



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

SISTEMAS DE CAPTACIÓN Y TRANSPORTE DE HIERRO EN
Acidithiobacillus ferrooxidans:
EFFECTO DE LA BIODISPONIBILIDAD DE HIERRO SOBRE LA EXPRESIÓN GÉNICA

Memoria para optar al título profesional de Bioquímico

PAMELA ANDREA NIETO PACHECO

Directora de memoria:

Dra. Eugenia Jedlicki C.

Laboratorio de Genética Molecular
Bacteriana
Programa de Biología Celular y
Molecular
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Sub-directora de memoria:

Dra. Raquel Quatrini N.

Centro de Bioinformática y
Biología Genómica
Fundación Ciencia para la Vida

Patrocinante:

Dra. Daniela Seelenfreund H.

Laboratorio de Bioquímica
Departamento de Bioquímica y Biología
Molecular
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Santiago de Chile, 2009

Dedicada a mis padres...

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer a la Dra. Eugenia Jedlicki, por su cariño, guía y constantes consejos. Porque ante todo siempre fue una *profesora*, que me enseñó cómo debe ser un buen investigador.

A la Dra. Raquel Quatrini, porque fue una excelente tutora y siempre tuvo palabras de apoyo y motivación... Gracias por tu cariño Raquel, porque además te convertiste en una amiga muy querida.

Al Dr. David S. Holmes... For helping me with my posters, paper, thesis summary, and for his useful comments on my seminar presentations.

A la Dra. Daniela Seelenfreund, por su constante preocupación y buena disposición ante todo.

A mis compañeros de laboratorio de la U, especialmente a Claudia, Assaf, Vero B., Vero M... ¡gracias por su buen humor, buenos momentos y ayuda!

A mis compañeros de laboratorio de la Fundación, Paulo y Cristian, por estar siempre dispuestos a ayudar y por todos los buenos momentos que pasamos.

A muchas otras personas, que a lo largo de mi carrera han sido parte importante de mi formación, entre ellas a la Dra. Inés Contreras, Dra. Cecilia Toro, Dr. Guillermo Figueroa.

A mis amigos de la Universidad... Andrea, Carla, Cecilia y Gonzalo. Gracias amigos por tantas risas, tardes de estudio y tardes de ocio que compartimos a lo largo de todos estos años.

Y finalmente quiero agradecer a las personas más importantes en mi vida...

A mi Pato... Porque durante todos estos años me apoyaste siempre y me hiciste sentir que podía lograr cualquier cosa... Porque gracias a ti los malos momentos no eran tan malos, y los buenos eran más buenos aún.

A mis papás, porque gracias a ustedes soy quien soy, porque me han apoyado en cada etapa de mi vida y me han hecho sentir lo importante que soy para ustedes... Porque a pesar de la distancia siempre han estado muy cerca de mí.

FINANCIAMIENTO

Este trabajo fue financiado por el Proyecto FONDECYT 1050063 y 11060164.

Esta tesis ha dado lugar a las siguientes presentaciones a congreso y publicaciones:

Nieto P, Bravo V, Jedlicki E, Holmes DS, Quatrini R. **2007**. Determination of most stably expressed housekeeping genes in *Acidithiobacillus ferrooxidans* under diverse experimental setups. XXIX Congreso Chileno de Microbiología; Viña del Mar, Chile.

Nieto PA, Jedlicki E, Holmes DS, Quatrini R. **2008**. New insights into iron management mechanisms in the acidophile *A. ferrooxidans*: an iron transporter dedicated to metal import for nitrogenase function. XXX Congreso Chileno de Microbiología; Concepción, Chile.

Nieto PA, Covarrubias PC, Jedlicki E, Holmes DS, Quatrini R. "Selection and evaluation of reference genes for improved interrogation of microbial transcriptomes: case study with the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*", manuscrito que se encuentra en revisión para su consideración en BMC Molecular Biology.

Parte del análisis bioinformático realizado en esta tesis ha contribuido a generar el manuscrito "Osorio H, Martinez V, **Nieto PA**, Holmes DS, Quatrini R. Microbial iron management mechanisms in extremely acidic environments: comparative genomics evidence for diversity and versatility", el cual ha sido recientemente publicado en BMC Microbiology 2008, 8:203.

INDICE GENERAL

Agradecimientos	iii
Financiamiento	iv
Presentaciones a congreso y publicaciones	v
Índice general	vi
Índice de figuras y tablas	x
Abreviaturas	xii
Resumen	xiv
Summary	xvi
1. Introducción	1
1.1 Importancia del control de la homeostasis de hierro	1
1.2 Acidófilos quimiolitioautótrofos y la gran cantidad de hierro biodisponible	2
1.3 Fur y sus conexiones con la respuesta de homeostasis de hierro	4
1.4 Validación de los modelos y conexiones regulatorias	5
1.5 Microarreglos específicos para <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	5
Hipótesis	7
Objetivo general	7
Objetivos específicos	7
2. Materiales y métodos	8
2.1 Reactivos	8
2.2 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	9

2.3 Colección de células	9
2.4 Extracción y cuantificación de DNA genómico	9
2.5 Extracción y cuantificación de RNA	10
2.6 Electroforesis en gel de agarosa	10
2.7 Amplificación por PCR	10
2.8 Síntesis de cDNA mediante RT-PCR	11
2.9 Ensayo de co-transcripción	11
2.10 PCR en tiempo real	11
2.11 Preparación de extractos y electroforesis de proteínas	12
2.12 Western blot	13
2.13 ChIP-on-chip	13
2.14 Métodos bioinformáticos	16
3. Resultados	17
3.1 Caracterización de módulos funcionales involucrados en la asimilación de hierro en bacterias del género <i>Acidithiobacillus</i>	17
3.1.1 Transportadores de ion férrico	17
3.1.1.a Tipos de transportadores	17
3.1.1.b Organización génica	18
3.1.1.c Puntos isoeléctricos predichos para los receptores de membrana externa (OMR)	21
3.1.2 Transportadores de ion ferroso: FeoB y MntH	21
3.2 Análisis de los perfiles transcripcionales de los transportadores y reguladores de hierro en <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	23
3.2.1 Búsqueda de genes de referencia para la normalización de la expresión en ensayos de PCR en tiempo real	25

3.2.1.a Estrategia para la selección de genes de referencia	25
3.2.1.b Análisis de los niveles de expresión	26
3.2.2 Cuantificación de la expresión de los genes <i>fur</i> y <i>phoB</i>	29
3.2.3 Cuantificación de la expresión de los transportadores de ion ferroso	30
3.2.4 Cuantificación de la expresión de los transportadores de ion férrico	31
3.2.4.a Expresión relativa de los genes de transportadores de ion férrico en hierro 200 mM con respecto a azufre pH 3,5	32
3.2.4.b Expresión relativa de los genes de transportadores de ion férrico en hierro 200 mM con respecto a calcopirita	34
3.2.4.c Expresión relativa de los genes de transportadores de ion férrico en azufre a pH 2,5; 4,5 y tiosulfato respecto a azufre a pH 3,5	35
3.2.5 Caracterización del <i>cluster</i> génico de transporte de Fe ⁺³ exclusivo de <i>A. ferrooxidans</i> ..	37
3.2.5.a Contexto génico	37
3.2.5.b Análisis de co-transcripción del operón de transporte de Fe ⁺³	38
3.3 Caracterización del regulón Fur en <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> a través de estrategias globales	40
3.3.1 Estandarización del protocolo de sonicación de los complejos Fur:DNA	41
3.3.2 Evaluación del protocolo de formación de inmuno-complejos en extractos totales de <i>A. ferrooxidans</i>	42
3.3.3 Evaluación del enriquecimiento por PCR semicuantitativo	43
3.3.4 Ensayo completo microarreglo de DNA inmunoprecipitado versus DNA total (paso 2 chIP-on-chip)	45
4. Discusión	46
4.1 Extensión del modelo de homeostasis de hierro en <i>A. ferrooxidans</i>	46

4.2 Análisis de los perfiles transcripcionales de los sistemas de adquisición de hierro	49
4.3 ChIP-on-chip	54
5. Conclusiones	55
6. Bibliografía	56
ANEXO 1: Partidores utilizados	62
ANEXO 2: Proteínas predichas para los genes de los 7 <i>clusters</i> de transporte de hierro en <i>A. ferrooxidans</i>	65
ANEXO 3: Expresión de los genes evaluados por PCR en tiempo real	66
3.1 Expresión de los genes candidatos a genes de referencia	67
3.2 Expresión de los genes de los reguladores Fur y PhoB	72
3.3 Expresión de los genes de los transportadores de Fe ⁺²	73
3.4 Expresión de los genes de los transportadores de Fe ⁺³	74
3.5 Niveles de expresión normalizados con los genes de referencia seleccionados	80

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1:	Sistemas de captación de Fe ⁺² y Fe ⁺³ en bacterias -----	3
Figura 2:	OMR predichos y su distribución en los Acidithiobacilli -----	18
Figura 3:	Organización de los 7 <i>clusters</i> génicos en donde están insertos los 11 genes <i>omr</i> predichos para <i>A. ferrooxidans</i> (AF) -----	19
Figura 4:	Modelo que conecta la biosíntesis de citrato con su posterior uso como ferri- sideróforo -----	20
Figura 5:	OMR predichos para <i>A. ferrooxidans</i> y sus correspondientes puntos isoeléctricos -	21
Figura 6:	Sistemas de transporte de Fe ⁺² FeoPABC y MntH -----	22
Figura 7:	Estrategia de trabajo utilizada para el análisis de perfil transcripcional en las seis condiciones de crecimiento estudiadas -----	24
Figura 8:	Estrategia de trabajo para la selección de genes de referencia a utilizar en estudios de PCR en tiempo real -----	26
Figura 9:	Valor M y variación del Factor de Normalización al considerar los 9 genes candidatos a genes de referencia -----	28
Figura 10:	Nivel de expresión relativo de los genes <i>omr</i> al comparar cultivos de Fe 200 mM con cultivos en azufre pH 3,5 -----	33
Figura 11:	Nivel de expresión relativo de los genes <i>omr</i> al comparar cultivos de Fe 200 mM cultivos de calcopirita 2,5% -----	34
Figura 12:	Nivel de expresión relativo de los genes <i>omr</i> al comparar cultivos de S a pH 2,5; 4,5 y de tiosulfato con cultivos de S a pH 3,5 -----	36
Figura 13:	Análisis de co-transcripción del <i>cluster</i> 4 -----	40
Figura 14:	DNA extraído de células tratadas con formaldehído, sometido a sonicación y a diferentes tratamientos para revertir el entrecruzamiento -----	42
Figura 15:	Western blot para Fur -----	43

Figura 16:	PCR semicuantitativo para los genes <i>pgm</i> y <i>gloA</i>	44
Tabla 1:	Genes candidatos a genes de referencia	27
Tabla 2:	Razones de expresión de los genes <i>fur</i> , <i>phoB</i> , <i>mntH</i> y <i>feoB</i> al comparar distintos medios de crecimiento	30
Tabla 3:	Nivel de expresión relativo de los once genes <i>omr</i> predichos para <i>A. ferrooxidans</i> en Fe 200 mM respecto a las demás condiciones de crecimiento	31
Tabla 4:	Expresión de los genes <i>omr</i> en Fe <i>versus</i> S y su correlación con la presencia o ausencia de caja Fur	33
Tabla 5:	Expresión de los genes <i>omr</i> en Fe <i>versus</i> calcopirita y su correlación con la presencia o ausencia de caja Fur	35
Tabla 6:	OMR y sus puntos isoeléctricos predichos	37
Tabla 7:	Evaluación del enriquecimiento del DNA inmunoprecipitado (“Fur DNA”)	44
Tabla 8:	Algunos de los genes identificados como blancos de Fur a partir de 3 réplicas del ensayo de chIP-on-chip	45

ABREVIATURAS

9K-Fe	Medio salino 9K a pH 1,6 al cual se ha adicionado FeSO ₄ 200 mM
9K-S	Medio salino 9K al cual se ha adicionado azufre particulado al 1%
A	Amperes
A_{260}/A_{280}	Razón de absorbancia a 260 nm y 280 nm
bp	Pares de bases
ChIP-on-chip	Ensayo de inmunoprecipitación de cromatina y microarreglo de DNA
CP	Calcopirita
DEPC	Dietilpirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EMSA	Ensayo de retardo de la movilidad electroforética
FURTA	Ensayo de titulación del represor Fur (<i>ferric uptake regulator titration assay</i>)
HKGs	Genes <i>housekeeping</i>
ITVA	Ensayo de transcripción <i>in vitro</i>
<i>omr</i> /OMR	Gen/proteína predicho(a) para receptor de membrana externa dependiente de TonB (<i>outer membrane receptor</i>)
pI	Punto isoeléctrico
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonil

RNA	Ácido ribonucleico
RT	Transcripción inversa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TBS	Amortiguador Tris salino
trHb	Hemoglobina truncada
TS	Tiosulfato
U	Unidad enzimática
UV	Ultravioleta
V	Volts

RESUMEN

El hierro es a la vez un micronutriente esencial y un potencial agente de daño oxidativo. Como para las bacterias este elemento es imprescindible, es necesaria una estricta regulación de su concentración intracelular. La homeostasis del hierro se logra mediante la regulación de su adquisición, almacenamiento y utilización.

Acidithiobacillus ferrooxidans es una bacteria acidófila que vive en un medio cuya biodisponibilidad de hierro supera con creces a la tolerada por bacterias neutrófilas. Es por lo tanto muy interesante estudiar cómo esta bacteria logra mantener la homeostasis del hierro en estas condiciones. El objetivo de esta tesis fue estudiar los sistemas de captación y transporte de hierro en *A. ferrooxidans*, centrando el análisis principalmente en los genes predichos para receptores de sideróforos (*omr*). Al analizar su ubicación y contexto genómico, se observó que estos genes forman parte de *clusters* bien definidos cuya organización génica es singular, ya que además de estar asociados a genes relacionados con el transporte de hierro, varios de ellos tienen genes vecinos con funciones predichas no relacionadas. Mediante un ensayo de co-transcripción demostramos que uno de los *clusters* génicos es un operón.

El análisis de la expresión a nivel de mRNA de los *omrs* se realizó en bacterias crecidas en medios de cultivo con diferente sustrato energético y concentración de hierro soluble (hierro, azufre, tiosulfato y calcopirita) y diferente pH (azufre a pH 2,5-3,5-4,5). Al comparar cultivos en hierro a pH 1,6 con cultivos en azufre a pH 3,5 la mayoría de los genes *omr* con igual especificidad predicha para sideróforo mostraron perfiles transcripcionales similares. Por otro lado, el análisis de expresión en medios de azufre con pHs diferentes se abordó considerando el punto isoeléctrico predicho para los OMR, pero no se encontró una correlación clara entre expresión, pH del medio y este parámetro.

Adicionalmente se evaluó la expresión génica de dos transportadores de Fe^{+2} (*feoB* y *mntH*), encontrándose resultados similares a los descritos en otras bacterias, esto es una mayor expresión cuando la concentración de hierro del medio de crecimiento es baja. Por otra parte, dada la presencia de cajas Fur predichas en varios de los *clusters* génicos de transporte de hierro, y la gran cantidad de genes relacionados con el metabolismo de fosfato que estos presentan, se incluyeron en el análisis los genes de los reguladores Fur y PhoB. Ambos genes mostraron un comportamiento opuesto a lo esperado: el gen *fur* mostró un perfil transcripcional inverso a lo que se observa a nivel de proteína; y

phoB, teniendo río arriba una caja Fur validada *in vitro*, presentó un comportamiento contrario al de un gen reprimido por Fur.

Para la validación *in vivo* de los sitios de unión del regulador Fur, implementamos en el laboratorio el ensayo de chIP-on-chip. Se logró implementar con éxito la primera etapa de este ensayo, pero deberán adicionarse en un futuro protocolos de amplificación de la señal para poder alcanzar los resultados esperados.

SUMMARY

Iron uptake and transport systems in *Acidithiobacillus ferrooxidans*:

Effects of iron bioavailability on gene expression

Iron is both an essential micronutrient and a potential agent of oxidative damage, and strict regulation of its intracellular concentration is required. This regulation is achieved by homeostatic mechanisms that balance iron acquisition, storage and utilization.

Acidithiobacillus ferrooxidans is an acidophilic bacterium that thrives in environments with very high levels of bioavailable iron greatly surpassing the concentration tolerated by neutrophilic bacteria. Therefore, it is very important to study iron homeostasis in *A. ferrooxidans*. This thesis aims to study the iron acquisition systems of *A. ferrooxidans*, focusing the analysis on genes predicted to encode siderophore receptors (*omr*) and Fe²⁺ transporters. An analysis of the genomic context and location of the *omr* genes revealed that they constitute defined clusters with genetic organizations not encountered in other microorganisms. In addition to their association with other genes related to iron transport, some of them have neighboring genes with non iron-related predicted functions. By means of a co-transcription assay we demonstrated that one of these clusters is an operon.

Gene expression analysis for the predicted *omrs* was performed on cell cultures grown, to the logarithmic phase, in media with different energetic substrates and soluble iron concentrations (iron, sulfur, thiosulfate and chalcopyrite) and with different pHs (sulfur at pH 2.5-3.5-4.5). When comparing results derived from iron cultures at pH 1.6 to sulfur cultures at pH 3.5, most *omrs* sharing similarly predicted siderophore affinities showed similar transcriptional profiles. An earlier observation had demonstrated that the OMR exhibited a range of predicted isoelectric points from pI 6.7 to pI 9.2 and we evaluated the possible relationship between these predicted pIs and the expression of the corresponding genes in cells grown in sulfur medium at different pHs. However, no clear correlation could be established.

In addition, the genetic expression of the two Fe⁺² transporters *feoB* and *mntH* was evaluated. Results demonstrate that these genes exhibit higher expression under iron restricted conditions, as has been observed in other bacterial systems. The presence of potential Fur boxes and genes related to phosphate metabolism in several of the predicted *omr* clusters prompted an evaluation of the expression of genes encoding the transcriptional regulators Fur and PhoB. Both *fur* and *phoB* showed

an unexpected behavior: *fur* was induced in iron while the Fur protein levels have been shown previously to decrease in the presence of high iron concentrations; and *phoB*, with an upstream experimentally validated Fur box, was not repressed in iron as expected for a typical Fur target.

Also, the first experimental stages of a chIP-on-chip strategy for the whole genome mapping of Fur binding sites *in vivo* were successfully implemented. Additional amplification steps are required for protocol completion.

1. INTRODUCCION

1.1 Importancia del control de la homeostasis de hierro.

El hierro es un micronutriente esencial para las bacterias, ya que gracias a sus propiedades redox, actúa como transportador de electrones y como cofactor de muchas enzimas. A pesar de ser un elemento abundante en nuestro planeta, su biodisponibilidad es baja, ya que si bien en condiciones reductoras o de anaerobiosis predomina el Fe^{+2} , a pH neutro y en presencia de oxígeno éste se oxida rápidamente a Fe^{+3} y forma compuestos insolubles que no pueden ser internalizados por la célula.

Si bien es un metal indispensable, en condiciones aeróbicas una alta concentración de hierro en el medio puede resultar tóxica para la bacteria, debido a que el metal favorece la producción de especies reactivas del oxígeno y cataliza reacciones de Fenton, contribuyendo así al estrés oxidativo (1). Frente a esta dualidad, la bacteria debe mantener un estricto control de los niveles intracelulares de hierro. Si éstos son suficientes para cubrir los requerimientos de la célula, se reprimen los sistemas de captación del metal y se promueve su almacenamiento y utilización. Si el hierro es escaso, se promueve la expresión de receptores y transportadores, para así lograr un mayor ingreso del metal (2-4). Este rol es desempeñado por reguladores transcripcionales, como Fur o DtxR, que operan simultáneamente como sensores citoplasmáticos de hierro y como efectores de respuesta, controlando la expresión de un vasto número de genes blanco, entre ellos los involucrados en la captación del metal.

Para la captación de Fe^{+3} , las bacterias secretan compuestos quelantes de hierro de alta afinidad llamados sideróforos. De acuerdo a los grupos funcionales que usan como ligando para coordinar el Fe^{+3} , éstos se clasifican en 3 categorías: hidroxamatos, α -hidroxiácidos y catecolatos (cíclicos y lineales) (5). En bacterias Gram negativas, la captación de ferri-sideróforos ocurre a través de receptores específicos de la membrana externa (OMR), cuya expresión por lo general se induce frente a la escasez de hierro. Tras la unión del ferri-sideróforo, el OMR sufre un cambio conformacional que se refleja en su porción periplásmica, la cual interactúa con la proteína TonB, parte del complejo proteico TonB-ExbD-ExbB. Se cree que las proteínas ExbD y ExbB utilizan energía proveniente del gradiente de carga electroquímica de la membrana interna para producir una forma “energizada” de TonB, la cual mediaría la translocación del ferri-sideróforo a través del OMR hacia el

periplasma (6). Una vez en el periplasma, el ferri-sideróforo es captado por proteínas periplásmicas de unión a sideróforos y es llevado al citoplasma por medio de transportadores tipo ABC asociados a la membrana interna. Se cree que en el citoplasma ocurre una reducción del Fe^{+3} , de manera que el Fe^{+2} se disocia del sideróforo debido a la baja afinidad que tiene el compuesto quelante por este ion. Existen varias enzimas con actividad férrico-reductasa, pero no se ha esclarecido su rol en este proceso (6).

La captación de Fe^{+2} se realiza a través de sistemas tipo Nramp, como MntH (7, 8) y permeasas tipo ABC, como SitABCD (9, 10); pero principalmente por medio del sistema FeoAB (11). El modelo de transporte de Fe^{+2} a través de este último sistema sugiere que el metal ingresa al periplasma través de una porina y es translocado al citoplasma por la proteína de membrana FeoB, la cual interactúa con FeoA en el citoplasma (12). Exclusivamente en las γ -proteobacterias existe un gen adicional que acompaña a *feoA* y *feoB*, denominado *feoC*. Su proteína posee un dominio putativo de unión a DNA, por lo que se cree podría ser un regulador transcripcional que ejerce un control directo sobre la transcripción de *feoABC*. Los tres genes que conforman este sistema son reprimidos por Fur (13). La **Figura 1** resume los componentes que forman parte del sistema de captación de Fe^{+2} y Fe^{+3} y su disposición en la membrana de una bacteria Gram negativa.

1.2 Acidófilos quimiolitautótrofos y la gran cantidad de hierro biodisponible.

Las bacterias acidófilas se enfrentan a niveles de hierro que sobrepasan con creces la concentración tolerada por bacterias neutrófilas, ya que a pH ácido el Fe^{+2} es bastante más soluble que a pH neutro y persiste en este estado por mucho más tiempo, incluso en presencia de oxígeno. Esta mayor presencia de hierro soluble y por lo tanto mayor biodisponibilidad del metal, hace que el control de la homeostasis de hierro sea sumamente interesante de estudiar en este grupo de microorganismos. Los mecanismos involucrados en la mantención de la homeostasis de hierro aún no han sido definidos, y siendo estos microorganismos los principales partícipes de la biolixiviación de minerales, es muy importante descifrar cuál es su papel en este proceso. Para entender cómo estas bacterias son capaces de tolerar niveles tan altos de hierro, es necesario comprender no sólo los mecanismos a través de los cuales adquieren, utilizan, almacenan y oxidan el hierro, sino también los mecanismos de regulación que coordinan todas estas funciones. Adicionalmente, es importante conocer los mecanismos de resistencia o amortiguación que poseen para sobrellevar el daño por estrés oxidativo que conlleva una sobrecarga constante de hierro en el medio.

