A aproximadamente 300 pb río arriba del sitio del codón de inicio de la traducción (Henkin y cols., 1992). La región líder contiene todos los elementos estructurales que son conservados entre los genes de sintetetas de bacterias Gram (+), al igual que el gen *thrS*. El líder de *thrZ* es mucho más largo (800 bases), y posee tres copias de los elementos regulatorios encontrados en los genes de sintetetas de bacterias Gram (+), lo que probablemente contribuye al bajo nivel de transcripción de este gen (Putzer y cols., 1992). La función que cumplirían los elementos estructurales de la región

líder del mRNA en el mecanismo de regulación de la expresión de los genes de aaRS se analizó sistemáticamente mediante el estudio de hibridación de los mRNA a dichos elementos y por la utilización de construcciones quiméricas, generadas por la fusión de un gen reportero (*lacZ*) a fragmentos mutados del líder del mRNA de genes de aaRS. Para analizar el efecto de las mutaciones del líder en la expresión del gen *lacZ*, estas construcciones se introdujeron en el cromosoma de *B. subtilis* y se midió la actividad de β -galactosidasa. Mediante este tipo de experimentos se observó que al eliminar el terminador de la transcripción presente en el líder del mRNA de *tyrS*, el gen reportero se expresaba en forma constitutiva, con un aumento en la expresión de 7 veces en relación al control sin mutar. Por otro lado, la eliminación de parte de la secuencia de la caja T provocó una disminución drástica de la expresión de la β -galactosidasa, que además no era inducible (Henkin y cols., 1992). El análisis estructural de la región líder de *tyrS* muestra que la caja T y el terminador, debido a complementariedad de bases, pueden formar una estructura secundaria alternativa (Putzer y cols. 1992), impidiendo la formación de la horquilla del terminador. La capacidad de formar estas estructuras alternativas es el elemento sustancial del modelo de terminación/antiterminación de la transcripción de genes de aaRS de bacterias Gram (+).

Un factor importante en la regulación de la expresión de las aaRS de *B. subtilis* parece ser la relación entre la concentración de tRNA específico aminoacilado y no aminoacilado. En el caso de treonil tRNA sintetasa, se demostró que la disminución de la concentración de treonil-tRNA^{Thr}, generada mediante la disminución de la concentración

intracelular de ThrS, induce la expresión de *thrS* y *thrZ* de la misma manera que la carencia de treonina (Putzer y cols., 1992). Por otro lado, se propuso que el tRNA^{Tyr} no aminoacilado reconoce un codón específico en la región líder de *tyrS*, y participa directamente en la inducción de la expresión (Grundy y Henkin, 1993). La presencia de un codón para el aminoácido correspondiente de la sintetasa en la región líder del mRNA en cada uno de los genes de sintetasas de bacterias Gram (+) sugiere que los tRNA específicos participan como efectores de la regulación de la expresión en todos los casos. Para estudiar la función del codón presente en la región líder de *tyrS* y la participación del tRNA en la regulación de la expresión, se utilizaron quimeras entre la región 5' de *tyrS* al gen *lacZ*, en las que el codón original UAC había sido cambiado. Estas construcciones se introdujeron en el cromosoma bacteriano y se midió la actividad β -galactosidasa en las bacterias. El cambio del triplete original UAC a UUC, que codifica para fenilalanina, resultó en la pérdida de la inducción por limitación de tirosina y generó la capacidad de inducir la expresión de *lacZ* por fenilalanina (Grundy y Henkin, 1993). La conversión del triplete a codones sin sentido (UAG y UAA), resultó en un fenotipo no inducible, que fue suprimido por introducción de la quimera en una cepa de *B. subtilis* que contenía un tRNA supresor (originado por una mutación en lis-tRNA), capaz de reconocer estos codones sin sentido. Más aún, en estas condiciones la respuesta regulatoria fue inducida por lisina (Grundy y Henkin, 1993). Estos resultados indicaron que el tRNA no aminoacilado, que se acumula en condiciones de limitación del aminoácido, probablemente interacciona con el líder del mRNA de *tyrS* en forma específica,

favoreciendo y estabilizando la formación de la estructura del antiterminador. Grundy y cols. (1994) postularon que otro punto de contacto entre el tRNA y el mRNA, además de la asociación codón-anticodón, estaría dado por la complementariedad de bases entre el extremo aceptor del tRNA y la secuencia UCCN de la caja T, que en la estructura de antiterminación se encuentra desapareada formando parte de una burbuja. Considerando que esta posición es un importante elemento de identidad en muchos tRNAs (incluyendo el tRNA^{Tyr}) este punto de interacción constituye un segundo sitio del mRNA determinante de la especificidad en la respuesta al tRNA adecuado.

Se ha propuesto que la estabilidad de la estructura de antiterminación probablemente no es suficiente para permitir la transcripción a través del terminador en condiciones de carencia del aminoácido específico (Gendron y cols., 1994). Es posible que se requiera la participación de algún factor que estabilice o favorezca la estructura de antiterminación. Considerando el alto grado de conservación de los elementos regulatorios en la mayoría de los genes de aaRS de *B. subtilis*, es posible suponer que este factor debería ser único e involucrado en la regulación de todos estos genes.

En resumen, todos los resultados experimentales recopilados en el estudio de la expresión de aaRS de *B. subtilis* apuntan a que el control de la expresión de los genes se produce por un mecanismo alternativo de terminación/antiterminación de la transcripción, dependiente de la disponibilidad del aminoácido específico de cada sintetasa. En figura 3 se muestra un esquema del modelo propuesto para este mecanismo de regulación (Henkin y cols., 1993). Cuando las bacterias proliferan en un medio con concentraciones

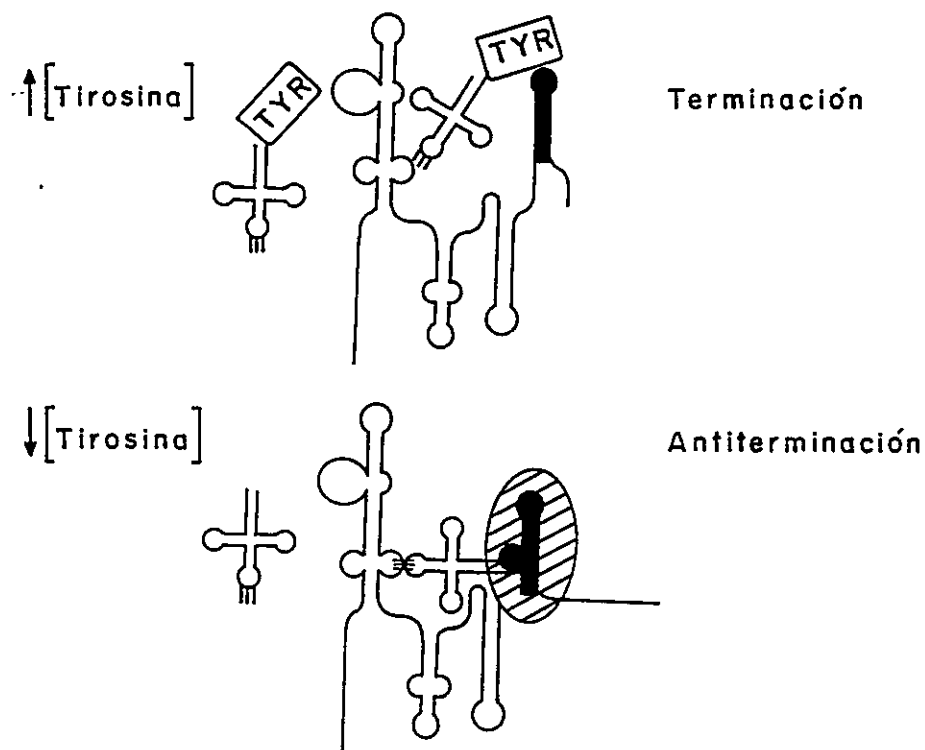


Fig. 3.- Representación esquemática del modelo de regulación de la expresión del gen *tyrS* de *B. subtilis* por terminación y antiterminación de la transcripción. La estructura en cruz representa al tRNA^{Tyr}, aminoacilado o no aminoacilado con tirosina. El círculo achurado representa a posibles factores proteicos involucrados en la antiterminación. En la parte superior se muestra la estructura de terminación que adoptaría el líder del mRNA en exceso de tirosina. En la parte inferior, la estructura de antiterminación que se formaría en condiciones de limitación de tirosina (Adaptado de Groundy y Henkin, 1993).

saturantes de un aminoácido, la expresión de la aaRS correspondiente se mantiene baja a causa de la terminación de la transcripción en el terminador de la región líder del mRNA de la sintetasa. Por el contrario, en condiciones de carencia del aminoácido, se induce la expresión de la sintetasa por la formación de una estructura de antiterminación, que consiste en el apareamiento de las secuencias conservadas de la caja T y de una parte del terminador. Esto impediría la formación del terminador y la RNA polimerasa podría transcribir el mRNA completo del gen. La estabilización de la estructura de antiterminación se lograría por la interacción del tRNA adecuado no aminoacilado, con la región líder del mRNA de la sintetasa correspondiente a través de los elementos determinantes de la especificidad, como el codón y la secuencia de la caja T. No se descarta la participación de un potencial factor que estabilice la estructura de antiterminación de la transcripción en condiciones de carencia del aminoácido.

II.- CARACTERISTICAS DE *Thiobacillus ferrooxidans*.

Thiobacillus ferrooxidans es una bacteria quimiolitotófica, autotrófica y acidófila, que junto a otros microorganismos forma parte de la comunidad biológica que participa en la biolixiviación de metales desde los minerales que los contienen. *T. ferrooxidans* tiene la capacidad de oxidar hierro ferroso y compuestos de azufre reducido. La importancia económica y las características bioquímicas poco comunes de *T. ferrooxidans* han impulsado extensas investigaciones relacionadas con la fisiología y con aspectos genéticos de esta bacteria.

1.- Fisiología de *T. ferrooxidans* .

T. ferrooxidans es una bacteria del género *Thiobacilli*, de la familia *Thiobacteraceae*. Es un bacilo Gram (-), clasificado en la subdivisión β de las *Proteobacterias* (Woese, 1987). Todas las cepas de *T. ferrooxidans* pueden crecer en condiciones estrictamente autotróficas. Obtienen el carbono necesario para la síntesis de compuestos celulares mediante la fijación de CO_2 atmosférico a través del ciclo de Calvin (Gale y Beck, 1967). Algunos autores han señalado que *T. ferrooxidans* puede crecer en condiciones heterotróficas, sin embargo estos informes se consideran errados, atribuidos a la posible contaminación de los cultivos de *T. ferrooxidans* con una bacteria heterotrófica del género *Acidophilium* (Harrison, 1984). Barros y cols. (1984), informaron del crecimiento de una cepa de *T. ferrooxidans* en un medio mixto de fierro y glucosa. Sin embargo, se ha descrito que en general los compuestos orgánicos inhiben el crecimiento de esta bacteria (Tabita y Lundgren, 1971; Alexander y cols., 1987).

T. ferrooxidans es un microorganismo quimiolitotrófico, que obtiene la energía que requiere para su crecimiento y mantención a partir de la oxidación de Fe^{2+} a Fe^{3+} y de compuestos de azufre reducido a sulfatos, utilizando oxígeno como último aceptor de electrones. Es un acidófilo obligado, capaz de crecer entre pH 1,5 y 4,0. Es mesófilo ya que prolifera a temperaturas que oscilan entre 30 y 35°C. Como fuente de nitrógeno, *T. ferrooxidans* es capaz de utilizar sales de amonio mediante una reacción catalizada por la glutamina sintetasa, o de fijar nitrógeno atmosférico a través de la nitrogenasa (Mackintosh, 1978).

2. Metabolismo de *T. ferrooxidans*.

Las vías metabólicas en *T. ferrooxidans* parecen ser las típicas presentes en microorganismos quimiolitotróficos. La bacteria posee un ciclo de Calvin (Gale y Beck, 1967), posiblemente una vía de oxidación de las hexosas monofosfato, enzimas glicolíticas y un ciclo del ácido cítrico incompleto (Anderson y Lundgren, 1969). Esta es una característica de microorganismos quimiolitotróficos y se piensa que se debe a que el ciclo está dirigido a proveer de metabolitos intermediarios carbonados para la síntesis de aminoácidos, más que funcionar como una vía catabólica (Smith y cols., 1967). Una característica de microorganismos quimiolitotróficos, entre ellos algunas cepas de *T. ferrooxidans*, es la carencia de NADH₂ oxidasa, que se considera la causa principal de la autotrofia obligada de estas bacterias (Smith y cols., 1967).

III.- OBJETIVO GENERAL DE LA TESIS.

El laboratorio en que se realizó esta tesis, desde hace algún tiempo ha estado interesado en el estudio de los mecanismos que regulan la expresión génica en *T. ferrooxidans*. Esta bacteria crece lentamente, y una posible explicación a esto es el bajo rendimiento energético que se obtiene de la oxidación de los compuestos inorgánicos de que se nutre *T. ferrooxidans*. En bacterias, la capacidad de las células de proliferar a altas velocidades depende, en parte, de la capacidad de las células de responder al

enriquecimiento nutricional del medio mediante el aumento de la síntesis de proteínas, es decir de la capacidad de incrementar la síntesis de ribosomas y de los precursores necesarios para la síntesis de proteínas. Considerando estos antecedentes, este laboratorio se interesó hace un tiempo en el estudio de la expresión de genes que codifican para componentes de la maquinaria traduccional en *T. ferrooxidans*, como los genes de rRNA, tRNAs y aminoacil tRNA sintetetasas. El conocimiento de aspectos que regulan la expresión de los genes de estas macromoléculas podría contribuir a la comprensión de los factores que limitan el crecimiento de esta bacteria.

Los genes de rRNA de *T. ferrooxidans* se aislaron a partir de una genoteca del DNA cromosomal de la bacteria (* , Salazar y cols., 1989). Se encuentran organizados en dos operones, *rrnT1* y *rrnT2*, cada uno con la estructura característica de los operones de rRNA bacterianos (5'-16S-23S-5S-3'). Río arriba del operón *rrnT2* se identificó la presencia de elementos característicos de la región promotora de genes de rRNA, como secuencias similares a los elementos de consenso para promotores asociados al factor σ^{70} , una secuencia llamada "discriminadora", que en *E. coli* participa en la respuesta a la carencia generalizada de aminoácidos, y elementos de antiterminación de la transcripción, que cumplirían la función de impedir la terminación prematura de la transcripción en regiones internas del operón ribosomal (Takamiya y cols., 1990).

Río arriba del operón de rRNA *rrnT2* se identificó un gen que codificaba para una tirosil tRNA sintetasa de *T. ferrooxidans*. En la secuencia predicha de la proteína, de 407

* Parte de los resultados del estudio de los genes de rRNA de *T. ferrooxidans* conformaron la Tesis de Bioquímico de la srta. Salazar, presentada a la Universidad de Concepción.

aminoácidos, se observó la presencia de las secuencias HIGH y KMSKS, que son elementos muy conservados, presentes en todas las aaRS de clase I (Fig 4). Río arriba del supuesto codón de inicio de la traducción se encontró una secuencia similar a la secuencia de Shine Dalgarno.

Al comparar la secuencia predicha de la tirosil tRNA sintetasa de *T. ferrooxidans* con la de otras tirosil tRNA sintetatas de origen bacteriano, se encontró que presentaba un 24 % de identidad con la TyrRS de *E. coli*, *B. stearothermophilus*, y *B. subtilis*. Un alineamiento múltiple de la secuencia de las cinco TyrRS descritas de bacterias (Fig. 5) mostró una identidad total de sólo 16 %, que aumenta a 20 % cuando se considera a los aminoácidos funcionalmente conservados (similitud). Por otro lado, se observó que la tirosil tRNA sintetasa de *T. ferrooxidans* es un 44 % idéntica y un 77 % similar a la secuencia predicha a partir del gen *tyrZ*, que codifica para una segunda tirosil tRNA sintetasa en *B. subtilis*. Por esta razón se denominó TyrRZ a la tirosil tRNA sintetasa de *T. ferrooxidans* y *tyrZ* al gen que la codifica.

La forma S de las tirosil tRNA sintetasa y también de treonil tRNA sintetasa son muy similares en secuencia a los enzimas homólogas de *E. coli* y se encuentran en bacterias Gram (-) y Gram (+). Sin embargo, la forma Z de estas enzimas se ha descrito sólo en *B. subtilis*, una bacteria Gram (+). La tirosil tRNA sintetasa codificada por el gen

1 ACCGATGCCGATTATCGTCGGCCTGCTCCTGGCGACGATGGTCTACACCCTGATCCTCGACCAGATCAAGGTGCCTTTG
 TGGCGGACTAACCCAGTGCCTGACCGTGACCCATGGCGCCAATCCCGGTGTCGGCAAAGAGCATTACGCCGAGAGCCC
 SD M T M K H Q D A F E Q I

160 GCCGATGCTAATATGCAGCCTCATCACAAGACACCGCCAATTTACTATGAAGCATCAGGATGCATTGCAACAAAT
 A F G T V D M L P E G E M L A R L A A A Q R D N R P
 CGCGTTTGGCACCGTCGACATGCTGCCGAAGGCGAAATGCTGGCGCGGCTCGCAGCGGCGCAGCGCATAACCGCCCC
 L R I K L G M D P T A P D L H L G H T V L L H K A R

320 CTACGGATCAAGCTGGGCATGGATCCCACCGCCCCGGATCTGCACCTGGGGCATAACCGTGCTACTCCATAAGGCCCGTC
 Q F Q D L G H R L L F V I G D F T A M I G D P T G K S
 AATTCAGGATCTCGGCCATCGCCTGCTGTTCTGTTATCGGCGATTTCACCGCCATGATCGGCGACCCACCGGCAAGAG
 V T R K A L S R E E V V A N A A T Y R P Q V F K I L D

480 CGTTACCCGCAAAGCGTTGAGTCGCGAAGAGGTGGTGGCCAATGCCGCGACGTATCGGCGCAGGTATTCAAGATACTG
 P E R T E V M F N S E W L G A L R P E E L I Q I A A
 GACCCGAGCGTACCGAAGTGTCAACTCGGAGTGGTGGCGCCCTGCGTCTGAGGAGCTGATCCAGATTGCCG
 C Y T V A R M L E R D D F N K R Y S A N Q P I A I H

640 CGTGTATACCGTGGCGGCGATGCTGGAGCGCGATGACTTCAACAAGCGTTACAGTGCGAATCAGCCCATCGCCATTCA
 E F L Y P L L Q G Y D S V A I K A D V E L G G T D Q
 CGAGTTTCTCTATCCTTTGCTACAAGTTATGACTCGGTGCTATCAAAGCGGACGTGGAGCTGGGCGGCACGGACCAG
 R F N L L V G R E L Q R E Y G Q K P Q L V L T M P I

800 CGCTCAACCTGCTGGTGGGTGCGGAATTACAACGAGAGTACGCCAGAAACCGCAGTTGGTGTCCACATGCCCATTC
 L E G L D G V Q K M S K S L G N F I A V E D P P A E M
 TCGAGGGTCTGGACGGTGTGCAAAAGATGTCCAATCCCTGGGCAATTCATCGCAGTAGAAGACCCGCCCGCAGAGAT
 F G K I M S I S D F L M W R Y Y A L S R V P A V E Q

960 GTTCGCAAGATCATGTCTATCTCGGACTTCCTGATGTGGCGTTACTACGCGTACTTTCCCGTGTACTGCGGTAGAG
 Q T R L Q K E A A S G A R N P R D I K L D L A G E L
 CAGACGCGCTGCAGAAAGAGGCGGCCAGTGGGCGCGCAATCCGCGTATATCAAGCTGGATCTGGCTGGTGGTGG
 V R R F H G T A A A Q E A H I A F L A R F Q R H E T P

1120 TGCGTGGTTTTTACGGCACCGCGCGGCTCAGGAAGCGCATATCGCCTTCCTTGCACGGTTTTACGCGCCACGAACTCC
 E D L P L Q A I K L S E A P R L S Q L L V Q V H L A
 TGAAGATCTGCCGTGCAAGCCATAAAGCTGTCCGAGGCCCTCGACTCAGTCAGCTATTGGTACAGGTACACCTTGCT
 A S T S E A M R K M K E G A V R V D W R R V V D P A

1280 GCCAGTACCAGCGAGGCGATGCGTAAGATGAAGGAGGCGCTGTGCGGGTGCAGTGGCGAAGGTTGTGACCCCTGCGA
 T I L A L D A V Y L L Q F G K R H F A R V A L Q K G E
 CAATTCTGGCTCTGGATGCGGTATATCTGCTGCAATTTGGTAAACGGCACTTCGCCCGCTGCTCTGCAGAAAGGCGA

*

1440 ATGATGACGCTCTAATTGCTGGTTCATATGGGATGGTCCACATAACCATGGTGCAGGGCAGGGAAGTCGAAATTGG
 -35 -10
 CTGTTGACACCCCTCGGGACCTCCGTATAATCGCCCTCACGACGCGCGCTGAGCCGAGGACTCCGGTCCGAATTGT
 1600 TCTTTTCCAGCCGAGTGGAGATGTGTGGGTTTAGGCCAGGGGATTATGAAGCGGTAGGCGTGGATGATCGCCCTG
 AGCAATATAGTTTGAATGGATTGAACCTTAAGAGTTTGATCCT.....
 [----- 16S ----->

Fig. 4- Secuencia del gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans* y secuencia predicha de la proteína. La secuencia aminoacídica deducida de la tirosil tRNA sintetasa está presentada por el sistema de una letra y las secuencias características de tirosil tRNA sintetastas están en rojo subrayadas. -10 y -35 representan a las secuencias del promotor ribosomal. La posible secuencia de unión al ribosoma (Shine Dalgarno) está subrayada y marcada como SD. La secuencia nucleotídica del gen de rRNA 16S se muestra remarcada en **letras negras**.

Tferr	M---TMKHQDAFE----QIAF---GTVDMLPEGEMLARLAAAQRDNRPLR	40
BsuZ	MRTFEQLTASQOKEVERQLQLYMTGAHEVIPPPEELKAKLVKSI STGTPLK	50
BsuS	MT-----NLLLEDLSF-RGLIQQMTDEEGLNKQLNEE-----K	31
Bstear	M-----DLLAELQW-RGLVNQTTDEEGLRKLLENE-----R	30
Ecoli	ASS-----NLIKQLQE-RGLVAQVTDEEALAEERLAQG-----P	32
Tferr	IKL--GMDPTAPDHLGHVYVLLHKARQFODLGHRLLEFVIGDFTAMIGDPT	88
BsuZ	IKL--GLDPSAPDVHGHITVVLNKLRFQENGHIVQLLIGDFTGKIGDPT	98
BsuS	IRLYSGFDPTADSLHGHLLPILTLRRFQAGHHPIALVGGATGLIGDPS	81
Bstear	VTLYCGFDPTADSLHGHLLPILTLRRFQAGHHPIALVGGATGLIGDPS	80
Ecoli	IALYCGFDPTADSLHGHLLVPLLCLKRFQAGHHPVALVGGATGLIGDPS	82
Tferr	GKSVTRKALSREEVVANAATYRPQVFKILD-----PERTEVMENSEWLG	132
BsuZ	GKSAARKQLTDEEVQHNAKTYFEQFGKVL D-----PEKVELHYNSKWLK	142
BsuS	GKKAERTLNTADIVSEWSQKIKNQLSRFLDFEAAENPAVIANNFD--WIG	129
Bstear	GKKSERTLNAKETVEAWSARIKEQLGRFLDFEADGNPAKIKNNYD--WIG	128
Ecoli	FKAAERKLNTEETVQEWVDKIRKQVAPFLDFDCGENSAIAANNYD--WFG	130
Tferr	ALRPEELI-QIAACYTVARMLERDDFNKRYSANQP-IAIHEFLYPLLQGY	180
BsuZ	TLNLEDVI-ELAGKITVARLMERDDFEERIAMQKP-ISLHEFFYPLMQGY	190
BsuS	KMNVIDFLRDVGKNFGINYLAKDTPVSSRI---ESGISYTEFSYMILOSY	176
Bstear	PLDVITFLRDVGKHFVSNYMMAKESVQSRI---ETGISFTEFSYMLLQAY	175
Ecoli	NMNVLTFLRDIGKHFVSNQMINKEAVKQRLNREDQGISFTEFSYNLLQGY	180
Tferr	DSVAIKAD----VELGGTDQRFNLLVGRELQREYQK--PQLVLTMPLE	224
BsuZ	DSVVLESD----IELGGTDQHFNVLMGRHFQERYNKE--KQVVILMPLE	234
BsuS	DFLNLYRDKNCKLQIGGSDQWGNITAGLELIRKSEEGAKAFGLTIPLVT	226
Bstear	DFLRLYTEGCRLEQIGGSDQWGNITAGLELIRKTKGE-ARAFGLTIPLVT	224
Ecoli	DFACLNKQYGVVLQIGGSDQWGNITSGIDLTRRLHQN--QVFGTLVPLIT	228
Tferr	GLDGVRKMSKSLGNFIAVEDP---PAEMFGKIMSISDFLMWRYYALLSRV	271
BsuZ	GLDGVEKMSKSKHNYIGINEH---PNDMYGKTMSLPSLSMKKYIHLATDL	281
BsuS	KADGT-KEGKIEGGAIWLDKEKTSPEYFYQFWINTDDRVDVVKYLKYFTFL	275
Bstear	KADGT-KEGKIESGTIWLKKEKTSPEYFYQFWINTDDRVDVIRYLKYFTFL	273
Ecoli	KADGT-KEGKIEGGAVWLDPKKTSPEYFYQFWINTADADVRELKFFTFM	277
Tferr	PAVEQTRLQKEAASGARNPRDIKLDLAGELVRRFHGTARAQEAHIAFLAR	321
BsuZ	ELEEKQLVKDLETGAVHPRDAKMLLARTIVRMVYHGEKAAEAHESFKTV	331
BsuS	SKEEIEAYA EK-TEAPEK-REAQKRLAEVTVSLVHGREALQAINISQAL	323
Bstear	SKEEIEALEQELREAPEK-RAAQKTLAEVTVSLVHGREALQAIRISEAL	322
Ecoli	SIEEINALEEEDKNSGKA-PRAQYVLAEQVTRLVHGEEGLQAARITECL	326
Tferr	FQ-----RHETPEDLPLQAIKLSAPRLSOLLVQVHAASTSEA	360
BsuZ	FQ-----ENSLPEDI PAVNWKGEKTIAMIDLLV LKLLSSKSEA	370
BsuS	FSGNIKELSAQDVKVGFKD-VPSMEVDSTQELSLVDVLVQSKLSPSKRQA	372
Bstear	FSGDIANLTA AEIEQGFKD-VPSF-VHEGGDVPLVELLVSAGISPSKRQA	370
Ecoli	FSGSLSALS EADFEQLAQDGVPMVEMEKGD--LMQALVDS ELPQSRGQA	374
Tferr	MRKMKEGAVRVDWRRVDPATILALDAVY----LLQFGKRHEARVALQK	405
BsuZ	RRMIQNGGVRIDGKVTDVHAKAEIRENM-----IIQVGRKRFKL----	411
BsuS	REDIQNGAVYINGERQTEINYTLSGEDRIENQFTVLRGKKKKYF---LVT	419
Bstear	REDIQNGAVYNGERLQDVGAILTA EHRLEGRFTVIRRGKKKYY---LIR	417
Ecoli	RKTIASNAITINGEKQSDPEYFFKEEDRLFGRFTLLRRGKKNYC---LIC	421

Fig. 5.- Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de tirosil tRNA sintetasas bacterianas. El alineamiento se realizó utilizando el programa computacional Clustal de PCGENE y fué mejorado manualmente. Los asteriscos representan aminoácidos idénticos en las cinco secuencias y los puntos representan aminoácidos funcionalmente conservados. Las regiones que se muestran encuadradas corresponden a las secuencias características de aminoacil tRNA sintetasas de Clase I. T. ferr, *Thiobacillus ferrooxidans*; BsuZ y BsuS, TyrRZ y TyrRS de *B. subtilis*; Bstear, *B. stearothermophilus*.

tyrZ de *T. ferrooxidans* es, hasta ahora, el primer ejemplo de una aaRS de forma Z presente en una bacteria Gram (-).

En *B. subtilis* los dos genes que codifican para tirosil tRNA sintetasas, *tyrS* y *tyrZ*, presentan en la región líder del mRNA elementos de estructura secundaria que indican que su expresión dependiente de la disponibilidad de tirosina, se regula por un mecanismo de terminación/antiterminación de la transcripción (Putzer y cols., 1995). Es posible que la similitud exhibida a nivel de la estructura primaria entre la tirosil tRNA sintetasa de *T. ferrooxidans* y la TyrRZ de *B. subtilis*, se extienda al mecanismo de regulación de la expresión del gen. Por lo tanto, considerando la similitud entre los productos de los genes *tyrZ* de *T. ferrooxidans* y de *B. subtilis*, en este proyecto se planteó estudiar la expresión dependiente del nivel de tirosina del gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans*. La hipótesis de trabajo es: **la expresión de la tirosil tRNA sintetasa de *T. ferrooxidans* se regula mediante un mecanismo de terminación o antiterminación de la transcripción, similar al de bacterias Gram (+).**

Para abordar el estudio de la expresión de *tyrZ* de *T. ferrooxidans*, en primer lugar se procedió a confirmar la identidad del gen a través del análisis de la actividad enzimática del producto génico. En segundo lugar se estudió la funcionalidad de *tyrZ* con el objetivo de conocer su expresión. Se analizó el efecto de una condición de carencia artificial de tirosina en la actividad de la tirosil tRNA sintetasa de *T. ferrooxidans*. Finalmente se analizó la región del DNA correspondiente al líder del mRNA de *tyrZ* para determinar la presencia de elementos de la estructura secundaria del RNA que pudieran

constituir indicios para la dilucidación del mecanismo de regulación de la expresión de *tyrZ*.

MATERIALES Y METODOS

I.-MATERIALES

1.- Bacterias y fagos.

La cepa Torma de *T. ferrooxidans* se mantuvo por cultivos sucesivos en medio Mackintosh o en medio tetrionato a 30°C con agitación constante. Se controlaba el crecimiento por conteo directo de las bacterias en un microscopio, utilizando una cámara Petroff-Hausser. Las bacterias se colectaban en la fase temprana de crecimiento exponencial, mediante centrifugación a 12.000 x g durante 15 min.

Las distintas cepas de *E. coli* se cultivaban en medio Luria Broth (LB) o LB suplementado con ampicilina 50 mg/ml, a 37°C con agitación. La cepa HB2109 (mutante termosensible) (Bedouelle y Winter, 1986) se cultivaba a 30°C o 34°C en LB. Se controlaba el crecimiento bacteriano midiendo turbidez en un espectrofotómetro Shimatzu a 600 nm de longitud de onda. Las bacterias se colectaban por centrifugación a 3000 x g durante 5 min.

E. coli JM105 [D(lacpro), thi, st A, end A, sbc B15, hsd R4, F' tra D36, pro AB, lacI^q, ZDM15], se usó como receptora en los experimentos de infección con fagos derivados de M13.

El clon recombinante del bacteriófago M13, que contenía la hebra de DNA no codificante del fragmento BamHI-BamHI de 1,4 - 1,5 kb del plasmidio pTR-1 fué construido

con anterioridad por el sr. Boris Sagredo en este laboratorio. Se utilizaba como DNA molde en una reacción de secuenciación que se empleaba como marcador de tamaño en los experimentos de extensión del partidor.

2.- Reactivos.

Los siguientes reactivos se obtenían de Sigma Co (USA): las enzimas RNasa A, proteinasa K y Lisozima; tirosina, hidroxamato de tirosina, tRNA total de *E. coli*, tetratoato de potasio, extracto de levadura, triptona, Tris, MOPS, EDTA, Agarosa tipo II, 2-mercaptoetanol, TEMED, persulfato de amonio, SDS, PPO, POPOP, glicerol, DEPC. Acrilamida y bis-acrilamida se obtenían de United States Biochemicals Co (USA). Urea se obtenía de Gibco BRL.

Todas las enzimas de restricción utilizadas en esta tesis procedían de Gibco BRL, con excepción de BsfI, que se obtenía de New England Biolabs, al igual que T4 DNA ligasa. Las enzimas DNasa I, DNasa I Grado Amplificación, fosfatasa alcalina de intestino de ternera (CIP), T4 polinucleótido quinasa, RNA polimerasa del fago T7, Fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli*, transcriptasa inversa AMV, transcriptasa inversa MLV, transcriptasa inversa SuperScript™, Taq DNA polimerasa, Nucleasa S1 y los nucleótidos dATP, dTTP, dCTP, dGTP, ATP, UTP, CTP, GTP, se obtenían de Gibco BRL. Inc. El DNA de espermio de salmón desnaturalado se obtenía de Promega.

Los reactivos radiactivos [α - 32 P]dATP, [α - 32 P]ATP, [α - 35 S]dATP, se obtenían de DuPont NEN (USA). [δ - 32 P]ATP, se obtenía de ICN Pharmaceutical Inc. 14 C-tirosina o 3 H-tirosina, de New England Biolabs.

De Gibco BRL se obtenía los marcadores de tamaño molecular de DNA y RNA. Se utilizaba una mezcla de fragmentos obtenidos de la digestión del DNA del bacteriófago λ con la enzima de restricción HindIII, que generaba fragmentos de 23.130, 9.419, 6.557, 4.370, 2.320, 2.028, 564 y 125 pb. Para rangos de tamaño menores se utilizaba el DNA de la forma replicativa del bacteriófago ϕ X174 digerido con la enzima de restricción HaeIII, que generaba fragmentos de 1.353, 1.078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, y 72 pb. Como marcador de tamaño para RNA se utilizaba una mezcla de fragmentos de RNA de 9.490, 7.460, 4.400, 2.370, 1.350 y 240 bases.

Todos los oligonucleótidos utilizados en esta tesis se obtuvieron del Centro de Análisis y Síntesis de Biomoléculas (Chile).

Las reacciones de secuenciación se realizaban utilizando la enzima SequenaseTM y los reactivos provistos por United States Biochemicals Co. (USA).

Todas las sales, ácidos, bases y compuestos orgánicos fueron de grado analítico y procedían de Sigma Co. o de Merck.

3.- Medios de cultivo.

Medio Mackintosh :

Contenía FeSO_4 33,3 g/l; KH_2HPO_4 0,04 g/l; MgSO_4 0,4 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,4 g/l. Se llevaba a pH 1,6 con H_2SO_4 concentrado.

Medio tetrionato:

Contenía $\text{Na}_2\text{S}_4\text{O}_6$ 3,0 g/l; KH_2PO_4 3,0 g/l; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 3,0 g/l; MgSO_4 0,5 g/l; CaCl_2 0,5 g/l. Se llevaba a pH 3,5 con H_2SO_4 concentrdo.

Medio Luria Broth (LB)

Contenía triptona 1 g/l, NaCl 0,5 g/l y extracto de levadura 0,5 g/l. Se esterilizaba en autoclave por 20 min a 15 atm. Cuando era necesario se agregaba ampicilina en una concentración de 50 mg/ml (LBA). El medio LB sólido tenía la misma composición excepto que se agregaba agar en una concentración de 1,5 % (p/v).

II.- METODOS

1.- Metodos generales.

1.1.- Digestión de DNA con enzimas de restricción.

El DNA en una concentración de 0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ se digería con enzimas de restricción utilizando 1 unidad de enzima por μg de DNA, en las condiciones de tiempo, temperatura y fuerza iónica recomendadas por los proveedores. Las reacciones enzimáticas se detenían por calentamiento a 65-70°C por 10 min o por extracción con fenol:cloroformo 1:1.

1.2.- Extracción de proteínas con fenol/cloroformo.

Las extracciones con fenol/cloroformo se realizaban con el propósito de eliminar proteínas de las preparaciones de DNA o RNA. Se agregaba a la muestra un volumen de fenol previamente saturado con una solución de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8. Las fases se mezclaban por vortex durante 1 a 2 min. Después de centrifugar por 5 min a 12.000 x g la fase acuosa se transfería a un tubo limpio y repetía el procedimiento con un volumen de una mezcla de fenol y cloroformo 1:1 y con cloroformo. Finalmente los ácidos nucleicos se precipitaban con etanol como se describe a continuación.

1.3.- Precipitación de ácidos nucleicos con etanol.

Las precipitaciones con etanol se realizaban con el propósito de concentrar los ácidos nucleicos. A las muestras de DNA o RNA se agregaba un décimo de su volumen de una solución de acetato de sodio 2 M (pH 5,2) y dos volúmenes de etanol absoluto frío. Las muestras se incubaron a -20°C por 2 a 12 horas. Después de centrifugar por 10 min a 12.000 x g a 4°C, el sedimento se lavaba con etanol 70 % en frío para eliminar sales, se secaba al vacío y se resuspendía en tampón TE o en agua.

1.4.- Cuantificación de DNA y RNA.

El valor máximo de absorbancia de soluciones acuosas de DNA y RNA se obtiene entre longitudes de onda de 258 y 260 nm. Considerando que una solución de DNA de 50

$\mu\text{g/ml}$ y de RNA de $40 \mu\text{g/ml}$ tienen una absorbancia de 1.0 a 260 nm, se utilizó esta relación para calcular las concentraciones de DNA y RNA respectivamente.

1.5.- Cuantificación de proteínas.

Se determinaba la concentración de proteínas en extractos totales de *T. ferrooxidans*, mediante la metodología de Bradford (1976), con algunas modificaciones. A $100 \mu\text{l}$ de una solución que contenía 1 - $10 \mu\text{g}$ de proteína se agregaba 1 ml de reactivo de Bradford (Azul de Coomassie Brilliant G $0,1 \text{ g/l}$, etanol 5 % v/v, ácido fosfórico 8,5 % v/v). La absorbancia se medía a una longitud de onda de 595 nm. La curva de calibración se realizaba con seroalbúmina de bovino como patrón.

1.6.- Determinación de radiactividad incorporada en ácidos nucleicos.

Alícuotas de 10 a 100 pg de las muestras de ácidos nucleicos (DNA o RNA) marcados con $[^{32}\text{P}]\text{PO}_4$ se precipitaban con 3 ml de una solución de TCA al 10 %, mediante incubación en hielo por 15 min. El precipitado se colectaba por filtración en filtros de fibra de vidrio GF/A (Whatman) y se lavaba con 50 a 100 ml de TCA 10 % frío. Los filtros se secaban y se suspendían en 5 ml de una solución de centelleo que contenía $3,92 \text{ g/l}$ de PPO y $0,08 \text{ g/l}$ de POPOP disueltos en tolueno. Se medía la radiactividad precipitada en un contador de centelleo Delta 300.

1.7- Electroforesis en geles de agarosa.

Las electroforesis de DNA se realizaban en geles horizontales, usando concentraciones de agarosa que dependían del tamaño de los fragmentos a separar, en tampón TBE que contenía Bromuro de etidio 0,5 mg/ml. En el gel se cargaban muestras a las que se agregaba un sexto de su volumen de una solución que contenía Azul de Bromofenol 0,25 % p/v, Xilen-cyanol 0,25 % p/v, glicerol 30 % v/v. Las electroforesis se realizaban a 60 volt (voltaje constante) por tiempos variables. La visualización del DNA se lograba por la emisión de fluorescencia por el bromuro de etidio intercalado, al irradiar el gel con luz U.V. Los geles se fotografiaban usando películas Polaroid del tipo 667.

1.8.- Electroforesis en geles de poliacrilamida.

A partir de una solución de acrilamida:bisacrilamida 19:1, se preparaban geles de poliacrilamida al 6 %, urea 8 M en tampón TBE. Las electroforesis se realizaban en tampón TBE, a 1.800 volt durante 6 a 7 horas. Una vez completada la electroforesis, el gel se pegaba sobre un papel filtro (Whatman 3 MM) y se secaba a 80°C con vacío. El gel seco se exponía sobre una película autorradiográfica Kodak XA-5 por un tiempo que variaba entre 16 y 48 horas. Después de un proceso de revelado, se analizaba la imagen autorradiográfica del gel para obtener la secuencia.

1.9.- Secuenciación en M13.

1.9.1.- Infección de *E. coli* por bacteriófagos M13 recombinantes

Se disponía de un clon recombinante de M13 que contenía el fragmento BamHI/BamHI de 1500 pb del plasmidio pTR-1 (Salazar y cols. , 1989). 20 µl de un cultivo de *E. coli* JM105 cultivadas a 37°C hasta una D.O. a 600 nm de 0,5-0,6 se diluían en 3,0 ml de medio LB y se agregaba los fagos M13 recombinante. La infección de las bacterias por los fagos se realizaba incubando este cultivo a 37°C por 5 horas con agitación.

1.9.2.- Preparación del DNA de hebra simple del bacteriófago M13.

Los cultivos de bacterias *E. coli* JM105 infectadas con fagos de M13 recombinante se centrifugaban a 12.000 x g por 3 min a 4°C. Se tomaba 1,3 ml del sobrenadante y se mezclaban con 250 µl de una solución de PEG al 20 % y NaCl 2,5 M. Esta mezcla se incubaba 15 min a temperatura ambiente y se centrifugaba a 12.000 x g durante 10 min. Una vez eliminado el sobrenadante, el sedimento se resuspendía en 100 µl de tampón TE (pH 8,0) y se extraía las proteínas con una mezcla de fenol y cloroformo. El DNA de hebra simple presente en la fase acuosa se recuperaba por precipitación etanólica y posterior resuspensión del sedimento en tampón TE.

1.9.3.- Reacción de marcación del DNA.

La reacción de marcación se realizaba según las protocolo recomendado por los proveedores de la United States Biochemical (USB), descrito en "Step by Step Protocols For DNA Sequencing With Sequenase". Se usó como nucleótido radiactivo [α - 35 S]-tio dATP.

2.- Preparación de DNA.

2.1.- Preparación de DNA plasmidial en pequeña escala.

Se utilizaba el sistema de purificación "MagicTM Minipreps Purification Systems" (Promega), basado en la metódica de Lisis Alcalina (Sambrook y cols., 1989). 1,5 ml de LB/ampicilina 50 μ g/ml se inoculaban con una colonia de *E. coli* proveniente de una placa de LB/amp sólido. Se incubaba el cultivo durante la noche a 37°C con agitación y se colectaba por centrifugación a 12.000 x g por 1 min. El sedimento bacteriano se resuspendía en 200 μ l de una solución Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), EDTA 10 mM. Se adicionaba 200 μ l de una solución NaOH 0,2 N, SDS, 1 % y 200 μ l de una solución fría de acetato de potasio 3 M (pH 5,5). La mezcla se centrifugaba a 12.000 x g por 10 min. Los ácidos nucleicos del sobrenadante se purificaban por cromatografía en mini-columnas de intercambio aniónico, o mediante extracción de las proteínas con fenol/cloroformo y posterior precipitación con etanol.

2.2.- Preparación de DNA plasmidial en gran escala.

Se utilizaba el sistema de purificación "Qiagen Plasmid Purification" (Qiagen), basado en la metódica de Lisis Alcalina (Sambrook y cols., 1989). Entre 200 y 500 ml de cultivo de

E. coli en medio LB/ amp se centrifugaban a 3.000 x g durante 5 min. a 4°C. Las bacterias se lavaban en tampón TE (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM) y se resuspendían en 10 ml de una solución de Tris-HCl 50 mM (pH 8,0), RNasa A 100 µg/ml, EDTA 10 mM. Se agregaba 10 ml de una solución de NaOH 0,2 M, SDS 1 % y se incubaba por 5 min. a temperatura ambiente. Se agregaba 10 ml de una solución fría de acetato de potasio 3 M (pH 5,5) y se incubaba por 20 min en hielo. Se centrifugaba a 12.000 x g por 30 min y se purificaba el DNA plasmidial presente en el sobrenadante por cromatografía de intercambio aniónico, según el procedimiento descrito por los proveedores de Qiagen.

2.3.- Preparación de DNA cromosomal de *T. ferrooxidans*.

Las bacterias se cultivaban en 200 ml de medio Mackintosh hasta alcanzar una densidad de 10^8 cel/ml. Las células se colectaban por centrifugación a 12.000 x g por 15 min a 4°C y se lavaban en H_2SO_4 10 mM y en TE hasta alcanzar pH 8,0. Se procedía a la preparación del DNA cromosomal según el método de Marmur (1961). Las bacterias se resuspendían en 1,5 ml de solución A [Tris-HCl 25 mM (pH 8,0), glucosa 50 mM, EDTA 10 mM]. Se agregaba 0,5 ml de una solución de lisozima 2 mg/ml en solución A y se incubaba por 60 min en hielo. La mezcla se llevaba a una concentración de 0,05 % SDS y proteinasa K 50 µg/ml y se incubaba durante 15 min a 37°C. Se extraían las proteínas por tratamiento con una mezcla de fenol-cloroformo 1:1 y con cloroformo. Los ácidos nucleicos se precipitaban con etanol en presencia de acetato de sodio 0,3 M durante la noche a -20°C. El sedimento de la centrifugación a 12.000 x g por 10 min se lavaba en etanol 70 %, se secaba y se

resuspendía en 1 ml de tampón Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), EDTA 1 mM. Se incubaba durante 2 horas a 37°C con 30 µg de RNasa A, se extraía con fenol-cloroformo y se precipitaba con etanol durante la noche. La mezcla alcohólica se centrifugaba durante 10 min a 12.000 x g y el DNA genómico finalmente se resuspendía en tampón TE en una concentración de 1 µg/µl.

3.- Preparación de RNA.

3.1.- Preparación de RNA total de *T. ferrooxidans*.

El RNA total de *T. ferrooxidans* se preparaba de acuerdo al procedimiento descrito por Hagen y Young (1978). Todas las soluciones y el material de vidrio se trataban previamente con 0,1 % dietilpirocarbonato (DEPC) y se esterilizaban por autoclave. Las bacterias se cultivaban en medio Mackintosh y se colectaban por centrifugación cuando el cultivo había alcanzado una densidad aproximada de 10^8 cel/ml. Se lavaban en H₂SO₄ 10 mM y en TE, manteniéndose siempre en hielo. Se resuspendían en 5 ml de TE que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 6,8), EDTA 2 mM, SDS 1 %, y se lisaban por calentamiento a 97°C en baño maría. La mezcla se llevaba NaAc 0,3 M (pH 5,2) y se extraía con fenol saturado en H₂O (previamente tratada con DEPC). La extracción se realizaba agitando suavemente durante 10 min. A la mezcla se adicionaba cloroformo y se repetía el procedimiento de extracción. Se centrifugaba por 10 min a 12.000 rpm x g a 4°C y la fase acuosa se reextraía con fenol/cloroformo por 10 min. Se precipitaba los ácidos nucleicos con etanol incubando por al menos dos horas a -20°C en presencia de NaAc 0,3 M (pH 5,2). La mezcla etanólica se

centrifugaba y el sedimento se resuspendía en 1 ml de una solución Tris-HCl 10 mM (pH 8.0), MgCl₂ 1 mM, DNasa libre de RNasa 10 µg/ml y se incubaba por 10 min a 37°C. Se agregaba NaAc a una concentración de 0,3 M final y se extraía con fenol-cloroformo por 5 min. La fase acuosa se obtenía por centrifugación a 12.000 x g por 10 min. Se añadía etanol absoluto y acetato de sodio precipitar el RNA. Es sedimento se secaba a temperatura ambiente por 10 min y se resuspendía en H₂O tratada con DEPC en una concentración de 1 mg/ml. Para almacenar el RNA por períodos prolongados (hasta por un mes), el RNA se precipitaba con etanol y se mantenía a -80°C.

3.2.- Preparación de RNA ribosomal de *T. ferrooxidans*.

1, 9 g de células se homogenizaba con 2,5 veces su peso en alúmina, mezclando vigorosamente en un mortero durante una hora, en hielo. La pasta formada se resuspendía en 10 ml de tampón Tris-HCl 10 mM (pH 7,6), NH₄Cl 60 mM, Mg(Ac)₂ 10 mM y se centrifugaba dos veces durante 30 min a 27.000 x g para remover la alúmina y los restos celulares. Al sobrenadante se agregaba DNasa I libre de RNasa a una concentración final de 20 µg/ml, se incubaba a 37°C por 10 min y se ultracentrifugaba por dos horas a 150.000 x g a 4°C para sedimentar los ribosomas. Estos se resuspendían en Tris-HCl 10 mM (pH 7,6), NH₄Cl 1,5 mM, Mg(Ac)₂ 10 mM, y se repetía la ultracentrifugación para lavar los ribosomas. El sedimento se resuspendía en 5 ml de Tris-HCl 50 mM (pH 6,8), EDTA 2 mM, SDS 1 % y se eliminaban las proteínas con dos extracciones con fenol saturado en agua y con cloroformo, en presencia de NaAc 0,2 M (pH 5,2). Finalmente los ácidos nucleicos de la

fase acuosa se precipitaban con etanol a -20°C , el sedimento etanólico se resuspendía en tampón Tris-HCl 10 mM (pH 8,0), MgSO_4 1 mM y se incubaba con DNasa libre de RNasa $1\mu\text{g/ml}$ por 30 min a 37°C . Finalmente se realizaba una extracción fenol/cloroformo, se precipitaba con etanol y el RNA ribosomal se resuspendía en agua tratada con DEPC en una concentración de $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$.

4.- Preparación de sondas radiactivas.

4.1.- Preparación de sondas de DNA.

4.1.1.- Purificación del fragmento BamHI-PstI.

El DNA del plasmidio pTR-1 (Fig. 7) se digería con las enzimas de restricción BamHI y PstI según las indicaciones del proveedor. Los fragmentos generados se resolvían por electroforesis en un gel de agarosa al 0,7 % en tampón TBE (Tris-borato 90 mM, EDTA 2 mM). El trozo de agarosa que contenía el fragmento de 678 pb se cortaba del gel y el DNA se extraía utilizando el kit "GeneClean II" (Bio 101 Inc.) El DNA así purificado se utilizaba para sintetizar la sonda mediante el procedimiento de "partidores al azar".

4.1.2.- Obtención de un fragmento de DNA de la región 5' no codificante de *tyrZ*.

El fragmento se obtenía por amplificación desde pTR1 utilizando los partidores TyrBC y PETyrZ (ver Fig. 6 para una lista de los oligonucleotidos utilizados como partidores en esta tesis). Las reacciones de amplificación del DNA se realizaban en un volumen de 25 o 50 μl de tampón Tris-HCl 20 mM (pH 8,4) que contenía KCl 50 mM, MgCl_2 1,5 mM, dATP, dTTP, dGTP, dCTP 0,2 mM cada uno, 1,25 unidades de Taq DNA polimerasa y 5 ng

de DNA molde. A las mezclas de reacción se agregaba 2 gotas de aceite mineral para evitar la evaporación. Las reacción se realizaba en un termociclador MJ Research PTC 100, utilizando

OLIGO	SECUENCIA
XA-2	5'- GCGGCAATCTGGATCAGCTCC-3'
PETyrZ	5'- CAGGCACTGGTTAGTCGCCGC-3'
TYRBC	5'- GTGCAGACCCTGGATTTC -3'
L-rnT2	5'- TATTGCTCAGGGCGATCATCC -3'
LYS1	5'- CAATTTGGTAACCGGCACTTC -3'
XA-8	5'- GGATGCATTTCGAACAAATCGC-3'

Fig. 6.- Lista de oligonucleótidos utilizados en el estudio de la expresión del gen *tyrZ*.

el siguiente programa de amplificación: 2 ciclos a 94°C por 3 min, 52°C por 1 min y 72°C por 1 min; 28 ciclos a 94°C por 30 s, 52°C por 30 s, 72°C por 30 s; 10 min a 72°C. Los productos generados se analizaban mediante electroforesis en geles de agarosa.

4.1.3.- Marcación del fragmento de DNA.