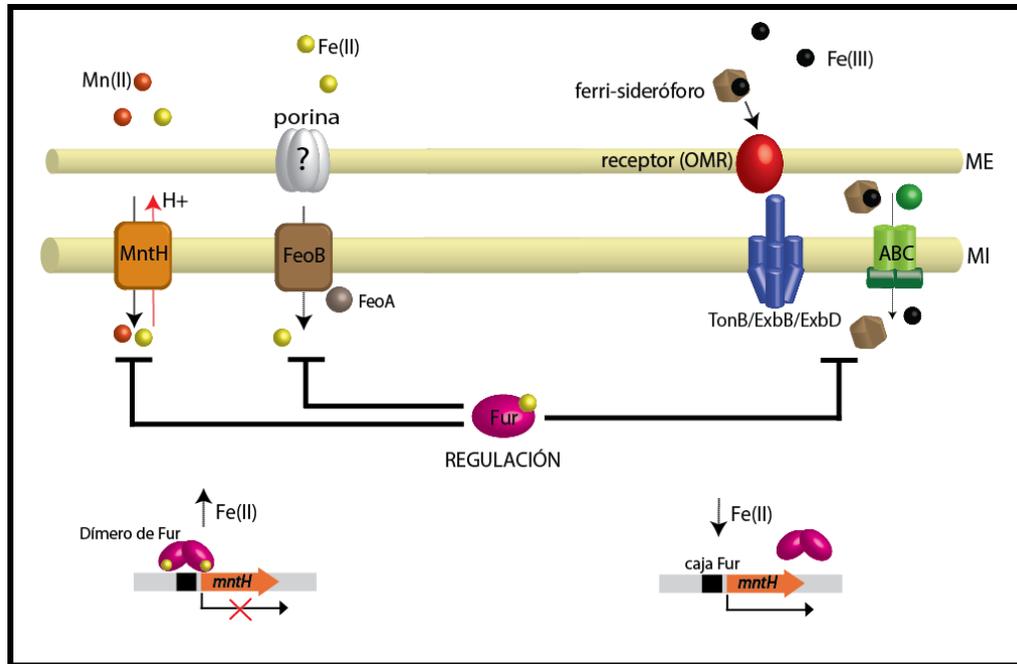


Figura 1: Sistemas de captación de Fe⁺² y Fe⁺³ en bacterias.

Disposición de los sistemas de captación de hierro en la membrana de una bacteria Gram negativa. Fur actúa como regulador global de estos sistemas, en su estado activo (unido a Fe⁺²) reprime la transcripción de los genes.

Acidithiobacillus ferrooxidans es una γ -proteobacteria quimiolitautótrofa perteneciente al grupo de bacterias acidófilas, por lo cual su nicho ecológico se caracteriza por una alta concentración de hierro. La bacteria utiliza este metal como metabolito primario y como fuente de energía y electrones (14); también es capaz de utilizar compuestos de azufre reducido y otros minerales compuestos como pirita y calcopirita (15). Es un componente importante del consorcio de microorganismos usados para la recuperación de metales (16), y dada la particularidad de su hábitat, es un modelo interesante para estudiar la homeostasis de hierro y develar aspectos importantes de ésta en acidófilos extremos.

1.3 Fur y sus conexiones con la respuesta de homeostasis de hierro.

En bacterias, la mantención de la homeostasis de hierro se logra en gran medida gracias al factor transcripcional Fur (*ferric uptake regulator*) (6, 17, 18). Inicialmente identificado en *E. coli* (19), este factor transcripcional ha sido caracterizado en una gran cantidad de bacterias Gram negativas (20-22), positivas (23-25) e incluso en cianobacterias (26). Es un regulador conservado que une Fe^{+2} , dimeriza por medio de su dominio C-terminal (27), y se une al DNA a través del dominio N-terminal (28, 29). Si las cantidades de hierro sobrepasan un determinado umbral, Fur se activa debido a que la unión del metal induce un cambio conformacional en la proteína (30, 31). Puede entonces unirse al promotor del gen blanco en una secuencia denominada caja Fur, e impedir así, la unión de la RNA polimerasa (32). Según el modelo del hexámero propuesto para *E. coli*, una caja Fur está formada por un mínimo de 3 repeticiones de la secuencia 5'-NAT^A/TAT-3' (33, 34). Estos hexámeros pueden estar ubicados en igual o distinta orientación, y se ha visto que repeticiones adicionales afectan la afinidad de la unión Fur-DNA (34).

Además de su comportamiento clásico (represión del gen blanco cuando Fur se encuentra en su estado activo, unido a hierro), existe evidencia de que Fur puede actuar como represor sin estar unido al metal (35). Por otra parte, en algunas bacterias actúa como activador; de manera similar a su modo de acción clásico, pero provocando un aumento en la expresión del gen blanco (37), y de manera indirecta a través de la represión del RNA pequeño RyhB, el cual reprime la expresión de proteínas que utilizan hierro (36).

A. ferrooxidans posee un ortólogo de Fur de *E. coli* (Fur_{AF}), que presenta una similitud con éste de un 51% a nivel de proteína y que es capaz de complementar su función en mutantes *fur* de *E. coli* (38). Mediante predicciones bioinformáticas se definió la secuencia consenso de la caja Fur (la cual concuerda con el modelo mencionado anteriormente) y se encontraron en el genoma 90 sitios candidatos de unión a Fur, algunos de los cuales fueron analizados por ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA), transcripción *in vitro* (IVTA) y ensayo de titulación del represor Fur (FURTA). Los resultados mostraron que Fur_{AF} estaría actuando como regulador de genes que codifican no sólo para proteínas que participan en la captación y utilización de hierro, sino también para reguladores transcripcionales y otros (39).

1.4 Validación de los modelos y conexiones regulatorias.

Dado que hasta el día de hoy es imposible la manipulación genética de *A. ferrooxidans*, las técnicas experimentales que se han empleado utilizan como base predicciones generadas mediante herramientas bioinformáticas. Éstas han sido fundamentales para la proposición de modelos que intentan explicar, por ejemplo, el metabolismo del azufre (40) o la homeostasis de hierro (39, 41).

En relación a la homeostasis de hierro, el análisis bioinformático del genoma de *A. ferrooxidans* ha permitido identificar genes putativos que codifican para funciones de captación, tanto de Fe^{+2} como de Fe^{+3} , de almacenamiento y de utilización del metal (39). Sin embargo, nada se sabe acerca del comportamiento de estos genes frente a la diferente biodisponibilidad de hierro que puede enfrentar *A. ferrooxidans* durante su participación en los ciclos de biolixiviación. Por otra parte, las regiones promotoras de muchos de estos genes presentan cajas Fur predichas, lo que sugiere una regulación hierro dependiente mediada por este regulador, aunque actualmente se desconoce si éstas participan efectivamente en el control transcripcional de estos transportadores. Por otro lado y si bien algunas de las cajas Fur predichas bioinformáticamente han sido validadas por ensayos FURTA y/o EMSA (datos que a su vez confirman la utilidad de dichas predicciones), no se ha realizado aún un análisis experimental completo del regulón Fur que defina su envergadura, ni que caracterice en detalle la naturaleza de sus blancos y su comportamiento transcripcional. Este vacío ha gatillado el presente estudio, que busca profundizar en ciertos aspectos de la homeostasis de hierro de *A. ferrooxidans* y establecer una conexión con la regulación transcripcional mediada por Fur.

1.5 Microarreglos específicos para *A. ferrooxidans* ATCC23270

En nuestro laboratorio se han construido microarreglos de oligonucleótidos (50mer) específicos para la cepa tipo de *A. ferrooxidans*, los cuales han sido empleados en el estudio de cambios en el perfil transcripcional de la bacteria cuando ésta es crecida en presencia de diferentes fuentes energéticas (42, 43). La disponibilidad de tales microarreglos permite abordar el estudio de otras respuestas transcripcionales, como la mediada por Fur o por hierro, de modo global. Sin embargo, frente a la imposibilidad de mutar o delecionar el gen del regulador, el análisis de la expresión de sus genes blancos con esta técnica puede resultar ambiguo. No obstante, la posibilidad de realizar entrecruzamiento entre las moléculas del complejo proteína:DNA *in vivo* y recuperar el DNA unido específicamente a un tipo de proteína (ej. el regulador Fur), abre nuevos caminos en la investigación

de regulones utilizando microarreglos. Esta técnica conocida como *chIP-on-chip* ha sido empleada exitosamente en el estudio de regulones bacterianos (44-46), y su implementación en nuestra bacteria modelo representaría un avance significativo para el estudio de respuestas regulatorias globales.

De acuerdo con los antecedentes expuestos, se ha propuesto la siguiente hipótesis de trabajo:

Hipótesis

La expresión de los genes de captación y transporte de hierro en *A. ferrooxidans* depende de la concentración de hierro biodisponible en el medio de crecimiento, siendo a su vez dependiente de la regulación mediada por el factor transcripcional Fur.

Objetivo general

Estudiar los perfiles transcripcionales de genes relevantes para la captación y transporte de hierro, algunos de los cuales son portadores de sitios de unión predichos para el regulador Fur.

Objetivos específicos

1. Caracterizar en profundidad los genes involucrados en la captación y transporte de hierro en la cepa tipo de *A. ferrooxidans*, en cuanto a su naturaleza y regulación dependiente de Fur, utilizando técnicas de biología genómica.
2. Estudiar la expresión de los genes codificantes para transportadores de Fe^{+2} y Fe^{+3} en *A. ferrooxidans*, en diversas condiciones de cultivo con diferente disponibilidad de hierro, mediante PCR cuantitativo.
3. Integrar los resultados obtenidos en los dos objetivos anteriores para determinar el efecto de la concentración de hierro del medio de cultivo de *A. ferrooxidans* sobre la expresión de los genes relacionados con la captación y transporte de hierro.
4. Expandir nuestros conocimientos en cuanto a la naturaleza de Fur como regulador global en *A. ferrooxidans* haciendo un *screening* de sus sitios de unión a través de ensayos de inmunoprecipitación de complejos Fur:DNA generados *in vivo* por entrecruzamiento con formaldehído.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Reactivos

- Sulfato de amonio, fosfato ácido de potasio, fosfato diácido de potasio, sulfato de magnesio heptahidratado, azufre, sulfato de hierro II heptahidratado, tiosulfato de sodio pentahidratado, cloruro de calcio dihidratado, cloruro de sodio, acetato de sodio, glucosa, ácido bórico, ácido sulfúrico, hidróxido de sodio, ácido clorhídrico, ácido acético glacial, etanol absoluto, isopropanol, metanol, acetona, alcohol isoamílico, cloroformo, formaldehído, azul de bromofenol, azul de Coomassie, glicina, proteinasa K, lisozima, bromuro de etidio, acrilamida, bisacrilamida, tween20: *Merck (Darmstadt, Alemania)*.
- Fenol ácido, fenol básico, TRIzol, agarosa, resina de agarosa con proteína A (Sepharose), Cy3/Cy5, dNTPs, Pfx Platinum, Superscript II, DTT, RNase OUT, First Strand Buffer 5X, random primers, Sybr GreenER qPCR Mix, Long fragment of DNA polymerase (Klenow), Buffer React2, DNA ladder 100 bp/1 kb: *Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA, EEUU)*.
- GeneRuler 100 bp Ladder Plus: *Fermentas (Glen Burnie, MD, EEUU)*.
- Sistema comercial One Step PCR: *Qiagen (Germantown, MD, EEUU)*.
- GoTaq, sistema comercial ChipShot Clean-Up System: *Promega (Madison, WI, EEUU)*.
- Sistema comercial Pronto! Hybridization #40026: *Corning Inc. Life Sciences (Lowell, MA, EEUU)*.
- Glicerol, Tris-Base, EDTA: *USBiological (Swampscott, MA, EEUU)*.
- Sistema comercial de detección quimioluminiscente Supersignal West Pico: *Pierce (Rockford, IL, EEUU)*.
- Dodecil sulfato de sodio (SDS): *Calbiochem (La Jolla, CA, EEUU)*.
- β -mercaptoetanol, persulfato de amonio (APS), N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED), fluoruro fenilmetilsulfonil (PMSF), Nonidet P-40 (NP-40), desoxicolato de sodio, dietilpirocarbonato (DEPC): *Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EEUU)*.

2.2 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

En el presente estudio se utilizó la cepa tipo de *Acidithiobacillus ferrooxidans* (ATCC 23270). Los cultivos bacterianos se crecieron a 30°C con agitación constante de 150 rpm en medio salino 9K (0,4 g (NH₄)₂SO₄; 0,1 g K₂HPO₄; 0,4 g MgSO₄ por litro) al cual se adicionó azufre (1% azufre particulado esterilizado en etanol), hierro (FeSO₄ 200 mM) o calcopirita (2,5%). El pH se ajustó con H₂SO₄ hasta alcanzar un valor de 2,5; 3,5 y 4,5 en el caso de los cultivos con azufre, y 1,6 en los cultivos de hierro y calcopirita. Para cultivos de tiosulfato se utilizó el medio DSMZ71 (5 g Na₂S₂O₃*5H₂O, 3 g KH₂PO₄, 0,5 g MgSO₄*7H₂O, 3 g (NH₄)₂SO₄ y 0,25 g CaCl₂*2H₂O por litro), cuyo pH se ajustó a 4,5- 4,7 con NaOH.

La calcopirita fue procesada en el laboratorio de molienda del SERNAGEOMIM a partir de un trozo del mineral hasta obtener un tamaño de malla de 0,2 mm. Las partículas de mineral se lavaron una vez con EDTA 0,1 M y NaOH 0,4 M durante 10 minutos, 3 veces con agua destilada y 3 veces con acetona. Finalmente la calcopirita granulada se secó en estufa a 90°C durante 48 horas.

2.3 Colección de células

Los cultivos se colectaron mediante centrifugación a 5000 x g durante 10 minutos. Las células se lavaron con medio 9K o DSMZ71 del pH correspondiente y se centrifugaron a 8000 x g durante 10 minutos, repitiendo el lavado y la centrifugación hasta obtener un sedimento celular libre de partículas minerales. Las células se mantuvieron en hielo o se guardaron a -80°C hasta su utilización.

2.4 Extracción y cuantificación de DNA genómico

Para la obtención de DNA genómico se utilizaron cultivos de fase logarítmica y estacionaria crecidos en medio 9K-Fe durante 48 y 72 horas, respectivamente. Las células se colectaron y resuspendieron en amortiguador TE (Tris-HCl 25 mM, EDTA 10 mM) pH 8,0 conteniendo 5 mg/ml de lisozima, y se incubaron a 37°C durante 30 minutos, seguidos de otra hora de incubación a la misma temperatura con 1% de SDS y 0,2 mg/ml de proteinasa K. Para la lisis celular se incubó la suspensión durante 1 minuto a 80°C y 1 minuto a -80°C, proceso que se repitió hasta observar una clarificación de la suspensión celular. El DNA se extrajo dos veces con una mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), y el fenol residual se extrajo con una mezcla cloroformo:alcohol isoamílico (24:1). El DNA contenido en la fase acuosa final se precipitó durante 12 horas a -20°C, con 0,1 volumen de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y dos volúmenes de etanol absoluto. El precipitado se centrifugó a 5600 x g durante 30 minutos y se lavó con etanol 70%. Se repitió el paso de centrifugación, se desechó el

etanol y se dejó secar el precipitado durante 5 minutos, para finalmente resuspenderlo en agua estéril. La concentración de DNA se determinó por medición espectrofotométrica a 260 nm y la contaminación con proteínas se evaluó mediante la razón A_{260}/A_{280} . La integridad del DNA se evaluó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,0% y amplificación mediante PCR estándar.

2.5 Extracción y cuantificación de RNA

Las extracciones de RNA total se realizaron a partir de cultivos en fase logarítmica. Las células colectadas se lavaron con H_2SO_4 10 mM (DEPC 0,1%) y se resuspendieron en 450 μ l de amortiguador TE (Tris-HCl 25 mM pH 8,0, EDTA 10 mM) frío y 50 μ l de amortiguador de extracción 10X (Tris-HCl 0,5 M pH 8,0, EDTA 20 mM, SDS 10%). La lisis celular se consiguió incubando a 100°C durante 5 minutos. La remoción de los detritos celulares y el DNA genómico se logró por tratamiento con Trizol:Cloroformo (1:1) y la extracción de RNA por tratamiento con fenol ácido, siguiendo los protocolos establecidos para *A. ferrooxidans* (42). Para la precipitación del RNA se siguieron los mismos pasos que para el DNA genómico, pero efectuando la centrifugación a 4°C. El RNA se resuspendió en H_2O destilada estéril (DEPC 0,1%), y se guardó a -80°C hasta el momento de su uso. La concentración de RNA se determinó por la medición espectrofotométrica a 260 nm, la contaminación con DNA se evaluó mediante un PCR estándar y la integridad del RNA se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,0%.

2.6 Electroforesis en gel de agarosa

Los geles de agarosa se prepararon al 1,0-2,0% en amortiguador TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8,0, EDTA 1 mM), conteniendo 0,5 μ g/ml de bromuro de etidio. Las muestras y los estándares de peso molecular 100 pb o 1Kb se diluyeron en amortiguador de carga antes de cargar en el gel. La electroforesis se realizó a 100 V y los ácidos nucleicos se visualizaron y fotografiaron sobre un transiluminador UV.

2.7 Amplificación por PCR

Para las reacciones de amplificación de rutina se empleó la enzima DNA polimerasa *GoTaq*. La reacción de PCR se realizó con 10 ng de DNA y una concentración final de 1 μ M para cada partidor, 2 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de cada dNTP y 1 U de polimerasa, en un volumen final de 25 μ l de 1x de amortiguador de PCR. El programa de amplificación consistió en un ciclo de desnaturalización (94°C durante 2 minutos), 35 ciclos de amplificación (92°C durante 30 segundos, 52°C durante 30 segundos,

y 72°C durante 30 segundos), y un ciclo de elongación final (72°C durante 10 minutos). Para las reacciones de PCR semi-cuantitativo se utilizó la DNA polimerasa *Pfx* Platinum. La reacción de PCR se realizó con 10 ng de DNA y una concentración final de 0,3 µM para cada partidor, 1 mM de MgSO₄, 0,3 mM de cada dNTP y 0,25 U de la polimerasa, en un volumen final de 12,5 µl de 2x amortiguador de PCR. El programa de amplificación consistió en un ciclo de desnaturalización (94°C durante 2 minutos), 35 ciclos de amplificación (94°C durante 15 segundos, 60°C durante 30 segundos, y 72°C durante 30 segundos), y un ciclo de elongación final (72°C durante 10 minutos).

2.8 Síntesis de cDNA mediante RT-PCR

La síntesis de cDNA se realizó a partir de 1 µg de RNA, utilizando la transcriptasa inversa Superscript II, hexámeros al azar o partidores específicos, según correspondiera, y el protocolo de síntesis sugerido por el fabricante.

2.9 Ensayo de co-transcripción

En los ensayos de co-transcripción del *cluster 4* se utilizó el sistema comercial “One-Step RT PCR” y se siguieron las recomendaciones del proveedor. En cada reacción se utilizaron 50 ng de RNA obtenidos a partir de un cultivo de *A. ferrooxidans* en fase logarítmica crecido en tiosulfato. La co-transcripción de genes vecinos se evaluó en función de la presencia o ausencia de amplicones, los cuales se visualizaron en un gel de agarosa al 1,5%. Los partidores empleados en este ensayo se indican en el **Anexo 1, Tabla A**.

2.10 PCR en tiempo real

Para la cuantificación de transcritos mediante PCR en tiempo real se utilizó el sistema comercial SYBR GreenER qPCR SuperMix y el instrumento Mx3000P (Stratagene). La reacción de amplificación se realizó según el protocolo siguiente: 10 minutos a 95°C; 35-45 ciclos de 30 segundos a 95°C, 15 segundos a 52°C, y 30 segundos a 72°C. Para generar la curva de disociación, la fluorescencia de los productos de PCR se midió entre 52°C y 95°C, aumentando 0,5°C/s. La especificidad de los productos se confirmó por la presencia de un único pico en la curva de disociación. Los partidores empleados en este ensayo se indican en el **Anexo 1, Tabla B y C**.

Análisis cuantitativo

Las cantidades relativas de cDNA en cada condición experimental se calcularon en base a la eficiencia específica de amplificación para cada gen. Estas cantidades se obtuvieron por interpolación con una curva estándar de 5 puntos realizada con diluciones de DNA genómico (10 ng a 0,0001 ng) para cada uno de los genes en estudio. Para la evaluación de los genes de referencia, se utilizó el programa geNorm (47), mediante el cual se calculó la estabilidad de la expresión génica (valor M) y el factor de normalización (FN). El cálculo de los niveles de expresión relativa de cada gen se realizó mediante la aplicación qBase 1.3.5 (48), utilizando como genes de referencia los 3 genes más estables seleccionados por geNorm.

Análisis estadístico

Todos los experimentos de PCR en tiempo real se realizaron a partir de dos réplicas biológicas para cada condición de crecimiento evaluada, y cada una de las réplicas se analizó en triplicado (seis valores en total para cada condición). Las cantidades relativas que se presentan en esta tesis equivalen al promedio \pm desviación estándar. Los datos se analizaron con el test de t-student o ANOVA seguido del test *a posteriori* de Dunnett, mediante el programa GraphPad Prism 4, que determinó la significancia estadística. Se consideró significativo $p < 0,05$.

2.11 Preparación de extractos y electroforesis de proteínas

Las células se resuspendieron en amortiguador de carga (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0,01%, β -mercaptoetanol 5%) y se hirvieron durante 10 minutos. Luego se centrifugaron a 9500 x g durante 5 minutos para decantar los detritos celulares, y el sobrenadante se cargó en un gel de poliacrilamida. Los geles de poliacrilamida se realizaron de la siguiente manera: para el gel resolutivo se mezclaron 1,33 ml de solución acrilamida total 30% – bisacrilamida 0,8%, 1,33 ml de amortiguador Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, 50 μ l de SDS 10%, 2,57 ml de H₂O, 50 μ l de APS 10% y 2 μ l de TEMED. Para el gel concentrador se mezclaron 330 μ l de solución acrilamida total 30% – bisacrilamida 0,8%, 250 μ l de amortiguador Tris-HCl 1 M pH 6,8, 20 μ l de SDS 10%, 1,4 ml de H₂O, 20 μ l de APS 10% y 2 μ l de TEMED. La cámara de electroforesis se llenó con amortiguador de corrida para proteínas (glicina pH 8,3 1,44%, Tris 0,3%, SDS 0,1%). La electroforesis se realizó a 150 V durante 1,5-2 horas. Los geles se tiñeron con solución de azul de Coomassie (azul de Coomassie 0,1%, metanol 45%, ácido acético 10%).

2.12 Western blot

Los geles de proteínas se lavaron con solución de transferencia (ácido bórico 0,5 M, NaOH 0,19 M, etanol 2%, SDS 0,1%) durante 30 minutos a 4°C para luego llevar a cabo la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa a 250 A durante 2 horas. El bloqueo de la membrana se realizó durante 1-2 horas a temperatura ambiente en solución de bloqueo, preparada con 100 ml de TBS/Tween 1x (para un litro: 100 ml TBS 10x (Tris-base 20 mM, NaCl 1,4M), 0,5 ml Tween20) y 5% de leche descremada. La incubación con el anticuerpo primario anti-Fur (1:500) se realizó a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación. Las membranas se enjuagaron varias veces con solución TBS/Tween 1x durante 20 minutos, para luego añadir el anticuerpo secundario conjugado con HRP (1:15000). Se repitieron los pasos de incubación y lavado. La detección de los anticuerpos secundarios se realizó utilizando el sistema comercial de detección quimioluminiscente Supersignal West Pico (Pierce), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.13 ChIP-on-chip

Inmunoprecipitación de complejos Fur:DNA

El experimento se realizó a partir de un cultivo de *A. ferrooxidans* en fase logarítmica crecido en 9K-Fe durante 48 horas. Las células se colectaron y lavaron, reservándose un tercio de éstas a -80°C como muestra control "DNA total". El entrecruzamiento DNA:proteína *in vivo* se realizó resuspendiendo el resto de las células en medio salino 9K pH 1,6 y tratándolo con formaldehído 1% a temperatura ambiente con agitación durante 30 minutos. Para detener la reacción se agregó glicina 125 mM, se mezcló invirtiendo el tubo repetidamente y se incubó a 37°C durante 5 minutos. Luego se centrifugó a 8000 x g, 4°C durante 10 minutos y se lavó el sedimento celular con 9K pH 1,6 dos veces. Las células entrecruzadas y la muestra "DNA total" se resuspendieron en 10 volúmenes de amortiguador de lisis (glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-Hcl 25 mM pH 8,0) con PMSF 1 mM y lisozima 10 mg/ml y se incubaron a 37°C durante 20 minutos hasta completar la lisis celular. Ambos lisados se diluyeron al 50% con amortiguador RIPA 2x (Tris-HCl 100 mM pH 8,0, NaCl 300 mM, EDTA 10 mM, Nonidet P-40 2%, SDS 2 mg/ml, desoxicolato 10 mg/ml), se dejaron reposar en hielo durante unos minutos y luego se sonicaron en el instrumento Branson Sonifier 250 de acuerdo a los siguientes parámetros: 20% potencia, 6 pulsos de 10 segundos cada uno, pausa en hielo de 3 minutos entre cada pulso. Para eliminar los detritos celulares las muestras se centrifugaron a 9500 x g y 4°C durante 12 minutos. Un 10% de la muestra entrecruzada se reservó a -80°C como muestra control "Input DNA".

Tanto la muestra entrecruzada restante (desde ahora denominada “Fur DNA”) como la muestra “DNA total” se sometieron a un paso de pre-aclarado (*pre-clearing*) siguiendo los criterios definidos por Danielli y cols., 2006 (44). La inmunoprecipitación de la muestra “Fur DNA” se llevó a cabo agregando 2,31 µl del anticuerpo específico anti-Fur (volumen previamente definido para lograr la máxima inmunoprecipitación) e incubando durante 12 horas a 4°C con agitación suave. A la muestra “DNA total” se añadió un volumen equivalente de amortiguador RIPA 1x en lugar del anticuerpo y se incubó de la misma manera. Luego, se agregaron 40 µl de resina de agarosa unida a proteína A a ambas muestras y se incubaron 1 hora a 4°C con agitación suave. Ambos se centrifugaron a 9500 x g y 4°C durante 5 minutos. El sobrenadante de la muestra “DNA total” se aspiró y se reservó en hielo hasta la reversión del entrecruzamiento. De la muestra “Fur DNA” se recuperó la resina de agarosa unida a proteína A y se lavó exhaustivamente, durante 10 minutos a 4°C con agitación del siguiente modo: a) un lavado con RIPA 2x (fuerza iónica alta, NaCl 300 mM, SDS 0,2%), b) dos lavados con RIPA 1x (fuerza iónica media, NaCl 150 mM, SDS 0,1%), c) dos lavados con RIPA 0,5x (fuerza iónica baja, NaCl 75 mM, SDS 0,05%) y d) un lavado con amortiguador TE (Tris-Hcl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM), mediando un paso de centrifugación a 9500 x g, 4°C durante 5 minutos, después de cada lavado. Los inmunocomplejos formados se eluyeron añadiendo 250 µl de amortiguador de elución (SDS 1%, NaHCO₃ 100 mM) e incubando la muestra durante 15 minutos a temperatura ambiente. Tras centrifugar a 9500 x g y temperatura ambiente durante 5 minutos se guardó el sobrenadante y se repitió el proceso una segunda vez. Los 500 µl de sobrenadante se diluyeron al 50% con amortiguador RIPA 2x. Para la reversión del entrecruzamiento, se tomaron las muestras “Fur DNA”, “DNA total” y “DNA input” y cada una de ellas se llevó a una concentración final de 200 mM de NaCl y se incubaron a 65°C durante 5 horas. Luego se añadió proteinasa K 200 µg/ml y se incubaron a 55°C durante 1 hora. El DNA de cada muestra se extrajo con una mezcla de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se precipitó con etanol absoluto.

Evaluación del enriquecimiento

Se habla de “enriquecimiento” cuando dentro de una población de fragmentos de DNA inmunoprecipitado hay mayor cantidad de fragmentos correspondientes a genes blancos de regulación por el factor transcripcional, en este caso Fur. Para comprobar este enriquecimiento en la muestra “Fur DNA” (inmunoprecipitado) respecto a la muestra “DNA total” (no inmunoprecipitado, y que por lo tanto no debiese mostrar enriquecimiento), se eligieron dos genes blancos de Fur, *gloA* y *feoB*, y dos genes control que no son regulados por Fur, *malQ* y *pgm*. La abundancia relativa de cada

uno en ambas muestras se evaluó mediante PCR-semicuantitativo, deteniendo la reacción de PCR luego de 20, 24, 28 y 35 ciclos de amplificación. Los productos de PCR se analizaron en geles de agarosa 1,5% y las bandas se cuantificaron por densitometría con el programa TotalLab TL100. El enriquecimiento en blancos de Fur se evaluó entonces comparando las razones (gen blanco en “Fur DNA” / gen control en “Fur DNA”) con (gen blanco en “DNA total” / gen control en “DNA total”). Los partidores utilizados se muestran en el **Anexo 1, Tabla D**.

Análisis de microarreglo

La marcación fluorescente del “DNA total” y del “Fur DNA” se realizó utilizando el fragmento Klenow de la polimerasa y las mezclas de reacción A (2 µg de DNA, 1 µl de hexámeros al azar, y H₂O estéril para completar 20 µl) y D (5 µl de amortiguador React2, 5 µl de una mezcla dNTPs {(dATP, dGTP, dTTP) 1,2 mM y dCTP 0,6 mM }, 3 µl de fluoróforo Cy5 o Cy3 1 mM, 1,4 µl del fragmento Klenow (7 U/µl) y 15,6 µl de H₂O estéril).

La mezcla A se preparó en hielo y se incubó a 95°C durante 5 minutos, manteniéndose luego en hielo. La mezcla D también se preparó en hielo, manteniéndose siempre protegida de la luz. Ambas mezclas se juntaron e incubaron a 37°C durante 3 horas. Para detener la reacción se añadió EDTA 25 mM pH 8,0. Las sondas marcadas se purificaron utilizando el sistema comercial ChipShot Clean-Up System según las instrucciones del fabricante y se concentraron utilizando un concentrador centrífugo tipo Speed Vac, a temperatura ambiente y protegidas de la luz. Las sondas concentradas se combinaron y resuspendieron en 40 µl de solución de hibridización para oligonucleótidos cortos (sistema comercial Pronto! Hybridization #40026), incubándose durante 5 minutos a 95°C. La co-hibridización de las sondas marcadas en el microarreglo de oligonucleótidos de *A. ferrooxidans* se llevó a cabo durante 16-20 horas en un baño termorregulado a 42°C. Los lavados del microarreglo post-hibridización se realizaron con el sistema comercial Pronto! Hybridization #40026, siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente el microarreglo se secó por centrifugación durante 2 minutos a 500 x g, y se guardó en un envase protegido de la luz hasta su escaneo. Los microarreglos se escanearon utilizando el lector de microarreglos ScanArray (Perkin Elmer) y las señales de fluorescencia se colectaron y analizaron utilizando el programa ScanArray Express (Perkin Elmer).

2.14 Métodos bioinformáticos

La secuencia completa del genoma de *A. ferroxidans* ATCC 23270 se obtuvo de la base de datos del Instituto de Investigación Genómica (TIGR) y las secuencias de *A. caldus* y *A. thiooxidans* se obtuvieron del Centro de Bioinformática y Biología Genómica (CBGB).

La caracterización de genes y comparación genómica se realizó mediante BlastP, PsiBlast, ClustalW y búsqueda en la base de datos pública NCBI.

3. RESULTADOS

3.1 Caracterización de módulos funcionales involucrados en la asimilación de hierro en bacterias del género *Acidithiobacillus*.

Un punto central de control de la homeostasis de hierro es la captación e ingreso del metal a la célula. La reconstrucción metabólica y la caracterización de los módulos funcionales involucrados en esta etapa son sumamente importantes para empezar a esclarecer esta respuesta en *A. ferrooxidans*. Los estudios de genómica comparativa, que abordan el análisis de similitudes y diferencias entre genomas de diferentes especies, permiten fortalecer las predicciones bioinformáticas generadas para un genoma. Por un lado, posibilitan la identificación de elementos comunes que son potencialmente importantes para el grupo de microorganismos en su nicho específico, y por otra parte dan cuenta de adaptaciones particulares de un tipo de microorganismo que puede ser de significancia ecológica en el contexto del consorcio microbiano.

3.1.1 Transportadores de ión férrico.

3.1.1.a Tipos de transportadores.

Utilizando herramientas de bioinformática y genómica, se evaluó la presencia, abundancia y especificidad química de los transportadores de Fe^{+3} en el genoma de la cepa tipo de *A. ferrooxidans* y en otras dos especies de *Acidithiobacillus* cercanamente emparentados con éste: *A. thiooxidans* y *A. caldus*. Contrario a lo que se podría esperar de la bacteria *A. ferrooxidans*, cuyo nicho ecológico se caracteriza por una gran cantidad de hierro soluble, hay en su genoma 11 marcos de lectura que codifican transportadores de ferri-sideróforos dependientes de TonB (OMR) (49). Este número es similar o incluso mayor al encontrado en bacterias neutrófilas, las cuales deben competir por el escaso hierro disponible en el medio (6, 50-51). Entre los OMR predichos para *A. ferrooxidans* hay receptores con especificidad predicha para dicitrato (tipo FecA), hidroxamato (tipo FhuA), catecolatos lineales (tipo CirA) y catecolatos cíclicos (tipo FepA) (49). Cuatro de ellos están presentes en todos los *Acidithiobacilli* secuenciados y 4 son exclusivos de *A. ferrooxidans* (**Figura 2**).

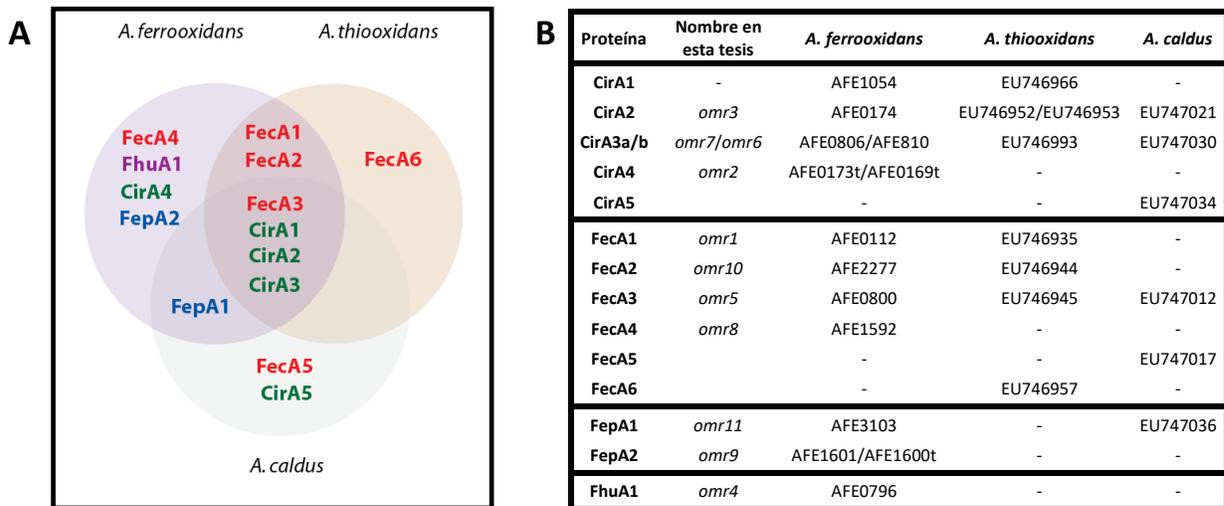


Figura 2: OMR predichos y su distribución en los Acidithiobacilli.

A) Distribución de los OMR predichos en los Acidithiobacilli. **B)** Designación dada a los genes predichos de OMR en esta tesis y su ID genómico correspondiente, de TIGR en el caso de *A. ferrooxidans* y de GenBank en el caso de *A. thiooxidans* y *A. caldus*. t = gen truncado. CirA = especificidad por catecolato lineal, FecA = especificidad por dicitrato, FepA = especificidad por catecolato cíclico, FhuA = especificidad por hidroxamato.

3.1.1.b Organización génica.

En bacterias, el análisis del contexto génico es sumamente relevante, puesto que genes asociados funcionalmente tienden a formar *clusters* génicos. En esta tesis se utiliza la palabra *cluster* para referirse a un conjunto de genes cercanos o yuxtapuestos ubicados río abajo de un promotor predicho, y que por lo tanto posiblemente conforman un operón o un grupo relacionado de operones. Los 7 *clusters* génicos en los cuales se encuentran los 11 genes *omr* predichos para *A. ferrooxidans*, y las cajas Fur predichas y/o previamente validadas en la cercanía de éstos se muestran en la **Figura 3**. Algunos de los genes *omr* de *A. ferrooxidans* y de los otros Acidithiobacilli secuenciados se encuentran insertos en contextos génicos típicos para este tipo de transportadores, es decir junto a los genes *tonB-exbB-exbD*, y con genes que codifican transportadores tipo ABC (ej.: *cluster 4*). Varios de ellos, además, tienen genes vecinos que codifican funciones aparentemente no relacionadas al transporte de hierro, entre ellos algunas enzimas (ej.: *cluster 1* y *3*), funciones de transporte y regulación (ej.: *cluster 2* y *6*) y proteínas de función desconocida (ej.: *cluster 7*) (49).

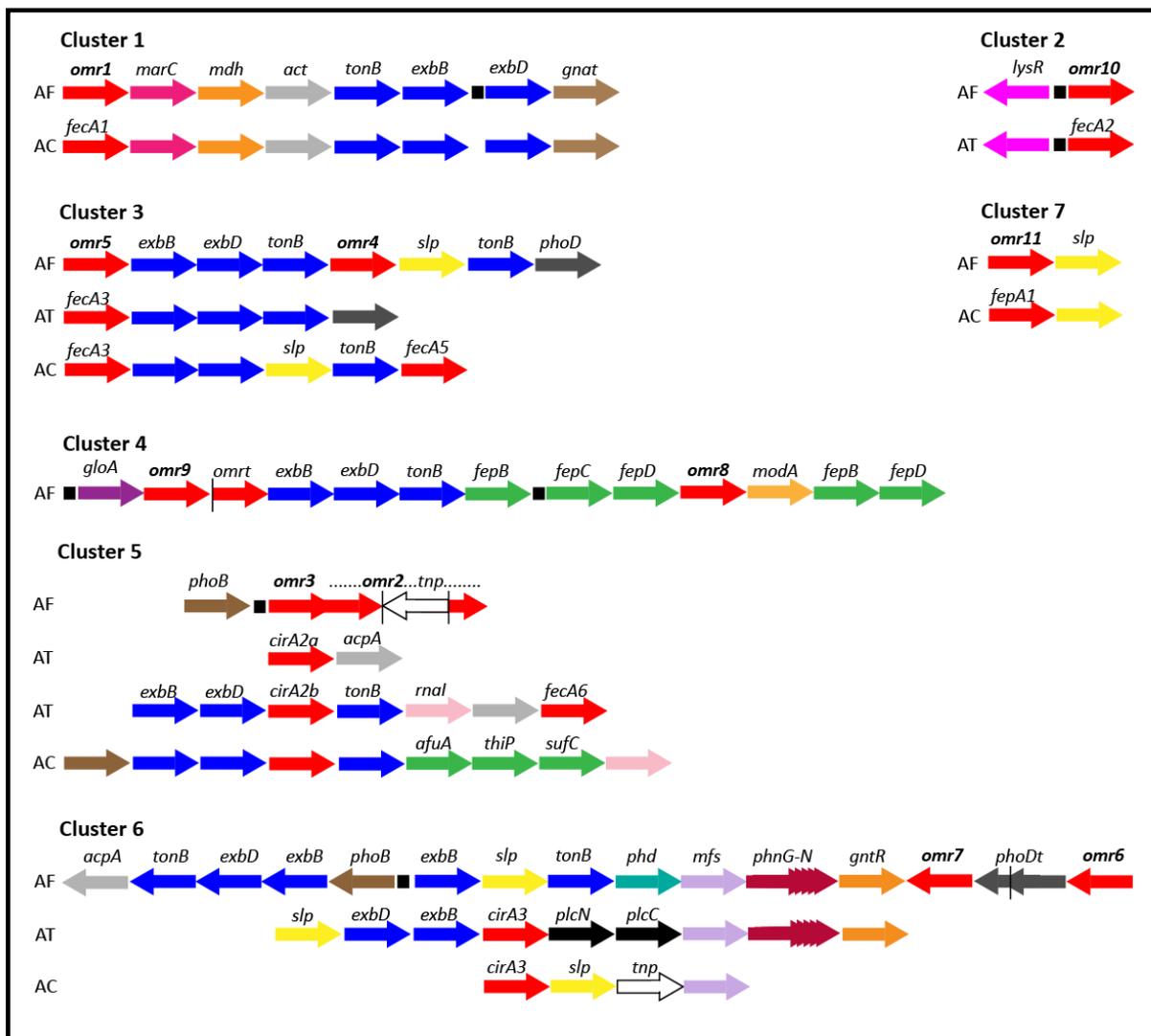


Figura 3: Organización de los 7 clusters genéticos en donde están insertos los 11 genes *omr* predichos para *A. ferrooxidans* (AF).

Se muestran también los contextos genéticos equivalentes en *A. thiooxidans* (AT) y en *A. caldus* (AC).

Cajas Fur: ■. Definiciones para cada gen en el **Anexo 2. Figura adaptada de Osorio y cols., 2008 (49).**

A pesar de ello, algunas de estas asociaciones podrían aportar indicios acerca de mecanismos relevantes para el transporte de hierro en condiciones de acidez extrema. Por ejemplo, el gen *omr1* (cluster 1) codifica un OMR con afinidad predicha para dicitrato, el tipo de OMR más abundante entre los Acidithiobacilli, y se encuentra asociado a genes que en conjunto codifican para un potencial

sistema de síntesis y eflujo de citrato. Las funciones predichas para estos genes sugieren que *A. ferrooxidans* podría sintetizar citrato para su posterior uso como ferri-sideróforo, de acuerdo al modelo esquematizado en la **Figura 4**. Este modelo conecta a la enzima malato deshidrogenasa (que produce oxalacetato a partir de L-malato) y a la citrato sintasa (que convierte el oxalacetato a citrato) con la secreción de citrato por medio de una bomba de eflujo (MarC). El citrato actuaría como sideróforo capturando Fe^{+3} y reingresaría a la célula como Fe^{+3} -dicitrato por medio del OMR específico (*omr1*), valiéndose de su sistema TonB- ExbB-ExbD y el transportador ABC asociado (49).

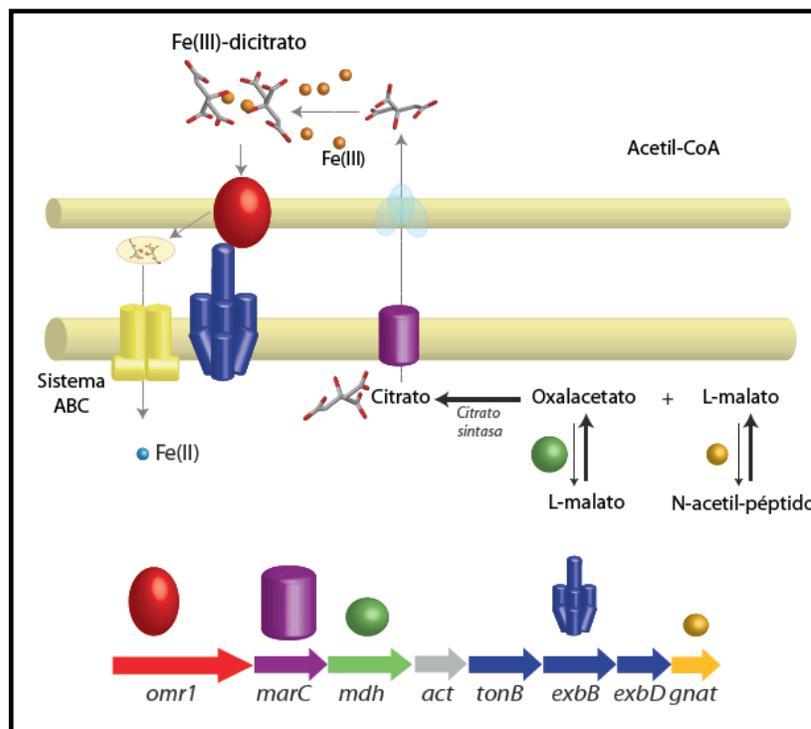


Figura 4: Modelo que conecta la biosíntesis de citrato con su posterior uso como ferri-sideróforo.

Genes: *omr1*, OMR específico para dicitrato; *marC*, bomba de eflujo; *mdh*, malato deshidrogenasa, *act*, proteína con dominio act; *tonB/exbB/exbD*, sistema transductor de energía; *gnat*, GNAT acetiltransferasa. *Figura adaptada de Osorio y cols., 2008 (49).*

3.1.1.c Puntos isoeléctricos predichos para los receptores de membrana externa (OMR).

Las bacterias neutrófilas poseen por lo general OMR cuyo pI es neutro (6-7), mientras que los OMR predichos para los tres Acidithiobacilli presentan en su mayoría pls básicos. En el caso particular de *A. ferrooxidans*, 8 de los 11 OMR tienen un pI predicho mayor a 8 (Figura 5). Otras bacterias que viven o toleran ambientes ácidos, como *H. pylori*, también poseen OMR de pI básico (FecA1_{HPJ99} pI 9,4; FecA2_{HPJ99} pI 9,5; FecA3_{HPJ99} pI 9,1) (datos no publicados de nuestro laboratorio). Sin embargo, los once OMR de *A. ferrooxidans* abarcan un rango amplio de pls de 6,7 a 9,2. Dado que los pI reflejan propiedades eléctricas de las proteínas, y en el caso específico de los microorganismos acidófilos éstos enfrentan condiciones potencialmente desnaturantes, se considera que el amplio rango de pls reflejaría los distintos nichos potencialmente utilizables por esta bacteria, así como también una mayor versatilidad que la de neutrófilos como *E. coli* o ácido-tolerantes como *H. pylori*.

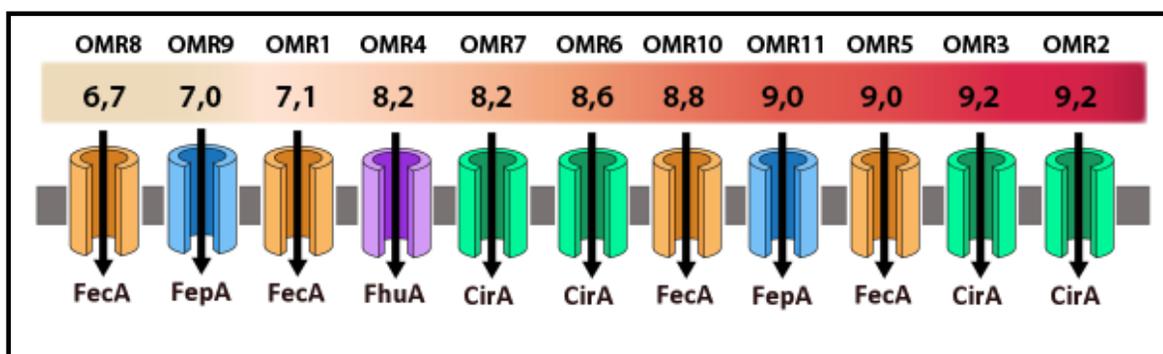


Figura 5: OMR predichos para *A. ferrooxidans* y sus correspondientes puntos isoeléctricos.

Los OMR se muestran ordenados de acuerdo a su pI, el cual se indica en la parte superior de la figura. En la parte inferior se muestra la especificidad predicha para el sideróforo de cada OMR. FecA = dicitrato, FepA = catecolato cíclico, FhuA = hidroxamato, CirA = catecolato lineal.

3.1.2 Transportadores de ión ferroso: FeoB y MntH.

En el genoma de *A. ferrooxidans* existen genes predichos que codifican el sistema de captación y transporte de Fe^{+2} FeoABC, en un contexto génico similar al descrito en otras bacterias. Este *cluster* forma una estructura tipo operón y presenta río arriba una caja Fur que ha sido validada *in vitro* mediante EMSA en nuestro laboratorio (39). Una particularidad del sistema encontrado en *A. ferrooxidans* es que el gen *feoA* se encuentra precedido por un gen que codifica una proteína de tipo

porina designada FeoP. Es posible que ésta sea la encargada de ingresar Fe^{+2} a nivel de periplasma, ya que presenta similitud con una familia de porinas implicadas en el ingreso de carbohidratos y otros iones. *A. caldus* y *A. thiooxidans* presentan una organización génica similar a *feoPABC*; en el caso de *A. caldus* el gen *feoP* no está contiguo a *feoA*, pero la presencia de una caja Fur putativa río arriba de él sugiere una relación con el metabolismo de hierro (**Figura 6**).

A. ferrooxidans también posee un gen putativo *mntH*, un transportador de tipo Nramp que transporta Mn^{+2} y Fe^{+2} en otras bacterias. Éste presenta una caja Fur validada *in vitro* (38). Tanto el gen como la caja Fur se encuentran conservados en los otros dos Acidithiobacilli, lo cual sugiere que constituye parte del regulón Fur en las 3 bacterias (**Figura 6**).