Se utilizaba el procedimiento de "marcación al azar" (Feinberg y Vogelstein, 1983), de acuerdo al protocolo descrito por Gibco BRL. 25-100 ng del DNA se desnaturaban por calentamiento a 100°C y enfriamiento inmediato en hielo. La marcación se realizaba incubando el DNA desnaturado en 50 μ l de un tampón que contenía HEPES 0,2 M, Tris-HCl 51 mM, MgCl₂ 5,1 mM, 2-Mercaptoetanol 10 mM, seroalbúmina de bovino 0,4 mg/ml, pH 6,8. Se incluía los partidores oligodesoxirribonucleótidos hexaméricos de secuencia al azar en una concentración de 5,4 unidades de D.O._{260nm}/ml, dCTP, dGTP, dTTP, cada uno 20 μ M, 50 μ Ci de [α -³²P]dATP (3000 Ci/mmol) y 3 unidades de fragmento Klenow de la DNA polimerasa de *E. coli*. La incubación se realizaba a temperatura ambiente (22-25°C) durante 2 horas. La reacción se detenía por adición de Na₂EDTA a una concentración final de 20 μ M. Se cuantificaba la incorporación de radiactividad en el DNA por precipitación de una alícuota de la muestra con TCA 10 % y posterior filtración en filtros de fibra de vidrio GF/A (Whatman). La radiactividad en los filtros se medía en un contador de centelleo líquido Delta 300.

4.2.- Preparación de una sonda de RNA.

El plasmidio pTZ18R (Pharmacia; Rokeach, 1988) posee varios sitios de reconocimiento para enzimas de restricción, localizados río abajo del promotor del fago T7. El clonamiento de un fragmento de DNA en esta región permite que el DNA clonado pueda ser transcrito *in vitro* por la RNA polimerasa del fago T7. La inclusión de un ribonucleótido marcado con [^{32}P]PO₄ en la reacción de transcripción permite obtener el RNA marcado uniformemente, el que puede ser utilizado como sonda en experimentos de hibridación.

Se disponía de un plasmidio (PTZ052) derivado de pTZ18R que contenía un fragmento de 250 pb del DNA de la región río arriba del gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans* clonado en orientación inversa con respecto al promotor del fago T7. El fragmento clonado se obtuvo por PCR desde el plasmidio pTR-1 (Fig. 7) utilizando los oligonucleótidos TyrBC y PEtyrZ como partidores. Se utilizaba pTZ052 como DNA templado en una reacción de transcripción *in vitro* del RNA complementario al RNA de *tyrZ*.

4.2.1.- Transcripción *in vitro*.

100 ng del plasmidio pTZ052 se suspendían en 20 μl de tampón T7 [Tris-HCl 50 mM pH 8,0, MgCl₂ 8 mM, espermidina-HCl 2 mM, NaCl 25 mM], DTT 5 mM, CTP, CTP, GTP, cada uno 0,4 mM, Inhibidor de RNasa de placenta humana 10 U/ μl , [α - ^{32}P]ATP 50 μCi (3000 Ci/mmol) y 50 U de RNA polimerasa del fago T7. Se incubaba por 60 min a 37°C y se agregaba 1 U de DNasa I libre de RNasa. Se continuaba incubando por 15 minutos, se extraía

con fenol/cloroformo y se precipitaba con etanol. El RNA se analizaba por electroforesis en un gel de agarosa en presencia de formaldehído.

4.3.- Marcación de oligodesoxirribonucleótidos.

Los oligodesoxirribonucleótidos ("oligonucleótidos") se marcaban radiactivamente por incorporación de un [^{32}P]PO₄ en el extremo 5' OH del oligo (Sambrook y cols., 1989). 1 pmol de oligonucleótido se incubaba con 10 unidades de la enzima polinucleótido quinasa del fago T4 en 50 μl de una solución que contenía Tris-HCl 70 mM (pH 7,6), MgCl₂ 10 mM, KCl 100 mM, 2-mercaptoetanol 1 mM y 150 μCi de [$\gamma^{32}\text{P}$]ATP (7000 Ci/mmol). La reacción se prolongaba por 60 min a 37°C y se detenía por calentamiento a 65°C por 10 min. Se cuantificaba la radiactividad incorporada por precipitación con TCA.

5.- Transformación de *E.coli*.

5.1.- Preparación de *E. coli* competentes.

Las células de *E. coli* se hacían competentes para la transformación con DNA exógeno por el método del CaCl₂ (Sambrook y cols., 1989). Se cultivaba las bacterias en medio LB líquido a 37°C. La cepa HB2109, mutante termosensible en el gen *tyrS*, se cultivaba a 30 o 34°C. Las células se colectaban por centrifugación cuando habían alcanzado una D.O. a 600 nm de 0,4 y se resuspendían en Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0), CaCl₂ 50 mM, en un volumen que correspondía a la mitad del volumen original de cultivo. Se incubaba en hielo por 30 min, se centrifugaba y las bacterias se resuspendían en Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0),

CaCl₂ 50 mM, utilizando un vigésimo del volumen original de cultivo. Las células competentes se guardaban a 4°C y se utilizaban para transformación 12 a 24 horas después de la preparación.

5.2.- Transformación.

Las bacterias competentes para transformación se mezclaban con 10 ng de DNA plasmidial y se incubaban en hielo por 20 min. Después de un pulso térmico a 42°C por 90 s, se transferían inmediatamente a hielo, donde se mantenían al menos durante 2 min. Se adicionaba 1 ml de medio LB y se incubaba a 37°C por 45 min para permitir la expresión de la resistencia al antibiótico. En el caso de la cepa HB2109, mutante termosensible de *E. coli*, el pulso térmico se realizaba a 37°C por 5 min y posteriormente las bacterias se incubaban a 30°C. Se tomaban alícuotas de la mezcla de transformación y se diseminaban en placas de medio LB-agar suplementado con 50 µg/ml de ampicilina, las que se incubaban a 37°C (o 30°C en el caso de *E. coli* HB2109) durante 12 a 24 horas.

6.- Preparación de extractos libres de células.

Las bacterias colectadas por centrifugación se lavaban y se resuspendían en tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,0, 2-mercaptoetanol 20 mM. Se lisaban por sonicación en un sonicador Ultrasonic mediante cuatro pulsos de 10 s a 200 Watts, a 4°C. La fracción soluble del lisado se recuperaba por centrifugación a 12.000 x g por 10 min a 4°C y en ella se medía la actividad tirosil tRNA sintetasa.

7.- Ensayo de la actividad tirosil tRNA sintetasa .

Para determinar la actividad tirosil tRNA sintetasa presente en los extractos de bacterianos, se medía la capacidad de éstos de aminoacilar tRNA de *E. coli* con tirosina. 0,1 a 5 µg de proteína total de los extractos se incubaba por 5 min a 37°C en un tampón que contenía Tris-HCl 50 mM pH 8,0, MgCl₂ 5 mM, ATP 2,6 mM, glutation reducido 2 mM, tRNA total de *E. coli* 4 mg/ml y [¹⁴C]tirosina (actividad específica 100 mCi/mmol) 8 µM. La reacción se detenía por la adición de 5 ml de TCA al 5 %. Las muestras se colectaban por filtración en filtros de fibra de vidrio (Whatman), y se cuantificaba la radiactividad de los filtros en un contador de centelleo líquido Delta 300 (Searle Analytical Inc.).

Los ensayos de la actividad tirosil tRNA sintetasa en los extractos de *T. ferrooxidans* se realizaban en las siguientes condiciones: Tris-HCl 50 mM pH 8,0, MgCl₂ 12 mM, ATP 5 mM, DTT 5 mM, tRNA total de *E.coli* 8 mg/ml y [³H]tirosina (actividad específica 500 mCi/mmol) 40 µM.

Se definió la unidad de actividad como la cantidad de enzima que aminoacila 1 pmol de tRNA en 5 min a 37°C.

8.- Ensayos de complementación de la mutación termosensible.

Se analizó la capacidad del producto del gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans* de complementar la mutación termosensible en el gen *tyrS* de la cepa HB2109 de *E .coli*. La cepa mutante se transformó con el plasmidio pTR-1, que contenía el gen *tyrZ* y las bacterias

transformantes se seleccionaron por cultivo en placas de LB/amp a 30°C durante la noche. Al día siguiente varias colonias se traspasaron a placas nuevas de LB/amp que se incubaron a 42°C. Se analizó la proliferación de las bacterias a las 16, 24 y 48 horas.

9.- Determinación de la actividad tirosil tRNA sintetasa del producto del gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans* en extractos de *E. coli* HB2109 (ts).

Las células de *E. coli* HB2109 que habían sido transformadas con el plasmidio pTR-1 o con pBR322 (control) se cultivaban a 30°C en medio LB/amp líquido hasta alcanzar una D.O. a 600 nm de 0,4. La mitad del cultivo se transfería a un baño con agitación a 42°C y la otra se mantenía a 34°C. Después de dos horas de incubación en estas condiciones, las bacterias se colectaban por centrifugación a 3000 x g por 5 min a 4°C y se preparaban extractos libres de células en los que se medía la actividad tirosil tRNA sintetasa de acuerdo al protocolo descrito.

10.- Hibridación tipo Southern.

Los ensayos de hibridación se realizaban según la metodología de Southern (1975), de acuerdo al protocolo descrito en Sambrook y cols. (1989). El DNA cromosomal bacteriano se digería con las enzimas de restricción apropiadas según las recomendaciones del proveedor. Los fragmentos generados se resolvían por electroforesis en un gel de agarosa al 0,7 % en tampón TBE. El DNA se desnaturaba por incubación del gel en una solución de NaOH 0,5 N, NaCl 1,5 M durante dos horas a temperatura ambiente con agitación, y se

neutralizaba en tampón Tris-HCl 1 M pH 7,4, NaCl 1,5 M en las mismas condiciones. El DNA se transferían por capilaridad a un filtro de Nylon (Gibco BRL) y se fijaba por calentamiento a 80°C por 2 horas. Para la prehibridación, los filtros se incubaban por dos horas a 42°C en una solución que contenía formamida 50 % p/v , SSC x 4 (1 x es Na₃ Citrato 15 mM, NaCl 150 mM), solución Denhardt x 5 (1 x es Ficoll 0,02 % p/v; polivinilpirrolidona 0,02 % p/v; BSA 0,02 % p/v) SDS 0,5 % p/v y 100 µg/ml de DNA de esperminio de salmón. La hibridación se realizaba por incubación durante 12-20 horas a 42°C en la misma solución, que contenía 10 ng/ml de una sonda específica para el gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans*, marcada homogéneamente con [³²P]PO₄ mediante la metódica de "marcación al azar" (radiactividad específica 0,6 µCi/µg de DNA).

Después de la hibridación los filtros se lavaban dos veces por 30 min a 42°C en 250 ml de una solución SSC x 2 , SDS 0,1 % p/v y dos veces por 10 min en una solución SSC x 0,1 , SDS 0,1 % p/v a 55°C. Las bandas de hibridación se detectaban mediante autorradiografía de los filtros.

11.- Hibridación tipo Northern.

Se utilizaba el protocolo descrito en Sambrook y cols. , (1989). Se precipitaba 100 µg de RNA total de *T. ferrooxidans* en etanol y se resuspendía en formaldehido 2,2 M, formamida 50 % v/v , MOPS 50 mM (pH 7,0), EDTA 1 mM. Se desnaturaba por calentamiento a 68°C por 15 min y transferencia inmediata a hielo. Se agregaba solución de carga (azul de bromofenol 0,04 % xilen cyanol 0,04 % p/v, glicerol 5 % v/v) y bromuro de

etidio a una concentración de 0,1 mg/ml) y se sometía electroforesis en un gel de agarosa 1 % p/v, formaldehído 2,2 M, MOPS 50 mM (pH 7,0), EDTA 1 mM, utilizando tampón MOPS 50 mM (pH 7,0) como tampón de electroforesis. Después de la electroforesis el gel se fotografiaba con una máquina fotográfica Polaroid.

Se procedía a transferir el RNA a una membrana de nylon (Gibco BRL) por capilaridad, mediante la misma metódica utilizada para transferir DNA.

El filtro que contenía el RNA se prehibridaba por incubación en tampón fosfato de sodio 0,2 M pH 7,2, seroalbúmina de bovino 1 % p/v, SDS 0,7 % p/v, EDTA 1 mM, durante una hora a 60°C. La hibridación se realizaba en la misma solución, que contenía además aproximadamente 20-40 millones de cpm de una sonda radiactiva. La hibridación se realizaba durante 16 a 20 hr a 60°C. Posteriormente los filtros se lavaban dos veces en tampón SSC x 2, SDS 0,1 % a 42°C durante 30 min, una vez en SSC x 0,1, SDS 0,1 % durante 10 min a 50°C y una vez en la misma solución a 55°C por 10 min. Las bandas de hibridación se revelaron mediante autorradiografía de los filtros en películas Kodak XA-5.

12.- PCR reverso.

Se utilizaba esta metódica para la detección de RNA de *T. ferrooxidans*.

12.1- Tratamiento de las preparaciones de RNA con DNasa I libre de RNasa.

Las preparaciones de RNA total de *T. ferrooxidans* se trataban con DNasa libre de RNasa para eliminar el DNA cromosomal bacteriano contaminante, según el siguiente protocolo: 100 µg de RNA total se incubaban con 200 U de DNasa pancreática de bovino en

50 ml de tampón Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), MgCl₂ 2 mM, KCl 50 mM, por 30 min a 37°C. Se extraía con fenol/cloroformo y se precipitaba con etanol absoluto a -20°C. El RNA se resuspendía en agua tratada con DEPC, en una concentración de 1 µg/µl.

12.2.- Síntesis de cDNA.

La preparación de RNA libre de DNA se calentaba a 85°C por 5 min y se trasladaba a hielo para obtener el RNA desnaturado. La reacción de síntesis de cDNA se realizaba en 20 µl de una solución que contenía 1 µg del RNA desnaturado, Tris-HCl 20 mM (pH 8,4), KCl 50 mM, MgCl₂ 6 mM, dATP, dCTP, dGTP y dTTP, cada uno en una concentración de 1 mM, Inhibidor de RNasa derivado de placenta humana 1 U/µl y Transcriptasa Inversa del virus de la leucemia de Moloney de ratón, 200 U. En los experimentos realizados para detectar el mRNA del gen *tyrZ* se utilizaba como partidor para la síntesis de cDNA el oligonucleótido XA-2, 1 pmol/µl. En los experimentos que se realizaron para estudiar la posible cotranscripción del gen *tyrZ* y del operón ribosomal *rnrT2*, se utilizaba el oligonucleótido L-rnrT2, 1 pmol/µl. La mezcla se incubaba por 60 min a 37°C y luego por 5 min a 85°C para detener la reacción de polimerización.

12.3.- Amplificación de cDNA mediante la Reacción de Polimerización en Cadena (PCR).

La reacción de amplificación se realizaba en un volumen de 25 µl. La mezcla de reacción contenía tampón Tris-HCl 20 mM (pH 8,4) KCl 50 mM, MgCl₂ 1,5 mM, dATP, dTTP, dGTP, dCTP 0,2 mM cada uno, 1,25 unidades de Taq DNA polimerasa y 5 µl de la

mezcla de la reacción de síntesis de cDNA. Se agregaba 2 gotas de aceite mineral para evitar la evaporación. Las reacción se realizaba en un termociclador MJ Research PTC 100. Los productos generados se analizaban mediante electroforesis en geles de agarosa.

En los experimentos realizados con el objetivo de detectar el mRNA del gen *tyrZ* se utilizaba los partidores XA-2 y XA-8, con el siguiente programa de amplificación: 2 ciclos de 2 min a 94°C, 1 min a 55°C y 1 min a 72°C; 28 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 55°C y 30 s a 72°C y finalmente 10 min a 72°C. La posible cotranscripción del gen *tyrZ* y del operón *rrnT2* se analizó mediante la amplificación de cDNA con pares de oligonucleotidos L-*rrnT2*/Lys1 y L-*rrnT2*/XA-8. En la amplificación con los oligonucleotidos L-*rrnT2* y Lys1 se utilizaba el siguiente programa: 2 ciclos de 2 min a 94°C, 1 min a 40°C y 1 min a 72°C; 28 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 56°C y 30 s a 72°C; 10 min a 72°C. En la amplificación de cDNA con L-*rrnT2* y XA-8 se utilizaba un programa de 2 ciclos a 3 min a 94°C, 1 min a 54°C y 1 min a 72°C; 28 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 54°C y 30 s a 72°C y finalmente 10 min a 72°C. Se analizaba los productos de amplificación por electroforesis en un gel de agarosa en tampón TBE.

13.- Extensión del partidor.

Se utilizó la metódica de extensión de un partidor para la identificación del extremo 5' del mRNA del gen *tyrZ* y del operón ribosomal *rrnT2*, de acuerdo al protocolo descrito en Sambrook y cols. (1989), con modificaciones. 100 ug de RNA total de *T. ferrooxidans* y 3-5 pmoles del oligonucleótido PETyrZ marcado con [³²P]PO₄ en el extremo 5' (8 x 10⁶ cpm) se precipitaban con etanol. La mezcla se resuspendía en 10 µl de tampón Tris-HCl 50 mM (pH

8,3), MgCl₂ 6 mM, KCl 100 mM. Se incubaba por 10 min a 85°C para desnaturar los ácidos nucleicos y dos horas a 52°C para permitir la hibridación del oligonucleótido al RNA. La reacción de síntesis de cDNA se realizaba incubando los ácidos nucleicos a 37°C por 1 hora en 20 µl de una solución que contenía Tris-HCl 50 mM (pH 8,3), MgCl₂ 6 mM, KCl 100 mM, DTT 5 mM, cada uno de los dNTP en una concentración de 1 mM, Inhibidor de ribonucleasa derivado de placenta humana 1 U/µl y 5 unidades de transcriptasa inversa del virus de la mieloblastosis de aves. La etapa de síntesis se repetía dos veces más, para lo cual la mezcla se calentaba por 5 min a 90°C, se agregaba transcriptasa inversa 1 U/µl y se incubaba por 30 min a 37°C. Luego a la mezcla se agregaba 20 µg de RNasa A libre de DNasa, se incubaba por 15 min a 37°C y se extraía con una mezcla 1:1 de fenol y cloroformo. Los ácidos nucleicos se precipitaban con etanol en presencia de 1 µg de DNA de espermio de salmón desnaturado. Finalmente el cDNA se resuspendía en 6 µl de tampón TE y 4 µl de solución de carga para geles de poliacrilamida desnaturantes (formamida 80 %, EDTA 10 mM pH 8, xilen cianol 1 mg/ml, azul de bromo fenol 1 mg/ml). Las muestras se analizaban en un gel de poliacrilamida al 6 % en presencia de urea 8 M.

14.- Adaptación de *T. ferrooxidans* a la presencia de tirosina en el medio de cultivo.

La adaptación se realizó mediante trasposos sucesivos de bacterias cultivadas en tetracionato con tirosina 4 mM que se encontraban en la fase temprana de la curva de crecimiento exponencial (4×10^8 cél/ml) a tetracionato/tirosina 4 mM., en una proporción del 1 ml de células por 100 de cultivo.

15.- Análisis del efecto de hidroxamato de tirosina en el crecimiento de *T. ferrooxidans*.

Se analizó el efecto de hidroxamato de tirosina en la proliferación de *T. ferrooxidans* en bacterias adaptadas a tirosina. Las bacterias se cultivaban en medio tetrionato con tirosina hasta la mitad de la curva de crecimiento exponencial. Se colectaban mediante centrifugación y se lavaban dos veces por resuspensión en medio tetrionato. Se resuspendían en medio tetrionato con tirosina 4 mM (control) o en tetrionato con hidroxamato de tirosina en concentraciones variables. Los cultivos se incubaban a 30°C con agitación y se tomaba muestras del cultivo a intervalos de 12-20 horas para cuantificar las células por ml por conteo directo al microscopio.

16.- Efecto de tirosina hidroxamato en la actividad tirosil tRNA sintetasa de *T. ferrooxidans*.

Las bacterias se cultivaban en medio tetrionato con tirosina hasta la mitad de la fase exponencial de la curva de crecimiento. Se colectaban mediante centrifugación y se lavaban dos veces por resuspensión en medio tetrionato. Se resuspendían en medio tetrionato con tirosina 4 mM (control) o en tetrionato con hidroxamato de tirosina 2 mM a una concentración de 1×10^8 cél/ml. Las bacterias se colectaban por centrifugación después de 22 horas de incubación a 30°C, se lavaban con tampón Tris-HCl 50 mM pH 8, 2-mercaptoetanol 20 mM. Los extractos libres de células se preparaban por el protocolo descrito y se determinaba la actividad tirosil tRNA sintetasa.

RESULTADOS

I.- Identidad del gen *tyrZ*.

Mediante el análisis de la secuencia del DNA localizado río arriba del operón ribosomal *rrnT2* de *T. ferrooxidans* se detectó un marco de lectura que codificaba para una proteína de aproximadamente 40 kDa (Salazar y cols., 1989; Fig. 4). Por comparación de la secuencia de aminoácidos deducida de este marco de lectura con la de proteínas conocidas, se observó que éste codificaba para una tirosil tRNA sintetasa similar al producto del gen *tyrZ* de *B. subtilis* (Fig. 5; Glaser y cols., 1991). Para confirmar la identidad de este gen de *T. ferrooxidans*, se procedió a caracterizar funcionalmente al producto codificado. Con este fin se utilizó la cepa mutante de *E. coli*, HB2109 (Bedouelle y Winter, 1986), que presenta una mutación en el gen que codifica para la tirosil tRNA sintetasa bacteriana (*tyrS*), que le otorga termosensibilidad a la enzima. Las bacterias mutantes son capaces de crecer a 30°C, pero no a 42°C. La cepa HB2109 se transformó con el DNA del plasmidio pTR-1 (Fig 7), que contiene el gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans* (Salazar y cols. 1989) o con el vector pBR322 y se analizó el crecimiento bacteriano en placas de medio LB/ampicilina. Los resultados (Tabla 2) mostraron que las bacterias transformadas con pTR-1 recuperaron la capacidad de crecer a la temperatura restrictiva (42°C), aunque más lentamente que las transformadas con el

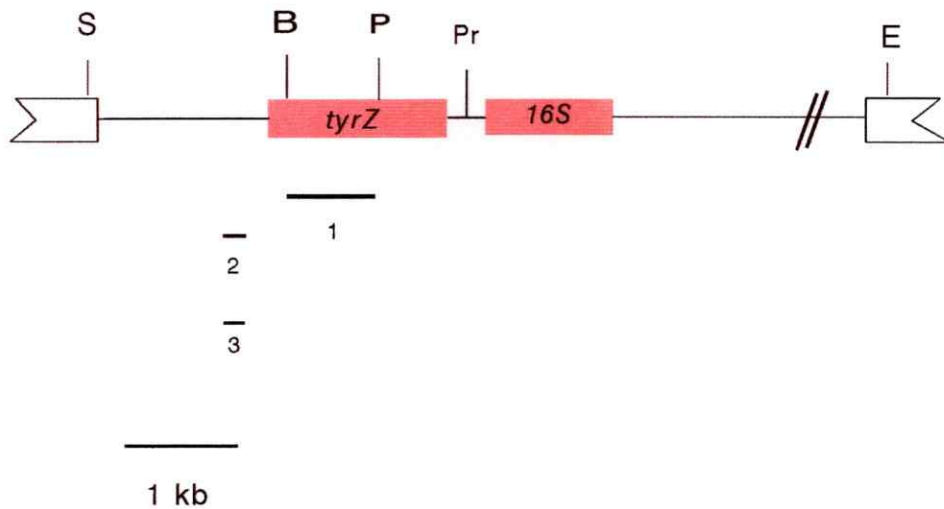


Fig. 7.- Representación esquemática del plasmidio pTR-1. Las cajas blancas representan al vector pBR322. Las cajas en color representan las regiones codificantes de los genes *tyrZ* y del rRNA *16S*. La línea negra representa al DNA genómico de *T. ferrooxidans*. Las barras bajo la figura señalan los fragmentos que se utilizaron como sondas en experimentos de hibridación. 1: Sonda BamHI/PstI; 2, sonda de DNA de la región 5' no codificante de *tyrZ*; 3, sonda de RNA preparada por transcripción *in vitro* de la región 5' no codificante. B, BamHI; P, PstI, E, EcoRI; S, Sal I. Pr, promotor ribosomal.

Tabla 2

PLASMIDIO	CARACTERISTICA	TEMP. DE CRECIMIENTO	
		30°C	42°C
—	—	+++	—
pBR322	vector sin inserto	+++	—
pTR-1	<i>tyrZ</i> de <i>T. ferrooxidans</i>	+++	+++
pTyr	<i>tyrS</i> de <i>E. coli</i>	++++	++++

Complementación de una mutación termosensible en el gen *tyrS* de *E. coli* HB2109 por el gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans*. Las células de *E. coli* se transformaron por el método del CaCl₂ con los plasmidios que se indica y se cultivaron en placas a 30 o 42° C. Se analizó el crecimiento bacteriano a través del tiempo. Símbolos utilizados: +++, crecimiento en 14 a 16 h; +, crecimiento en 24 h; —, no hubo crecimiento en 48 h.

plasmidio pTyr, que contenía el gen *tyrS* de *E. coli* (Barker y cols., 1982). Por el contrario, las bacterias transformadas con el vector pBR322 no crecieron a 42°C. Estos resultados indicaron que el producto del gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans* es capaz de complementar la mutación en el gen *tyrS* de *E. coli* HB2109, y por lo tanto *tyrZ* codifica para una tirosil tRNA sintetasa que es funcional en *E. coli*.

Se midió actividad de tirosilación de tRNA total en extractos crudos preparados a partir de *E. coli* HB2109 transformada con el plasmidio pTR-1. Se usó como sustrato tRNA total de *E. coli*. Las bacterias se cultivaron a 34°C hasta una D.O. a 600 nm de 0,4, se transfirieron a 42°C por dos horas, se colectaron y se preparó los extractos celulares en los que se midió actividad tirosil tRNA sintetasa. Como se observa en la Tabla 3, la actividad enzimática presente en los extractos de bacterias mutantes transformadas con pBR322 e incubadas a 42°C fue muy inferior a la de las mismas bacterias incubadas a 34°C, debido al carácter termosensible de la mutación en *tyrS*. Este control permitió atribuir la actividad tirosil tRNA sintetasa detectada en los extractos de *E. coli* HB2109 transformada con pTR-1 e incubada a 42°C, al producto del gen *tyrZ* presente en pTR-1.

Se observó en estos experimentos que las bacterias transformadas con pTR-1 e incubadas a 42°C tenían menor actividad tirosil tRNA sintetasa codificada por *tyrZ* que las que fueron incubadas a 34°C. Es posible que este hecho se deba a cierto grado de desnaturación térmica de la tirosil tRNA sintetasa de *T. ferrooxidans*.

De los dos experimentos anteriores se dedujo que el gen *tyrZ* codifica para una

Tabla 3

PLASMIDIO	TEMP. DE CRECIMIENTO (°C)	ACT. ESPECÍFICA (U/mg prot.)
pBR322	34	111,1
pBR322	42	15,0
pTR-1	34	1423,0
pTR-1	42	501,0

Actividad *in vitro* de tirosil tRNA sintetasa en extractos de *E. coli* HB2109 que expresa el gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans*. La cepa HB2109 de *E. coli* se transformó con los plasmidios que se indica. Las bacterias se cultivaron en medio LBA líquido a 34°C hasta alcanzar una D. O. a 600 nm de 0,4. En este punto la mitad del cultivo se mantuvo a 34°C y el resto se transfirió 42°C. Después de dos horas de incubación, las bacterias se colectaron y se prepararon extractos crudos en los que se midió la actividad tirosil tRNA sintetasa por la incorporación de ¹⁴C-tyr en tRNA total de *E. coli*.

proteína con actividad tirosil tRNA sintetasa y que ésta es capaz de utilizar el tRNA^{tyr} de *E. coli* como sustrato para la reacción de aminoacilación por tirosina.

2.- Determinación del número de copias del gen *tyrZ* en el genoma de *T. ferrooxidans*.

En *E. coli*, los genes que codifican para aminoacil tRNA sintetetas generalmente se encuentran en copias únicas, con excepción del gen de lisil tRNA sintetasa, del que se han identificado dos copias por genoma, siendo ambas proteínas casi idénticas [85 % de identidad (Clark y Neidhardt, 1990)]. En *B. subtilis* se ha identificado sólo 14 genes de sintetetas, por lo tanto no es posible hacer una generalización con respecto al número de genes. Sin embargo, se sabe que existen dos genes que codifican para tirosil tRNA sintetasa (*tyrS* y *tyrZ*) en esa bacteria (Henkin y cols. 1992; Glaser y cols. 1991), siendo ambos productos génicos muy distintos entre sí (27 % de identidad). Se analizó la posibilidad que en el cromosoma de *T. ferrooxidans* exista más de una copia del gen *tyrZ*. Con este fin se realizaron experimentos de hibridación tipo Southern (Southern, 1975). El DNA cromosomal bacteriano se digirió con la enzima de restricción EcoRI o con una mezcla de BamHI y PstI (ver Fig. 7 para un mapa de restricción del gen *tyrZ*). Los fragmentos generados se resolvieron por electroforesis en un gel de agarosa, se transfirieron a un filtro de nylon y se hibridaron con el fragmento BamHI/PstI del plasmidio pTR-1, marcado radiactivamente con ³²P[ATP]. En ambas digestiones se observó sólo una banda de hibridación (Fig. 8), lo que indicó que existe sólo una copia

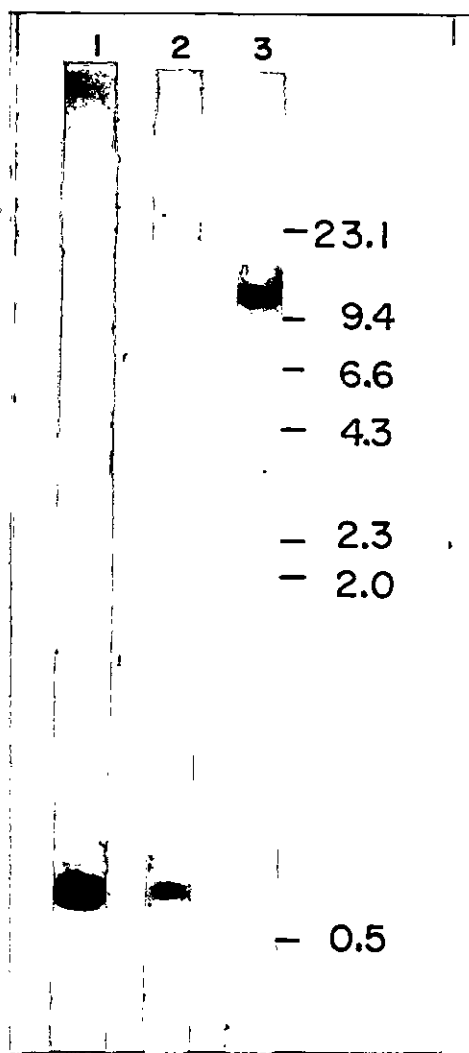


Fig. 8.- Análisis tipo Southern del DNA genómico de *T. ferrooxidans*. El DNA cromosomal de *T. ferrooxidans* se digirió con las enzimas de restricción que se indican. Los fragmentos generados se resolvieron por electroforesis en un gel de agarosa, se transfirieron por capilaridad a un filtro de Nylon y se hibridaron a una sonda específica, consistente en el fragmento BamHI/PstI de pTR-1 (ver fig 7) marcado con ^{32}P . Los fragmentos hibridados se revelaron por autorradiografía. Carril 1, plasmidio pTR-1 digerido con una mezcla de BamHI y PstI; carriles 2 y 3, DNA genómico de *T. ferrooxidans* digerido con BamHI/PstI y EcoRI, respectivamente.

del gen *tyrZ* en el cromosoma de *T. ferrooxidans*. Para investigar la existencia de un segundo gen que codifique para una tirosil tRNA sintetasa muy diferente, se realizó un ensayo de hibridación con menor estrictez para permitir la reacción de fragmentos del DNA genómico que tuvieran menor similitud de secuencia con la sonda. Sin embargo, se observó la aparición de numerosas señales de hibridación, y no fué posible discriminar entre específicas e inespecíficas (resultados no mostrados).

3. - Funcionalidad del gen *tyrZ*.

3.1.- Detección del mRNA de *tyrZ*.

El gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans* codifica para una tirosil tRNA sintetasa activa en *E. coli*. Con el fin de conocer si *tyrZ* es funcional *in vivo* se realizaron experimentos tendientes a la detección del mRNA del gen *tyrZ* en *T. ferrooxidans*. Se realizaron experimentos de hibridación tipo Northern al RNA total bacteriano (Sambrook y cols., 1989) utilizándose como sonda el fragmento BamHI/PstI de pTR-1, que contiene 680 pb de la región codificante de *tyrZ*. Los resultados de estos experimentos (Fig 9A) mostraron una banda de hibridación correspondiente a un mRNA de aproximadamente 1300-1400 bases, concordando con el tamaño esperado para el mRNA de *tyrZ*. Sin embargo, en experimentos de hibridación a RNA ribosomal purificado de *T. ferrooxidans* se observó la misma señal, indicando que la sonda BamHI/PstI hibridaba en forma

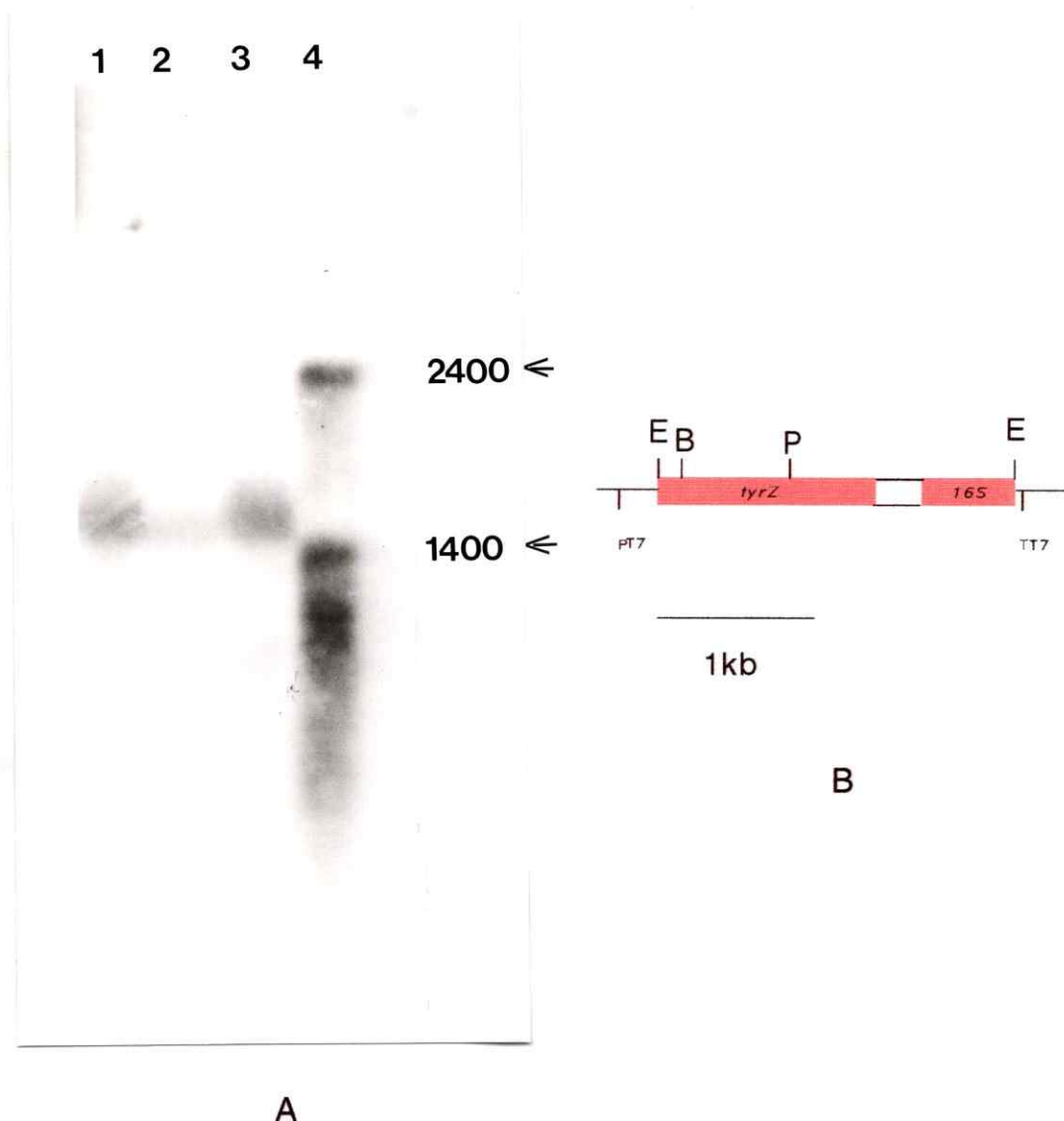


Fig. 9.- Análisis tipo Northern blot del RNA de *tyrZ*. A.-Las preparaciones de RNA total de *T. ferrooxidans* y de *E. coli*/pET56 se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa al 1 % en condiciones desnaturantes y se transfirieron a un filtro de Nylon. Posteriormente se hibridaron a una sonda radiactiva de la región interna de *tyrZ*, consistente en el fragmento BamHI/PstI de pTR-1. Carril 1, 100 μ g de rRNA de *T. ferrooxidans*; carriles 2 y 3, 10 y 100 μ g de RNA total de *T. ferrooxidans*; carril 4, RNA total de *E. coli*/pET56. Las flechas muestran los tamaños de los transcritos detectados en *E. coli*/pET56. En B se muestra un esquema parcial del plasmidio pET56. Las líneas negras representan al vector pET22b. E, EcoRI; B, Bam HI; P, PstI; P_{T7} y T_{T7}, promotor y terminador de la transcripción derivados del fago T7.

cruzada con el RNA 16S de *T. ferrooxidans* (Fig. 9A). Esta misma sonda hibridó con el gen *tyrZ* en Southern, pero no con DNA ribosomal clonado (resultado no mostrado).

Como control positivo de la hibridación de la sonda BamHI/PstI al RNA del gen *tyrZ* se utilizó RNA total preparado a partir de la cepa de *E. coli* BL-21(DE3) que contenía al plasmidio pET56. Este plasmidio se había obtenido previamente al clonar en el vector de expresión pET22b bajo la dirección del promotor del fago T7, un fragmento de DNA de *T. ferrooxidans* de 2,2 kb, que incluía la región codificante del gen *tyrZ* y 600 pb del gen de rRNA 16S (Fig. 9B) (Salazar y cols., 1994). La cepa BL-21 (DE3) de *E. coli* contiene una copia cromosomal del gen de la RNA polimerasa del fago T7, lo que permitía la sobreexpresión del RNA del fragmento clonado en pET56. Como resultado de la hibridación se observó la aparición de una banda de 2400 bases que probablemente correspondía a la transcripción del fragmento clonado completo. La segunda banda, de 1400 bases se atribuyó a hibridación con el RNA de *tyrZ*, posiblemente generado por procesamiento del transcrito más largo.

Se probó utilizar como sonda un fragmento de DNA que contenía la región 5' no codificante de *tyrZ*. Este se obtuvo por amplificación desde el plasmidio pTR-1 con los partidores TyrBC y PETyrZ (ver Fig. 10 para la identificación de la posición de alineamiento de los oligonucleótidos utilizados en esta tesis), y se marcó posteriormente con ^{32}P . Mediante la utilización de esta sonda se logró eliminar la hibridación cruzada con rRNA 16S, aunque no se detectó el RNA de *tyrZ*.

El uso de sondas de hebra simple marcadas homogéneamente se ha señalado como un procedimiento útil para aumentar la sensibilidad de la hibridación en experimentos de Northern, ya que se evita la competencia que se produce entre el RNA complementario (en el fitro) y la hebra de DNA no codificante. Por lo tanto se probó utilizar como sonda un RNA de 250 bases, correspondiente a la región 5' no codificante de *tyrZ*. Este RNA se obtuvo por transcripción *in vitro* del DNA de esta región clonado en el vector de expresión pTZ18R (ver Materiales y Métodos). En estos experimentos tampoco se detectó el mRNA de *tyrZ*. Una posible explicación para estos resultados es que los niveles del mRNA de *tyrZ* son inferiores a los niveles detectables por la metodología de Northern.

Mediante la utilización de la metodología de amplificación por PCR de cDNA sintetizado a partir de RNA total, ha sido posible detectar cantidades de RNA tan ínfimas como 1 a 10 moléculas por célula (Kawasaki, 1990). Se utilizó esta metodología para analizar la transcripción *in vivo* del gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans*. Se purificó el RNA total bacteriano y se sintetizó el cDNA por transcripción inversa, utilizando como partidor un oligonucleótido específico, complementario a la región interna de *tyrZ* (XA-2, Fig 10). El cDNA se amplificó por PCR, utilizando como partidores los oligonucleótidos XA-8 (extremo 5') y XA-2 (extremo 3'). Como se muestra en la Fig 11, la amplificación del cDNA de *T. ferrooxidans* generó un fragmento de 450 pb, igual al obtenido al amplificar el DNA de *tyrZ* desde pTR-1 con los mismos partidores. En el control realizado en ausencia de transcriptasa inversa no se observó amplificación, demostrando que el

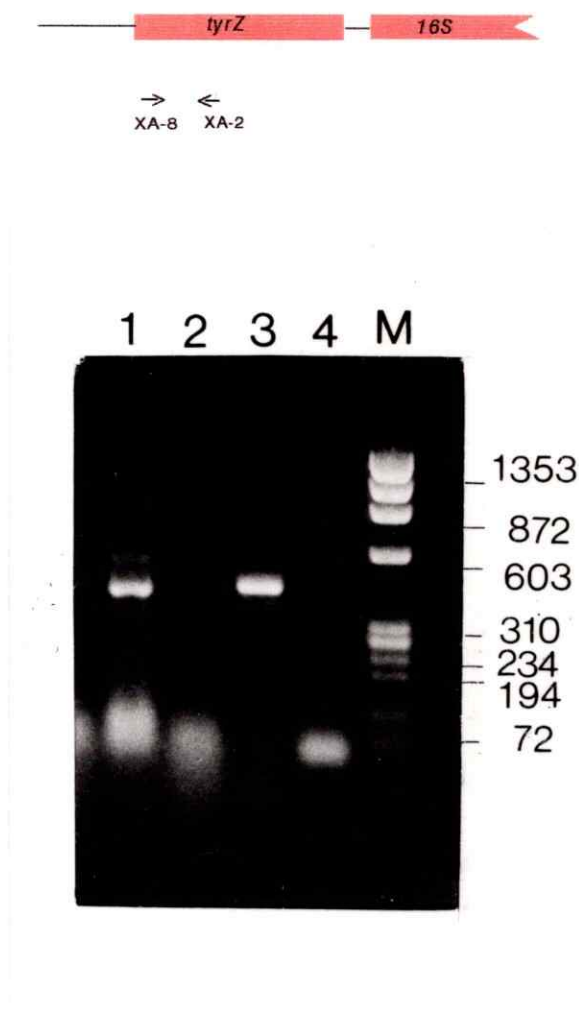


Fig. 11.- PCR de cDNA de *T. ferrooxidans*. El RNA total de *T. ferrooxidans* se sometió a transcripción inversa con el partidor XA-2 (Fig. 10) y transcriptasa inversa del virus de la amieloblastosis de aves. El cDNA se sometió a PCR utilizando partidores específicos para la región interna de *tyrZ* (XA-2 y XA-8). Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 %, en presencia de bromuro de etidio. Carril 1, 5 μ g de RNA total de *T. ferrooxidans*; en el carril 2, el ensayo se realizó en ausencia de transcriptasa inversa; carril 3, amplificado a partir del gen *tyrZ* clonado en pTR-1; carril 4, control de amplificación en ausencia de DNA. M indica marcador de tamaño molecular. En la parte superior de la figura se muestra un esquema parcial de pTR-1, con los partidores utilizados en el experimento.

fragmento amplificado de 450 pb proviene de cDNA y no de DNA genómico que pudiera estar contaminando la preparación de RNA. Estos resultados demostraron la existencia de un mRNA de *tyrZ*, indicando por lo tanto, que el gen *tyrZ* es funcional *in vivo*. La imposibilidad de detectarlo en experimentos de hibridación sugiere que los niveles de este mRNA son bajos, ya sea a causa de baja velocidad de síntesis o por una velocidad de degradación elevada.

3.2.- Determinación del extremo 5' del mRNA de *tyrZ*.

En el marco de la caracterización del mRNA del gen *tyrZ* se procedió a determinar la localización del extremo 5' del transcrito. Con este fin se utilizó la metódica de extensión del partidor (Sambrook y cols., 1989), que consistió esencialmente en la hibridación del RNA de *T. ferrooxidans* con el oligonucleótido PETyrZ (Fig. 10) marcado radiactivamente en el extremo 5', y posterior generación del cDNA por transcripción inversa. Con el objeto de detectar posibles detenciones de la transcriptasa inversa por formación de estructura secundaria en el RNA molde, el experimento se realizó a distintas temperaturas de hibridación. Los resultados (Fig. 12) fueron idénticos a las tres temperaturas ensayadas, sugiriendo que la señal observada se generó por detención de la transcriptasa inversa en el extremo 5' del mRNA. El tamaño del fragmento sintetizado por la transcriptasa inversa se determinó por comparación con fragmentos de DNA generados por una reacción de secuenciación realizada con el mismo partidor. El resultado mostró que el extremo 5' del mRNA de *tyrZ* se encontraba 350

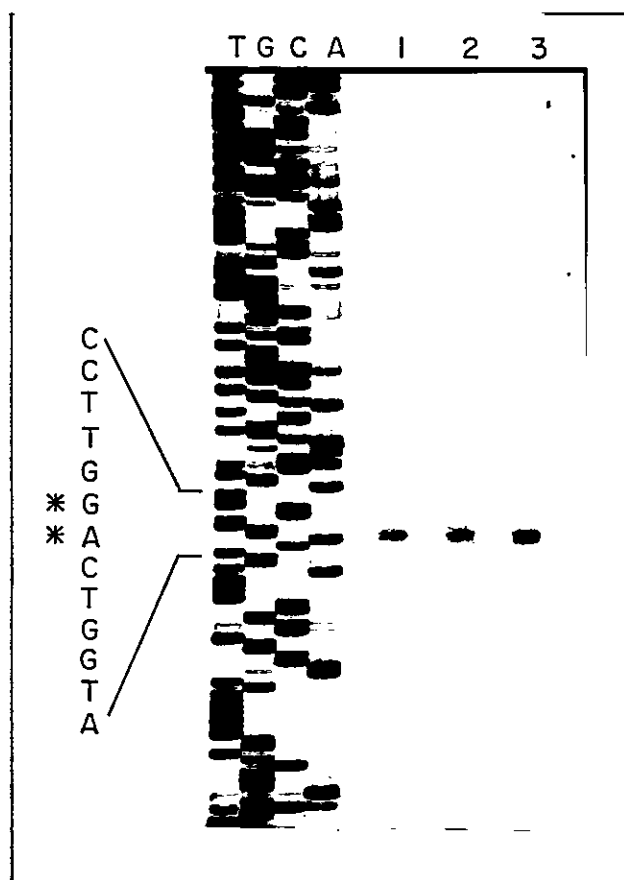


Fig. 12.- Determinación del extremo 5' del mRNA del gen *tyrZ*. El producto de la transcripción inversa del RNA total de *T. ferrooxidans* con el partidor PETyrZ (ver fig 10), se analizó en un gel de poliacrilamida al 6%, en condiciones desnaturalantes. El alineamiento del partidor al RNA se realizó a 50°C (carril 1), 55°C (carril 2) y 60°C (carril 3). Se usó como marcador de tamaño un ensayo de secuenciación del gen utilizando el mismo partidor.

bases río arriba del supuesto sitio de inicio de la traducción del gen. Alternativamente, es posible que el extremo 5' que se detectó en estos experimentos no corresponda al sitio de inicio de la transcripción, sino a un sitio de procesamiento de un transcrito precursor del mRNA de *tyrZ*.

Todos los genes de aminoacil tRNA sintetasas de bacterias se transcriben a partir de promotores asociados al factor σ^{70} . En una búsqueda de posibles secuencias promotoras de la transcripción, se analizó en el DNA la región aledaña al extremo 5' del RNA de *tyrZ*. Aproximadamente a 11 y 34 pb. río arriba del extremo 5' del RNA se identificó dos elementos de secuencia que comparten cierto grado de similitud con las secuencias de consenso de promotores (Fig. 18) A pesar que la similitud es baja, no se descarta que efectivamente correspondan a elementos de un promotor, ya que se ha descrito que, en general, los promotores de genes de aminoacil tRNA sintetasas escapan del consenso característico (Putzer y cols., 1995).

3.3.- Cotranscripción de *tyrZ* y el operón *rrnT2*.

El gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans* está localizado adyacente al extremo 5' del operón ribosomal *rrnT2*. El gen *tyrZ* y el gen del rRNA 16S están separados por aproximadamente 100 pb (Fig. 4; Salazar y cols., 1994). La secuencia de la región que separa ambos genes no presenta los elementos de secuencia característicos de terminadores de la transcripción independientes del factor rho. Por lo tanto, se analizó la posibilidad que ambos genes se co-transcriban. Para detectar un posible RNA producto

de la cotranscripción, se empleó la metódica de amplificación por PCR de cDNA de *T. ferrooxidans*. Tanto para la síntesis de cDNA como para la amplificación se utilizaron partidores específicos, complementarios a la región espaciadora entre *tyrZ* y el gen *16S*. Para la transcripción inversa se utilizó el oligonucleótido L-rrnT2, complementario a la región líder del operón ribosomal; para la amplificación del cDNA se usó L-rrnT2 y el oligonucleótido Lys1, complementario al extremo 3' del gen *tyrZ*. Los resultados mostraron la amplificación de un cDNA de aproximadamente 190 pb, igual al obtenido al amplificar el DNA de pTR-1 con los mismos partidores (Fig. 13), sugiriendo que ambos genes se cotranscriben.

Para saber si el RNA detectado en el experimento anterior se iniciaba río arriba de *tyrZ*, el mismo cDNA se analizó por PCR con los oligonucleótidos XA-8 (complementario al extremo 5' del gen *tyrZ*) y L-rrnT2; sin embargo, no se observó amplificación (Fig. 13, carril 3). Este resultado sugirió que el RNA detectado en el experimento de amplificación con los oligonucleótidos Lys1 y L-rrnT2 no correspondía a un transcrito del gen *tyrZ* completo. Se puede suponer que es producto de la iniciación de la transcripción en algún punto de la región interna de *tyrZ*, río arriba del sitio de alineamiento del partidor Lys-1.

Para evaluar la posibilidad de la existencia de un transcrito que se inicie en un promotor en la región interna de *tyrZ* y que abarque al gen del rRNA 16S, se procedió a identificar el extremo 5' del transcrito primario del operón *rrnT2*. Con este fin se empleó la metódica de extensión del oligonucleótido L-rrnT2, utilizado como partidor para la

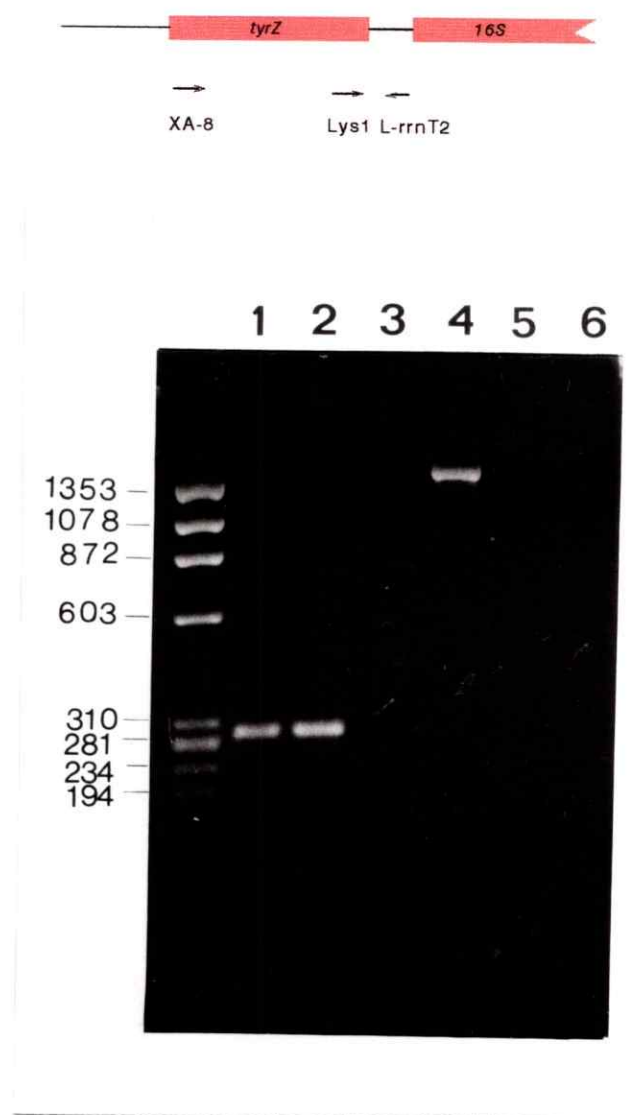


Fig. 13.- PCR de cDNA de la región espaciadora de los genes *tyrZ* y del rRNA *16S*. El RNA total de *T. ferrooxidans* se sometió a transcripción inversa con el partidor L-rrnT2. El cDNA se amplificó por PCR utilizando como partidores los oligonucleótidos L-rrnT2 y Lys 1 (carriles 1 y 2) ó L-rrnT2 y XA-8 (carriles 3 y 4). Los productos de amplificación se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa al 1,5 % en presencia de bromuro de etidio. Carriles 1 y 3, amplificación del cDNA de *T. ferrooxidans*; carriles 2 y 4, amplificación del DNA de pTR-1. En el carril 5, el ensayo se realizó en ausencia de transcriptasa inversa; carril 6, amplificación en ausencia de DNA. En la parte superior de la figura se muestra un esquema parcial de pTR-1, con los partidores utilizados en el experimento.

transcripción inversa del RNA. Los fragmentos de cDNA generados se analizaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida y posterior autorradiografía. Se observó la formación de cDNAs de 130, 169 y 300 nucleótidos (Fig. 14). El cDNA de 130 nucleótidos indica que el extremo 5' de RNA está cercano a las cajas -10 y -35 de un promotor de la transcripción, descrito con anterioridad a partir del análisis de la secuencia del DNA de la región líder del operón *rrnT2* (Takamiya y cols., 1990). Por esta razón, es muy probable que el extremo 5' revelado por esta señal autorradiográfica corresponda realmente a un sitio de inicio de la transcripción.