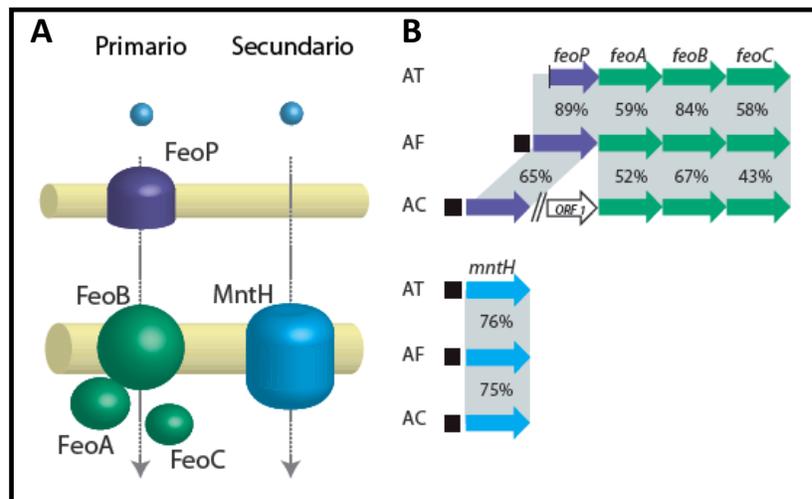


Figura 6: Sistemas de transporte de Fe^{+2} FeoPABC y MntH.

A) Disposición en la membrana de los sistemas FeoPABC y MntH.

B) Contexto génico en los tres Acidithiobacilli y la similitud con respecto a *A. ferrooxidans*. AT = *A. thiooxidans*, AF = *A. ferrooxidans*, AC = *A. caldus*. Caja Fur: ■ (49).

En síntesis, la predicción de cajas Fur asociada a varios de estos *clusters* génicos sugiere que hay una regulación Fur y hierro dependiente de 5 genes *omr* y de ambos transportadores de Fe^{+2} de *A. ferrooxidans*. Cómo se comportan transcripcionalmente estos blancos de Fur y los demás genes *omr* sigue siendo una interrogante. Llama la atención la presencia de genes de otros reguladores transcripcionales en la cercanía de los genes de transporte de hierro; por ejemplo, LysR (Figura 3,

cluster 2), y PhoB, el regulador del metabolismo de fosfato (Figura 3, *cluster 5*). Esto podría ser un indicio de cascadas de regulación independientes de Fur o de respuestas regulatorias coordinadas, como por ejemplo, entre el metabolismo de hierro y fosfato.

3.2 Análisis de los perfiles transcripcionales de los transportadores y reguladores de hierro en *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

Para determinar el efecto que tienen diferentes disponibilidades de hierro y/o pH del medio de cultivo sobre la expresión de los genes *omr*, de transportadores de Fe⁺² y de los genes de los reguladores Fur y PhoB, se utilizó el diseño experimental presentado en la **Figura 7**. Se cultivó *A. ferrooxidans* en seis medios diferentes: medio salino 9K con **1)** Fe 200 mM a pH 1,6; **2)** Fe 200 mM pH 1,6 y traspaso de las células a calcopirita 2,5% a pH 1,6; **3)** azufre 1% a pH 2,5; **4)** azufre 1% a pH 3,5; **5)** azufre 1% a pH 4,5; y **6)** medio DSMZ71 con tiosulfato 0,5% a pH 4,5.

- Fe 200 mM: Este es un medio rico en hierro en relación a los medios de crecimiento de otros microorganismos (ej.: Luria Bertani 40 µM). En esta condición de cultivo *A. ferrooxidans* crece utilizando el Fe⁺² soluble disponible en el medio como única fuente de energía. Se espera que en esta condición los genes de captación y transporte de hierro, especialmente aquellos dependientes del regulador transcripcional Fur se transcriban a bajos niveles o incluso se encuentren reprimidos.
- Calcopirita: La fórmula química de este mineral es FeCuS₂, contiene dos de los elementos que *A. ferrooxidans* utiliza como fuente de energía: hierro y azufre. Sin embargo, la calcopirita es recalcitrante a la oxidación y a la lixiviación química por parte de *A. ferrooxidans* en cultivo puro, lo cual resulta en una baja cantidad de hierro soluble en el medio. A diferencia del primer medio, el hierro presente en éste no se encuentra biodisponible, por lo que se espera que *A. ferrooxidans* en esta condición ponga en marcha los mecanismos que permiten el ingreso del metal, como por ejemplo un aumento en la síntesis de OMR y de sistemas asociados de transporte de hierro.
- Azufre pH 3,5/Tiosulfato pH 4,5: Durante su crecimiento en azufre elemental a pH 3,5 o tiosulfato a pH 4,5, *A. ferrooxidans* se enfrenta, a lo sumo, a cantidades traza del metal. En esta

condición de carencia de hierro, se espera que los genes de captación de hierro activen su transcripción.

- Azufre pH 2,5/pH 4,5: La variación en el pH de un medio de cultivo puede cambiar la biodisponibilidad del hierro presente en éste o del hierro liberado luego de la lisis de los microorganismos que crecen en él. Esta condición nos permite evaluar la influencia del pH en la expresión de los transportadores de hierro. Adicionalmente, y teniendo en cuenta los distintos puntos isoeléctricos predichos para los OMR de *A. ferrooxidans*, es de interés evaluar el efecto del pH independientemente de su efecto en la solubilidad del hierro.

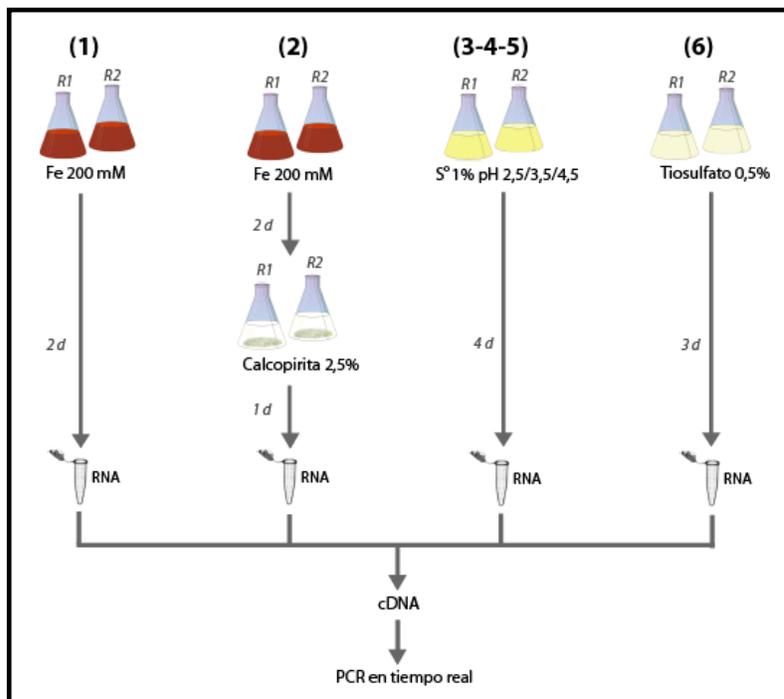


Figura 7. Estrategia de trabajo utilizada para el análisis de perfil transcripcional en las seis condiciones de crecimiento estudiadas.

R1 y R2 son réplicas biológicas de cada condición. Se muestran los días (d) necesarios para alcanzar la fase logarítmica media, en la cual se efectuó la extracción de RNA total que luego fue utilizado para el análisis cuantitativo por PCR en tiempo real.

3.2.1 Búsqueda de genes de referencia para la normalización de la expresión en ensayos de PCR en tiempo real.

El PCR en tiempo real es una herramienta poderosa para la cuantificación de los niveles de mRNA. Sin embargo, al utilizar esta técnica es importantísimo controlar una serie de parámetros para que los resultados sean reales y confiables; entre éstos la cantidad de material de partida, la eficiencia en la extracción de RNA, la integridad/calidad de éste y la eficiencia en la síntesis de cDNA (52). La estrategia más usada para controlar estas diferencias entre dos o más muestras es la normalización relativa, específicamente aquella que utiliza un gen de referencia que se supone se expresa de manera constante e invariable en todas las muestras a comparar. Este normalizador suele ser un gen constitutivo. Los genes *recA* (53), *alaS* (54) y *rrs* (38, 55-59), han sido utilizados con este propósito en *A. ferrooxidans*. Sin embargo no existen estudios que avalen su calidad como genes de referencia, ni la estabilidad de su expresión en condiciones de cultivo distintas de las clásicas, 9K-Fe y 9K-S, medios salinos conteniendo hierro o azufre elemental. Frente a lo expuesto anteriormente, antes de evaluar el perfil transcripcional de los transportadores y reguladores blancos de estudio, se identificaron y validaron genes de referencia que demostraran ser adecuados para este tipo de investigación en *A. ferrooxidans* y posiblemente en otros Acidithiobacilli.

3.2.1.a Estrategia para la selección de genes de referencia.

La estrategia computacional y experimental utilizada para la identificación de genes candidatos a ser normalizadores en *A. ferrooxidans* se resume en los siguientes pasos y se muestra en la **Figura 8**:

1. Búsqueda de genes esenciales (genes 'housekeeping', HKGs) en el genoma de *A. ferrooxidans*. Ésta se realizó en base a los genes calificados como parte del genoma mínimo de una bacteria (60).
2. Selección de HKGs conservados entre especies cercanamente emparentadas con *A. ferrooxidans*: *A. thiooxidans* y *A. caldus*.
3. Selección de genes de expresión no diferencial ($|M| < 1,5$) en microarreglos de expresión de *A. ferrooxidans*, que comparan los perfiles transcripcionales de la bacteria modelo crecida en hierro *versus* azufre, hierro + azufre *versus* azufre y hierro *versus* hierro en alta concentración.

4. Selección de los genes de expresión más estable ($M \sim 0$).
5. Selección de genes pertenecientes a diferentes vías metabólicas o función fisiológica, con el objeto de evitar una posible co-regulación.
6. Evaluación de la expresión de los genes seleccionados mediante PCR en tiempo real.

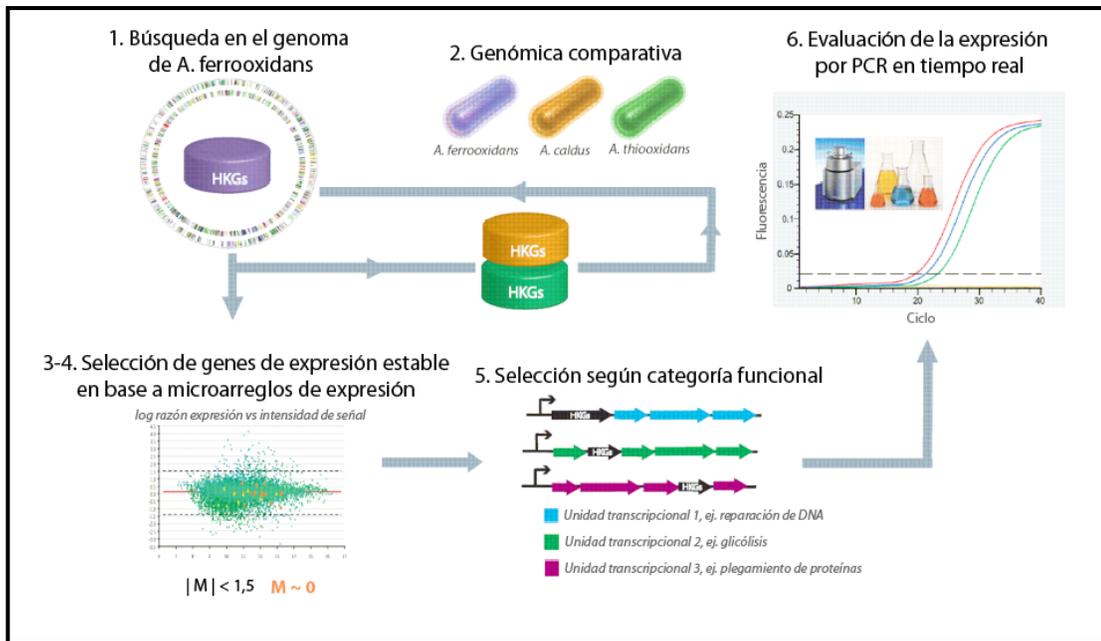


Figura 8. Estrategia de trabajo para la selección de genes de referencia a utilizar en estudios de PCR en tiempo real. *Figura adaptada de Nieto y cols., 2009 (en revisión).*

3.2.1.b Análisis de los niveles de expresión.

La **Tabla 1** muestra los nueve genes candidatos a genes de referencia seleccionados luego de aplicar esta rutina de selección. Se evaluó su expresión mediante PCR en tiempo real para determinar cuál o cuáles de ellos mostraban la expresión más constante en las seis condiciones de crecimiento definidas en nuestro diseño experimental (las cantidades crudas obtenidas para cada gen se muestran en el **Anexo 3.1**). Los resultados de expresión fueron procesados mediante la aplicación geNorm (47), la cual compara la expresión de cada uno de los genes analizados con respecto a todos los demás, no teniendo en cuenta el valor de expresión particular para cada gen, sino la razón entre la expresión de uno y otro. Esta razón debería ser la misma en todas las condiciones analizadas, si se trata efectivamente de genes de expresión estable. La suma de las variaciones de todas estas razones

entrega un valor de estabilidad denominado “M”, el cual permite ordenar los genes de acuerdo a su estabilidad en la expresión. Al ser un método basado en comparaciones múltiples, se finaliza siempre con la pareja de genes de expresión más estable. Además, la aplicación permite definir la cantidad de genes necesarios para una normalización confiable. Se determina si la inclusión de un gen adicional provoca o no cambios significativos en el factor de normalización (FN), considerando como límite una variación entre FN_n y FN_{n+1} de 0,15 (valor definido por Vandesompele y cols., 2002). Por debajo de 0,15 no se considera necesario agregar un gen adicional. Este FN es el valor que se utiliza para normalizar las cantidades de los genes blanco, y equivale a la media geométrica de los genes de referencia seleccionados.

Tabla 1: Genes candidatos a genes de referencia.

Gen	Locus	Proteína	Categoría biológica
<i>era</i>	AFE_1680	Proteína de unión a GTP	Funcionalidad, maduración y modificación del ribosoma
<i>nth</i>	AFE_0424	Endonucleasa III	Reparación y restricción del DNA
<i>map</i>	AFE_2121	Metionin-aminopeptidasa tipo III	Modificación post-traduccional de proteínas
<i>gyrA</i>	AFE_2150	DNA girasa, subunidad α	Maquinaria básica de la replicación
<i>rplI</i>	AFE_0288	Proteína ribosomal L9	Proteínas ribosomales
<i>rpoC</i>	AFE_2711	RNA polimerasa, subunidad β	Maquinaria básica de la transcripción
<i>trpS</i>	AFE_1296	Triptofanil-tRNA sintetasa	Síntesis de aminoacil-tRNAs
<i>gmk</i>	AFE_2475	Guanilato quinasa	Síntesis de nucleótidos
<i>alaS</i>	AFE_2112	Alanil-tRNA sintetasa	Síntesis de aminoacil-tRNAs

Nueve genes candidatos a genes de referencia, cuya expresión fue evaluada por PCR en tiempo real. Se seleccionaron genes pertenecientes a distintas categorías biológicas, de manera de evitar la co-regulación de éstos.

Considerando el nivel de expresión de los nueve genes candidatos en las seis condiciones estudiadas, los genes de expresión más constante entre condiciones resultaron ser *map* y *rpoC*. La **Figura 9A** muestra el valor M promedio obtenido para el grupo de genes candidatos y los cambios que éste sufre a medida que se excluye del análisis el gen de expresión más variable. Por ejemplo, el primer gen en ser eliminado es *alaS*, provocando una disminución en el valor M promedio de 0,05 unidades. Sucesivamente, se van eliminando genes hasta que sólo quedan *map* y *rpoC*, con un valor M de 0,27. La **Figura 9B** muestra la variación que se produce entre dos FN consecutivos, ej. V2/3 considera la variación que se produce entre un FN formado por los dos genes más estables (*map* y *rpoC*) y un FN al cual se agregó un gen adicional (*map*, *rpoC* y *era*). Como la variación que se produce en el FN al usar

dos genes o al incluir un tercero es mayor a 0,15, se decidió incluir también a *era* dentro del conjunto de genes de referencia a utilizar en el resto del estudio.

Se calculó un FN basado en la media geométrica de los tres genes *map*, *rpoC* y *era* para normalizar la expresión de los genes blanco. La expresión relativa de cada gen blanco bajo estudio versus los 3 genes de referencia se calculó mediante la aplicación qBase 1.3.5 (48).

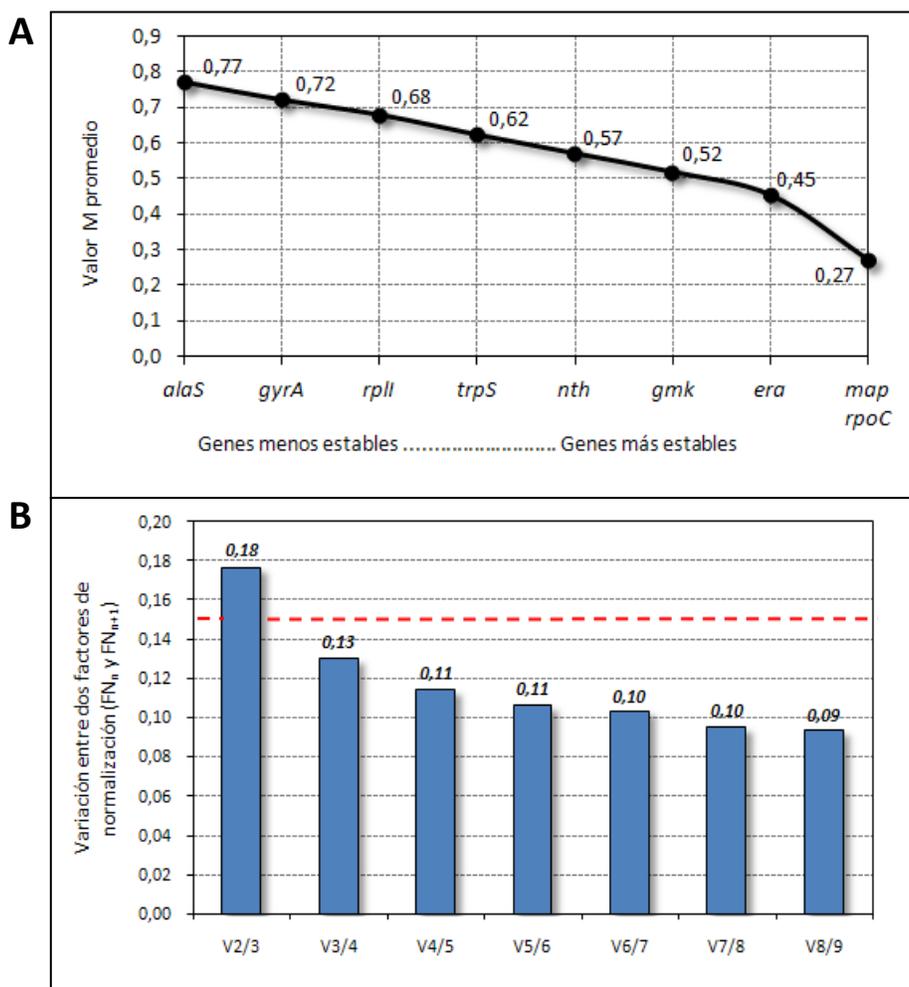


Figura 9: Valor M y variación del Factor de Normalización

A) Gráfico del valor promedio de estabilidad "M" a medida que se va excluyendo el gen de expresión menos estable. **B)** Gráfico de la variación entre dos FN consecutivos. La línea roja punteada muestra el límite aceptado para esta variación (0,15).

3.2.2 Cuantificación de la expresión de los genes *fur* y *phoB*.

Como regulador maestro de la homeostasis de hierro, Fur incide sobre la regulación génica en función de la presencia o ausencia del metal en el ambiente y consecuentemente en el citoplasma. En otros microorganismos modelo, su expresión a nivel transcripcional es alta y constitutiva (61-63). En *A. ferrooxidans* se han observado diferencias en la cantidad de proteína Fur presente en extractos de proteínas totales obtenidos a partir de cultivos crecidos en azufre pH 3,5 o en cantidades crecientes de hierro. Estas diferencias no se ven reflejadas en los niveles de mRNA según estudios de expresión en los medios de crecimiento convencionales (38). En este estudio se analizaron los patrones de expresión del regulador a nivel de mRNA, en cultivos crecidos bajo concentraciones estándar de azufre o hierro y adicionalmente en tiosulfato, calcopirita y a diferentes pHs.

En virtud de la asociación detectada entre genes de transporte de hierro y el regulador PhoB, y de la existencia de una caja Fur validada *in vitro* río arriba de un ortólogo de este regulador, se le incluyó también en el análisis de expresión. Cambios en la expresión de éste frente a condiciones de crecimiento en medios de cultivo con diferente disponibilidad de hierro pueden generar resultados que avalen o refuten la hipótesis de un mecanismo coordinado entre PhoB y Fur para el ingreso de hierro.

Siguiendo la estrategia detallada en la **Figura 7**, se generó cDNA a partir de RNA extraído de cultivos de *A. ferrooxidans* en cada una de las condiciones de crecimiento analizadas, y se evaluó el nivel de expresión de *fur* y *phoB*. En el **Anexo 3.2** se indican las cantidades crudas obtenidas y las cantidades ya normalizadas contra los genes de referencia y escaladas en relación a una muestra elegida como “calibradora”. La **Tabla 2A** resume la expresión relativa de *fur* y *phoB* en cultivos de Fe 200 mM respecto a cada una de las otras cinco condiciones de crecimiento. Se observa que *phoB* se expresa 4 a 7 veces más en el medio rico en hierro disponible que en cualquier medio de azufre, tiosulfato o calcopirita, independientemente del pH del medio. Por su parte, la expresión de *fur* aumenta significativamente en Fe 200 mM con respecto a azufre pH 3,5 y pH 4,5 siendo su nivel transcripcional cerca de 3 y 2 veces mayor respectivamente. Por el contrario, en las demás condiciones de carencia de hierro analizadas se expresa a niveles similares a los de Fe 200 mM.

Tabla 2: Razones de expresión de los genes *fur*, *phoB*, *mntH* y *feoB* al comparar distintos medios de crecimiento.

A Razón de expresión	<i>fur</i>	<i>phoB</i>	B Razón de expresión	<i>mntH</i>	<i>feoB</i>
Fe / TS pH 4,5	0,9	4,4	Fe / TS pH 4,5	0,1	0,5
Fe / S pH 4,5	1,8	5,1	Fe / S pH 4,5	0,1	0,2
Fe / S pH 3,5	2,6	6,9	Fe / S pH 3,5	0,1	0,2
Fe / S pH 2,5	1,5	6,7	Fe / S pH 2,5	0,1	0,3
Fe / CP pH 1,6	1,4	4,6	Fe / CP pH 1,6	0,1	0,4

A) Nivel de expresión relativo de los genes *fur* y *phoB* en la condición rica en hierro (Fe 200 mM) respecto a cada una de las otras condiciones analizadas. **B)** Nivel de expresión relativo de los genes *mntH* y *feoB* en la condición rica en hierro (Fe 200 mM) respecto a cada una de las otras condiciones analizadas. Un valor mayor a 1 indica mayor expresión en el medio de hierro. Números en negrita representan diferencias en la expresión consideradas significativas mediante un análisis estadístico de ANOVA seguido del test *a posteriori* de Dunnet.

3.2.3 Cuantificación de la expresión de los genes de transportadores de ión ferroso.

El análisis de la expresión de *feoB* y *mntH* nos permite visualizar si los sistemas de captación de Fe⁺² están activos en *A. ferrooxidans* y si efectivamente éstos responden a una regulación mediada por Fur, dado que ambos poseen sitios de unión para el regulador validados *in vitro*. La estrategia experimental fue similar a la utilizada para estudiar *fur* y *phoB*, es decir siguiendo el procedimiento detallado en la **Figura 7**. De igual manera, en el **Anexo 3.3** se puede encontrar información detallada de las cantidades de transcritos obtenidas.

Tanto *feoB* como *mntH* muestran el comportamiento esperado para genes regulados de modo hierro y Fur dependiente (**Tabla 2B**). En ambos casos existe una menor expresión a nivel de mRNA en Fe 200 mM en comparación con los diversos medios carentes del metal. Una expresión relativa 10 veces mayor en calcopirita reflejaría la adaptación de la bacteria para captar más Fe⁺² cuando ésta pasa de un medio rico en hierro disponible a un medio con hierro recalcitrante a la oxidación y consecuente solubilización del metal. Ni *mntH* ni *feoB* muestran cambios significativos frente al aumento o la disminución del pH.