No se detectaron secuencias características de promotores de la transcripción en el DNA en las regiones cercanas a los extremos 5' correspondientes a las bandas de 169 y de 300 nucleótidos. Alternativamente, se puede pensar que corresponden a extremos generados por procesamiento de un transcrito precursor de los rRNA. Aunque no fue posible discriminar experimentalmente entre estas alternativas, la generación de la banda de 300 nucleótidos es un indicio claro de la existencia de un RNA que contiene la región espaciadora entre *tyrZ* y el operón *rrnT2*, cuya transcripción se inicia probablemente dentro de la región codificante del gen *tyrZ*.

En la figura 15 se muestra un esquema que resume la información obtenida sobre la co-transcripción de *tyrZ* y el gen de RNA 16S mediante los experimentos de amplificación de cDNA y extensión del partidador.

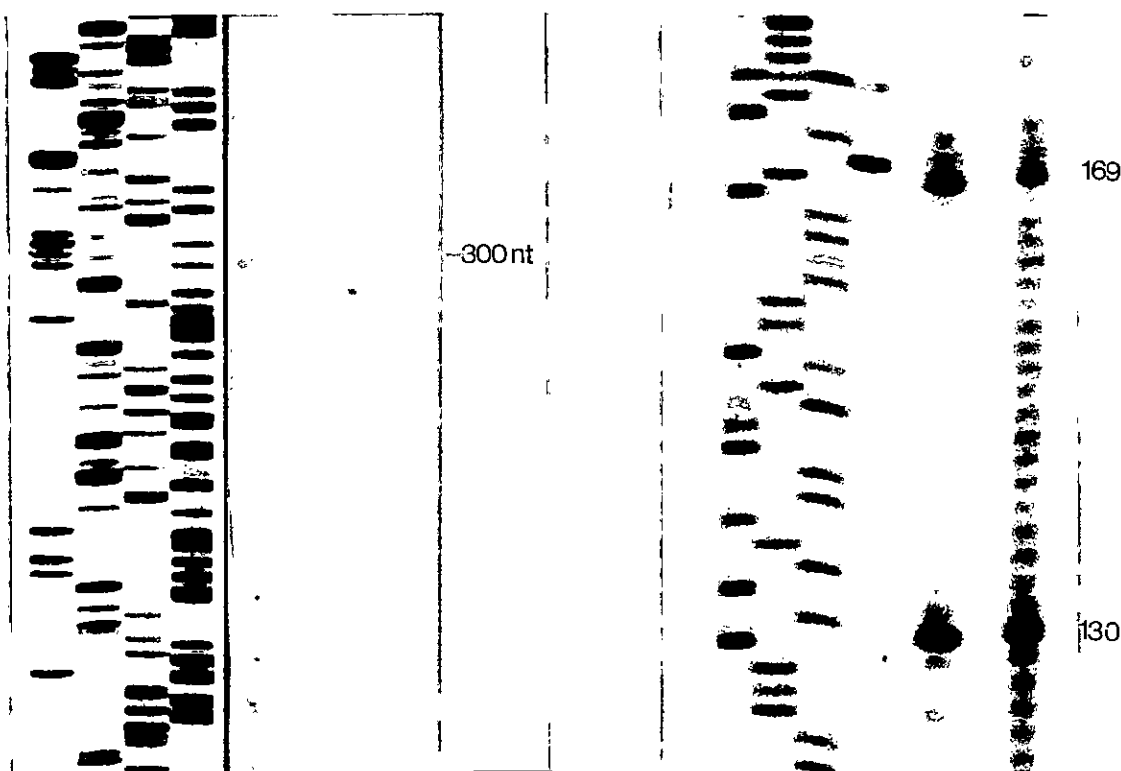


Fig. 14.- Análisis del extremo 5' del precursor del rRNA del operón *rnrT2*. El producto de la transcripción inversa del RNA total de *T. ferrooxidans* con el partidor L-rnrT2 (ver fig 10) marcado en el extremo 5' con ^{32}P , se analizó en un gel de poliacrilamida al 6%, en condiciones desnaturantes. El alineamiento del partidor al RNA se realizó a 52°C (carril 1) y 60°C (carril 2). En las fotos se muestra la autorradiografía de un gel dividido en dos partes debido a la extensión del gel. Se usó como marcador de tamaño molecular un ensayo de secuenciación.

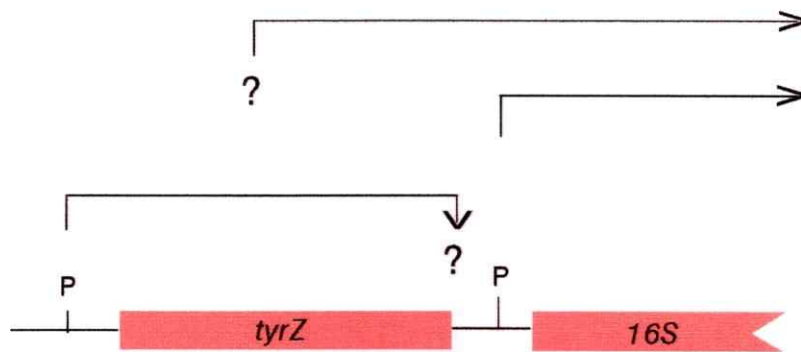


Fig. 15.- Cotranscripción del gen *tyrZ* y del gen de rRNA 16S. En este esquema se muestran los posibles transcritos (flechas horizontales sobre la figura) generados a partir de los promotores (P) de *tyrZ* y del operón *rrnT2*, deducidos de experimentos de extensión del partidor y de la amplificación por PCR de cDNA de *T. ferrooxidans*. Los signos de interrogación se usaron para indicar la existencia de un promotor ribosomal en una posición no determinada de la región interna de *tyrZ*, y para señalar el extremo 3' no identificado del mRNA de *tyrZ*.

4.- Efecto del nivel de aminoácidos en la expresión del gen *tyrZ*.

En bacterias, la expresión de las aminoacil tRNA sintetetas se regula específicamente por los niveles del aminoácido correspondiente (Rev. en Putzer y cols., 1995). En condiciones de hambruna de un aminoácido individual, el nivel de la aminoacil tRNA sintetasa correspondiente aumenta en una magnitud que varía dependiendo de la sintetasa y del microorganismo en estudio. Por el contrario, la expresión se reprime en condiciones de abundancia del aminoácido. Para investigar la posibilidad que la expresión de la tirosil tRNA sintetasa de *T. ferrooxidans* se regule de acuerdo a los niveles de tirosina, se utilizó un análogo estructural de este aminoácido, hidroxamato de tirosina (HT). Se ha demostrado que el uso de análogos de aminoácidos es una herramienta útil para el estudio de los mecanismos de regulación de la expresión de aminoacil tRNA sintetetas y del metabolismo de los aminoácidos en general. (Nass y Neidhardt, 1967; McGinnis y Williams 1971, Tosa y Pizer, 1971; Jenal y cols., 1993). En el caso específico de los hidroxamatos de aminoácido, estos compuestos actúan como inhibidores de las sintetetas, al competir con el aminoácido en la unión a la enzima. Esta competencia provocaría la disminución del nivel de aminoacil tRNA, generando una situación artificial de carencia del aminoácido, la que sería reconocida en forma específica como una señal para la inducción de la expresión de la enzima correspondiente.

4.1.- Efecto de hidroxamato de tirosina en la actividad enzimática *in vitro* de la tirosil tRNA sintetasa de *T. ferrooxidans*.

Para investigar la posible inhibición de la actividad tirosil tRNA sintetasa de *T. ferrooxidans* por hidroxamato de tirosina, las bacterias se cultivaron en medio tetracionato. Se preparó extractos crudos en los que se determinó actividad enzimática en presencia de concentraciones del análogo que variaron entre 0,1 y 2,0 mM. De los resultados obtenidos (Tabla 4) se deduce que el análogo inhibe *in vitro* a la tirosil tRNA sintetasa de *T. ferrooxidans*.

4.2.- Adaptación de *T. ferrooxidans* a la presencia de tirosina en el medio de cultivo.

Se han descrito efectos de inhibición del crecimiento de *T. ferrooxidans* por aminoácidos (Sugio y cols., 1987). Por lo tanto, antes de iniciar el estudio del efecto de hidroxamato de tirosina en la proliferación de *T. ferrooxidans*, se estudió el efecto de incluir tirosina en los cultivos.

Se cultivó *T. ferrooxidans* en medio tetracionato con tirosina en concentraciones entre 1 y 4 mM. Se observó que al aumentar la concentración de tirosina en el medio se producía una extensión del período de latencia, después del cuál las bacterias recuperaban la capacidad de proliferar. El tiempo de generación también se afectó por la presencia del aminoácido, aumentando a medida que se incrementaba la concentración de tirosina en el medio de cultivo (Fig. 16A, Tabla 5). Este hecho muestra que existe un

Tabla 4

[HIDROXAMATO DE TIROSINA] (mM)	ACTIVIDAD ENZIMÁTICA* (Unidades)	ACTIVIDAD RESIDUAL (%)
0	104	100
0,1	100	96,9
0,5	68,5	65,8
2,0	26,7	25,7

Inhibición de la actividad tirosil tRNA sintetasa por hidroxamato de tirosina. *T. ferrooxidans* se creció en medio tetrationato hasta la mitad de la fase exponencial de la curva de crecimiento. Las bacterias se colectaron y se prepararon extractos crudos. Se midió actividad de aminoacilación del tRNA^{tyr} de *E. coli* por ¹⁴C-tyr en presencia de concentraciones variables de hidroxamato de tirosina. * Se define una unidad de actividad enzimática como la cantidad de enzima que transfiere un 1 pmol de tirosina a 37°C en 5 min.

Efecto de tirosina en el crecimiento de *T. ferrooxidans*.

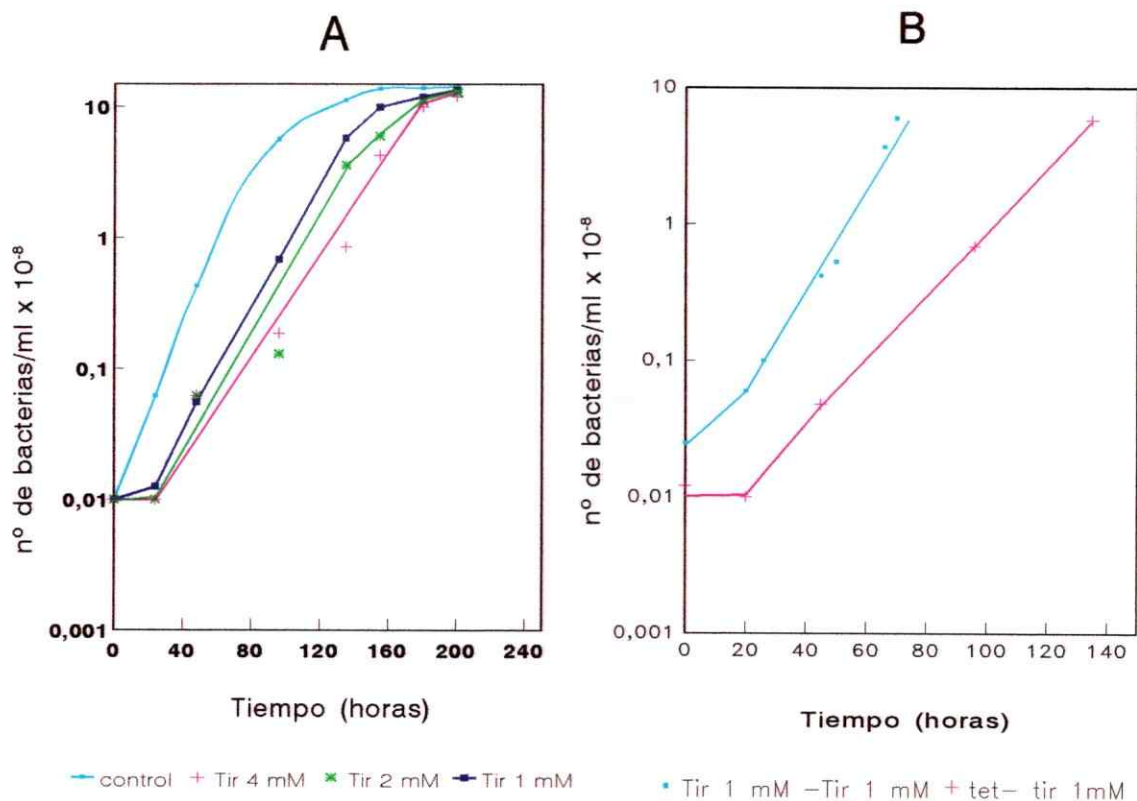


Fig. 16.- Efecto de tirosina en el crecimiento de *T. ferrooxidans*.

A.- Inhibición de la proliferación de *T. ferrooxidans* por tirosina. Las bacterias mantenidas en medio tetrionato se incubaron a 30°C, en medio suplementado con tirosina en distintas concentraciones por el tiempo que se indica. Se determinó el número de bacterias/ml por conteo directo al microscopio. **B -** Adaptación de *T. ferrooxidans* a tirosina en el medio de cultivo. Las bacterias se cultivaron en tetrionato (—+—) o en tetrionato con tirosina 1 mM (—■—) y posteriormente se traspasaron a medio tetrionato/tirosina 1 mM. Se registró el crecimiento bacteriano, el que se muestra en la figura.

Tabla 5

[Tyr] mM	k (h ⁻¹)	t _g (h)
0	0,06	11,5
1	0,055	12,6
2	0,047	14,7
4	0,036	19,2

Efecto de tirosina sobre la velocidad de proliferación de *T. ferrooxidans*. Las bacterias se cultivaron en medio tertationato o en medio tetratonato suplementado con concentraciones variables de L-tirosina. Se midió el crecimiento bacteriano mediante el conteo directo al microscopio. * La constante de crecimiento (k) se determinó a partir de la pendiente de la curva de crecimiento semilogarítmica, representada matemáticamente por la ecuación $\ln x_t = \ln x_0 + kt$, en que x corresponde al n° de bacterias/ml de cultivo, t al tiempo de cultivo en horas y k a la constante de velocidad de crecimiento. El tiempo de generación (t_g) se calculó como el cociente entre ln2 y k.

proceso de inhibición del crecimiento por la presencia de tirosina en el cultivo. Al traspasar estas bacterias a un medio fresco con tirosina 1 mM, el período de latencia disminuyó a valores similares a los exhibidos por un cultivo de bacterias en ausencia de tirosina (Fig. 16B), y el tiempo de generación de las bacterias fué incluso mayor que el exhibido por las bacterias cultivadas en ausencia de tirosina (8 horas). En experimentos posteriores se observó que la actividad específica de la tirosil tRNA sintetasa en extractos crudos de *T. ferrooxidans* cultivado en medio tetrionato con tirosina 4 mM fué levemente inferior a la actividad específica de las bacterias cultivadas sin el aminoácido.

Considerando estos resultados, en los experimentos realizados para medir el efecto de hidroxamato de tirosina en la proliferación y en la actividad de la tirosil tRNA sintetasa de *T. ferrooxidans* se utilizaron bacterias que habían sido previamente adaptadas a tirosina (por lo tanto eran resistentes a la inhibición por el aminoácido). En estas condiciones, se esperaba poder distinguir el efecto específico de HT de un efecto inhibitorio general en la proliferación por los aminoácidos.

4.3.- Efecto de hidroxamato de tirosina en la proliferación de *T. ferrooxidans*.

Para investigar el efecto de HT sobre la proliferación de *T. ferrooxidans*, las bacterias adaptadas a tirosina se cultivaron en medio tetrionato con tirosina 4 mM hasta la mitad de la fase exponencial de la curva de crecimiento. Posteriormente las células se colectaron, se lavaron para retirar la tirosina del medio, se resuspendieron en medio tetrionato/tirosina 4 mM (control) o en medio tetrionato que contenía HT 2 o 4 mM y

se continuó la incubación. Con HT 2 mM se observó inhibición de la proliferación por al menos 22 horas, después de lo cual las bacterias retomaron el crecimiento a una velocidad levemente inferior a la del control (Fig. 17A). En la Tabla 6 se muestra el efecto inhibitorio de diferentes concentraciones de HT. Con HT 4 mM el crecimiento se detuvo totalmente, efecto que se mantuvo por al menos 130 horas después del traspaso. Cuando las bacterias incubadas en HT 4 mM se cambiaron a un medio que contenía una mezcla de HT 4 mM y tirosina 1 mM (Fig. 17B), recuperaron la capacidad de proliferar, mostrando que tirosina es capaz de desplazar a HT del sitio en que actúa para inhibir la proliferación de *T. ferrooxidans*.

En conjunto, estos resultados demostraron que HT inhibe la proliferación de *T. ferrooxidans* en una magnitud que depende de la concentración del análogo en el medio de cultivo. Probablemente este efecto inhibitorio es el resultado de la interferencia del HT en la utilización de tirosina como sustrato de la tirosil tRNA sintetasa de *T. ferrooxidans*. La inhibición de esta enzima generaría una condición de carencia artificial de tirosina. Se utilizó este sistema experimental para estudiar el efecto de la carencia de tirosina en la expresión de la tirosil tRNA sintetasa de *T. ferrooxidans*.

4.4.- Efecto de la presencia de hidroxamato de tirosina en el medio de cultivo sobre la actividad de la tirosil tRNA sintetasa en *T. ferrooxidans*.

Para estudiar el efecto en la carencia artificial de tirosina en la expresión del gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans*, se midió la actividad específica de la tirosil tRNA sintetasa en

Inhibición de la proliferación de *T. ferrooxidans* por hidroxamato de tirosina

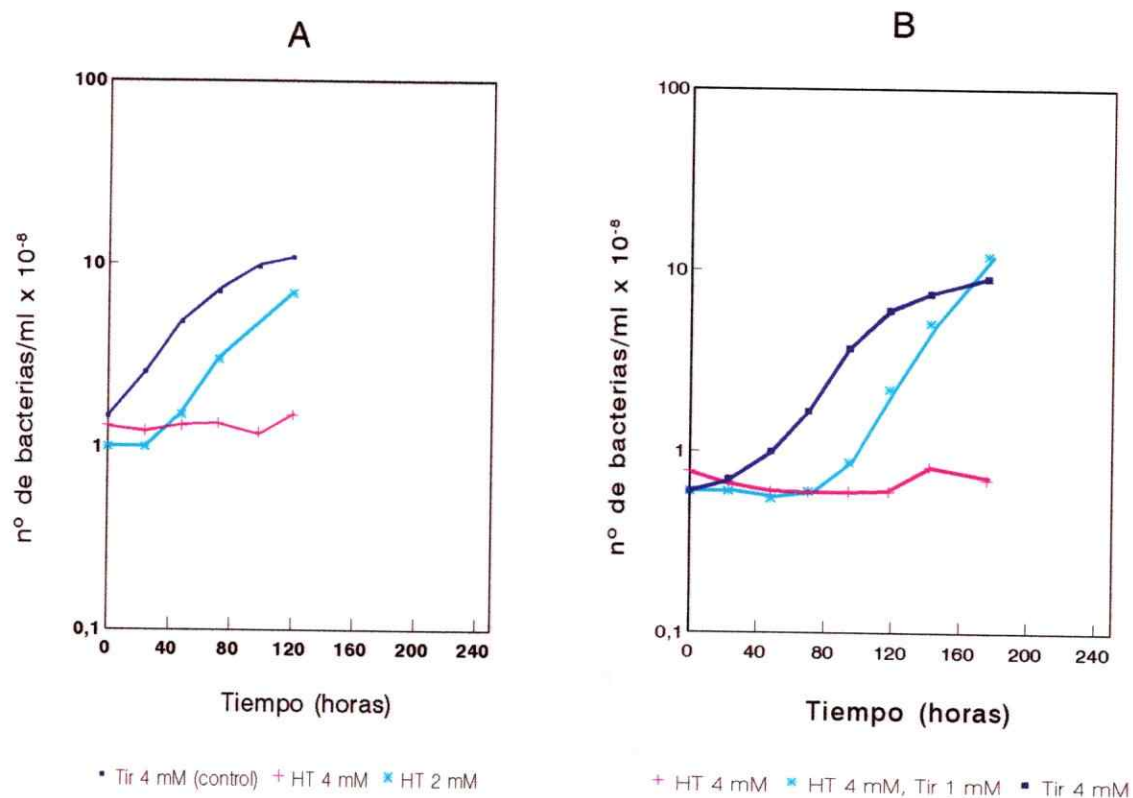


Fig. 17.- Inhibición de la proliferación de *T. ferrooxidans* por hidroxamato de tirosina.
A.- Las bacterias se cultivaron en medio tetrionato/tirosina 4 mM hasta la mitad de la fase exponencial de la curva de crecimiento. Las células se colectaron, se lavaron y se resuspendieron a tiempo cero en los medios que se indica. Se incubó a 30°C y se tomaron alícuotas a diferentes tiempos, en las que se determinó el número de bacterias/ml.
B.- Reversión por tirosina del efecto inhibitorio de hidroxamato de tirosina. Las bacterias que habían sido cultivadas en tetrionato con hidroxamato de tirosina 4 mM por al menos 48 horas, se colectaron por centrifugación y se lavaron. A tiempo cero se resuspendieron en los medios que se indica y se incubaron a 30°C.

Tabla 6

CONDICION DE CULTIVO	k (h^{-1})	t_g (h)
Tyr 4 mM	0,05	13,8
HT 2,5 mM	0,037	18,7
HT 3,0 mM	0,023	30,1
HT 4,0 mM	0,00	∞

Inhibición de la proliferación de *T. ferrooxidans* por hidroxamato de tirosina. Las bacterias se cultivaron en medio tetrionato/tirosina 4 mM hasta la mitad de la fase exponencial de la curva de crecimiento. Las células se colectaron, se lavaron y se resuspendieron en los medios que se indica. Se incubó a 30°C y se midió el crecimiento bacteriano mediante conteo directo al microscopio. La constante de crecimiento (k) y el tiempo de generación (t_g) se determinaron como se indica en la tabla 5.

extractos crudos de las células cultivadas en presencia del análogo. Las bacterias cultivadas en tirosina 4 mM en la mitad de la fase exponencial de la curva de crecimiento se traspasaron a un medio que contenía HT 2 mM ó tirosina 4 mM como se describe en Métodos. Se colectaron a las 22 horas de incubación, se prepararon extractos celulares y se midió actividad tirosil tRNA sintetasa. Los resultados (Tabla 7) mostraron que después de las 22 horas en presencia del análogo, la actividad específica de tirosil tRNA sintetasa de las bacterias aumentó 6,6 veces con respecto a la actividad específica en las bacterias cultivadas en tirosina 4 mM. Este efecto fué transitorio, ya que no se observó al prolongar la incubación de las bacterias en HT 2 mM por 8 horas más (datos no mostrados).

5.- Un mecanismo posible de regulación de la expresión del gen *tyrZ*.

Se analizó la secuencia de nucleótidos de la región correspondiente al líder del mRNA de *tyrZ*, localizada entre el sitio de inicio de la transcripción y el codón de inicio de la traducción del gen. Mediante este análisis, realizado a través de los programas computacionales HAIRPIN y RNAFOLD, se identificó la presencia de elementos estructurales característicos del sistema de regulación por terminación/antiterminación de bacterias Gram (+). Estos hallazgos sugieren que la expresión del gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans* se regula por un mecanismo similar de terminación y antiterminación de la transcripción.

Tabla 7

CONDICION DE CULTIVO	ACTIVIDAD ESPECIFICA (U/mg prot)	AUMENTO RELATIVO
tirosina 4 mM (control)	13.457	1,0
hidroxamato de tirosina 2 mM	88.612	6,6

Efecto de hidroxamato de tirosina sobre la actividad de la tirosil tRNA sintetasa de *T. ferrooxidans* cultivado en presencia del análogo. Las bacterias adaptadas a la presencia de tirosina 4 mM se cultivaron en tetracionato con tirosina 4 mM hasta alcanzar la mitad de la fase exponencial de la curva de crecimiento. En ese punto se colectaron y se lavaron para eliminar el aminoácido del medio. Las bacterias se transfirieron a medio tetracionato/tirosina 4 mM ó tetracionato/HT 2 mM. A las 22 horas se colectaron y se prepararon extractos crudos en los que se midió actividad tirosil tRNA sintetasa.

5.1.- Análisis de la región líder del mRNA del gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans*.