3.2.4.a Expresión relativa de los genes de transportadores de ion férrico en hierro 200 mM con respecto a azufre pH 3,5.

Siendo hierro 200 mM y azufre pH 3,5 dos condiciones de crecimiento típicas para *A. ferrooxidans*, se decidió realizar una comparación entre los niveles relativos de expresión de los genes *omr* en una condición con respecto a la otra. El resultado se muestra en la **Figura 10A y B**; y en la **Tabla 4** se resume información relevante para el análisis de tendencias funcionales de estos genes. A partir de los resultados se puede concluir lo siguiente:

- Aunque sólo el cambio de expresión de *omr10* es estadísticamente significativo (dado el número de réplicas empleadas en este estudio), los tres genes *omr* con especificidad predicha para dicitrato (1, 10 y 8) se expresan menos en hierro que en azufre. También sigue esta tendencia *omr4*, con especificidad predicha para hidroxamato.
- *omr2*, 3, 6 y 7, todos con especificidad predicha para catecolato lineal, y *omr11* con especificidad predicha para catecolato cíclico, aumentan su expresión en hierro con respecto a azufre.
- No existe una correlación perfecta entre la presencia de caja Fur y el cambio en el nivel de expresión de los genes *omr* entre un medio rico y un medio carente en hierro.

Los resultados obtenidos sugieren que no existe una relación directa entre los niveles de expresión de los genes *omr* con la presencia de cajas Fur, pero sí se observa una correlación con la especificidad de sustrato. Esto implicaría que existen niveles adicionales de regulación inducida por hierro y/o por sideróforos, independientes de Fur.

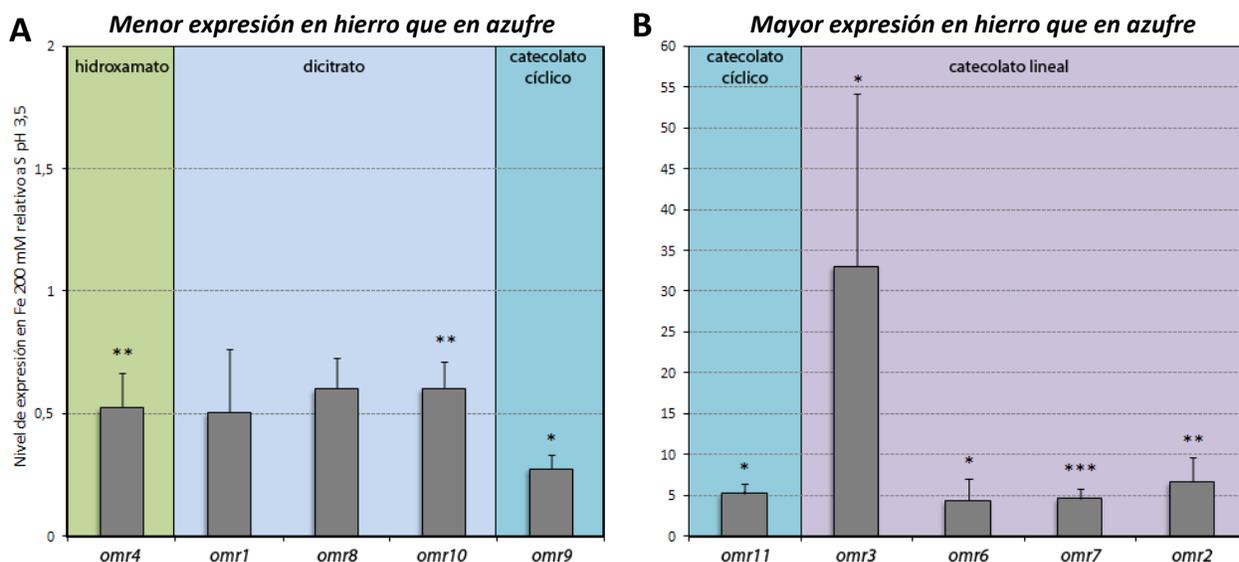


Figura 10: Nivel de expresión relativo de los genes *omr* al comparar cultivos de *A. ferrooxidans* en Fe 200 mM con cultivos en azufre pH 3,5.

A) Genes *omr* cuya expresión es menor en hierro que en azufre (menor a 1). **B)** Genes *omr* cuya expresión es mayor en hierro que en azufre (mayor a 1). Los genes se muestran ordenados de acuerdo a la especificidad predicha para sideróforo de sus proteínas. Los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$; test de t-student.

Tabla 4: Expresión de los genes *omr* en Fe versus S y su correlación con la presencia o ausencia de caja Fur.

Receptor	Sustrato	Caja fur	Expresión Fe/S
<i>omr4</i>	hidroxamato	-	↓
<i>omr1</i>	dicitrato	-	↓
<i>omr8</i>	dicitrato	+	↓
<i>omr10</i>	dicitrato	+	↓
<i>omr9</i>	catecolato cíclico	+	↓
<i>omr11</i>	catecolato cíclico	-	↑
<i>omr3</i>	catecolato lineal	+	↑
<i>omr6</i>	catecolato lineal	-	↑
<i>omr7</i>	catecolato lineal	-	↑
<i>omr2</i>	catecolato lineal	+	↑

Se indica la presencia (+) o ausencia (-) de caja Fur, ↑ indica mayor expresión en hierro que en azufre, ↓ indica menor expresión en hierro que en azufre (estas tendencias no consideran la significancia del análisis estadístico).

3.2.4.b Expresión relativa de los genes de transportadores de ion férrico en hierro 200 mM con respecto a calcopirita.

Para analizar si ocurría un incremento en la expresión de los genes *omr* se realizó el paso de un cultivo de *A. ferrooxidans* desde un medio rico en hierro (Fe 200 mM) a uno con hierro recalcitrante a la oxidación (calcopirita). Al comparar ambas condiciones (**Figura 11, Tabla 5**), se observa un perfil transcripcional de los genes *omr* algo similar a cuando se compara hierro con azufre. El gen del receptor de hidroxamato (*omr4*) y 2 de los genes de receptores de dicitrato (*omr1* y *omr10*) se expresan más en el medio carente de hierro soluble (calcopirita), mientras que genes de los receptores de catecolatos cíclicos y lineales se inducen en presencia de hierro. Estos patrones transcripcionales parecen ser independientes de la presencia de cajas Fur asociadas a estos genes.

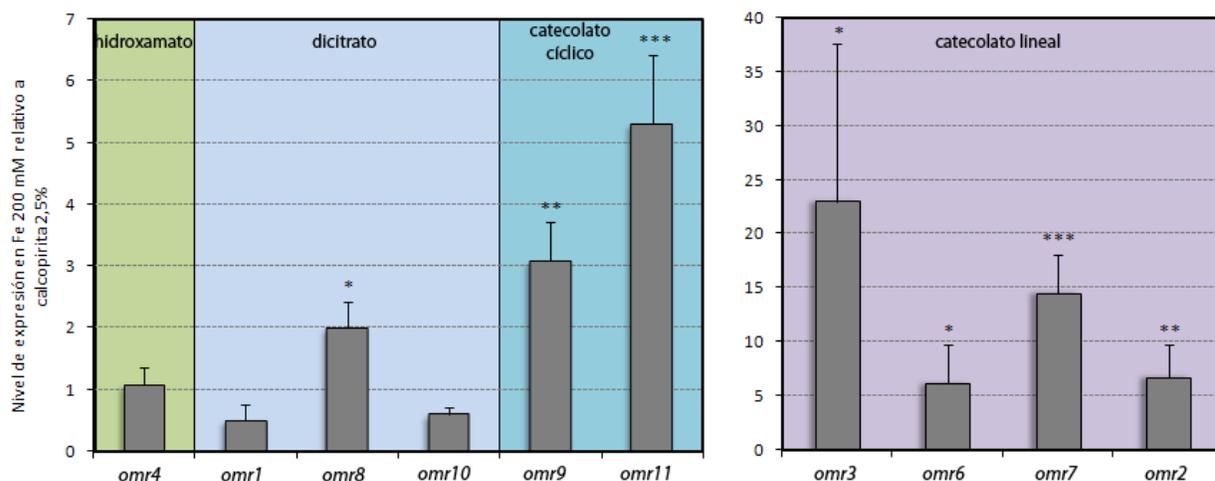


Figura 11: Nivel de expresión relativo de los genes *omr* al comparar cultivos de Fe 200 mM con cultivos de calcopirita 2,5%.

Los genes *omr* se muestran ordenados de acuerdo al tipo de especificidad predicha para sideróforo de su proteína (los gráficos difieren en la escala). Un valor mayor a 1 indica mayor expresión en hierro. Los valores corresponden al promedio \pm desviación estándar, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$; test de t-student.

Tabla 5: Expresión de los genes *omr* en Fe versus calcopirita y su correlación con la presencia o ausencia de caja Fur.

Receptor	Sustrato	Caja Fur	Expresión Fe/calcopirita
<i>omr4</i>	hidroxamato	-	=
<i>omr1</i>	dicitrato	-	↓
<i>omr8</i>	dicitrato	+	↑
<i>omr10</i>	dicitrato	+	↓
<i>omr9</i>	catecolato cíclico	+	↑
<i>omr11</i>	catecolato cíclico	-	↑
<i>omr3</i>	catecolato lineal	+	↑
<i>omr6</i>	catecolato lineal	-	↑
<i>omr7</i>	catecolato lineal	-	↑
<i>omr2</i>	catecolato lineal	+	↑

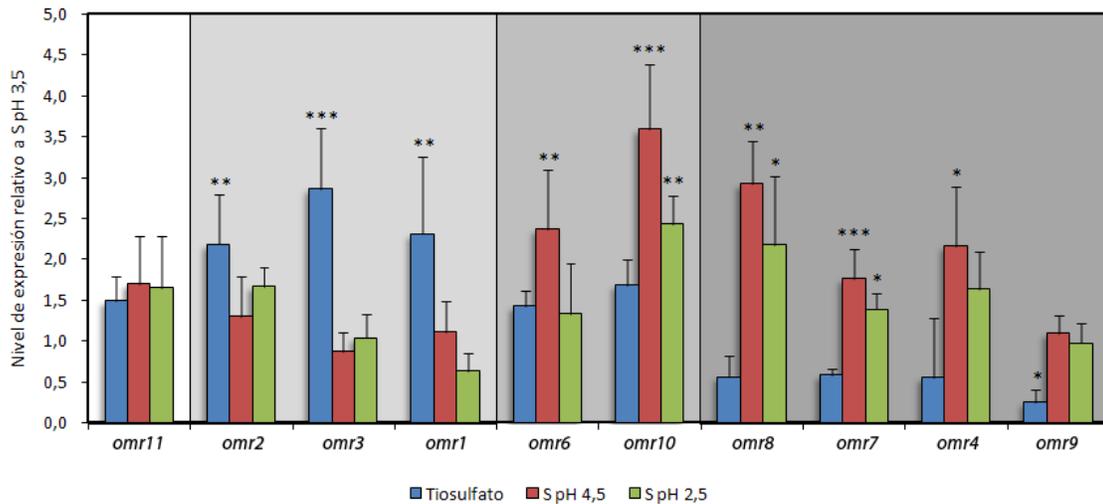
Se indica la presencia (+) o ausencia (-) de caja Fur, ↑ indica mayor expresión en hierro que en calcopirita, ↓ indica menor expresión en hierro que en calcopirita (estas tendencias no consideran la significancia del análisis estadístico).

3.2.4.c Expresión relativa de los genes de transportadores de ion férrico en azufre a pH 2,5; 4,5 y tiosulfato respecto a azufre a pH 3,5.

Para el análisis de la expresión de los genes *omr* de *A. ferrooxidans* en medios de crecimiento que difieren en el pH, se optó por evaluar si existía correlación entre la expresión del gen *omr* y el pI predicho para su proteína, a un pH dado, dejando de lado la especificidad por sideróforo. Se optó por este análisis considerando que los cambios en el pH del medio podrían afectar la estabilidad de los receptores y por lo tanto privilegiarse la expresión de aquellos genes *omr* cuya proteína fuese capaz de mantener su integridad y funcionamiento a un pH particular. Además, se incluyó en el análisis la condición de tiosulfato ya que en este caso, el medio de cultivo tiene un pH similar al del medio con azufre pH 4,5; pero a diferencia de este último, el tiosulfato es soluble. La **Figura 12** muestra los resultados, que indican lo siguiente:

- *omr11* presenta un perfil de expresión invariante en las cuatro condiciones experimentales de distinto pH.

- *omr2*, 3 y 1, cuyas proteínas comparten la característica estructural de tener un “tapón” de pl predicho mayor a 9 y un “barril” de pl casi neutro, se expresan significativamente más en tiosulfato a pH 4,5 que en las demás condiciones de cultivo.
- *omr6* y 10, cuyas proteínas tienen un “barril” de pl predicho levemente básico, se expresan significativamente más en azufre a pH 4,5 que en azufre a pH 3,5 y a niveles similares a tiosulfato a pH 4,5.
- *omr10*, 8, 7, 4 y 9, cuyas proteínas comparten un “tapón” de pl predicho ácido, se expresan significativamente más en azufre a pH 2,5 y 4,5 que en azufre a pH 3,5 o tiosulfato a pH 4,5.



Razón de expresión	<i>omr11</i>	<i>omr2</i>	<i>omr3</i>	<i>omr1</i>	<i>omr6</i>	<i>omr10</i>	<i>omr8</i>	<i>omr7</i>	<i>omr4</i>	<i>omr9</i>
TS pH 4,5/S pH 3,5	1,4	2,1	2,8	2,6	1,5	1,7	0,6	0,6	0,5	0,2
S pH 4,5/S pH 3,5	1,6	1,2	0,9	1,3	2,5	3,7	2,9	1,9	1,9	1,1
S pH 2,5/S pH 3,5	1,6	1,6	1,0	0,7	1,4	2,5	2,2	1,5	1,4	1,0

Figura 12: Nivel de expresión relativo de los genes *omr* al comparar cultivos de S a pH 2,5; 4,5 y de tiosulfato con cultivos de S a pH 3,5.

Los genes *omr* están ordenados según el patrón de expresión observado. La tabla resume los valores relativos de expresión con respecto a S pH 3,5 (valor 1). Los resultados representan el promedio \pm desviación estándar, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$; test de ANOVA seguido del test *a posteriori* de Dunnet.

Estos resultados indican que existe cierta correlación entre los perfiles de expresión de los genes *omr* en los distintos medios de crecimiento carentes de hierro y de distinto pH y los pls predichos del “barril” y/o “tapón” estructural de la proteína correspondiente, como se muestra en la **Tabla 6**.

Tabla 6: OMR y puntos isoeléctricos predichos

Receptor	Sustrato	pl proteína	pl "tapón"	pl "barril"
OMR11	catecolato cíclico	9,0	10,0	8,5
OMR2	catecolato cíclico	9,2	9,7	6,6
OMR3	catecolato lineal	9,2	9,9	8,9
OMR1	dicitrato	7,1	9,4	6,2
OMR6	catecolato lineal	8,6	9,1	7,4
OMR10	dicitrato	8,8	4,5	8,4
OMR8	dicitrato	6,7	4,2	8,6
OMR7	catecolato lineal	8,2	5,1	8,6
OMR4	hidroxamato	8,2	5,0	8,5
OMR9	catecolato cíclico	7,0	5,1	8,5

OMR ordenados de arriba hacia abajo de acuerdo al patrón de expresión génica que se aprecia en la **Figura 11**. Se muestran los pl predichos para la proteína total, para el “tapón”, y para el “barril”.

3.2.5 Caracterización del *cluster* génico de transporte de Fe⁺³ exclusivo de *A. ferrooxidans*.

3.2.5.a Contexto génico

El análisis de genómica comparativa entre tres Acidithiobacilli cercanamente emparentados efectuado en la sección 3.1.1.a reveló la presencia de un *cluster* génico (**Figura 3, cluster 4**) presente únicamente en *A. ferrooxidans*. Este *cluster* es particularmente interesante porque presenta varios aspectos inusuales:

- 1) Codifica para todos los componentes necesarios para incorporar Fe⁺³ asociado a sideróforos desde el medio extracelular hasta el citoplasma, incluyendo al receptor de membrana externa, al sistema TonB que energiza al receptor y al transportador ABC que media el ingreso de Fe⁺³ desde el periplasma hasta el citoplasma (**Figura 13A**).
- 2) Incluye dos genes *omr*; *omr8* cuya proteína tiene afinidad predicha por dicitrato y *omr9* cuya proteína tiene afinidad predicha por catecolatos lineales.

- 3) Presenta en total dos sistemas de transporte ABC de membrana interna que incluyen tres proteínas periplásmicas, dos de ellas con afinidad predicha por ferrisideróforos y una con afinidad por molibdeno.
- 4) El primer gen del *cluster* codifica para una proteína de tipo hemoglobina truncada (trHb). Las trHbs son proteínas pequeñas con un grupo hemo capaz de unir oxígeno, presentes en plantas, eubacterias, cianobacterias y protozoos. Forman una familia separada de las flavohemoglobinas bacterianas (64).
- 5) Antecede al *cluster* una caja Fur predicha a nivel del promotor.
- 6) El *cluster* se encuentra inserto en una isla genómica consistente en sesenta y nueve genes, que al igual que el *cluster* mismo, tampoco está presente en los otros Acidithiobacilli. Dentro de esta isla hay genes relacionados con la fijación de nitrógeno y el ensamblaje de la nitrogenasa.

Todos estos antecedentes hacen relevante responder por un lado, cuál es perfil de expresión de los genes *omr* que lo integran y por otro si este *cluster* se transcribe como una única unidad transcripcional.

La primera interrogante ha sido respondida en los puntos anteriores. En todos los casos analizados, el comportamiento transcripcional de los genes *omr8* y *omr9* es similar. En Fe 200 mM se expresan menos que en azufre y calcopirita, y en azufre a pH 2,5 y 4,5 se expresan significativamente más que en azufre a pH 3,5 o tiosulfato a pH 4,5. Esto es consistente con un rol de estos OMR en la captación de hierro en medio carente del metal y/o en condiciones de estrés de pH en medio pobre en hierro.

3.2.5.b Análisis de co-transcripción del operón de transporte de Fe⁺³

Para responder a la segunda interrogante, si este *cluster* génico constituye o no una única unidad transcripcional, se diseñaron partidores que amplifican cada una de las regiones intergénicas del *cluster* 4 (**Figura 13A**). A partir de RNA extraído de cultivos de *A. ferrooxidans* crecido en tiosulfato, se sintetizó cDNA mediante el sistema comercial One-Step RT-PCR utilizando en cada reacción un partidador inverso que se aparea con un gen en particular. La amplificación de la región intergénica se

realizó utilizando además un partidador directo que se aparee con el gen vecino. Los productos de amplificación generados se muestran en la **Figura 13B**.

Se observa en la figura que todos los pares de partidores internos generan producto de amplificación, no así los pares de partidores 1-3 y 29-30, cuyo producto de PCR abarca una zona fuera del *cluster*. Este resultado sirve para delimitar el operón y adicionalmente para descartar contaminación de las muestras de RNA con DNA. Los pares de partidores 15-16 y 2-3 se aparean con dos pequeños marcos de lectura abiertos predichos en la anotación de TIGR, pero que no codifican para genes de función conocida. La pareja 15-16 genera un producto de PCR, que si bien no demuestra la presencia de un gen, comprueba la continuidad de la transcripción en esa zona. Por otro lado, la pareja 2-3 no produce amplificado detectable lo cual define el inicio del operón a nivel del gen codificante para la hemoglobina troncada (*gloA*). Adicionalmente, se sintetizó cDNA utilizando los partidores inversos 9, 20 y 28 y se realizó un PCR posterior con los mismos partidores indicados en la **Figura 13**, para cada región intergénica (**Figura 13C**).

Este experimento comprueba los resultados anteriores, ya que los 3 cDNAs generados se superponen entre sí, estando los amplificados 6-7 y 8-9 presentes tanto en el cDNA sintetizado a partir de 9 como en el de 20; y los amplificados 15-16 y 17-18 en el cDNA sintetizado a partir de 20 y en el de 28. Mediante esta estrategia no fue posible amplificar el fragmento 14-16, pero habiendo sido detectado en el experimento anterior, lo ocurrido se debe probablemente a problemas en la reacción de PCR y no a la falta de continuidad en esa zona.

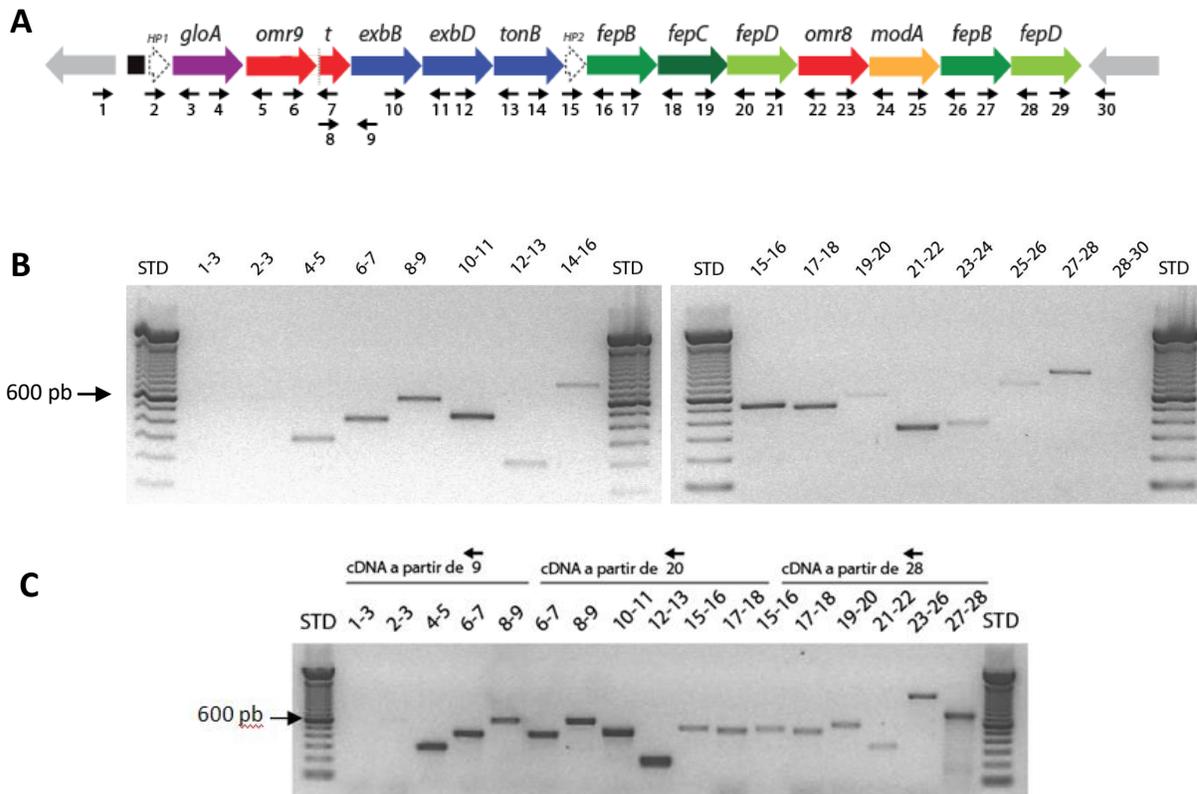


Figura 13: Análisis de co-transcripción del cluster 4.

A) Organización génica del cluster. Se muestran en gris los genes vecinos que limitan con este cluster. Los partidores utilizados para el ensayo de co-transcripción se indican con flechas. **B)** Amplificados obtenidos utilizando los partidores que se muestran en 13A y el sistema comercial One-Step RT-PCR. STD = Marcador de peso molecular de 100 pb. **C)** Amplificados obtenidos a partir de 3 moléculas de cDNAs generadas usando los partidores específicos 9, 20 y 28. *Los fragmentos correspondientes de DNA genómico, los cuales todos fueron amplificados positivamente, se omitieron de la figura.