Aproximadamente 220 nucleótidos río abajo del extremo 5' del mRNA del gen *tyrZ* se detectó la presencia de secuencias repetidas invertidas (Fig. 18). Estas secuencias, que podrían estar formando en el RNA una estructura de tipo horquilla, preceden a varios residuos de uridina. Ambos rasgos son característicos de estructuras reconocidas por la RNA polimerasa como señales de terminación de la transcripción independientes del factor rho (Richardson, 1993). Inmediatamente río arriba, se identificó una secuencia de 12 nucleótidos, con similitud a secuencias conservadas denominadas "cajas T", presentes en la región líder de los mRNA de aminoacil tRNA sintetasas de *B. subtilis* y otras bacterias Gram (+) (Putzer y cols., 1995). En la figura 19 se muestra una comparación de estas cajas T con la secuencia encontrada en *T. ferrooxidans*.

En la región 5' no codificante de *tyrZ* se detectó un segundo par de secuencias repetidas invertidas, centradas en el nucleótido 175 (fig. 18). Estas secuencias preceden a un grupo de siete timidinas, y podrían formar en el RNA una estructura tipo horquilla, similar a un terminador de la transcripción independiente del factor rho. La posición de esta horquilla es coincidente con el extremo 5' del mRNA que se detectó mediante los experimentos de extensión de un partidador en esta tesis.

El análisis computacional de la secuencia del DNA de la región líder del mRNA de *tyrZ* permitió predecir la formación de una estructura secundaria en el RNA, con una energía de estabilización de -120 kcal/mol. Se identificó dos horquillas principales en esta

```

1
CAACGTGCGTCCCTCGCCGAAACCGGATCGCTGGGACATACATACCCTGGTATTTTCC
CGCTGGTCGTTTCCTTCGCCTGGCTGATTTATATCTTCGCCGTGTATGGTGTGGGCCGG
120      - 35      - 10      **
TCGCTGGGGCTGCCGCTGGCATCCGTGCAGACCCTGGATTTCCTTGGACTGGTATTTT
                                ----->
CCGGCCTGGCCAATGTTTTTTTTGGTGCGGGAGCGTGGCCATCTCTGGGCGTCAGTCCC
240 <-----
CGGTCGTTCTCTGCTCTGGGCCAGCCTCGCGGATATTCTGGTGGTGGGCGGTCTGGCTG
CGATGGGTTGGTTGATGGCGCCCTTACCGATGCCGATTATCGTCGGCCTGCTCCTGGC
360
GACGATGGTCTACACCCTGATCCTCGACCAGATCAAGGTGCCTTTGTTGCGGCGACT
                                ----->
AACCAGTGCCTGACCGTGACCCATGGCGCCAATCCCGGTGTCGGCAAAGAGCATTTCAG
480
                                SD
CCGAGAGCCCGCCGATGCTAATATGCAGCCTCATCACAAGACACCGCCAATTTATGA
                                M T
CTATGAAG
M K

```

Fig. 18.- Secuencia del extremo 5' no codificante del gen *tyrZ*. Las flechas bajo la secuencia señalan la regiones de simetría de posibles terminadores de la transcripción. Los asteriscos indican el extremo 5' del mRNA del gen *tyrZ*, determinado por la metódica de extensión de un partidor. Las posiciones -10 y -35, indican elementos de un posible promotor de la transcripción. La secuencia encuadrada en rojo representa la secuencia con similitud a cajas T de bacterias Gram (+). Se muestran los primeros aminoácidos de la secuencia predicha de *tyrZ*. SD, secuencia de Shine Dalgarno del gen *tyrZ*.

CAJA T

ACCAGGGTGGT--ACCGC
 AGTAGGGTGGT--ACCGC
 AAAAGGGTGGA--ACCAC
 APTTGGGTGGA--ACCAC
 ATCAGGGTGGT--ACCAC
 AATAGGGTGGC--ACCGC
 ACCAGGGTGGT--ACCGC

AnnaGGGTGGn--ACCnC

* * *** ** *

GCGACGATGGTCTACACC

GEN

tyrZ *B. subtilis*
tyrS *B. subtilis*
thrS *B. subtilis*
thrZ *B. subtilis*
trpS *B. subtilis*
tyrS *B. stearothermophilus*
tyrS *B. caldotenax*

Consenso

tyrZ *T. ferrooxidans*

Fig. 19.- Comparación de la secuencia de cajas T de bacterias Gram (+) con la caja T descrita en la región 5' no codificante del gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans*. Los asteriscos muestran los nucleótidos de la caja T de *tyrZ* idénticos a los de la secuencia de consenso de Gram (+). "n" es cualquiera de las cuatro bases y "a" indica preferencia por adenosina.

región (Fig. 20). La mayor de ellas está constituida 166 nucleótidos. Entre las posiciones 156 y 158 de esta horquilla se identificó en una burbuja un triplete que codifica para tirosina., que es único en las 350 bases de la región líder del mRNA de *tyrZ*. La presencia de un codón para el aminoácido específico de la sintetasa en la región líder del gen es una característica de los genes de aminoacil tRNA sintetasas de *B. subtilis* y otros Gram (+). Existen datos que demuestran que la presencia de este codón se relaciona con la especificidad de la regulación de la transcripción por el tRNA correspondiente (Grundy y Henkin, 1993).

La segunda horquilla presente en la región líder del gen *tyrZ* es la que se constituye por la complementariedad de bases de la caja T y una parte del terminador de la transcripción (nucleótidos 192 al 237 en la fig. 20). Los nucleótidos UGGU de la supuesta caja T de *T. ferrooxidans*, que forman parte de la secuencia de consenso de cajas T de Gram (+), se encuentran formando parte de una pequeña burbuja en esta horquilla, al igual que en la estructura secundaria de la región líder del mRNA de aaRS de dichas bacterias. Se postula que esta secuencia interactúa con el extremo aceptor del tRNA correspondiente (Grundy y cols., 1994).

Con estos antecedentes es posible predecir que la región líder del mRNA de *tyrZ* podría encontrarse en dos estructuras alternativas (Fig. 20): una de ellas se generaría por la formación del terminador de la transcripción; la otra, de antiterminación, estaría formada por la caja T y un brazo del terminador. La posibilidad de la formación de estas

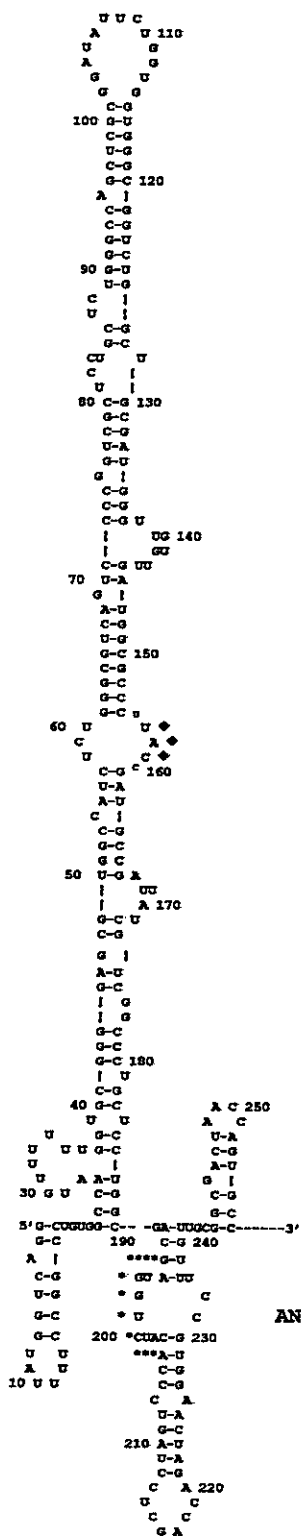
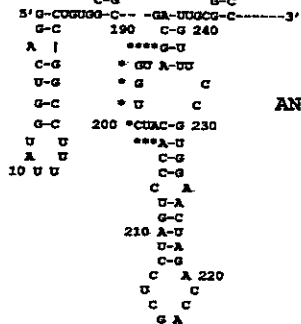


Fig. 20.- Estructura secundaria predicha para la región líder del mRNA de *tyrZ*. Mediante el programa computacional RNAFOLD de PCGENE se predijo la estructura secundaria que adoptaría el extremo 5' del mRNA de *tyrZ*. Los rombos (◆) indican el codón para tirosina. Los nucleótidos de la caja T se señalan con asteriscos. Se muestra las posibles estructuras de terminación y antiterminación de la transcripción.

TERMINADOR



ANTITERMINADOR



dos estructuras es la base del mecanismo de regulación de la transcripción de los genes de aminoacil tRNA sintetasas de *B. subtilis* y otras bacterias Gram (+).

En *B. subtilis*, la presencia de los elementos estructurales descritos en los párrafos anteriores, en la región líder del mRNA de aminoacil tRNA sintetasas, se asocia con la regulación de la expresión de estas enzimas en respuesta a la disponibilidad del aminoácido específico por un mecanismo de terminación/antiterminación de la transcripción (Putzer y cols, 1995). Por esta razón, la presencia de rasgos estructurales similares en la región 5' no codificante del gen *tyrZ* sugiere que la expresión de este gen se regula por un mecanismo similar frente a cambios en los niveles intracelulares de tirosina.

DISCUSION

Las aminoacil tRNA sintetisas cumplen un papel fundamental en la biosíntesis de proteínas al catalizar la unión de un aminoácido al extremo 3' del tRNA correspondiente (Miennel y cols., 1995). La especificidad de la reacción de aminoacilación del tRNA asegura la fidelidad del proceso de traducción. La síntesis de estas enzimas es un proceso regulado por las condiciones de proliferación de la bacteria y por la disponibilidad del aminoácido sustrato de la sintetasa. En la bacteria Gram (-) *Thiobacillus ferrooxidans*, se identificó un gen que codificaba para una tirosil tRNA sintetasa (*tyrZ*), en que la secuencia de aminoácidos predicha es similar al producto del gen *tyrZ*, uno de los dos genes que codifican para tirosil tRNA sintetasa en la bacteria Gram (+) *B. subtilis* (Salazar y cols., 1994). Con el interés de conocer los mecanismos que regulan la síntesis de aaRS en *T. ferrooxidans*, se planteó como objetivo general de esta tesis el estudio de la expresión del gen *tyrZ*. En esta sección se discutirán los resultados obtenidos en relación a la confirmación de la identidad del gen, su expresión y a un posible mecanismo de regulación de su expresión.

Identidad del gen *tyrZ*.

La comparación de la secuencia de aminoácidos predicha para el producto del gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans* con secuencias de proteínas presentes en bancos de datos sugirió que correspondía a un gen de tirosil tRNA sintetasa (Salazar y cols., 1994). Los experimentos de complementación de una mutación termosensible en el gen *tyrS* de la cepa HB2109 de *E. coli* con el gen *tyrZ* contenido en el plasmidio pTR-1 demostraron que el producto del gen *tyrZ* efectivamente correspondía a una proteína con actividad enzimática de tirosil tRNA sintetasa. La capacidad de complementar era totalmente dependiente de la presencia del plasmidio pTR-1, lo que sugirió que el efecto observado se debía a una complementación y no a reversión de la mutación. El fragmento clonado en pTR-1 contenía además del gen *tyrZ*, aproximadamente 1,1 kb de la región 5' no codificante del gen, por lo que supuestamente incluía las señales promotoras de la transcripción. Por lo tanto, es posible que la TyrRZ de *T. ferrooxidans* se estuviera expresando en *E. coli* desde su propio promotor, aunque no se puede descartar que se utilizara un promotor del plasmidio.

La actividad enzimática del producto del gen *tyrZ* se comprobó al medir la capacidad de aminoacilar el tRNA^{Tyr} de *E. coli* con tirosina. Se incubó un extracto de bacterias de *E. coli* HB2109 transformadas con pTR-1 a 42°C para inactivar la tirosil tRNA sintetasa endógena. En estos experimentos se observó que la tirosil tRNA sintetasa codificada por el gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans* es capaz catalizar la incorporación de tirosina en tRNA total de *E. coli*, probablemente por reconocer y utilizar el tRNA^{Tyr} como sustrato.

Las bacterias de *E. coli* HB2109 transformadas con pTR-1 proliferaron más lentamente que las transformadas con el gen homólogo (*tyrS*). La eficiencia de la complementación pudo verse afectada por tres factores: 1) actividad específica menor de la TyrRZ de *T. ferrooxidans*, producto de una posible eficiencia catalítica menor. No es posible descartar este punto, ya que no se ha realizado la caracterización cinética de la TyrRZ; 2) Bajo nivel de expresión de TyrRZ. La transcripción del gen *tyrZ* en *T. ferrooxidans* es débil, no detectable por hibridación en filtros. Por lo tanto, si el gen *tyrZ* clonado en el plasmidio pTR-1 se está expresando en *E. coli* desde su propio promotor, es posible que la concentración del mRNA y por lo tanto la de TyrRZ sea baja. 3) Por otro lado, es necesario considerar que existe la posibilidad que el tRNA^{Tyr} de *E. coli* no sea el sustrato idóneo para la tirosil tRNA sintetasa de *T. ferrooxidans*.

Expresión de *tyrZ* en *T. ferrooxidans*.

Como lo demostraron los experimentos de amplificación por PCR de cDNA realizados para detectar el mRNA, el gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans* se transcribe *in vivo*. Este resultado se confirmó por los experimentos de extensión del partidor realizados para identificar el extremo 5' del mRNA de *tyrZ*. De los experimentos de extensión del partidor se dedujo que el segmento líder del mRNA es de aproximadamente 350 nucleótidos. En general se considera que la presencia de secuencias similares a las de los elementos de consenso para promotores bacterianos, como las cajas -10 y -35, a una distancia apropiada del extremo 5', es un indicio de la existencia de un promotor. Las secuencias de consenso para las cajas -10 y -35 son

TAtaaT y TTgaca respectivamente, en que las letras mayúsculas simbolizan a los nucleótidos más conservados (presentes en más de un 90 % de los promotores funcionales descritos). En el caso del gen *tyrZ*, 7 pb río arriba del extremo 5' identificado, se encontró la secuencia TGGATT, cuya diferencia más importante con la secuencia de consenso -10, es la presencia de una guanosina en la segunda posición, en lugar de una adenosina. Río arriba se encontró la secuencia CTGCCG, con cierta similitud a la caja -35, aunque separada de la supuesta caja -10 por 19 pb, dos bases más de las 17 que se considera como la distancia óptima entre ambos elementos de un promotor. Se deduce entonces que si estas secuencias corresponden efectivamente a un promotor transcripcional del gen *tyrZ*, ellas no son muy similares a las secuencias de consenso. Este parece ser un rasgo común entre los promotores de aminoacil tRNA sintetasas de *E. coli* (Putzer y cols., 1995). En ausencia de ensayos de transcripción *in vitro* que demuestren la funcionalidad de un supuesto promotor, no es posible saber con certeza si el extremo 5' se originó por iniciación de la transcripción o es producto del procesamiento de un RNA precursor de mayor tamaño. En experimentos realizados después de finalizada esta tesis, se observó que al extender el partidor PETyrZ con transcriptasa inversa se generaban además del cDNA de 250 nt, dos cDNA de mayor tamaño. Es posible entonces que existan otros extremos 5' del mRNA de *tyrZ*, localizados río arriba del extremo determinado en esta tesis. Es necesario por lo tanto considerar la posibilidad que la transcripción de *tyrZ* se inicie en más de un promotor. Alternativamente, el extremo 5' identificado en esta tesis puede corresponder a un producto del procesamiento de un precursor generado en un promotor más alejado de *tyrZ*.

Los niveles en estado estacionario del mRNA de *tyrZ* parecen ser inferiores a los de sintetasas de otras bacterias, en que son perfectamente detectables por hibridación tipo Northern (Cheung y Söll, 1984; Gagnon y cols., 1994; Putzer y cols., 1992). En cambio para detectar el mRNA de *tyrZ* fué necesario utilizar una metódica más sensible, como la amplificación de cDNA por PCR. Niveles bajos de mRNA en estado estacionario pueden ser causados por transcripción baja o por inestabilidad del mRNA. En cualquier caso, surge la interrogante sobre si este nivel de expresión de *tyrZ* es suficiente para sostener la proliferación de *T. ferrooxidans*. Si no es así, es posible que se requiera una fuente alternativa de enzima desde otro gen en el genoma de la bacteria.

Para detectar el mRNA de *tyrZ* mediante Northern en primera instancia se utilizó como sonda un fragmento derivado del plasmidio pTR-1, que contenía aproximadamente 700 pb de la región interna de *tyrZ*. Esta sonda hibridó en forma cruzada con el rRNA 16S de *T. ferrooxidans*, y no con el rRNA de *E. coli*. Este resultado fué inesperado, ya que por comparación de la secuencia parcial de fragmentos de rDNA de *T. ferrooxidans* clonado se había observado previamente que los rRNA de ambas bacterias son muy similares (Salazar y cols., 1989). Por otro lado, ¿ es posible que existan regiones de la secuencia del gen de rRNA 16S de *T. ferrooxidans* que hibriden con el mRNA del gen *tyrZ* ?. De la comparación de secuencias parciales se observó que no existe similitud significativa entre el gen de rRNA 16S y el gen *tyrZ*. En una compilación de secuencias de aaRS se detectó una región de 15 nucleótidos localizada inmediatamente río abajo del codón de inicio de la traducción que es complementaria al rRNA 16S, y que está presente en todos los genes de sintetasas de *E. coli*

(Ito y cols., 1993). Sin embargo, la sonda utilizada para analizar la expresión de *tyrZ* no incluye esa región. El efecto observado se relaciona con la sonda, ya que al cambiar la sonda, la hibridación disminuyó considerablemente, a pesar de lo cuál no fué posible detectar el mRNA de *tyrZ* por esta metódica.

Posible cotranscripción del gen *tyrZ* y el operón *rnmT2* de *T. ferrooxidans*.

En el genoma de *T. ferrooxidans*, el gen *tyrZ* se encuentra ubicado aproximadamente 100 pb río arriba del operón ribosomal *rnmT2* (Takamiya y cols., 1990). En la secuencia que separa a *tyrZ* del gen de rRNA 16S no se detectó elementos característicos de un terminador de la transcripción independiente del factor rho. Considerando estas características y que los productos de ambos genes participan en el proceso de síntesis de proteínas, se pensó en la posibilidad que ambos genes se cotranscriban. En *E. coli* existen ejemplos de aminoacil tRNA sintetasas que se expresan desde unidades transcripcionales policistrónicas. En algunos de estos casos no se ha logrado identificar la función de las proteínas codificadas en los otros marcos de lectura que forman parte del operón. En otros casos, el gen de aminoacil tRNA sintetasa es contiguo a genes que codifican para productos no relacionados con síntesis de proteínas. Por ejemplo, el gen que codifica para la tirosil tRNA sintetasa de *E. coli*, *tyrS*, está localizado inmediatamente río abajo del gen *pdxH*, que codifica para piridoxina 5' fosfato oxidasa (Lam y Winkler, 1992). Ambos genes están separados por aproximadamente 120 nucleótidos, sin un sitio aparente de terminación de la transcripción independiente de rho. Experimentos de mapeamiento con nucleasa T2 muestran que el gen *tyrS* se transcribe a partir

de un promotor localizado entre ambos genes, pero que también se transcribe desde un promotor ubicado río arriba de *pdxH*.

En otros casos los genes de aaRS se cotranscriben con genes cuyos productos también son constituyentes de la maquinaria de biosíntesis de proteínas. Por ejemplo, el gen *lysS* se cotranscribe con el gen *pfrB*, localizado inmediatamente río abajo y que codifica para el Factor de Liberación de la cadena polipeptídica (RF2) (Kawakami y cols., 1988). En *B. subtilis*, se describió la cotranscripción de los genes que codifican para CysRS y GluRS, y para serina-acetiltransferasa (Gagnon y cols., 1994). Los tres genes parecen ser transcritos a partir de un promotor localizado río arriba de *gltX*, el primer gen del operón. Entre todos los casos descritos hasta ahora, el gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans* es el único en que un gen de aaRS se encuentra asociado a un operón de rRNA. La transcripción conjunta de estos genes podría constituir un mecanismo de coordinación de la síntesis de rRNA y tirosil tRNA sintetasa en alguna condición de proliferación. Para analizar la posibilidad de la cotranscripción de *tyrZ* y el operón *rrnT2* se realizaron experimentos de amplificación por PCR de cDNA de *T. ferrooxidans* utilizando partidores que abarcaban sólo la región espaciadora entre estos dos genes. En estos experimentos se detectó un RNA de aproximadamente 190 pb, que debería contener la región intergénica. Sin embargo, no se observó amplificación en los experimentos realizados con partidores que abarcaban desde el extremo 5' de *tyrZ* hasta el final de la región espaciadora. Estos resultados permitieron suponer que el RNA de la región espaciadora entre *tyrZ* y *rrnT2* no correspondía a un transcrito iniciado río arriba de *tyrZ*, sino más probablemente era producto de la iniciación de la transcripción en un promotor localizado en

el gen *tyrZ*. A pesar de este resultado, no es posible descartar totalmente la cotranscripción de *tyrZ* y el operón *rrnT2*, ya que en bacterias los rRNA son sintetizados a partir de un operón, como un transcrito primario que posteriormente es procesado para generar las diferentes especies maduras de rRNAs (King y cols., 1986). En *E. coli*, la primera etapa del procesamiento consiste en el ataque endonucleolítico del RNA por RNasa III, después del cual se obtienen las moléculas inmaduras del rRNA 16S, 23S y 5S. Este procesamiento es muy rápido, e incluso se ha descrito que ocurre simultáneamente con la transcripción (King y Schlessinger, 1983; Apirion y Gegenheimer, 1984), razón por la cual es difícil detectar el precursor 30S. No existe antecedentes en la literatura sobre el procesamiento de rRNAs en *T. ferrooxidans*. Sin embargo, si el gen *tyrZ* se expresa débilmente y el procesamiento es rápido, se puede predecir la dificultad en detectar el precursor, a pesar de la utilización de una metodología tan sensible como la transcripción reversa de cDNA.

En el caso de no existir cotranscripción de *tyrZ* y el gen de rRNA 16S, surge la interrogante acerca de cómo terminaría la transcripción de *tyrZ*. Considerando la ausencia de un terminador independiente del factor rho al final del gen, es necesario examinar la posibilidad de que en este sitio existan elementos que permitan la terminación dependiente del factor rho. La acción de rho como factor de terminación depende de requisitos de secuencia y de estructura para la unión al RNA, además de otros factores que determinan la velocidad de adición de nucleótidos durante la transcripción. En su conjunto, las secuencias que forman un terminador dependiente de rho se extienden desde aproximadamente 60 pb río arriba y 20 pb río abajo del sitio de terminación. El análisis de la secuencia de varios terminadores

dependientes de rho no ha revelado una región de consenso que permita predecir si una región del RNA actuará como terminador transcripcional en presencia de rho. La única característica de secuencia que ha permitido establecer una correlación con este tipo de terminadores es el bajo contenido de G y alto de C en regiones del transcrito que interaccionan con este factor (Alifano y cols., 1991). En la secuencia de DNA localizada río abajo del extremo 3' de la región codificante del gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans* no se observa una predominancia de C sobre G (27 % G, 24 % C). En algunos casos se ha descrito que la presencia de estructuras de horquilla cerca del extremo 3' del mRNA se relaciona con sitios de pausa de la transcripción (Landick y Yanofsky, 1984), es decir sitios en que la velocidad de incorporación de nucleótidos es inferior al promedio. Aparentemente rho provoca que la RNA polimerasa termine la transcripción preferencialmente en puntos de la secuencia que son sitios de pausa naturales (Morgan y cols., 1983; Lau y cols., 1983). Veintiseis pares de bases río abajo del codón de término de la traducción de *tyrZ* se observó un par de secuencias repetidas invertidas, que podrían formar en el RNA una estructura tipo horquilla, con un tallo de 5 nt. No se conoce la función que cumplirían estos elementos en esa región. Si la transcripción de *tyrZ* termina al final del gen, sería de interés investigar la posible participación de estos elementos estructurales en el mecanismo de terminación de la transcripción.

Análisis de los promotores de la transcripción del operón ribosomal *rnt2*.

En trabajos anteriores realizados en este laboratorio se analizó la secuencia de la región 5' no codificante del operón ribosomal *rnt2* de *T. ferrooxidans*, con el fin de investigar la

presencia de los elementos promotores y regulatorios de la transcripción del operón (Takamiya y cols., 1990). Se detectó la existencia de dos secuencias idénticas a las cajas -10 y -35 que se han descrito como los elementos de consenso para promotores bacterianos asociados al factor σ^{70} . En esta tesis se demostró que estas secuencias, localizadas 156 y 178 pb río arriba del supuesto inicio del rRNA 16S, efectivamente corresponden a un promotor transcripcional. Estos experimentos demostraron que el operón ribosomal *rnmT2* de *T. ferrooxidans* es funcional, y que probablemente éste se expresa a partir de más de un promotor, ya que los resultados de experimentos de extensión de un partidor sugieren que existe iniciación de la transcripción en algún punto de la región codificante de *tyrZ*, aunque se desconoce la posición exacta. Este resultado es concordante con los obtenidos en trabajos anteriores de este grupo, en que se observó que el fragmento de la región localizada río arriba del operón *rnmT2*, comprendido entre los nucleótidos 1354 y 1726 (Fig 4, esta tesis), contenían un promotor funcional (Takamiya y cols., 1990). Posteriormente se comprobó que la región analizada estaba contenida en la parte codificante del gen *tyrZ*. Es probable que los elementos promotores revelados en aquellos experimentos correspondan a los mismos que dan origen a algunos de los transcritos detectados en esta tesis mediante la metódica de extensión de un partidor. En *E. coli* los operones de rRNA poseen dos promotores σ^{70} , P1 y P2, localizados aproximadamente 300 y 200 pb (Gilbert y cols., 1979) río arriba del gen de rRNA 16S. *In vivo*, la expresión desde P1 es generalmente mayor y se regula dependiendo de la velocidad de proliferación y de las condiciones nutricionales de la bacteria; en cambio, la expresión desde P2 es débil y no regulada, aparentemente con la función de mantener la

expresión basal del operón (Sarmientos y Cashel, 1983; Sarmientos y cols., 1983). Boros y cols. (1983) informaron de la identificación de dos promotores adicionales en el operón *rrnB* de *E. coli*, localizados más de 1 kb río arriba de P1 y P2, y propusieron que la transcripción iniciada en estos promotores es capaz de continuar en el operón ribosomal. Para conocer la función de los diferentes promotores descritos en el operón *rrnT2* de *T. ferrooxidans*, será necesario en primer lugar, evaluar la expresión de los genes de rRNA de esta bacteria en distintas condiciones de proliferación y posteriormente cuantificar la actividad de los promotores en cada una de estas condiciones. Es posible que los promotores más alejados del gen de rRNA 16S cumplan la misma función propuesta para los promotores P3 y P4 de *E. coli*, es decir, la de mantener un nivel de expresión basal de los genes de rRNA.