3.3 Caracterización del regulón Fur en *Acidithiobacillus ferrooxidans* a través de estrategias globales.

Para abordar el análisis experimental del regulón Fur de *A. ferrooxidans* desde una perspectiva más amplia, y en virtud de la disponibilidad en nuestro laboratorio de microarreglos de oligonucleótidos específicos para la cepa tipo, se implementó la técnica conocida como *chIP-on-chip*. Esta técnica combina la selectividad de la inmunoprecipitación de cromatina (*ChIP*) o de complejos DNA:proteína con el análisis global que provee un microarreglo de DNA (*chip*), permitiendo realizar un mapa

genómico de los sitios de unión de un factor transcripcional. Brevemente, el procedimiento completo consiste en capturar el factor transcripcional de interés unido al DNA *in vivo* (lo cual se logra por entrecruzamiento con formaldehído), sonicar el DNA hasta romperlo en fragmentos pequeños (200-1000 nt), formar y precipitar inmunocomplejos de anticuerpo:proteína:DNA, recuperar el DNA a partir de éstos, marcarlo con fluoróforos, y por último co-hibridizar en el microarreglo de DNA las sondas marcadas junto a una muestra tratada de la misma manera, a excepción del paso de entrecruzamiento, marcada con el fluoróforo de contraste. La inmunoprecipitación consigue detectar la unión proteína:DNA *in vivo* y el microarreglo permite la identificación de los genes blanco comprometidos. Como la técnica entrega información acerca de la unión proteína:DNA pero no necesariamente de la funcionalidad de ésta, se suele utilizar en conjunto con microarreglos de expresión, transformándose así en una técnica extremadamente útil para hacer inferencias acerca de la composición y el funcionamiento de un regulón.

En virtud de la complejidad del ensayo y con el fin de lograr que éste fuera representativo de la mayoría de los sitios de unión del factor transcripcional *in vivo*, fue necesario estandarizar las etapas críticas del mismo.

3.3.1 Estandarización del protocolo de sonicación de los complejos Fur:DNA.

Para obtener fragmentos de DNA de un tamaño óptimo (entre 200 a 1000 pb), es importante estandarizar la sonicación del extracto de proteína:DNA entrecruzado. Esto garantiza que no haya una menor detección de los sitios de unión debido a la presencia de fragmentos demasiado grandes o demasiado pequeños, ni muchos falsos positivos debido a un aumento en la hibridización inespecífica de fragmentos muy pequeños.

Luego de ajustar el protocolo de sonicación a seis pulsos de 10 segundos y a una potencia del 20%, se verificó la distribución esperada de tamaños del DNA fragmentado entre 200 y 1000 pb (**Figura 14**, carril 2 y 3). Además, a partir de alícuotas equivalentes de un cultivo de *A. ferrooxidans*, se comparó la eficiencia en la recuperación del DNA sonicado utilizando dos estrategias alternativas para revertir el entrecruzamiento proteína:DNA: a) adición de NaCl 200 mM e incubación a 65°C durante 5 horas (carril 2) o b) ebullición durante 5 minutos (carril 3). Como se observa en la **Figura 14**, tras la extracción de DNA se logra una mayor recuperación utilizando la primera estrategia (carril 2).

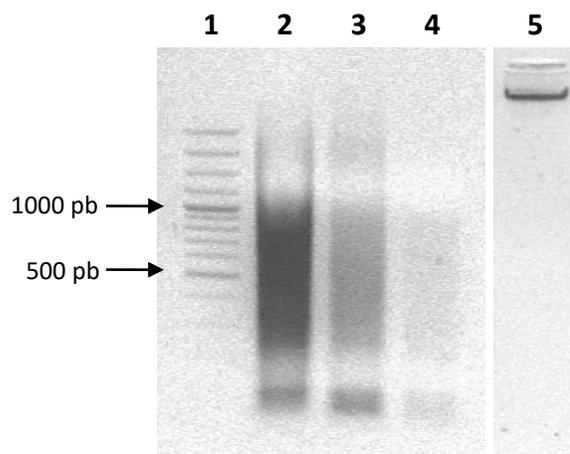


Figura 14: DNA extraído de células tratadas con formaldehído, sometido a sonicación y a diferentes tratamientos para revertir el entrecruzamiento.

Carril 1) Marcador de peso molecular de 100 pb (Fermentas GeneRuler 100bp Ladder Plus); 2) tratamiento de incubación a 65°C por 5 horas; 3) tratamiento de hervido por 5 minutos; 4) sin tratamiento; 5) Control de DNA genómico sin sonicar.

Se decidió, por lo tanto, revertir el entrecruzamiento mediante la adición de NaCl 200 mM e incubación a 65°C durante 5 horas para obtener la mayor recuperación de fragmentos de tamaño óptimo.

3.3.2 Evaluación del protocolo de formación de inmuno-complejos en extractos totales de *A. ferrooxidans*.

Con el fin de determinar la concentración de anticuerpo que permitiera la máxima inmunoprecipitación del complejo Fur:DNA, un cultivo de *A. ferrooxidans* sometido a entrecruzamiento con formaldehído, se dividió en 4 alícuotas, cada una de las cuales fue inmunoprecipitada con diferente cantidad de anticuerpo, definida de manera arbitraria tal que la relación anticuerpo:proteína fuera de 1:1, 5:1, 10:1 y 15:1. Posteriormente, y luego de la preparación necesaria de las muestras, éstas fueron separadas en un gel de poliacrilamida y sometidas a un Western blot utilizando el mismo anticuerpo para la detección de Fur (**Figura 15**).

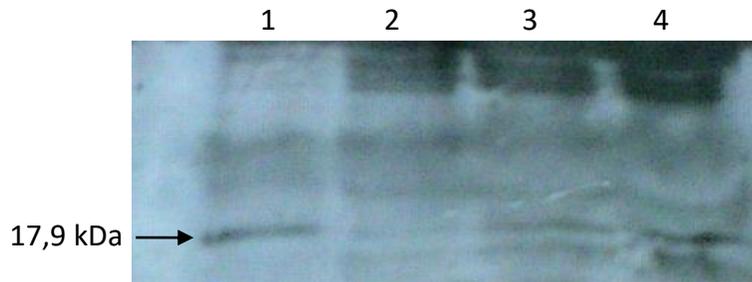


Figura 15: Western blot para Fur.

Se indica la banda de 17,9 kDa, correspondiente a la proteína Fur. Carril 1) cantidad de anticuerpo:proteína 1:1, 2) 5:1, 3) 10:1 y 4) 15:1.

La **Figura 15** muestra que con la menor cantidad de anticuerpo utilizada se logra la mayor inmunoprecipitación. El uso de cantidades crecientes de anticuerpo no aumentó la recuperación del complejo Fur:DNA.

Tras evaluar las etapas de fragmentación del DNA e inmunoprecipitación de la proteína, se definió el protocolo final a aplicar en *A. ferrooxidans* (Materiales y Métodos, punto **2.15**).

3.3.3 Evaluación del enriquecimiento por PCR semicuantitativo

Antes de proceder con los restantes pasos del protocolo y para comprobar que la etapa de inmunoprecipitación fue exitosa, se verificó el enriquecimiento del “Fur DNA” en controles positivos (genes blancos de Fur) mediante PCR semicuantitativo. Para ello, se realizó la amplificación por PCR de los genes *feoB* y *gloA* (cuyas cajas Fur han sido previamente validadas mediante EMSA en nuestro laboratorio) (39) y de dos controles negativos, *pgm* y *malQ*, carentes de cajas Fur. Los productos respectivos se separaron en geles de agarosa, se analizaron por densitometría y se comparó la proporción entre control positivo y negativo presentes tanto en el “Fur DNA” como el “DNA total”. El enriquecimiento se consideró exitoso cuando la proporción entre un control positivo y negativo en el “Fur DNA” fue al menos dos veces mayor que la proporción en el “DNA total”. La **Figura 16** muestra como ejemplo el gel de agarosa con los productos para los genes *gloA* y *pgm*. La **Tabla 7** muestra las razones entre ambos genes obtenidas luego de cuantificar las bandas mediante el programa TotalLab TL100.

Al comparar la razón de amplificación de un gen blanco de Fur (ej, *gloA*) y un control negativo (ej, *pgm*) entre el “Fur DNA” y el “DNA total”, se observa un enriquecimiento promedio de 3,6 veces en el tratamiento “Fur DNA”, indicando que los pasos de inmunoprecipitación de los complejos Fur:DNA fueron exitosos.

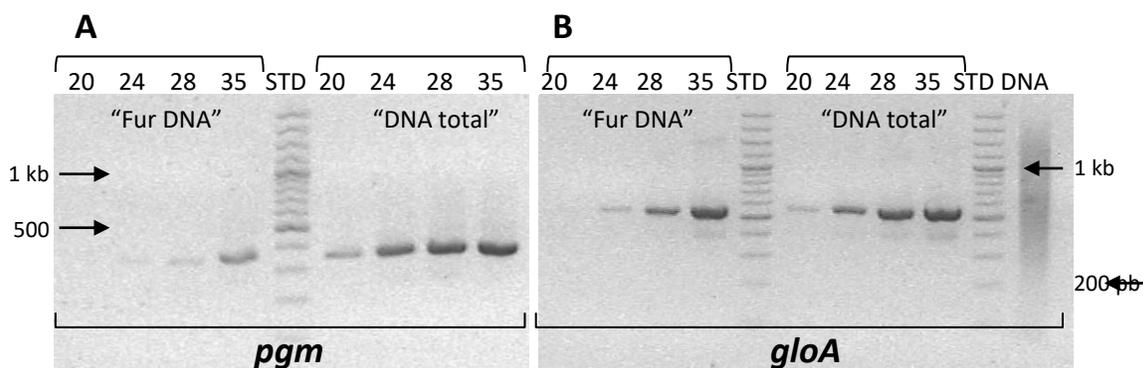


Figura 16: PCR semicuantitativo para los genes *pgm* y *gloA*.

A) Producto de PCR del gen *pgm* amplificado a partir de “Fur DNA” y “DNA total”. **B)** Producto de PCR del gen *gloA* amplificado a partir de “Fur DNA” y “DNA total”. 20, 24, 28 y 35 son el número de ciclos de amplificación. STD: estándar de peso molecular de 100 pb (Fermentas GeneRuler 100 bp Ladder Plus). DNA: Alícuota de “DNA total” que muestra el rango de tamaños obtenido.

Tabla 7. Evaluación del enriquecimiento del DNA inmunoprecipitado (“Fur DNA”).

	<i>gloA</i>		<i>pgm</i>		<i>gloA/pgm</i>		$[(gloA/pgm)_{FurDNA}] / [(gloA/pgm)_{DNAtotal}]$
	Fur DNA	DNA total	Fur DNA	DNA total	Fur DNA	DNA total	
20	15,4	46,5	8,02	73,6	1,92	0,63	3,03
24	48,2	163	15,4	203	3,12	0,80	3,90
28	176	284	29,1	233	6,04	1,22	4,95
35	333	318	111	264	3,01	1,20	2,50

Cantidades estimadas de *gloA* y *pgm* al cuantificar las bandas correspondientes a los ciclos 20, 24, 28 y 35, y la relación que se obtiene al dividir *gloA* por *pgm* en el “Fur DNA” y en el “DNA total”. $[(gloA/pgm)_{FurDNA}] / [(gloA/pgm)_{DNAtotal}]$ = indicador de enriquecimiento. 20, 24, 28 y 35 son el número de ciclos de amplificación.

3.3.4 Ensayo completo microarreglo de DNA inmunoprecipitado *versus* DNA total (paso 2 ChIP-on-chip)

Luego de estandarizar el protocolo de inmunoprecipitación de los complejos Fur:DNA, se siguieron los lineamientos definidos por Quisel y cols., 1999 (65) y Molle y cols., 2003 (66) para llevar a cabo la hibridización contra el microarreglo de DNA de *A. ferrooxidans*. Se utilizaron 2 µg de “DNA total” y 2 µg de “Fur DNA”, y se marcó cada una de las muestras con fluoróforo Cy5 y Cy3, respectivamente. En las 3 réplicas del experimento se observó señal fluorescente homogénea y de intensidad suficiente en el canal correspondiente al tratamiento de “DNA total”, representativo de todo el genoma bacteriano. Sin embargo, en el canal correspondiente al tratamiento de “Fur DNA”, se observó escasa señal, pudiéndose coleccionar unos pocos *spots* positivos. Esto podría indicar que el regulón Fur de *A. ferrooxidans* es pequeño y que el regulador controla la expresión de tan sólo unos pocos genes en las condiciones analizadas. Sin embargo, la mayoría de los datos coleccionados de las 3 réplicas efectuadas de este experimento no son reproducibles entre ellas. Para ilustrar este aspecto se muestran en la **Tabla 8** algunos de los genes cuya pertenencia al regulón Fur es probable, en virtud de la naturaleza de los blancos recuperados, de antecedentes bibliográficos en otros microorganismos y de la predicción o detección de cajas Fur en nuestro laboratorio. Se observa en la tabla sin embargo, que los ensayos no son consistentes entre sí. Esto indica por el contrario, que la sensibilidad lograda en el experimento no fue la suficiente. Se concluye que sería necesario implementar protocolos de amplificación de la señal antes de re-implementar la técnica en *A. ferrooxidans*. Por razones de tiempo y presupuesto, este objetivo excede las metas propuestas en la presente tesis.

Tabla 8. Algunos de los genes identificados como blancos de Fur

Gen	ID TIGR	Cluster	chIP01	chIP02	chIP03	Proteína predicha
<i>fepD</i>	AFE1589	4		+		Permeasa, parte del transportador ABC de Fe ⁺³
<i>exbD</i>	AFE0798	3		+		Proteína ExbD, parte del sistema de transporte TonB
<i>marC</i>	AFE0111	1	+			Bomba de eflujo de dicarboxilato, proteína relacionada a MarC
OMR2	AFE0169	5	+			OMR truncado, interrumpido por transposasa

Se muestran sólo los genes pertenecientes a los *clusters* descritos en esta tesis.

4. DISCUSIÓN

4.1. Extensión del modelo de homeostasis de hierro en *A. ferrooxidans*.

El genoma de *A. ferrooxidans* presenta una gran variedad de genes relacionados con el transporte y almacenamiento de hierro, además del regulador transcripcional Fur. Por analogía con otros sistemas conocidos, se elaboró un modelo que plantea que estos genes funcionarían en conjunto y de modo coordinado, haciendo a la bacteria capaz de balancear los requerimientos biosintéticos y bioenergéticos frente a la distinta biodisponibilidad de hierro de acuerdo al medio de crecimiento. En este trabajo se ha extendido y refinado el modelo preliminar descrito (38) a través del análisis del contexto génico y por medio de genómica comparativa contra dos Acidithiobacilli cercanamente emparentados a *A. ferrooxidans*.

La presencia de múltiples receptores de sideróforos es algo inesperado de encontrar en bacterias extremófilas acidófilas. Este hecho puede dar cuenta de los diferentes pHs y la consecuente variabilidad en la disponibilidad de hierro que podría ser tolerada por estas bacterias, y de su capacidad para competir por el metal con otros microorganismos del mismo nicho.

Por otro lado, la asociación entre genes involucrados en la preservación de la homeostasis de hierro y genes con otras funciones no relacionadas, formando *clusters* y posiblemente operones, aportaría indicios acerca de mecanismos propios de microorganismos acidófilos como *A. ferrooxidans* para resolver el tema de la captación controlada de hierro.

Cluster 1: Citrato.

Un ejemplo de esto, se observa en el *cluster* 1, en el que genes de transporte de dicitrato férrico se asocian estrechamente a un módulo de biosíntesis de citrato y a un módulo de exportación de citrato. Esta asociación está conservada entre *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*. Tal observación es relevante ya que el citrato es un ácido orgánico que sirve como precursor para la síntesis de sideróforos (67), pero también es capaz de actuar como quelante de Fe^{+3} por sí solo (68). La estructura del *cluster* génico encontrado en *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans* no ha sido descrita en otros microorganismos. Sin embargo, existen antecedentes de otra naturaleza que vinculan estos procesos aparentemente

independientes entre sí. Por ejemplo, en *Bradyrhizobium japonicum* se ha demostrado la secreción de ácido cítrico bajo condiciones de limitación de hierro (69).

Los genes de captación y transporte de dicitrato en otros microorganismos son regulados por Fur. En *H. pylori* se ha visto un aumento marcado de la expresión de dos genes de OMR específicos para dicitrato en una mutante de *fur* (35, 70). Sin embargo, el aumento en la expresión de estos transportadores en respuesta al citrato ambiental sugiere un nivel de regulación adicional. Altos niveles de citrato en el medio inducen la síntesis de transportadores de citrato férrico en *E. coli* (71, 72). En esta misma bacteria se ha demostrado que el receptor de membrana externa FecA, que reconoce citrato férrico, sirve además como regulador, ya que la unión de citrato a FecA induce la transcripción de los genes de transporte de dicitrato férrico, *fecABCDE* (73).

Los perfiles de expresión para los receptores de dicitrato de *A. ferrooxidans*, obtenidos en este estudio, indican una mayor expresión de éstos en medios carentes de hierro. Esto es consistente con una regulación dependiente de Fur u otro regulador de respuesta a hierro. Es posible, que en *A. ferrooxidans* la expresión de estos genes también esté controlada por citrato y se induzca a niveles mayores en presencia de este agente quelante.

Cluster 4: transporte de hierro y fijación de nitrógeno.

Otro ejemplo interesante es el del *cluster 4*, en parte por ser exclusivo de *A. ferrooxidans* y en parte por varias particularidades del sistema.

Por un lado, este *cluster* asocia genes de captación y transporte de hierro con genes de transporte de molibdeno. Los ortólogos más similares a la proteína periplásmica con afinidad predicha por molibdeno detectados en las bases de datos se encuentran en bacterias fijadoras de nitrógeno. Es interesante destacar que estos dos metales son relevantes como cofactores de la nitrogenasa. Por otro lado, este *cluster* está inserto en una isla genómica ausente en los otros dos Acidithiobacilli secuenciados y que le confiere a *A. ferrooxidans* una capacidad distintiva, precisamente la de fijar nitrógeno en condiciones de carencia de otras fuentes de nitrógeno como amonio. Esto se debe a que la isla genómica en cuestión agrupa varios *clusters* génicos involucrados en el ensamblaje y maduración de la nitrogenasa (44 genes *nif*). Por tal motivo se propone que el sistema de transporte ABC codificado en el *cluster 4* representaría un sistema bifuncional destinado a cubrir los requerimientos tanto de hierro como de molibdeno para el óptimo funcionamiento de la nitrogenasa de *A. ferrooxidans*.

Algo que llama fuertemente la atención es la presencia de un gen codificante para una hemoglobina truncada (trHb) al inicio del *cluster 4*, con una caja Fur río arriba que ha sido validada *in vitro* (39). Esta asociación entre un gen tipo trHb con genes de transporte de hierro no ha sido descrita en ninguna bacteria, sino que se ha descrito asociada a genes del complejo de fijación de nitrógeno *nif* en la bacteria *Burkholderia fungorum* y en la cianobacteria *Nostoc* sp. (74).

Considerando el contexto génico de *A. ferrooxidans*, esta trHb podría sensar los niveles de hierro mediante la titulación de grupos hemo, regulando en consecuencia su propia expresión y la del operón asociado; o podría operar como sensor de oxígeno con el objeto de disminuir los riesgos de estrés oxidativo producto de la presencia simultánea de hierro y oxígeno dentro de la célula. Otra alternativa es que exista una relación entre la trHb de *A. ferrooxidans* y el estrés por especies reactivas del nitrógeno (estrés nitrosativo), ya que principalmente en bacterias patógenas entéricas se ha visto inducción de genes de tipo hemoglobina frente a este tipo de estrés (75, 76).

En *Mycobacterium bovis* se ha descrito la participación de una trHb (HbN) en la protección de la respiración frente al óxido nítrico (77). En *Campylobacter jejuni* se ha descrito que Ctb, una trHb sería la encargada de moderar el flujo de oxígeno hacia la célula (78); además se ha observado un aumento en la expresión de genes involucrados en el transporte de hierro cuando la bacteria se somete a estrés nitrosativo. También aumentan su expresión Ctb y una hemoglobina de dominio simple (Cgb) (79). En esta bacteria por lo tanto se conjugan la participación de dos hemoglobinas de distinta familia (entre ellas una trHb) con la disponibilidad de oxígeno, el estrés nitrosativo y el transporte de hierro.

En este estudio se demostró la co-transcripción de todos los genes predichos dentro de este *cluster*. Antecedentes previos, generados en nuestro laboratorio indican la unión *in vitro* de la proteína Fur de *A. ferrooxidans* al promotor de *gloA* y ensayos de transcripción *in vitro* sugieren que su transcripción está controlada por Fur (39).

Congruentemente, la expresión de los genes *omr* presentes en este *cluster* es menor en la condición de crecimiento bacteriano rica en hierro soluble que en la de azufre o calcopirita. Sin embargo, las variaciones en la expresión de ellos en bacterias crecidas en medios carentes de hierro y de diferente pH abren otras interrogantes en cuanto a su regulación. En función de los aspectos develados en este estudio, se infiere que en la regulación de este *cluster* podría participar más de un modulador.

4.2 Análisis de los perfiles transcripcionales de los sistemas de adquisición de hierro.

Con el objeto de esclarecer la relevancia de Fur en el control de la homeostasis de hierro en *A. ferrooxidans* y de contribuir a la comprensión de sus mecanismos de regulación *in vivo*, se analizaron en este estudio los perfiles transcripcionales de genes involucrados en la adquisición de hierro. Adicionalmente, se pretendió verificar experimentalmente algunas de las predicciones derivadas del análisis bioinformático que han permitido inferir algunos aspectos de la respuesta de homeostasis de hierro en *A. ferrooxidans*.

Expresión de los genes de transportadores de Fe⁺² en diferentes condiciones de cultivo.

Los genes *mntH* y *feoB* de *A. ferrooxidans* poseen cajas Fur validadas experimentalmente (38, 39), pero hasta la realización de este estudio no existían antecedentes sobre la expresión y el control de la expresión de estos genes en nuestra bacteria modelo. El análisis del perfil transcripcional mediante PCR cuantitativo confirma lo observado en otras bacterias, una variación en la expresión del *cluster feoPABC* acorde a la disponibilidad de hierro. Si se toma en cuenta el comportamiento de este sistema en otras bacterias y la existencia de una caja Fur funcional en el promotor predicho del gen *feoP* de *A. ferrooxidans*, es muy probable que esta variación sea Fur-dependiente. El presente trabajo también demuestra la regulación hierro dependiente del gen *mntH*, codificante para un transportador secundario de Fe⁺². Ambos transportadores disminuyen su expresión en hierro con respecto a azufre. Por el contrario, cambios en el pH no provocaron variación significativa en la expresión de ninguno de los dos transportadores.

La presencia en el genoma de *A. ferrooxidans* de dos sistemas de transporte de Fe⁺² que responden a los cambios de biodisponibilidad de hierro, demuestra que las bacterias acidófilas conservan estrategias propias de microorganismos neutrófilos aerobios para la captación de hierro (80). Estas estrategias serían utilizadas en condiciones de carencia de hierro y durante el proceso de biolixiviación en el ambiente.

Expresión de los genes de transportadores de Fe⁺³ en diferentes condiciones de cultivo.

En este trabajo se demostró, adicionalmente, que los once genes *omr* predichos en el genoma de *A. ferrooxidans* se expresan a nivel de mRNA en una variedad de condiciones que difieren en cuanto a disponibilidad de hierro, pH del medio y sustrato energético. A la fecha, existía escasa evidencia de la expresión de estos genes. En un estudio proteómico reciente *Chi* y *cols.* encontraron péptidos

pertenecientes a los OMR 3 y 11 en la fracción periplásmica de la bacteria cuando ésta crece en tiosulfato (81). En este mismo estudio se detectó una proteína de unión a hierro perteneciente al *cluster* génico 4; cuya presencia sugiere la utilización de este *cluster* para la adquisición de Fe⁺³ en cultivos crecido en tiosulfato.

La presencia de sistemas de captación y transporte de ferri-sideróforos en el genoma de *A. ferrooxidans*, sumado a la comprobación de su expresión *in vivo*, permite hipotetizar que éstos confieren a la bacteria la capacidad de cubrir sus requerimientos del metal en condiciones en las que éste es limitado, ya sea durante el crecimiento a partir de fuentes energéticas distintas del hierro como azufre o minerales compuestos, en condiciones fuera del rango de pH óptimo o incluso en condiciones competitivas en cultivo mixto. Al igual que otros microorganismos, *A. ferrooxidans* muestra asociación de estos genes *omr* con genes codificantes para transportadores de membrana interna tipo ABC y sistemas de transducción de energía TonB/ExbB/ExbD, brindando así soporte a la idea de que estos receptores son funcionales. Cabe destacar, sin embargo, que no se han encontrado en el genoma de *A. ferrooxidans* ni en ninguno de los Acidithiobacilli secuenciados, genes que codifiquen para rutas de biosíntesis de los principales sideróforos descritos en otras bacterias. No obstante, es sabido que muchas bacterias son capaces de utilizar sideróforos exógenos. En tal sentido, la diversidad de OMR mostrada por *A. ferrooxidans* podría conferirle un ventaja adaptativa en situaciones de carencia de hierro permitiéndole competir eficientemente por sideróforos exógenos frente a otros miembros del consorcio microbiano.

Por otro lado, en varias bacterias se sabe que la síntesis de OMR es dependiente de Fur (17). Consecuentemente, la predicción de cajas Fur en la cercanía de varios de los OMR de *A. ferrooxidans* apoya su rol en la captación de hierro. La falta de una correlación clara entre la presencia de una caja predicha y el comportamiento transcripcional de él o los genes de OMR río abajo, sería indicativo de la existencia de niveles adicionales de regulación, eventualmente independientes de Fur. Alternativamente, es posible que el sistema de predicción de cajas Fur basado en la información disponible para otros microorganismos, implementado en nuestro laboratorio no haya detectado todas las cajas Fur existentes en el genoma de *A. ferrooxidans* (39).

El análisis efectuado durante esta tesis reveló, sin embargo, la existencia de patrones de expresión según la especificidad predicha de los OMR. Mientras que los genes de OMR con afinidad por dicitrato se expresan más en medio carente de hierro que en medio rico en hierro soluble, como es esperable para un transportador de hierro, existe un grupo de 5 genes *omr* (2, 3, 6, 7 y 11) que

muestra el comportamiento opuesto. Todos ellos comparten especificidad por catecolatos, lineales o cíclicos. De este grupo, sólo los genes *omr2* y *omr3* poseen caja Fur, pero su funcionalidad es cuestionable ya que ambas tienen puntajes de predicción relativamente bajos (39).

Hasta el momento no existen estudios que muestren un aumento de la expresión de este tipo de receptores en condiciones de alta disponibilidad de hierro. Tal resultado sugiere que estos receptores tienen en *A. ferrooxidans* una función diferente. Aunque altamente especulativo, sería posible pensar que su mecanismo de funcionamiento fuera inverso, es decir que estuvieran involucrados en el eflujo de hierro. Alternativamente, podrían participar en la transferencia extracelular de electrones, mediada por sideróforos. Se ha reportado que algunas bacterias pueden utilizar moléculas orgánicas pequeñas, redox activas, para transferir electrones entre compuestos con distinto potencial redox (82-84). A la fecha se ha descrito este proceso en bacterias reductoras de minerales, que transfieren electrones a los metales contribuyendo a su disolución. Aunque se ha cuestionado la relevancia de los sideróforos en la respiración de minerales de hierro, se ha planteado que estos podrían efectivamente funcionar como centros redox en condiciones de adsorción a su receptor.

La diversidad de OMR presente en *A. ferrooxidans* no sólo se manifiesta en su especificidad por sideróforos, sino también en sus pls. Mientras las bacterias neutrófilas poseen receptores con pls en el rango neutro, *A. ferrooxidans* presenta OMR predichos que abarcan un amplio rango de pl, desde 6,7 a 9,2. Otra bacteria ácido-tolerante, *Helicobacter pylori*, posee únicamente cuatro OMR, todos específicos para dicitrato, los que también presentan pls básicos. Se ha especulado que en microorganismos acidófilos, el pl elevado de las proteínas extracitoplasmáticas sería necesario para mantener su estabilidad en un medio ácido. Se ha propuesto además que proteínas de membrana externa de pl elevado actuarían como barrera para el flujo de protones, ya que en un medio ácido se encontrarían con una carga neta positiva y esto impediría o retardaría el ingreso de protones al citoplasma, por una repulsión de las cargas (81).

Puesto que los cambios en el pH del medio se ven acompañados de cambios en la cantidad de hierro disuelto (85), la distribución de pls observada para los OMR de *A. ferrooxidans* podría ser indicativa de la capacidad de esta bacteria de adquirir el metal en condiciones de distinto pH y disponibilidad de hierro. Esta predicción es consistente con el hecho de que *A. ferrooxidans* es capaz de crecer en hierro (pH 1,6-2,0) o azufre (pH 2,5-5,5). Durante su crecimiento en hierro por sobre pH 2,0, el Fe^{+3} generado por la biooxidación del Fe^{+2} es poco soluble y comienza a precipitar. Por otro lado, durante su crecimiento en compuestos reducidos del azufre, el sulfato que se produce de la oxidación de

estos compuestos reacciona con el Fe^{+3} y forma complejos que precipitan, reduciendo aún más la concentración de hierro soluble (86). Esto sugiere que en cualquier medio de pH mayor a 2,0, *A. ferrooxidans* y los otros Acidithiobacilli podrían verse comprometidos debido a la falta de hierro disponible, y por lo tanto aumentarían la producción de receptores de alta afinidad por este ión. El amplio rango de pls de los OMR permitiría a la bacteria expresar aquellos que pueden permanecer estables y funcionar a un pH determinado, asegurando así la captación de hierro a diversos pHs.

Aunque la evidencia experimental obtenida en este estudio revela patrones de expresión de los OMR en función de sus pls y el pH del medio de crecimiento, la respuesta no es lineal. Casi todos los OMR se expresan más a pH 4,5 que a pH 2,5, aunque existen discrepancias según si la fuente de energía es azufre elemental o tiosulfato. Es importante mencionar que si bien el pH inicial de estos medios utilizados es diferente, a medida que progresa la oxidación de azufre el pH del medio se acidifica siguiendo una cinética propia. Es posible que las diferencias observadas se correlacionen mejor con el pH final de cada medio. Dado que este parámetro no fue considerado en el diseño experimental, la interrogante queda abierta.

Expresión de los genes de los reguladores Fur y PhoB en diferentes condiciones de cultivo.

En la mayoría de los microorganismos estudiados Fur se expresa constitutivamente en altos niveles (58, 59), encontrándose como apo-represor cuando la concentración intracelular de hierro es baja. En *A. ferrooxidans*, por el contrario, se observa una disminución en la expresión de la proteína Fur_{AF} cuando los niveles de hierro son altos (38), sin embargo, esta disminución no se debe a una diferencia en la transcripción de *fur*, ya que los niveles de mRNA se mantienen relativamente constantes, sino pareciera deberse a un mecanismo post-transcripcional aún no definido. En este trabajo observamos que los niveles del mRNA de *fur* en cultivos de hierro son entre 1,5 y 3 veces mayor que en azufre. El significado biológico de esta diferencia entre los niveles de mRNA y de proteína se desconoce. Por otro lado, los resultados obtenidos en este estudio, permiten afirmar que cambios en el pH, por lo menos en una unidad hacia arriba y hacia abajo en el medio de azufre (pHs 2,5/3,5/4,5), no provocan cambios en la expresión del regulador a nivel transcripcional. Consecuentemente, las diferencias observadas en los perfiles transcripcionales de los genes *omr* no se deberían a un efecto mediado por Fur y cambios en el pH.

El regulador PhoB en otras bacterias, como *E. coli*, es el activador transcripcional del regulón fosfato (87), el cual se induce en condiciones de carencia de fosfato. En el genoma de *A. ferrooxidans* se

encuentran dos reguladores de esta familia junto a genes relacionados al transporte de hierro. Adicionalmente, cuatro de los once genes *omr* de *A. ferrooxidans* están en *clusters* asociados a genes que participan en distintos procesos relacionados al metabolismo del fosfato. Siendo el fosfato un quelante de especies del hierro se sugiere que en bacterias acidófilas el fosfato podría funcionar como quelante de Fe^{+3} . Por otro lado, la presencia de reguladores de la familia PhoB sugiere la existencia de un mecanismo coordinado entre la regulación de hierro y fosfato. A favor de esta última hipótesis, una de las copias de *phoB* en el genoma de *A. ferrooxidans* presenta una caja Fur predicha a nivel de su promotor y según ensayos EMSA e IVTA, constituye un gen blanco de Fur confirmado y eventualmente reprimido por Fur en presencia del cofactor metálico (39).

En este trabajo se analizó la expresión de este gen *in vivo* en diversas condiciones de crecimiento. Contrario a lo observado en los experimentos de transcripción *in vitro*, *in vivo* se observó un aumento en la expresión de *phoB* en células crecidas en medio con alto contenido de hierro soluble. Esto hace pensar en tres posibles explicaciones: 1) que el ensayo *in vitro* no permita reproducir fidedignamente la regulación positiva que Fur ejercería sobre *phoB in vivo*, 2) que el cambio en la expresión de *phoB* sea producto de un mecanismo regulatorio diferente al ejercido por Fur (situación que no descarta que Fur efectivamente se una a la caja de este gen, con o sin efecto biológico) o 3) que la unión demostrada *in vitro* tenga un efecto activador *in vivo*. Favorecemos la tercera explicación, ya que en *S. oneidensis*, *phoB* aumenta su expresión en 4 veces en presencia de hierro (88), estando la caja Fur de este gen a una distancia similar a la de *A. ferrooxidans* (a 105 y a 109 pb de distancia del inicio de la transcripción, respectivamente). Además, si bien en la mayoría de los casos de regulación positiva ésta es a través de RNAs pequeños (36), en algunas bacterias se ha demostrado que la unión de Fur induce de manera directa la expresión del gen blanco. Por ejemplo, la unión de Fur a un operador de alta afinidad, ubicado arriba del promotor del gen *norB* resulta esencial para la activación del promotor tanto *in vitro* como *in vivo* en *N. meningitidis* (37). Resta definir si esta sería la situación en *A. ferrooxidans*.

La imposibilidad de relacionar indefectiblemente la presencia de cajas Fur predichas con el comportamiento transcripcional de los blancos putativos de Fur y la abundancia de hierro soluble en el medio, hace necesario encarar la pregunta subyacente a esta tesis de un modo alternativo. Debido a la falta de herramientas adecuadas para la manipulación genética de *A. ferrooxidans*, ensayos como el *chIP-on-chip* toman fuerza para obtener indicios sobre lo que está ocurriendo con Fur y su regulación.

4.3 ChIP-on-chip

Para comprobar la unión a DNA del factor transcripcional Fur de *A. ferrooxidans in vivo*, determinar experimentalmente los sitios de unión de Fur y obtener una visión global del regulón Fur de nuestra bacteria modelo *in vivo*, se implementó la técnica de ChIP-on-chip.

Luego de estandarizar los pasos críticos del ensayo, la implementación del ensayo completo reveló baja intensidad de señal en el microarreglo para la muestra Fur-DNA. Los datos obtenidos a partir de las tres réplicas efectuadas del ensayo fueron pocos e inconsistentes entre sí. Estos resultados negativos serían el reflejo de una recuperación insuficiente de la muestra inmunoprecipitada dada la sensibilidad del ensayo de microarreglos.

En los últimos años, se han desarrollado métodos alternativos que permiten obtener mayor cantidad de DNA. Algunos de ellos prescinden del microarreglo y optan en cambio por identificar los sitios de unión del factor transcripcional en estudio mediante secuenciación. La ventaja de estos métodos es que no requieren el uso de DNA total como muestra de referencia, ya que al secuenciar no es necesario demostrar el enriquecimiento del DNA inmunoprecipitado con respecto al DNA total. La desventaja es que son costosos, sobre todo si se pretende realizar el análisis para varias condiciones. Es por esto que los métodos más usados continúan siendo aquellos que amplifican y comparan DNA inmunoprecipitado con DNA total, de tal modo que la cantidad de muestra final se incrementa enormemente y se puede utilizar sin problemas para varios microarreglos. Entre estos métodos el más usado es el LM-PCR (*ligation-mediated PCR*), y un nuevo método: la amplificación con la RNA polimerasa del fago T7 (89). Este último ha demostrado ser mejor que el LM-PCR, y actualmente se está implementado en nuestro laboratorio para aumentar la cantidad de DNA en las muestras sometidas a inmunoprecipitación y poder así contestar las interrogantes que aquí quedan abiertas.

El objetivo central de este trabajo fue contribuir a la descripción de los mecanismos involucrados en la mantención de la homeostasis de hierro en *A. ferrooxidans*. Esto se logró a través del análisis bioinformático de su genoma y mediante el análisis del perfil transcripcional de genes de relevancia en distintas condiciones de crecimiento. Los resultados generados en este trabajo contestan algunas de las interrogantes planteadas, y generan otras nuevas redireccionando el trabajo futuro.

5. CONCLUSIONES

1. *A. ferrooxidans* presenta múltiples sistemas de captación y transporte de Fe^{+3} con distinta afinidad predicha por sideróforos y distinto pI predicho. Se observa una asociación entre genes involucrados en el transporte de hierro y genes con otras funciones aparentemente no relacionadas, formando *clusters* y posiblemente operones.
2. Existe en el genoma de *A. ferrooxidans* un *cluster* (*cluster 4*) que contiene todos los genes necesarios para la captación y el transporte de hierro hacia la célula. La co-transcripción de los genes que lo conforman confirma que se trata de un operón.
3. Al comparar cultivos en Fe 200 mM con cultivos en S a pH 3,5, los genes de OMR con afinidad predicha para dicitrato muestran un perfil de expresión consistente con el de un gen regulado por Fur, es decir su expresión es menor en el medio rico en hierro. Los genes de OMR con especificidad predicha para catecolato en cambio, muestran un perfil transcripcional opuesto, lo cual sugiere que tienen un rol distinto al de un receptor y transportador de Fe^{+3} .
4. El presente trabajo deja en claro que en *A. ferrooxidans* existe regulación hierro-dependiente de genes involucrados en el transporte de hierro, muy posiblemente a través del regulador Fur. Sin embargo, los genes *omr2* y *omr3*, por ejemplo, ambos con caja Fur predicha en su promotor muestran un perfil transcripcional que no concuerda con una regulación mediada por Fur. Definitivamente es necesario comprobar la funcionalidad de las cajas Fur *in vivo*.
5. El enriquecimiento en genes blancos de Fur en el DNA inmunoprecipitado ("Fur DNA") tras entrecruzar químicamente los complejos Fur:DNA muestra que la técnica implementada en esta tesis es funcional y promisorio. Sin embargo, la baja señal fluorescente obtenida en el análisis de microarreglos indica que es imperativo realizar una etapa posterior de amplificación para obtener material suficiente y poder generar resultados consistentes.

6. BIBLIOGRAFÍA

1. Touati D. 2000. Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch Biochem Biophys* **373**:1-6.
2. Bereswill S, Greiner S, van Vliet AH, Waidner B, Fassbinder F, Schiltz E, Kusters JG, Kist M. 2000. Regulation of ferritin-mediated cytoplasmic iron storage by the ferric uptake regulator homolog (Fur) of *Helicobacter pylori*. *J Bacteriol* **182**:5948-5953.
3. Delany I, Spohn G, Rappuoli R, Scarlato V. 2001. The Fur repressor controls transcription of iron-activated and -repressed genes in *Helicobacter pylori*. *Mol Microbiol* **42**:1297-1309.
4. Ollinger J, Song KB, Antelmann H, Hecker M, Helmann JD. 2006. Role of the Fur regulon in iron transport in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol* **188**:3664-3673.
5. Wandersman C, Delepelaire P. 2004. Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol* **58**:611-647.
6. Andrews SC, Robinson AK, Rodriguez-Quinones F. 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol Rev* **27**:215-237.
7. Makui H, Roig E, Cole ST, Helmann JD, Gros P, Cellier MF. 2000. Identification of the *Escherichia coli* K-12 Nramp orthologue (MnTH) as a selective divalent metal ion transporter. *Mol Microbiol* **35**:1065-1078.
8. Kehres DG, Janakiraman A, Schlauch JM, Maguire ME. 2002. Regulation of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mnTH transcription by H₂O₂, Fe²⁺, and Mn²⁺. *J Bacteriol* **184**:3151-3158.
9. Zaharik ML, Cullen VL, Fung AM, Libby SJ, Kujat Choy SL, Coburn B, Kehres DG, Maguire ME, Fang FC, Finlay BB. 2004. The *Salmonella enterica* serovar Typhimurium divalent cation transport systems MntH and SitABCD are essential for virulence in an Nramp1G169 murine typhoid model. *Infect Immun* **72**:5522-5525.
10. Sabri M, Leveille S, Dozois CM. 2006. A SitABCD homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide. *Microbiology* **152**:745-758.
11. Hantke K. 2003. Is the bacterial ferrous iron transporter FeoB a living fossil? *Trends Microbiol* **11**:192-195.
12. Marlovits TC, Haase W, Herrmann C, Aller SG, Unger VM. 2002. The membrane protein FeoB contains an intramolecular G protein essential for Fe(II) uptake in bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:16243-16248.
13. Cartron ML, Maddocks S, Gillingham P, Craven CJ, Andrews SC. 2006. Feo--transport of ferrous iron into bacteria. *Biometals* **19**:143-157.
14. Rawlings DE, Kusano T. 1994. Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol Rev* **58**:39-55.
15. Sand W, Gehrke T. 2006. Extracellular polymeric substances mediate bioleaching/biocorrosion via interfacial processes involving iron(III) ions and acidophilic bacteria. *Res Microbiol* **157**:49-56.
16. Rawlings DE. 2002. Heavy metal mining using microbes. *Annu Rev Microbiol* **56**:65-91.
17. Crosa JH. 1997. Signal transduction and transcriptional and posttranscriptional control of iron-regulated genes in bacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **61**:319-336.
18. Escolar L, Pérez-Martin J, de Lorenzo, V. 1999. Opening the iron box: transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J Bacteriol* **181**:6223-6229.

19. Hantke K. 1981. Regulation of ferric iron transport in *Escherichia coli* K12: isolation of a constitutive mutant. *Mol Gen Genet* **182**:288-292.
20. Bereswill S, Lichte F, Greiner S, Waidner B, Fassbinder F, Kist M. 1999. The ferric uptake regulator (Fur) homologue of *Helicobacter pylori*: functional analysis of the coding gene and controlled production of the recombinant protein in *Escherichia coli*. *Med Microbiol Immunol* **188**:31-40.
21. Friedman YE, O'Brian MR. 2004. The ferric uptake regulator (Fur) protein from *Bradyrhizobium japonicum* is an iron-responsive transcriptional repressor in vitro. *J Biol Chem* **279**:32100-32105.
22. Yang Y, Harris DP, Luo F, Wu L, Parsons AB, Palumbo AV, Zhou J. 2008. Characterization of the *Shewanella oneidensis* Fur gene: roles in iron and acid tolerance response. *BMC Genomics* **9** Suppl 1:S11.
23. Heidrich C, Hantke K, Bierbaum G, Sahl HG. 1996. Identification and analysis of a gene encoding a Fur-like protein of *Staphylococcus epidermidis*. *FEMS Microbiol Lett* **140**:253-259.
24. Bsat N, Herbig A, Casillas-Martinez L, Setlow P, Helmann JD. 1998. *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. *Mol Microbiol* **29**:189-198.
25. Ledala N, Pearson SL, Wilkinson BJ, Jayaswal RK. 2007. Molecular characterization of the Fur protein of *Listeria monocytogenes*. *Microbiology* **153**:1103-1111.
26. Ghassemian M, Straus NA. 1996. Fur regulates the expression of iron-stress genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Microbiology* **142** (Pt 6):1469-1476.
27. Coy M, Neilands JB. 1991. Structural dynamics and functional domains of the fur protein. *Biochemistry* **30**:8201-8210.
28. Stojiljkovic I, Hantke K. 1995. Functional domains of the *Escherichia coli* ferric uptake regulator protein (Fur). *Mol Gen Genet* **247**:199-205.
29. Tiss A, Barre O, Michaud-Soret I, Forest E. 2005. Characterization of the DNA-binding site in the ferric uptake regulator protein from *Escherichia coli* by UV crosslinking and mass spectrometry. *FEBS Lett* **579**:5454-5460.
30. Bagg A, Neilands JB. 1987. Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* **26**:5471-5477.
31. González de Peredo A, Saint-Pierre C, Latour JM, Michaud-Soret I, Forest E. 2001. Conformational changes of the ferric uptake regulation protein upon metal activation and DNA binding; first evidence of structural homologies with the diphtheria toxin repressor. *J Mol Biol* **310**:83-91.
32. Escolar L, Pérez-Martin J, de Lorenzo, V. 1998. Coordinated repression in vitro of the divergent *fepA-fes* promoters of *Escherichia coli* by the iron uptake regulation (Fur) protein. *J Bacteriol* **180**:2579-2582.
33. Escolar L, Pérez-Martin J, de Lorenzo, V. 1998. Binding of the fur (ferric uptake regulator) repressor of *Escherichia coli* to arrays of the GATAAT sequence. *J Mol Biol* **283**:537-547.
34. Lavrrar JL, McIntosh MA. 2003. Architecture of a fur binding site: a comparative analysis. *J Bacteriol* **185**:2194-2202.

35. Ernst FD, Bereswill S, Waidner B, Stoof J, Mader U, Kusters JG, Kuipers EJ, Kist M, van Vliet AH, Homuth G. 2005. Transcriptional profiling of *Helicobacter pylori* Fur- and iron-regulated gene expression. *Microbiology* **151**:533-546.
36. Masse E, Gottesman S. 2002. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:4620-4625.
37. Delany I, Rappuoli R, Scarlato V. 2004. Fur functions as an activator and as a repressor of putative virulence genes in *Neisseria meningitidis*. *Mol Microbiol* **52**:1081-1090.
38. Quatrini R, Lefimil C, Holmes DS, Jedlicki E. 2005. The ferric iron uptake regulator (Fur) from the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Microbiology* **151**:2005-2015.
39. Quatrini R, Lefimil C, Veloso FA, Pedroso I, Holmes DS, Jedlicki E. 2007. Bioinformatic prediction and experimental verification of Fur-regulated genes in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Nucleic Acids Res* **35**:2153-2166.
40. Valdés J, Veloso F, Jedlicki E, Holmes D. 2003. Metabolic reconstruction of sulfur assimilation in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* based on genome analysis. *BMC Genomics* **4**:51.
41. Quatrini R, Jedlicki E, Holmes DS. 2005. Genomic insights into the iron uptake mechanisms of the biomining microorganism *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **32**:606-614.
42. Quatrini R, Appia-Ayme C, Denis Y, Ratouchniak J, Veloso F, Valdés J, Lefimil C. 2006. Insights into the iron and sulfur energetic metabolism of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by microarray transcriptome profiling. *Hydrometallurgy* **83**:263-272
43. Appia-Ayme C, Quatrini R, Denisa Y, Denizota F, Silverc S, Robertod F, Veloso F, Valdés J, Cárdenas JP, Esparza M, Orellana O, Jedlicki E, Bonnefoy V, Holmes DS. 2006. Microarray and bioinformatic analyses suggest models for carbon metabolism in the autotroph *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* **83**:273-280.
44. Danielli A, Roncarati D, Delany I, Chiarini V, Rappuoli R, Scarlato V. 2006. In vivo dissection of the *Helicobacter pylori* Fur regulatory circuit by genome-wide location analysis. *J Bacteriol* **188**:4654-4662.
45. Engels V, Lindner SN, Wendisch VF. 2008. The global repressor sugr controls expression of genes of glycolysis and of the l-lactate dehydrogenase Idha in *Corynebacterium glutamicum*. *J bacteriol* **190**:8033-8044.
46. Bruscella P, Eraso JM, Roh JH, Kaplan S. 2008. The use of chromatin immunoprecipitation to define PpsR binding activity in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *J bacteriol* **190**:6817-6828.
47. Vandesompele J, De PK, Pattyn F, Poppe B, Van RN, De PA, Speleman F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**:RESEARCH0034.
48. Hellemans J, Mortier G, De PA, Speleman F, Vandesompele J. 2007. qBase relative quantification framework and software for management and automated analysis of real-time quantitative PCR data. *Genome Biol* **8**:R19.
49. Osorio H, Martinez V, Nieto PA, Holmes DS, Quatrini R. 2008. Microbial iron management mechanisms in extremely acidic environments: comparative genomics evidence for diversity and versatility. *BMC Microbiology* **8**:203

50. Chain P, Lamerdin J, Larimer F, Regala W, Lao V, Land M, Hauser L, Hooper A, Klotz M, Norton J, Sayavedra-Soto L, Arciero D, Hommes N, Whittaker M, Arp D. 2003. Complete genome sequence of the ammonia-oxidizing bacterium and obligate chemolithoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *J Bacteriol* **185**:2759-73.
51. Cornelis P, Matthijs S. 2002. Diversity of siderophore-mediated iron uptake systems in fluorescent pseudomonads: not only pyoverdines. *Environ Microbiol* **4**:787-798.
52. Andersen CL, Jensen JL, Orntoft TF. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* **64**:5245-5250.
53. McGrew DA, Knight KL. 2003. Molecular design and functional organization of the RecA protein. *Crit Rev Biochem Mol Biol* **38**:385-432.
54. Schimmel P. 1990. Alanine transfer RNA synthetase: structure-function relationships and molecular recognition of transfer RNA. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **63**:233-270.
55. Yarzabal A, Appia-Ayme C, Ratouchniak J, Bonnefoy V. 2004. Regulation of the expression of the *Acidithiobacillus ferrooxidans* *rus* operon encoding two cytochromes c, a cytochrome oxidase and rusticyanin. *Microbiology* **150**:2113-2123.
56. Rivas M, Seeger M, Jedlicki E, Holmes DS. 2007. Second acyl homoserine lactone production system in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* **73**:3225-3231.
57. He Z, Zhong H, Hu Y, Xiao S, Liu J, Xu J, Li G. 2005. Analysis of differential-expressed proteins of *Acidithiobacillus ferrooxidans* grown under phosphate starvation. *J Biochem Mol Biol* **38**:545-549.
58. Wakai S, Kikumoto M, Kanao T, Kamimura K. 2004. Involvement of sulfide:quinone oxidoreductase in sulfur oxidation of an acidophilic iron-oxidizing bacterium, *Acidithiobacillus ferrooxidans* NASF-1. *Biosci Biotechnol Biochem* **68**:2519-2528.
59. Carlos C, Reis FC, Vicentini R, Madureira DJ, Ottoboni LM. 2008. The *rus* operon genes are differentially regulated when *Acidithiobacillus ferrooxidans* LR is kept in contact with metal sulfides. *Curr Microbiol* **57**:375-380.
60. Gil R, Silva FJ, Pereto J, Moya A. 2004. Determination of the core of a minimal bacterial gene set. *Microbiol Mol Biol Rev* **68**:518-537.
61. Barton HA, Johnson Z, Cox CD, Vasil AI, Vasil ML. 1996. Ferric uptake regulator mutants of *Pseudomonas aeruginosa* with distinct alterations in the iron-dependent repression of exotoxin A and siderophores in aerobic and microaerobic environments. *Mol Microbiol* **21**:1001-1017.
62. Watnick PI, Eto T, Takahashi H, Calderwood SB. 1997. Purification of *Vibrio cholerae* fur and estimation of its intracellular abundance by antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. *J Bacteriol* **179**:243-247.
63. Zheng M, Doan B, Schneider TD, Storz G. 1999. OxyR and SoxRS regulation of fur. *J Bacteriol* **181**:4639-4643.
64. Wittenberg JB, Bolognesi M, Wittenberg BA, Guertin M. 2002. Truncated hemoglobins: a new family of hemoglobins widely distributed in bacteria, unicellular eukaryotes, and plants. *J Biol Chem* **277**:871-4
65. Quisel JD, Lin DC, Grossman AD. 1999. Control of development by altered localization of a transcription factor in *B. subtilis*. *Mol Cell* **4**:665-672.