Inhibición del crecimiento de *T. ferrooxidans* por tirosina.

Tirosina inhibió la proliferación de *T. ferrooxidans*, provocando un aumento en el período de latencia de la curva de crecimiento y retomando posteriormente el crecimiento a una velocidad inferior a la normal. Este efecto no se observó en el segundo transpaso, comportándose las bacterias como si se hubieran adaptado a la presencia del aminoácido. El efecto de compuestos orgánicos sobre el crecimiento de *T. ferrooxidans* se ha estudiado por varios autores. Tabita y Lundgren (1971), informaron que glucosa y otros azúcares inhibían la oxidación de ión ferroso y la actividad de la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa en *T. ferrooxidans* en reposo. En bacterias autotróficas, la síntesis de precursores de compuestos de carbono y la generación de ATP no son procesos acoplados como en bacterias heterotróficas

(Smith y cols., 1967). Algunos autores han sugerido que la inhibición de la proliferación de microorganismos autotróficos por compuestos orgánicos se debería a la necesidad de limitar la síntesis de compuestos celulares a partir de compuestos orgánicos exógenos, con un consumo desmedido de ATP. Este mecanismo permitiría mantener un nivel de síntesis de compuestos celulares equilibrado con la generación de ATP a partir de la oxidación de compuestos inorgánicos (Peck y cols., 1967). Por otra parte, Sugio y cols. (1987) observaron que aminoácidos en una concentración de 10 mM inhibían el crecimiento de la bacteria en medio con Fe^{2+} como fuente de energía. El grado de inhibición era específico para cada aminoácido e independiente de la polaridad y del tamaño de la molécula. Tirosina en particular exhibía el mismo efecto que se observó en esta tesis en *T. ferrooxidans* cultivados en medio tetrionato, es decir un aumento del período de latencia del cultivo, con una proliferación posterior mas lenta. Es posible que la inhibición de la proliferación de *T. ferrooxidans* por tirosina obedezca al mecanismo de control del metabolismo propuesto por Peck y cols., (1967). Sin embargo, es necesario considerar alternativas, como la inhibición de la proliferación de *T. ferrooxidans* por productos de la degradación de tirosina o un efecto relacionado con el transporte del aminoácido a través de la membrana bacteriana.

Regulación de la actividad de la tirosil tRNA sintetasa de *T. ferrooxidans*.

En todas las bacterias estudiadas hasta el momento la síntesis de las aminoacil tRNAsintetasas se regula de acuerdo a la velocidad de crecimiento y a la disponibilidad del aminoácido específico de cada sintetasa. Esta regulación se ejerce a nivel transcripcional o

traduccional. En bacterias heterotróficas como *E. coli* y *B. subtilis*, el estudio de los mecanismos de regulación de la expresión de sintetetas se ha abordado en la mayor parte de los casos, mediante la utilización de cepas mutantes deficientes en la vía de síntesis del aminoácido en estudio, ya que en estas cepas parece ser más fácil inducir cambios en la concentración interna de aminoácidos que en las cepas silvestres. Los hidroxamatos de aminoácidos han sido de gran utilidad en el estudio del metabolismo de aminoácidos en bacterias (Tosa y Pizer, 1971). Ellos se comportan como inhibidores competitivos de la aminoacil tRNA sintetasa correspondiente. La presencia del grupo hidroxamato en lugar del grupo carboxilo del aminoácido impide la activación del análogo, por lo que es presumible que la inhibición resulte de la exclusión de tirosina del sitio activo de la enzima. Se postula que la disminución de la disponibilidad de aminoacil-tRNA, uno de los productos de la reacción de aminoacilación, generaría una condición artificial de carencia del aminoácido. Para estudiar la regulación de la expresión de la tirosil tRNA sintetasa dependiente de la disponibilidad de tirosina en *T. ferrooxidans*, se utilizó hidroxamato de tirosina. La inhibición de la actividad de la tirosil tRNA sintetasa de *T. ferrooxidans* por el análogo en ensayos *in vitro* y la especificidad del efecto de hidroxamato de tirosina, inferida de la capacidad de tirosina de desplazar la acción del análogo en el medio de cultivo, son indicios de que el efecto de hidroxamato de tirosina en la proliferación de esta bacteria se debe a la interferencia del análogo en la incorporación del aminoácido en la síntesis de proteínas.

La actividad específica de la tirosil tRNA sintetasa en bacterias cultivadas en presencia del análogo 2 mM aumentó 6 a 7 veces en relación a la actividad específica en las bacterias

cultivadas en tirosina 4 mM. El efecto es dependiente de la síntesis de proteínas, ya que al aumentar la concentración de hidroxamato de tirosina a 4 mM, condición en que se inhibe totalmente la proliferación, no se observa este efecto en la actividad específica de la enzima. El contenido de proteínas de las bacterias tratadas con el análogo a una concentración de 2 mM es diez veces menor que el contenido proteico de las células en tirosina, como se esperaba por la propiedad del hidroxamato de tirosina de inhibir la síntesis de proteínas. El mecanismo molecular que provoca el aumento de la actividad específica de tirosil tRNA sintetasa en bacterias tratadas con hidroxamato de tirosina podría tener varias explicaciones. En *E. coli* y *B. subtilis*, la escasez de un aminoácido generalmente resulta en un aumento de la síntesis de la sintetasa correspondiente (Putzer y cols., 1995). Por lo tanto, es probable que el efecto observado en la actividad específica de la TyrRZ se origine en un aumento de los niveles en estado estacionario de la enzima, producto de la elevación de la velocidad de síntesis. Sin embargo, aunque no existen precedentes, los resultados experimentales no permiten descartar la posibilidad de que la inducción de la tirosil tRNA sintetasa se deba a la disminución de la velocidad de degradación de la sintetasa. Otra alternativa es que el aumento de la actividad específica de la tirosil tRNA sintetasa de *T. ferrooxidans* se origine en una activación de la enzima, inducida por la carencia artificial de tirosina.

El aumento de la velocidad de síntesis de la enzima puede ser el resultado del aumento de la transcripción del gen *tyrZ*, o de la velocidad de traducción del mRNA. A su vez, la transcripción del gen puede verse afectada a nivel de la iniciación o del alargamiento del mRNA. Considerando los elementos de secuencia y estructura secundaria que se detectaron

en la región líder del mRNA de *tyrZ* (que se discuten en párrafos posteriores) que sugieren que la transcripción de este gen se regula por terminación/antiterminación de la transcripción, es necesario considerar la posibilidad que en carencia de tirosina se favorezca la antiterminación de la transcripción, lo que permitiría la extensión del RNA hasta la región codificante de *tyrZ*, aumentando los niveles del mRNA y por lo tanto de la TyrRZ. Para aclarar estas interrogantes será necesario estudiar la velocidad de síntesis de la TyrRZ en *T. ferrooxidans* y cuantificar los niveles de mRNA en bacterias cultivadas en presencia de tirosina e hidroxamato de tirosina.

En *E. coli* y *B. subtilis*, la expresión de las aminoacil tRNA sintetasas se regula por la disponibilidad del aminoácido respectivo, ya sea a nivel de la traducción o de la transcripción de los genes. El factor determinante en la regulación parece ser generalmente la relación entre las concentraciones de tRNA aminocilado y no aminoacilado. En el caso particular de *T. ferrooxidans* por lo tanto, es muy posible que la disminución de la concentración de TyrRNA^{Tyr} provocada por la inhibición de la actividad de la tirosil tRNA sintetasa por hidroxamato de tirosina, sea el factor desencadenante de la respuesta regulatoria de la expresión de la enzima.

La actividad específica de aaRS aumentó en la condición de carencia de tirosina. Sin embargo, al comparar la actividad específica de la enzima de bacterias cultivadas en medio tetrionato sin y con tirosina, en esta última condición se detectó sólo una leve disminución de la actividad específica de la enzima. Este hecho sugiere que la expresión de la tirosil tRNA sintetasa en *T. ferrooxidans* cultivados en tetrionato se mantiene permanentemente

reprimida, en un nivel que es suficiente para sostener el crecimiento celular, posiblemente por una concentración interna de tirosina alta, cercana a la saturación. Sin embargo, la actividad de la tirosil tRNA sintetasa es susceptible de ser inducida, como se demostró por los experimentos con hidroxamato de tirosina. La existencia de este mecanismo de control en *T. ferrooxidans* sugiere que este microorganismo se encuentra preparado para subsistir en condiciones en que la concentración interna de los aminoácidos varía, por ejemplo en alguna condición que provoque disminución de la síntesis endógena de tirosina. En estas condiciones se requeriría que la síntesis de las aminoacil tRNA sintetasa se induzca, al menos transitoriamente para permitir la sobrevivencia de las bacterias.

En el curso de los experimentos realizados para estudiar el efecto de la carencia intracelular de tirosina sobre la actividad de la tirosil tRNA sintetasa, se observó que después de varias horas de incubar las bacterias con hidroxamato de tirosina, el efecto inhibitorio del análogo sobre el crecimiento de *T. ferrooxidans* se disipó, al mismo tiempo que se observó disminución de la actividad enzimática a valores similares a los del cultivo en tirosina. Este efecto puede ser causado por dos mecanismos, posiblemente complementarios. Por un lado, es posible que el aumento inicial de la actividad tirosil tRNA sintetasa permita la recuperación de los niveles de tyr-tRNA^{Tyr} que se requieren para el crecimiento normal. Por otra parte se sabe que en *E. coli* y otras bacterias Gram (-), los niveles intracelulares de tirosina (y de los aminoácidos en general) se regulan mediante el control de la incorporación desde el medio extracelular y de la síntesis endógena. En el mecanismo de control de la síntesis de tirosina, el aminoácido libre participa como inhibidor de la actividad de la corismato mutasa-prefenato

deshidrogenasa (Hudson y cols., 1983) y de la tirosina aminotransferasa (Mavrides y Orr, 1974), y como correpresor de la síntesis de algunas enzimas de la vía (Pittard, 1987). No existen antecedentes sobre la regulación de la síntesis de aminoácidos en *T. ferrooxidans*, pero este resultado podría ser un indicio de que la síntesis de tirosina también está sometida a control por autorregulación negativa. Es posible que el cultivo en medio con hidroxamato de tirosina, la inhibición de las enzimas biosintéticas se libere, provocando el aumento de la síntesis endógena de tirosina. Si el aumento es suficiente, podría desplazar competitivamente al hidroxamato de tirosina, superar el efecto inhibitorio y recuperar el crecimiento bacteriano. El aumento en los niveles de tirosina debería causar el retorno de la actividad tirosil tRNA sintetasa a los valores presentes en medio tetrionato suplementado con el aminoácido, resultado que se observó experimentalmente.

Un mecanismo posible para la regulación de la expresión del gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans*.

La expresión de aaRS en bacterias se regula en respuesta a la disponibilidad del aminoácido que es sustrato de la sintetasa (Putzer y cols., 1995). En *E. coli* existen múltiples mecanismos de regulación de la expresión de estos genes, entre los cuales se cuenta la regulación traduccional y transcripcional. En cambio, en bacilos Gram (+), la regulación de la expresión de los genes de aaRS y de algunas de las enzimas que participan en la biosíntesis de aminoácidos, parece realizarse a través de un mecanismo común de terminación/antiterminación de la transcripción, mediado por el tRNA correspondiente, que le

permite a cada gen responder específicamente a la disminución del aminoácido apropiado, aumentando la expresión de la sintetasa. Se analizó la región correspondiente al líder del mRNA del gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans*, para buscar elementos de la estructura secundaria que permitieran predecir un mecanismo de regulación del gen *tyrZ*. En esta búsqueda se encontró segmentos de nucleótidos en la región líder que comparten algún grado de similitud con los presentes en la región líder de genes de aaRS de bacterias Gram (+). Se observó la presencia de un par de secuencias repetidas invertidas seguidas de varios residuos de timidina, similares a los terminadores de la transcripción independiente de rho; una secuencia de 13 nucleótidos, similar a la caja T de Gram (+); un codón de tirosina en una posición parecida a la que ocupa el codón en la estructura secundaria predicha para el líder del mRNA de *tyrZ* de *B. subtilis*. Estos rasgos sugieren que un mecanismo de terminación/antiterminación de la transcripción puede operar en la regulación de la expresión del gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans*. En relación a estos posibles elementos regulatorios es necesario hacer las siguientes consideraciones: en primer lugar, los terminadores de la transcripción independientes de rho se caracterizan por ser secuencias con alto contenido de G y C. Este es también un rasgo sobresaliente en los terminadores de la región líder del mRNA de genes de sintetasa en Gram (+). Este factor contribuye a la estabilidad de la estructura tipo horquilla que se formaría en el RNA, que a su vez se correlaciona con la eficiencia de terminación (Yager y von Hippel, 1987). El largo de la extensión de politimidinas que se encuentra en todos los terminadores transcripcionales también parece ser determinante de la fuerza del terminador (Lynn y cols., 1988). Las secuencias repetidas invertidas presentes en la región 5' no codificantes de *tyrZ* no son

particularmente ricas en G y C (aproximadamente 30 % G+ C), y presentan un par de bases que no son complementarias, lo que sugiere la formación de una horquilla imperfecta. Estos antecedentes permiten predecir que si estas secuencias forman un terminador funcional la eficiencia de este terminador será baja. En experimentos futuros se pretende analizar la funcionalidad de este hipotético terminador mediante experimentos de protección del RNA a la digestión con nucleasa S1, por una sonda de DNA marcada radiactivamente. Este tipo de experimentos permitiría detectar el RNA generado por terminación en el posible terminador de la transcripción. Otra alternativa es el análisis de los RNA generados en experimentos de transcripción *in vitro*, utilizando como molde el DNA correspondiente a la región líder del gen *tyrZ*.

Se analizó la posibilidad de que la caja T descrita en la región líder del gen *tyrZ* se asocie al brazo más próximo del supuesto terminador de la transcripción para formar la estructura antiterminadora, que según el modelo en Gram (+) sería predominante en una situación de carencia de tirosina. Para la formación de esta estructura se requiere que ambas secuencias sean complementarias, lo que no se cumple totalmente. Sin embargo, la secuencia de la caja T en cierta extensión es complementaria al extremo más distal del terminador y a la secuencia de uridinas. Si la interacción de estas dos secuencias impide la formación de un terminador funcional, es posible que, aunque levemente diferente del antiterminador prototipo de la región líder de genes de sintetasas de Gram (+), cumpliera la misma función que aquella estructura. En el modelo de antiterminación, se postula que el tRNA^{Tyr} interacciona con la estructura secundaria del RNA líder de genes de sintetasas, por un lado a través de la

asociación del anticodón con el codón presente en una burbuja lateral, y por otro con bases complementarias al extremo 3' del tRNA presentes en el antiterminador. La región líder de *tyrZ* contiene un codón para tirosina en una posición similar, y presenta la secuencia complementaria al extremo aceptor del tRNA^{Tyr} de *E. coli* en el supuesto antiterminador. La presencia de estos elementos en la región líder de *tyrZ* sugiere que el tRNA^{Tyr} podría estar participando en la regulación de la expresión del gen, mediante un mecanismo de terminación/antiterminación de la transcripción.

Como se señaló en la Introducción, *T. ferrooxidans* es una bacteria Gram (-), perteneciente a la subdivisión β de las Proteobacterias. El mecanismo de regulación de la expresión de aaRS por antiterminación de la transcripción ha sido descrito hasta el momento sólo en bacterias Gram (+). Ya que la separación de Proteobacterias y Gram (+) es un evento ancestral, es probable que existan otras bacterias Gram (-) que compartan este mecanismo de regulación. Por otro lado, este mecanismo es común para la regulación de la mayoría de los genes de sintetasas de bacilos Gram (+). Por lo tanto, para investigar estos aspectos será necesario analizar las secuencias de genes de aaRS provenientes tanto de otros microorganismos Gram (-) como del propio *T. ferrooxidans*.

Otra alternativa de regulación de la expresión por terminadores de la transcripción es por atenuación. La presencia de terminadores de la transcripción independientes del factor rho en la región líder de unidades transcripcionales es un rasgo característico de operones biosintéticos de aminoácidos, en que la transcripción se regula por el mecanismo de atenuación (Landick y Yanofsky, 1987). Sin embargo, el RNA líder de *tyrZ* no presenta un

marco de lectura pequeño para la traducción de un péptido con un alto contenido del aminoácido correspondiente, que es otra característica de los genes regulados por este mecanismo. Por esta razón se descartó que este corresponda al mecanismo de regulación de la expresión de *tyrZ*.

En bacterias existen otros ejemplos de sistemas que funcionan para generar antiterminación de la transcripción, tales como el descrito en el caso de los operones de rRNA y en la regulación de la expresión del operón *bgl*. El sistema de antiterminación de la transcripción de genes de rRNA de bacterias es similar al modelo propuesto para el bacteriófago λ (Richardson, 1991), presumiéndose que existe para impedir la terminación prematura en sitios internos dependientes del factor rho, en el transcrito de rRNA (revisado en Condon y cols., 1995). La antiterminación depende de la presencia de una secuencia conservada, denominada caja A, presente en todos los operones de rRNA de *E. coli* y de otras bacterias. Esta secuencia se localiza en dos posiciones: río abajo del promotor P2 y en la región localizada entre el gen de rRNA 16S y 23S. Precediendo a la caja A de la región líder se encuentra una estructura de horquilla denominada caja B, que parece ser importante en la antiterminación en el fago λ . La región líder del RNA de *tyrZ* contiene una secuencia similar a la caja A identificada en la región líder del operón *rrnT2* de *T. ferrooxidans* (Takamiya y cols. 1090) (Fig. 4, nucleótidos 188 al 198), aunque no se observa una estructura secundaria que pudiera cumplir la función de la caja B. Sin embargo este mecanismo, que está asociado a terminadores dependientes de rho, hasta ahora ha sido descrito exclusivamente en operones de rRNA, donde es fundamental en la mantención de los niveles de expresión de estas moléculas,

que no son protegidas de la acción del factor rho por la maquinaria traduccional. En primera instancia es posible suponer que la asociación transcripcional de *tyrZ* con el operón *rrnT2*, un operón ribosomal, plantea la necesidad de la presencia de un sistema de antiterminación de la transcripción en la región líder de *tyrZ*. Sin embargo, un gen que codifica para un producto proteico podría no requerir de este mecanismo de protección. Adicionalmente, es poco probable que un mecanismo de este tipo estuviera asociado a una terminación independiente de rho como, la descrita en el gen *tyrZ*.

En *E. coli*, la expresión de proteínas que participan en el metabolismo de β -glucósidos se induce en presencia de estos compuestos, por un mecanismo de terminación/aniterminación de la transcripción de los genes correspondientes, codificados en el operón *bgl* (Mahadevan y Wright, 1987; Houman y cols., 1990). Un elemento central de la regulación del operón es la presencia de dos terminadores transcripcionales independientes de rho, que flanquean al gen *bglG*, el primero del operón. BglG, el producto de *bglG*, tiene la propiedad de unirse específicamente a una región de ambos terminadores. La interacción de la proteína BglG con el RNA interfiere con la función de la horquilla en el mecanismo de terminación, provocando un aumento de la transcripción del operón completo. La capacidad de BglG de unirse al RNA depende de su estructura cuaternaria, que es controlada por el grado de fosforilación, que a su vez se regula en respuesta al nivel de β -glucósidos en el medio (Amster-Choder y cols., 1989). El operón *bgl* tiene en común con *tyrZ* la presencia en la región líder de un terminador de la transcripción independiente del factor rho. Si la secuencia de la caja T, que se sobrepone al terminador en una corta extensión, constituyera un sitio blanco para un factor regulador de la

expresión de *tyrZ*, podría operar un mecanismo de regulación similar en ambos casos. Sin embargo, en *tyrZ* existen además otros elementos estructurales, como el codón de tirosina, y la estructura secundaria general del RNA, que sugieren un mecanismo de regulación de la terminación independiente de rho diferente.

Proyecciones del trabajo realizado en esta tesis.

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta tesis, las proyecciones del trabajo experimental pueden asociarse en tres partes:

1.- Efecto de la carencia de tirosina sobre la expresión de la tirosil tRNA sintetasa de *T. ferrooxidans*.

Para conocer el nivel al cual se produce el efecto de la carencia de tirosina en la actividad de la tirosil tRNA sintetasa será necesario analizar la síntesis de la tirosil tRNA sintetasa, por ejemplo mediante la detección y cuantificación de la proteína en los distintos medios de cultivo por la utilización de anticuerpos policlonales, dirigidos contra la tirosil tRNA sintetasa de *T. ferrooxidans*. Se analizará el efecto de hidroxamato de tirosina sobre los niveles del mRNA de *tyrZ* mediante la metódica de extensión de un partidor. Estos experimentos son de importancia fundamental para establecer si el mecanismo de regulación de la expresión de *tyrZ* opera a nivel de la traducción o de la transcripción del gen.

2.- Mecanismo de regulación de la expresión de la tirosil tRNA sintetasa.

En esta tesis se ha propuesto un mecanismo de la regulación de la expresión de un gen de tirosil tRNA sintetasa. Ha quedado pendiente la confirmación de la funcionalidad de las señales estructurales presentes en la región 5' no codificante de *tyrZ* y la verificación del mecanismo propuesto. Para abordar estas tareas, en etapas posteriores a esta tesis será imperativo el desarrollo de metódicas tendientes a probar la funcionalidad del potencial terminador de la transcripción, determinar la magnitud de la terminación de la transcripción en ese sitio en mRNA provenientes de bacterias cultivadas en alta o baja disponibilidad de tirosina.

Para estudiar la participación del triplete que codifica para tirosina y por lo tanto del tRNA^{Tyr} en la regulación de la transcripción de *tyrZ*, sería de gran utilidad disponer de construcciones que contengan la región 5' no codificante de *tyrZ* mutada en esa secuencia, por ejemplo por un cambio a un codón para otro aminoácido o a un codón sin sentido. Considerando que no es posible introducir DNA exógeno en *T. ferrooxidans*, existe la posibilidad de transformar *B. subtilis* con estas construcciones fusionadas a un gen reportero y analizar el efecto de la disponibilidad de tirosina en la expresión de este gen.

3.- Número de genes que codifican para la tirosil tRNA sintetasa de *T. ferrooxidans*.

En *E. coli*, *S. typhi* y otros microorganismos Gram (-), las aminoacil tRNA sintetatas son enzimas codificadas por un solo gen, con excepción de la lisil tRNA sintetasa (revisión en

Grunberg-Manago, 1987; Putzer y cols., 1995). En base a este hecho, en el análisis e interpretación de los resultados de actividad enzimática en carencia de tirosina se ha supuesto que la actividad detectada en los extractos de *T. ferrooxidans* corresponde a la codificada por el gen *tyrZ*, caracterizado en esta tesis. Esta suposición se apoya además, en los resultados de hibridación al DNA genómico de *T. ferrooxidans* que indicaban la existencia de una copia de este gen en el cromosoma de la bacteria. Sin embargo, en esta discusión es necesario considerar otras alternativas, como la posibilidad de que la actividad enzimática se origine en un segundo gen funcional de tirosil tRNA sintetasa. En *B. subtilis* existen dos genes que codifican para tirosil tRNA sintetasa, *tyrZ* y *tyrS*, cuyos productos son muy disímiles entre sí (27 % de identidad en aminoácidos) (Glaser y cols., 1991; Henkin y Grundy, 1992). Uno de estos genes, *tyrZ*, no se expresa en condiciones normales de proliferación vegetativa, y el mRNA se ha detectado sólo cuando *tyrS* no es funcional (Putzer y cols., 1995). El gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans* es muy similar al gen *tyrZ* de *B. subtilis* (Salazar y cols., 1994), por lo que se considera factible la existencia de un segundo gen para tirosil tRNA sintetasa en esa bacteria. Es posible que ambos genes fueran muy diferentes entre sí, lo que explicaría el hecho que no se detectara en los experimentos de hibridización contra una sonda consistente en un fragmento de DNA de *tyrZ*. Por otro lado, el gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans* se transcribe débilmente, por lo que es necesario cuestionarse si la síntesis de tirosil tRNA sintetasa desde *tyrZ* es suficiente para satisfacer los requerimientos de síntesis de proteínas de la célula. En este sentido, es posible que la existencia de otro gen respondiera a la necesidad de una segunda fuente de tirosil tRNA sintetasa. Para abordar el problema del número de genes de

tirosil tRNA sintetasa en *T. ferrooxidans* es fundamental contar con la posibilidad de manipular los genes de esta bacteria. Las aaRS son enzimas fundamentales para la viabilidad celular, por lo tanto, si existe un segundo gen funcional de tirosil tRNA sintetasa en *T. ferrooxidans*, las bacterias deberían sobrevivir a la inactivación del gen *tyrZ*.

CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en esta tesis se puede concluir lo siguiente:

- Existe sólo una copia del gen *tyrZ* en el genoma de *T. ferrooxidans*.
- El producto del gen *tyrZ* de *T. ferrooxidans* es capaz de complementar una mutación termosensible en el gen *tyrS* de *E. coli*, por lo que se concluye que *tyrZ* codifica para una tirosil tRNA sintetasa funcional.
- Mediante PCR de cDNA de *T. ferrooxidans* se logró detectar el mRNA de *tyrZ*, por lo tanto se concluye que el gen se transcribe *in vivo*.
- El extremo 5' del mRNA de *tyrZ* se localiza aproximadamente 350 nucleótidos río arriba del supuesto inicio de la traducción del gen *tyrZ*.
- No se detectó un producto de cotranscripción de *tyrZ* y del operón ribosomal *rrnT2*. Sin embargo, la posibilidad de la cotranscripción no se puede descartar totalmente, debido a la probable inestabilidad de un precursor que abarque ambos genes.
- El operón ribosomal *rrnT2* se transcribe a partir de un promotor localizado aproximadamente 140 pb río arriba del inicio del rRNA 16S. Es probable que además exista transcripción del rRNA a partir de un promotor localizado en la región interna de *tyrZ*.
- En bacterias cultivadas en presencia de hidroxamato de tirosina, una condición de carencia artificial de este aminoácido, la actividad específica de la tirosil tRNA sintetasa de *T. ferrooxidans* aumentó 6 a 7 veces en comparación a la actividad en las

bacterias cultivadas en exceso de tirosina. Posiblemente este aumento se debe a un incremento en la velocidad de síntesis de la enzima en la condición de carencia artificial de tirosina.

- En la región del DNA correspondiente al líder del mRNA de *tyrZ* se detectó elementos de secuencia y de la estructura secundaria del RNA que sugieren que la expresión del gen *tyrZ* dependiente de la disponibilidad de tirosina, se regula por un mecanismo de terminación/antiterminación de la transcripción, similar al sistema de regulación de la expresión de genes de aaRS de bacterias Gram (+).

REFERENCIAS

- Alexander, B., Leach, S. y Ingledew, W.J. 1987. The relationship between chemiosmotic and sensitivity to anions and organic acids in the acidophile *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Gen. Microbiol.* 133: 1171-1179.
- Alifano, P., Rivellini, F., Limauro, D., Bruni, C., y Carlomagno, M.S. 1991. A consensus motif common to all Rho-dependent prokaryotic transcription terminators. *Cell* 64: 553-563.
- Amster-Choder, O., Houman, F. y Wright, A. 1989. Protein phosphorylation regulates transcription of the β glucoside utilization operon in *E. coli*. *Cell* 58: 847- 855.
- Apirion, D. y Gegenheimer, P. 1984. Molecular biology of RNA processing in prokaryotic cell, pag. 36-62. En D. Apirion (de.), Processing of RNA. CEC Press, Boca Raton, Fla.
- Archibold, E.R., y Williams, L.S. 1972. Regulation of synthesis of methionyl-, prolyl-, and threnyl -transfer ribonucleic acid synthetases of *E. coli*. *J. Bacteriol.* 109: 1020-1026.
- Archibold, E.R., y Williams, L.S. 1973. Regulation of methionyl-transfer ribonucleic acid synthetase formation in *E. coli* and *S. typhimurium*. *J. Bacteriol.* 114: 1007-1013.
- Baht, T.N., Blow, D.M. y Brick, P. 1982. Tyrosyl tRNA synthetase forms a mononucleotide binding fold. *J. Mol. Biol.* 158: 699-719.
- Baracchini, E., y Bremer, H. 1988. Stringent control and growth of rRNA synthesis in *Escherichia coli* are both mediated by ppGpp. *J. Biol. Chem.* 263: 2597-2602.
- Baracchini, E., y Bremer, H. 1991. Control of rRNA synthesis in *Escherichia coli* at increased *rrn* gene dosage: role of guanosine tetraphosphate and ribosome feedback. *J. Biol. Chem.* 266: 11753- 11760.
- Barker, D.G., Brunton, C.J., Winter, G. 1982. The Tyrosyl tRNA synthetase from *E. coli*. *FEBS Letters* 150: 419-423.
- Barros, M.E.C., Rawlings, D.E. y Woods, D.R. 1984. Mixotrophic growth of *Thiobacillus ferrooxidans* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 593-595.

- Bedouelle, H. y Winter, G. 1986. A model of synthetase transfer RNA interaction as deduced by protein engineering. *Nature* 320: 371-373.
- Blow, D.M., Bhat, T.N., Metcalfe, A., Risler, J.L., Brunie, S., y Zelwer, C. 1983. Structural homology in the amino terminal domains of two aminoacyl-tRNA synthetases. *J. Mol. Biol.* 171: 571-576.
- Boros, Y., Csordás-Tóth, E., Kiss, A., Kiss, I., Török, I., Udvardy, A., Udvardy, K., y Venetianer, P. 1983. Identification of two new promoters probably involved in the transcription of a ribosomal RNA gene of *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta* 739: 173-180.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Ann. Biochem.* 72: 248-254.
- Bremer, H., Dennis, P.P. 1987. Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate,. En F.C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology, vol. 2 p. 1527-1542. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Brun, Y.V., Sanfaçon, H., Brenton, R., y Lapointe, J. 1990. Closely spaced and divergent promoters for an aminoacyl-tRNA synthetase gene and a tRNA operon in *E. coli*. Transcriptional and post-transcriptional regulation of *gltX*, *valU* and *alaW*. *J. Mol. Biol.* 214: 845-864.
- Casio, D. 1975. Role of methionyl-transfer ribonucleic acid in the regulation of of methionyl-transfer ribonucleic acid synthetase in *E. coli* K-12. *J. Bacteriol.* 123: 589-587.
- Clark , R.L. , Neidhardt, F.C. 1990. Roles of the two lysyl-tRNA synthetases of *Escherichia coli*: analysis of the nucleotide sequences and mutant behavior. *J. Bacteriol.* 172: 3237-3243.
- Cole, J.R., y Nomura, M. 1986. Translation regulation is responsible for growth-rate-dependent and stringent control of the synthesis of ribosomal proteins L11 and L1 in *E. coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83: 4129-4133.
- Condon, C., Squires, C. y Squires, C.L. 1995. Control of rRNA transcription in *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 56: 623-645.
- Cusack, S., Berthet-Colominas, C., Härtlein, M., Nassar, N. y Leberman, R. 1990. A second class of synthetase structure revealed by X-ray analysis of *Escherichia coli* seryl-tRNA synthetase at 2.5 Å. *Nature (London)* 347: 249-255.

- Cheng, S.-W.C, Lynch, E.C., Leason, K.R., Court, D.L. , Shapiro, B.A., y Friedman, D.L. 1991. Functional importance of sequence in the stem-loop of a transcription terminator. *Science* 254: 1205- 1207.
- Cheung, A.Y. y Söll, D. 1984. *In vivo* and *in vitro* transcription of the *E. coli glnS* gene. *J. Biol. Chem.* 259: 9953-9958.
- Cheung, A.Y., Watson, L., y Söll, D. 1985. Two control systems modulate the level of glutaminyl-tRNA synthetase in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 161: 212-218.
- Dale, B.A., Nester, E.W. 1971. Regulation of tyrosyl transfer ribonucleic acid synthetase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 108: 586-588.
- Dardel, F., Panvert, M., y Fayat, G. 1990. Transcription and regulation of of expression of the *E. coli* methionyl-tRNA synthetase gene. *Mol. Gen. Genet.* 223: 121-133.
- Eriani, G., Delarue, M., Poch, J.G., y Moras, D. 1990. Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature* 347: 203-206.
- Fayat, G., Blanquet, S., Dessen, P., Batelier, G., Waller, J.P. 1974. The molecular weight and subunit composition of phenylalanyl- tRNA synthetase from *Escherichia coli* K-12. *Biochimie* 56: 35-41.
- Fayat, G., Mayaux, J.F., Sacerdot, C., Fromant, M., Springer, M., Grunberg-Manago, M., y Blanquet, S. 1983. *Escherichia coli* phenylalanyl-tRNA synthetase operon region. Evidence for an attenuation mechanism. Identification of the gene for the ribosomal protein L20. *J. Mol. Biol.* 171: 239-261.
- Feinberg, A.P y Vogelstein, B. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132: 6-13.
- Fersht, A.R., Knill-Jones, J.W., Bedouelle, H., Winter, G. 1988. Reconstruction by site-directed mutagenesis of the transition state for the activation of tyrosine by the tyrosyl-tRNA synthetase: a mobile loop envelopes the transition state in an induced-fit mechanism. *Biochemistry* 27: 1581-1587.
- Gaal, T., y Gourse, R.L. 1990. Guanosine 3'-diphosphate 5'-diphosphate is not required for growth-rate-dependent control of rRNA synthesis in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 5533-5537.
- Gagnon, Y., Breton, R., Putzer, H., Pelchat, M., Grunberg-Manago, M., Lapointe, J. 1994. Clustering and co-transcription of the *Bacillus subtilis* genes encoding the

aminoacyl-tRNA synthetases specific for glutamate and for cysteine and the first enzyme for cysteine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 269: 7473-7482.

Gale, N.L., Beck, J.V. 1967. Evidence for the Calvin cycle and hexose monophosphate pathway in *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 91: 1052-1059.

Gendron, N., Putzer, H., y Grunberg-Manago, M. 1994. Expression of both *B. subtilis* Threonyl tRNA synthetase genes is autogenously regulated. *J. Bacteriol.* 176: 486-494.

Gilbert, S.F., de Boer, H.A. y Nomura, M. 1979. Identification of initiation sites for the *in vitro* transcription of rRNA operons *rrnE* and *rrnA* in *E. coli*. *Cell* 17: 211-224.

Glaser, P., Kunst, F., Débarbouillé, M., Vertès, A., Danchin, A. y Dedonder, R. 1991. A gene encoding a tyrosine-tRNA synthetase is located near *sacS* in *Bacillus subtilis*. *J. DNA Mapping Sequencing* 1: 251- 261.

Gourse, R.L., Takebe, Y., Sharrock, R.A., y Nomura, M. 1985. Feedback regulation of rRNA and tRNA synthesis and accumulation of free ribosomes after conditional expression of rRNA genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1069-1073.

Grandoni, J.A., Zahler, S.A., Calvo, J.M. 1992. Transcriptional regulation of the *ilv-leu* operon of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 174: 3212-3219.

Grunberg-Manago, M. 1987. Regulation of the expression of aminoacyl-tRNA synthetases and translation factors. p 1386-1409. En F.C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology, vol. 2 American Society for Microbiology, Washington D.C.

Grundy, F.J. y Henkin, T.M. 1994. Conservation of a transcription antitermination mechanism in aminoacyl-tRNA synthetase and amino acid biosynthesis genes in Gram-positive bacteria. *J. Mol. Biol.* 235: 798-804.

Grundy, F.J., Henkin, T.M. 1993. tRNA as a positive regulator of transcription antitermination in *B. subtilis*. *Cell* 74: 475-482.

Hagen, F.S., Young, E. 1978. Effect of RNase III on the efficiency of translation of bacteriophage T7 lysozyme mRNA. *J. Virol.* 26: 793-804.

Hall, C.V., y Yanofsky, C. 1982. Regulation of tryptophanyl-tRNA synthetase formation. *J. Bacteriol.* 151: 918-923.

Harrison, A.P.Jr. 1984. The acidophilic Thiobacilli and other acidophilic bacteria that share their habitat. *Annu. Rev. Microbiol.* 38: 265-292.

- Henkin, T.M. 1994. tRNA-directed transcription antitermination. *Mol. Microbiol.* **13**: 381-387.
- Henkin, T.M., Glass, B.L. y Grundy, F.J. 1992. Analysis of the *Bacillus subtilis tyrS* gene: conservation of a regulatory region sequence in multiple tRNA synthetase genes. *J. Bacteriol.* **174**: 1299-1306.
- Houman, F., Diaz-Torres, M.R. y Wright, A. 1990. Transcriptional antitermination in the *bgl* operon of *E. coli* is modulated by a specific RNA binding protein. *Cell* **62**: 1153-1163.
- Hudson, G.S., Howlett, G.J., Davidson, B.E. 1983. The binding of tyrosine and NAD⁺ to chorismate mutase/prephenate dehydrogenase from *Escherichia coli* K-12 and the effects of these ligands on the activity of self-association of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **258**: 3114-3120.
- Ingledeu, W.J. 1982. *Thiobacillus ferrooxidans*, the bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph. *Biochim. Biophys. Acta* **683**: 89-117.
- Ito, K., Kawakami, K., y Nakamura, Y. 1993. Multiple control of *Escherichia coli* lysyl tRNA synthetase expression involves a transcriptional repressor and a translational enhancer element. *Proc. Natl. Acad. Sci.(USA)* **90**: 302-306.
- Jenal, U., Thurner, C., y Leisinger, T. 1993. Transcription of the *ileS* operon in the Archaeon *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marmurg. *J. Bacteriol.* **175**: 5945-5952.
- Jensen, K.F., y Pedersen, S. 1990. Metabolic growth rate control in *E. coli* may be a consequence of subsaturation of the macromolecular biosynthetic apparatus with substrates and catalytic components. *Microbiol. Rev.* **54**: 89-100.
- Jinks-Robertson, S. y Nomura, M. 1987. Ribosomes and tRNA, p. 1358-1385. En Neidhardt, F.C., Ingraham, J.L., Low, K.B., Magasanik, B., Schaechter, M. y Umberger, H.E. (eds.), "*Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology". American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Jinks-Robertson, S., Gourse, R., y Nomura, M. 1983. Expression of rRNA and tRNA genes in *E. coli*: evidence for feedback regulation by products of rRNA operons. *Cell* **33**: 865-876.
- Jones, M.D., Lowe, D.M., Borgford, T., y Fersht, A.R. 1986. Natural variation of Tyrosyl tRNA synthetase and comparison with engineered mutants. *Biochemistry* **25**: 1887- 1891.

- Kawakami K., Jönsson, Y.H. Björk, G.R., Ikeda, H. y Nakamura, Y. 1988. Chromosomal location and structure of the operon encoding peptide-chain-release factor 2 of *E. coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5620-5624.
- Kawasaki, E.S. 1990. Amplification of RNA, en Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J. y White, T.J. (eds), PCR Protocols. A guide to methods and applications. pag.21-27. Academic Press, Inc. San Diego, California, USA.
- King, T.C. y Schlessinger, D. 1983. S1 nuclease mapping analysis of ribosomal RNA processing in wild type and processing deficient *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 258: 12034-12042.
- King, T.C., Sirdeskmukh, R. y Schlessinger, D. 1986. Nucleolytic processing of ribonucleic acid transcripts in prokaryotes. Microbiological Rev. 50: 428 - 451.
- Lam, H.M. y Winkler, M.E. 1992. Characterization of the complex *pdxH-tyrS* operon of *E. coli* K-12 and pleiotropic phenotypes caused by *pdxH* insertion mutations. J. Bacteriol. 174: 6033-6045.
- Landick, R. y Yanofsky, C. 1984. Stability of an RNA secondary structure affects *in vitro* transcription pausing in the *trp* operon leader region J. Biol. Chem. 259: 11550 - 11555.
- Landick, R., y Yanofsky, C. 1987. Transcription attenuation,. En Neidhardt, F.C. (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, p1276-1301, vol 2. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
- Lau, L.F., Roberts, J.W., y Wu, R. 1983. RNA polymerase pausing and transcript release at the λt_{R1} terminator *in vitro*. J. Biol. Chem. 258: 9391-9397.
- Leatherbarrow, R.J., Fersht, A.R. 1987. Investigation of transition-state stabilization by residues histidine-45 and threonine-40 in the tyrosyl -tRNA synthetase. Biochemistry 26: 8524-8528.
- Leatherbarrow, R.J., Fersht, A.R. y Winter, G. 1985. Transition-state stabilization in the mechanism of tyrosyl-tRNA synthetase revealed by protein engineering. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 7840-7844.
- Leberman, R., Härtle, M., y Cusack, S. 1991. *Escherichia coli* seryl- tRNA synthetase: the structure of a class 2 aminoacyl-tRNA synthetase. Biochem. Biophys. Acta. 1089: 287-298.

- Lee, F., y Janofsky, C. 1977. Transcription termination at the *trp* operon attenuators of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: RNA secondary structure and regulation of termination. Proc. Natl. Acad. Sci. 74: 4365-4369.
- Lestienne, P., Plumbridge, J.A., Grunberg-Manago, M., y Blanquet, S. 1984. Autogenous repression of *Escherichia coli* Threonyl-tRNA synthetase expression *in vitro*. J. Biol. Chem. 259: 5232-5237.
- Levêque, F., Plateau, P., Dessen, P. y Blanquet, S. 1990. Homology of *lysS* and *lysU*, the two *Escherichia coli* genes encoding distinct lysyl-tRNA synthetase species. Nucl. Acids Res. 8: 305-312.
- Lindahl, L., y Zengel, J.M. 1986. Ribosomal genes in *Escherichia coli*. Annu. Rev. Genetic. 20: 297-396.
- Lindahl, L., y Zengel, J.M. 1990. Autogenous control is not sufficient to ensure steady-state growth rate-dependent regulation of the S10 ribosomal operon of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 172: 305-309.
- Mackintosh, M.E. 1978. Nitrogen fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Gen. Microbiol. 34: 263-283.
- Mahadevan, S. y Wright, A. 1987. A bacterial gene involved in transcription antitermination: regulation at a rho-independent terminator in the *bgl* operon of *E. coli*. Cell 50: 485- 494.
- Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acids from microorganisms. J. Mol. Biol. 3: 208- 218.
- Mavrides, C. y Orr, W. 1974. Multiple forms of plurispecific aromatic: 2-oxoglutarate (oxaloacetate) aminotransferase (transaminase A) in *Escherichia coli* and selective repression by L-tyrosine. Biochim. Biophys. Acta 336: 70-78.
- Mayaux, J.F., Fayat, G., Panvert, M., Springer, M., Grunberg-Manago, M., y Blanquet, S. 1985. Control of Phenylalanyl-tRNA synthetase genetic expression. Site-directed mutagenesis of the *pheST* operon regulatory region *in vitro*. J. Mol. Biol. 184: 31-44.
- McGinnis, E., Williams, S. 1971. Regulation of synthesis of the aminoacyl-transfer ribonucleic acid synthetase for the branched -chain aminoacids of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 108: 254-262.
- Mechulam, Y., Dardel, F., LeCorre, D., Blanquet, S., y Fayat, G. 1991. Lysine 335, part of the KMSKS signature sequence, plays a crucial role in the amino acid activation

- catalysed by the methionyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 217: 465-475.
- Miennel, T., Mechulam, Y. y Blanquet, S. 1995. Aminoacyl-tRNA synthetases: occurrence, structure and function. p. 251-292. En Söll, D. y Rajbhandary, U. (eds), "tRNA structure, biosynthesis, and function." American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Miller, C.G. 1987. Protein degradation and proteolytic modifications. En F.C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology, p. 680-691, vol 1. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Moine, H., Romby, P., Springer, M., Grunberg-Manago, M., Ebel, J.P., Ehresmann, B., y Ehresmann, C. 1990. *Escherichia coli* Threonyl-tRNA synthetase and tRNA^{Thr} modulate the binding of the ribosome to the translational initiation site of the *thrS* mRNA. J. Mol. Biol. 216: 299-310.
- Moras, D. 1992. Structural and functional relationships between aminoacyl-tRNA synthetases. Trends Biochem. Sci 17: 159-164.
- Morgan, W.D., Bear, D.G., y von Hippel, P.H. 1983. Rho-dependent termination of transcription II. Kinetics of mRNA elongation during transcription from the bacteriophage λ P_R promotor. J. Biol. Chem. 258: 9565- 9574.
- Nass, G., y Neidhardt, F. 1967. Regulation of formation of amino-acyl ribonucleic acid synthetases in *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta 134: 347-359..
- Peck, H.D. 1968. Energy-coupling mechanism in chemolithotrophic bacteria. Annu. Rev. Biochem. 22: 489-518.
- Pittard, A.J. 1987. Biosynthesis of the aromatic amino acids. En F.C. Neidhardt (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology, p 368-394, vol 1. American Society for Microbiology, Washington D.C.
- Putney, S.D., Schimmel, P. 1981. An aminoacyl-tRNA synthetase binds to a specific DNA sequence and regulates its gene transcription. Nature (London) 291: 632-635.
- Putzer, H., Grunberg-Manago, M. y Springer, M. 1995. Bacterial aminoacyl-tRNA synthetases: genes and regulation of expression. p. 251- 333. Dieter Söll y Uttam Rajbhandary (eds.). En "tRNA: structure, biosynthesis and function". American Society for Microbiology, Washington, D.C.

- Putzer, H., Brakhage A.A. y Grunberg-Manago, M. 1990. Independent genes for two threonyl-tRNA synthetases in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 172: 4593-4602.
- Putzer, H., Gendron, N. y Grunberg-Manago, M. 1992. Co-ordinate expression of the two threonyl-tRNA synthetase genes in *Bacillus subtilis*: control by transcriptional antitermination involving a conserved regulatory sequence. *EMBO J.* 11: 3117-3127.
- Reeh, S., Pedersen, S., Neidhardt, F.C. 1977. Transient rates of synthesis of five aminoacyl-transfer ribonucleic acid synthesis during a shift-up of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 129: 702-706.
- Richardson, J.P. 1993. Transcription termination. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology.* 28: 1-30.
- Risler, J.L., Zelwer, C., y Brunie, S. 1981. Methionyl-tRNA synthetase shows the nucleotid binding fold observed in dehydrogenases. *Nature (London)* 292: 384-386.
- Rokeach, L.A. 1988. Molecular cloning of a cDNA encoding the human Sm-D autoantigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4832- 4836.
- Rossmann, M.G., Moras, D., y Olsen, K.W. 1974. Chemical and biological evolution of a nucleotide-binding protein. *Nature (London)* 250: 194-199.
- Rould, M.A., Perona, J.J., Söll, D., y Steitz, T.A. 1989. Structure of *E. coli* glutaminyl-tRNA synthetase complexed with tRNA^{Gln} and ATP at 2.8 Å resolution. *Science* 246: 1135-1142.
- Ruff, M., Cavarelli, J., Mikol, V., Lorber, B., Mitschler, A., Giegé, R., Thierry, J.C., y Moras, D. 1988. A high resolution diffracting crystal form of the complex between yeast tRNA^{Asp} and aspartyl-tRNA synthetase. *J. Mol. Biol.* 201: 235- 236.
- Ryals, J., Little, R., y Bremer, H. 1982. Control of rRNA and tRNA syntheses in *Escherichia coli* by guanosine tetraphosphate. *J. Bacteriol.* 158: 1261- 1268.
- Salazar, .O., Sagredo, B., Jedlicki, E., Söll, D., Weygand- Durasevic, I., y Orellana, O. 1994. *Thiobacillus ferrooxidans* Tyrosyl-tRNA synthetase functions *in vivo* in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 176: 4409-4415.
- Salazar, O., Takamiya, M., y Orellana, O. 1989. Characterization of the two rRNA gene operons present in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEBS Lett.* 242: 439-443
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. Pag. 7.39-7..52. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, USA.

- Sarmientos, P. y Cashel, M. 1983. Carbon starvation and growth-rate regulation of the *Escherichia coli* ribosomal RNA promoters: differential control of dual promoters. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 7010-7013.
- Sarmientos, P., Sylvester, J.E., Contente, S., y Cashel, M. 1983. Differential stringent control of the tandem *E. coli* ribosomal RNA promoters from the *rrnA* operon expressed *in vivo* in multicopy plasmids. Cell 32: 1337-1346.
- Schmitt, E., Meinnel, T., Panvert, M., Mechulam, Y. y Blanquet, S. 1995. Transition state stabilization by the "HIGH" motif of class I aminoacyl-tRNA synthetases: the case of *Escherichia coli* methionyl-tRNA synthetase. Nucl. Acids Res. 23: 4793-4798.
- Sherman, J.M., Rogers, M.J., y Söll, D. 1992. Competition of aminoacyl-tRNA synthetases for tRNA ensures the of aminoacylation. Nucl. Acids Res. 20: 2847-2852.
- Smith, A.J., London, J., y Stainer, R.Y. 1967. Biochemical basis of obligate autotrophy in blue-green algae and *Thiobacilli*. J. Bacteriol. 94: 972-983.
- Southern, E.M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98 : 503-517.
- Springer, M., Graffe, M., Butler, J.S., y Grunberg-Manago, M. 1986. Genetic definition of the translational operator of the threonine-tRNA ligase gene in *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 4384-4388.
- Springer, M., Mayaux, J.F., Fayat, G., Plunbridge, J.A., Graffe, M., Blanquet, S., y Grunberg-Manago, M. 1985. Attenuation control of the *Escherichia coli* Phenylalanyl-tRNA synthetase operon. J. Mol. Biol. 181: 467-478.
- Springer, M., Plunbridge, J.A., Butler, J.S., Graffe, M., Dondon, J., Mayaux, J.F., Fayat, G., Lestienne, P., Blanquet, S., y Grunberg-Manago, M. 1985. Autogenous control of *Escherichia coli* threonyl-tRNA synthetase expression *in vivo*. J. Mol. Biol. 185: 93-104.
- Springer, M., Trudel, M., Graffe, M., Plumbridge, J., Fayat, G., Mayaux, J.F., Sacerdot, C., Blanquet, S., y Grunberg-Manago, M. 1983. *Escherichia coli* Phenylalanyl-tRNA synthetase operon is controlled by attenuation *in vivo*. J. Mol. Biol. 171: 263-279.
- Sugio, T., Tanijiri, Sh., Fukuda, K., Yamaryo, K., Inagaki, K., y Tano, T. 1987. Utilization of amino acids as a sole source of nitrogen by obligate chemolithoautotroph *Thiobacillus ferrooxidans*. Agric. Biol. Chem. 51: 2229-2236.

- Swanson, R., Hoven, P., Summer-Smith, M., Uemura, H., Watson, L., y Söll, D. 1988. Accuracy of *in vivo* aminoacylation requires proper of tRNA and aminoacyl-tRNA synthetase. *Science* 242: 1548- 1551.
- Tabita, R. y Loundgren, D.G. 1971. Utilization of glucose and the effect of organic compounds on the chemolithotroph *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 108: 328-333.
- Takamiya, M., Salazar, O., Vargas, D., Jedlicki, E., y Orellana, O. 1990. Identification and structural, analysis of a ribosomal rRNA gene promotor from *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEBS Lett.* 272: 50-54.
- Tosa, T. y Pizer, L. 1971. Biochemical base for the antimetabolite action of L-serine hydroxamate. *J. Bacteriology* 106: 972-982.
- Waye, M.M., Winter, G. 1986. A transcription terminator in the 5' non-coding region of the Tyrosyl tRNA synthetase gene from *Bacillus stearothermophilus*. *Eur. J. Biochem.* 158: 505-510.
- Winter, G., Koch, L.E., Hartley, B.S., y Barker, D.G. 1983. The amino acid sequence of the Tyrosyl tRNA synthetase from *B. stearothermophilus*. *Eur. J. Biochem.* 132: 383-387.
- Woese, C.R. 1987. Bacterial Evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221-271.