66. Molle V, Nakaura Y, Shivers RP, Yamaguchi H, Losick R, Fujita Y, Sonenshein AL. 2003. Additional targets of the *Bacillus subtilis* global regulator CodY identified by chromatin immunoprecipitation and genome-wide transcript analysis. *J Bacteriol* **185**:1911-1922.
67. Winkelmann G. 2002. Microbial siderophore-mediated transport. *Biochem Soc Trans* **30**:691-696.
68. Pich A, Manteuffel R, Hillmer S, Scholz G, Schmidt W. 2001. Fe homeostasis in plant cells: does nicotianamine play multiple roles in the regulation of cytoplasmic Fe concentration? *Planta* **213**:967-76
69. Guerinot ML, Meidl EJ, Plessner O. 1990. Citrate as a siderophore in *Bradyrhizobium japonicum*. *J Bacteriol* **172**:3298-3303.
70. Gancz H, Censini S, Merrell DS. 2006. Iron and pH homeostasis intersect at the level of Fur regulation in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Infect Immun* **74**:602-614.
71. Frost GE, Rosenberg H. 1973. The inducible citrate-dependent iron transport system in *Escherichia coli* K12. *Biochim Biophys Acta* **330**:90-101.
72. Lin J, Hogan JS, Smith KL. 1999. Antigenic homology of the inducible ferric citrate receptor (FecA) of coliform bacteria isolated from herds with naturally occurring bovine intramammary infections. *Clin Diagn Lab Immunol* **6**:966-969.
73. Enz S, Mahren S, Stroeher UH, Braun V. 2000. Surface signaling in ferric citrate transport gene induction: interaction of the FecA, FecR, and FecI regulatory proteins. *J Bacteriol* **182**:637-646.
74. Angeloni SV, Potts M. 1994. Analysis of the sequences within and flanking the cyanoglobin-encoding gene, glbN, of the cyanobacterium *Nostoc commune* UTEX 584. *Gene* **146**:133-134.
75. Poole RK, Hughes MN. 2000. New functions for the ancient globin family: bacterial responses to nitric oxide and nitrosative stress. *Mol Microbiol* **36**:775-783.
76. Poole RK. 2005. Nitric oxide and nitrosative stress tolerance in bacteria. *Biochem Soc Trans* **33**:176-180.
77. Ouellet H, Ouellet Y, Richard C, Labarre M, Wittenberg B, Wittenberg J, Guertin M. 2002. Truncated hemoglobin HbN protects *Mycobacterium bovis* from nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:5902-5907
78. Wainwright LM, Elvers KT, Park SF, Poole RK. 2005. A truncated haemoglobin implicated in oxygen metabolism by the microaerophilic food-borne pathogen *Campylobacter jejuni*. *Microbiology* **151**:4079-4091
79. Monk CE, Pearson BM, Mulholland F, Smith HK, Poole RK. 2008. Oxygen- and NssR-dependent globin expression and enhanced iron acquisition in the response of campylobacter to nitrosative stress. *J Biol Chem* **283**:28413-28425.
80. Hantke K. 2001. Iron and metal regulation in bacteria. *Curr Opin Microbiol* **4**:172-177.
81. Chi A, Valenzuela L, Beard S, Mackey AJ, Shabanowitz J, Hunt DF, Jerez CA. 2007. Periplasmic proteins of the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*: a high throughput proteomics analysis. *Mol Cell Proteomics* **6**:2239-2251.
82. Hernández ME, Newman DK. 2001. Extracellular electron transfer. *Cell Mol Life Sci* **58**:1562-1571.
83. Hernández ME, Mitsch WJ. 2007. Denitrification potential and organic matter as affected by vegetation community, wetland age, and plant introduction in created wetlands. *J Environ Qual* **36**:333-342.

84. Marsili E, Baron DB, Shikhare ID, Coursolle D, Gralnick JA, Bond DR. 2008. *Shewanella* secretes flavins that mediate extracellular electron transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:3968-3973.
85. Brown Theodore L, LeMay H. Eugene, Bursten Bruce E. Metales y metalurgia. En su: Química, la ciencia central. 7ª ed. México, Prentice Hall, 1998. pp.869-896.
86. Malki M, González-Toril E, Sanz JL, Gómez F, Rodríguez N, Amlils R. 2006. Importance of the iron cycle in biohydrometallurgy. *Hydrometallurgy* **83**:223-228.
87. Wanner BL. 1996. Signal transduction in the control of phosphate-regulated genes of *Escherichia coli*. *Kidney Int* **49**:964-967.
88. Thompson DK, Beliaev AS, Giometti CS, Tollaksen SL, Khare T, Lies DP, Nealson KH, Lim H, Yates J, Brandt CC, Tiedje JM, Zhou J. 2002. Transcriptional and proteomic analysis of a ferric uptake regulator (*fur*) mutant of *Shewanella oneidensis*: possible involvement of *fur* in energy metabolism, transcriptional regulation, and oxidative stress. *Appl Environ Microbiol* **68**:881-892.
89. van Bakel H, van Werven FJ, Radonjic M, Brok MO, van Leenen D, Holstege FC, Timmers HT. 2008. Improved genome-wide localization by CHIP-chip using double-round T7 RNA polymerase-based amplification. *Nucleic Acids Res* **36**:e21.

ANEXO 1: Partidores utilizados

TABLA A: Partidores para ensayo de co-transcripción

Partidor	Secuencia 5' – 3'	T° de alineamiento (°C)	Tamaño del producto (pb)	
AFE1604-F (1)	TGC CGC ATG ATG GTG TTG GT	60	879	
AFE1602-R (3)	CAT TGC TGC CAA AGA TGG GC	60		585
AFE1603-F (2)	TCG CGA CAG AAT TTG TCC GG	60		
AFE1602-F (4)	CTC TGT CCA TCC GCA TGA TC	60	287	
AFE1601-R (5)	AAT GCA TGG CCG CTG ATG GT	60		
AFE1601-F (6)	TAA CCG CCA CTA TAT CGG CC	60	422	
AFE1600-R (7)	AGA GGT CGA AGC TGG AGT TG	60		
AFE1600-F (8)	TGG AGC GAA CTA ACC GCA AG	60	599	
AFE1599-R (9)	GTT GGC GCG GTA TCT GGA TT	60		
AFE1599-F (10)	ACG GCC ATT ACC GGT CAT GT	60	459	
AFE1598-R (11)	AGA CTG ACG GTC TTA TCG CG	60		
AFE1598-F (12)	AAA CCG TGA CCT TGC AGC AG	60	195	
AFE1597-R (13)	ACG GCC AAA ACC GCC AGA AT	60		
AFE1597-F (14)	TGC TGG TCA ATG TGT CCG GT	60	777	
AFE1595-R (16)	AAT TTG CTC ACC ACG CTC GC	60		516
AFE1596-F (15)	TCT TGG GAC ATC CCG ACA TC	60		
AFE1595-F (17)	TTA CGC TGG AAC CCT GAG GT	60	490	
AFE1594-R (18)	ACC ATT ACT GCG GCC AGG AT	60		
AFE1594-F (19)	CAT CGT AAT GGC CAC CAT CG	60	578	
AFE1593-R (20)	ATC AGC ACC ACA TCC TGC AC	60		
AFE1593-F (21)	CCT GCG GAA ATC GTG CTT TG	60	324	
AFE1592-R (22)	TGC AGT CGC AGA GTT TCC TG	60		
AFE1592-F (23)	TAC GCA CTA AGC GCT TCA CC	60	358	
AFE1591-R (24)	CCG TAT CGG TCT GCA CGA AT	60		
AFE1591-F (25)	CTC ATG GAA GAG CGC TAT GC	60	685	
AFE1590-R (26)	CGT AGC TGG CAG GAG GTA TT	60		
AFE1590-F (27)	TAC CGA AGT GAT CCG TGC TG	60	830	
AFE1589-R (28)	AAC ATC CAC GGA GAA CAG	60		
AFE1589-F (29)	CAG TAT TCT CCG TGC CGC AT	60	545	
AFE1588-F (30)	GAG CCA CCC TTC AAG CCA TT	60		

TABLA B: Partidores para análisis de expresión de transportadores y reguladores

Gen	Partidor	Secuencia 5' – 3'	T° de alineamiento (°C)	Tamaño del producto (pb)
AFE0112	omr1-1	TGT ATA TCC CGG TGT TGC TC	52	299
	omr1-2	AGA GGC CGT AGT CAT AAG GC		
AFE0173	omr2-1b	CTG TAC TCC AAG CTG AAC CT	52	146
	omr2-2b	GAG CTC GGG TTG TAA TAC TC		
AFE0174	omr3-1b	CGT ATC TCT ACA TGA CCG AC	52	157
	omr3-2b	ATC AGG TTA GCC ACA CTC GT		
AFE0796	omr4-1	GGC TGG AAC TGG GAC AAT TA	52	243
	omr4-2	GGA GGG CAC ATA AGG GGT AT		
AFE0800	omr5-1b	CGT ATT GCA ACG TCA TAG CG	52	148
	omr5-2b	GTT GCC GTT GTA ATA CTG GC		
AFE0806	omr6-1	AAC AGC ACC AGG GGT ACA TA	52	190
	omr6-2	CTG GTT GGA GTT CCA TTG AC		
AFE0810	omr7-1	AAC AAT CCA CTG GCA TCC TA	52	167
	omr7-2	GGT TTT TCT CCG GAT GAC TT		
AFE1592	omr8-1	AGA TTT CGC CCA GAG TCT G	52	219
	omr8-2	CCT GGT TTG ACA TTA ATG GC		
AFE1601	omr9-1b	TTC ATT GGT AGT CTG GGT GC	52	148
	omr9-2b	GGT GAT AAC CCA TGT TCA		
AFE2277	omr10-1b	TGG ACC CTA TTA CCA ATG GC	52	147
	omr10-2b	CGA TTG GAG TTG GTA AAG GC		
AFE3103	omr11-1	CTT CAA CAG TGG GCA GTT CT	52	163
	omr11.2	GAC CGA AGG ATT GTT GAT CC		
AFE0827	AFphoB-1	CTT TAT CAG GCA CGC ATT CT	52	214
	AFphoB-2	AAG CCG GGT AAG CAC TTA AT		
AFE2747	RTfur-1	TGT GTA CTG CCT GTG GTA AG	52	169
	RTfur-2	TCG TCG TCC CTT AGT GAA CA		
AFE2920	AFmntH-1	ATA TCG GTG CCG TCA TCA TG	52	217
	AFmntH-2	GAG AGC TGA TGC ACC GTA TT		
AFE0578	AFfeoB-1	GGC TGA ATC TGG TGA TTT CC	52	190
	AFfeoB-2b	ATG ATG GCG GGT ACA TTG		

TABLA C: Partidores para análisis de genes de referencia

Gen	Partidor	Secuencia 5' – 3'	T° de alineamiento (°C)	Tamaño del producto (pb)
AFE2112	AFalaS1	CTG GAA TCT GGT CTT CAT GC	52	152
	AFalaS2	GCT TGA AGA GAT CGG TGT CA		
AFE2839	AFcoaE1	ACT ATC GCC CAT TGC TGG AT	52	169
	AFcoaE2	TTG GTA ATG ATC CAG TCG GC		
AFE1296	AFtrpS1	TCT GCT CAT CGA ATG GTT GG	52	230
	AFtrpS2	GAA TGT CTG CCG TCA TCA AC		
AFE2711	AFrpoC1	AAT GCG GTG TTG AGG TAA CC	52	238
	AFrpoC2	AGG TAC TGG TCT TCG GTA AG		
AFE1680	AFera1	CAT GGA TGA GAT CAA GAG CG	52	174
	AFera2	GTA TCC CGA GAA TCT GAT CC		
AFE2475	AFgmk1	ATG GCA CTA GTG AAC CTT GG	52	197
	AFgmk2	AAT GAC CGT CTC CGA ATC CT		
AFE2150	AFgyrA1	TAC CTC GAT TAC GCC ATG AG	52	202
	AFgyrA2	TGT CAT AGA CAG CGG TAT CG		
AFE2121	AFmap1	TTA CCA CCG ATG AAC TGG AC	52	222
	AFmap2	AGC CAT CCT TGA TAA CCG TG		
AFE0424	AFnth1	ATC GTC TGG GAC TGT TCA AC	52	153
	AFnth2	TAT TGA GGA CGA CAT TGG CG		
AFE0288	AFrplI1	GAT GCC ATG GTT ACG ATT GC	52	210
	AFrplI2	GAC CAT CAC ATC CAG TTC GA		

TABLA D: Partidores para evaluar enriquecimiento del DNA inmunoprecipitado.

Gen	Partidor	Secuencia 5' – 3'	T° de alineamiento (°C)	Tamaño del producto (pb)
AFE0268	malQ-1	CGA AGA TCT GCG TTA TCG C	52	296
	malQ-2	TCG TTC ATC TCG CTG TAG G		
AFE0775	pgm-2	TCA GGT GAT GAC AGT GGG G	52	351
	pgm-3	GAT CAT GCA CAG CAT TGC CGC		
AFE1602	AF-glob1	GAA TTC ATG GTG TAC TCC TGT TAC CG	52	550
	AF-glob2	TGG ATC CAG GAC GGC TGA TCT TTC CTG		
AFE0578	AF-feoB1	CTC GGT GGT AGA CCT TCC	52	998
	AF-feoB2	ATA CGG CGC ATC AGG CG		

ANEXO 2: Proteínas predichas para los genes de los 7 *clusters* de transporte de hierro en *A. ferrooxidans*

Gen	Proteína predicha
<i>acpA</i>	Fosfatasa ácida
<i>act</i>	Proteína con dominio ACT
<i>afuA</i>	Proteína periplásmica de unión a Fe ⁺³ , parte del transportador ABC de Fe ⁺³
<i>exbB</i>	Proteína ExbB, parte del sistema transductor de energía TonB/ExbB/ExbD
<i>exbD</i>	Proteína ExbD, parte del sistema transductor de energía TonB/ExbB/ExbD
<i>fepB</i>	Proteína periplásmica de unión a Fe ⁺³ , parte del transportador ABC de Fe ⁺³
<i>fepC</i>	Proteína de unión a ATP, parte del transportador ABC de Fe ⁺³
<i>fepD</i>	Permeasa, parte del transportador ABC de Fe ⁺³
<i>gloA</i>	Proteína de tipo hemoglobina truncada
<i>gnat</i>	Acetiltransferasa de la familia GNAT
<i>gntR</i>	Regulador transcripcional del operón de fosfonato, de la familia GntR
<i>lysR</i>	Regulador transcripcional de la familia LysR
<i>marC</i>	Bomba de eflujo de dicarboxilato, proteína relacionada a MarC
<i>mdh</i>	Malato deshidrogenasa
<i>mfs</i>	Transportador de la superfamilia principal de facilitadores
<i>modA</i>	Proteína periplásmica de unión a Mo, parte del transportador ABC de Fe+3
<i>phd</i>	Fosfohidrolasa predicha
<i>phnG-N</i>	Proteínas relacionadas con el metabolismo de fosfonato
<i>phoB</i>	Activador transcripcional del regulón de fosfato
<i>phoD</i>	Fosfatasa alcalina D
<i>plcC</i>	Fosfolipasa C no hemolítica
<i>plcN</i>	Proteína hipotética, COG0790
<i>rnaI</i>	Ribonucleasa I
<i>slp</i>	Proteína hipotética de superficie
<i>sufC</i>	Proteína de unión a ATP, parte del transportador ABC de Fe ⁺³
<i>thiP</i>	Permeasa, parte del transportador ABC de Fe ⁺³
<i>tnpISEc8</i>	Transposasa codificada por ISEc8
<i>tonB</i>	Proteína TonB, parte del sistema transductor de energía TonB/ExbB/ExbD

ANEXO 3: Expresión de los genes evaluados por PCR en tiempo real.

Definiciones:

- 3,5(1) y 3,5(2): Réplicas biológicas 1 y 2 de un cultivo en azufre a pH 3,5.
- 2,5(1) y 2,5(2): Réplicas biológicas 1 y 2 de un cultivo en azufre a pH 2,5.
- 4,5(1) y 4,5(2): Réplicas biológicas 1 y 2 de un cultivo en azufre a pH 4,5.
- Fe200(1) y Fe200(2): Réplicas biológicas 1 y 2 de un cultivo en hierro 200 mM.
- TS(1) y TS(2): Réplicas biológicas 1 y 2 de un cultivo en tiosulfato al 0,5%.
- CP(1) y CP(2): Réplicas biológicas 1 y 2 de un cultivo en calcopirita al 2,5%.
- Ct: *Cycle Threshold*. Para cada muestra, el software determina en qué ciclo el valor de la fluorescencia emitida cruza la línea arbitraria (threshold). Este valor es inversamente proporcional a la cantidad inicial de moléculas específicas en la muestra original.
- Muestra Ad01, Ad02, etc.: Son muestras adicionales, analizadas sin la realización de una curva estándar. La cantidad de producto por lo tanto, no se puede calcular directamente, el valor se obtiene gracias al análisis que realiza qBase al comparar muestras "calibradoras" presentes en un ensayo con curva estándar y muestras "calibradoras" en un ensayo sin curva.
- 3,5(1)* y 2,5(1)*: Muestras utilizadas como calibradoras.
- Valores normalizados y escalados en qBase: Cantidad para cada transcrito, obtenida definiendo como genes de referencia a *map*, *rpOC* y *era*, y como muestra control (valor 1) a la muestra 3,5(2).

3.1 Expresión de los genes candidatos a genes de referencia.

<i>rpoC</i>											
Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra Ad01	Ct	Muestra Ad02	Ct	Muestra Ad03	Ct
G-1	14,26	1,00E+01	3,5(1)	20,65	13,63	3,5(1)*	20,65	3,5(1)*	20,85	3,5(1)*	20,98
G-1	14,53	1,00E+01	3,5(1)	20,48	15,25	3,5(1)*	20,48	3,5(1)*	20,94	3,5(1)*	21,29
G-2	17,51	1,00E+00	3,5(2)	20,88	11,70	2,5(1)*	21,10	3,5(1)*	21,08	3,5(1)*	21,16
G-2	17,53	1,00E+00	3,5(2)	21,06	10,34	2,5(1)*	20,74	2,5(1)*	21,41	2,5(1)*	21,08
G-3	20,88	1,00E-01	2,5(1)	21,10	10,10	Fe200(2)	20,80	2,5(1)*	21,59	2,5(1)*	21,24
G-3	20,94	1,00E-01	2,5(1)	20,74	12,83	Fe200(2)	20,73	2,5(1)*	21,75	2,5(1)*	21,47
G-4	24,60	1,00E-02	2,5(2)	21,21	9,40	Fe200(2)	20,75	TS(1)	21,20	CP(1)	22,44
G-4	24,87	1,00E-02	2,5(2)	20,85	11,96			TS(1)	21,49	CP(1)	22,7
NTC	No Ct	No Ct	4,5(1)	20,85	11,90			TS(1)	21,38	CP(1)	22,88
			4,5(1)	21,00	10,79			TS(2)	22,06	CP(2)	21,35
			4,5(1)	20,65	13,63			TS(2)	21,87	CP(2)	21,2
			4,5(2)	20,43	15,80			TS(2)	21,98	CP(2)	21,27
			4,5(2)	20,38	16,36						
			Fe200(1)	20,93	11,33						
			Fe200(1)	20,75	12,77						
<i>map</i>											
Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra Ad01	Ct	Muestra Ad02	Ct	Muestra Ad03	Ct
G-1	14,58	1,00E+01	3,5(1)	20,66	18,51	3,5(1)*	20,66	3,5(1)*	21,71	3,5(1)*	21,71
G-1	14,84	1,00E+01	3,5(1)	20,64	18,71	3,5(1)*	20,64	3,5(1)*	21,80	3,5(1)*	21,8
G-2	17,99	1,00E+00	3,5(2)	21,01	14,66	2,5(1)*	20,67	2,5(1)*	22,02	2,5(1)*	21,83
G-2	17,94	1,00E+00	3,5(2)	21,00	14,76	2,5(1)*	20,61	2,5(1)*	21,84	2,5(1)*	21,95
G-3	21,78	1,00E-01	2,5(1)	20,67	18,30	Fe200(2)	20,71	2,5(1)*	21,89	2,5(1)*	21,9
G-3	21,62	1,00E-01	2,5(1)	20,61	19,09	Fe200(2)	21,08	TS(1)	21,55	CP(1)	22,23
G-5	28,46	1,00E-03	2,5(2)	20,86	16,18			TS(1)	21,71	CP(1)	22,14
NTC	No Ct	No Ct	2,5(2)	20,70	17,92			TS(1)	21,50	CP(1)	22,28
			2,5(2)	20,67	18,32			TS(2)	22,23	CP(2)	21,48
			4,5(1)	20,74	17,50			TS(2)	21,72	CP(2)	21,65
			4,5(1)	20,70	17,97			TS(2)	22,15	CP(2)	21,32
			4,5(2)	20,31	23,27						
			4,5(2)	20,18	25,41						
			Fe200(1)	20,14	26,15						
			Fe200(1)	20,16	25,73						

era

Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra Ad01	Ct	Muestra Ad02	Ct	Muestra Ad03	Ct
G-1	14,68	1,00E+01	3,5(1)	22,59	5,03	3,5(1)*	21,95	3,5(1)*	21,95	3,5(1)*	23,13
G-1	14,72	1,00E+01	3,5(1)	22,64	4,87	3,5(1)*	21,94	3,5(1)*	21,94	3,5(1)*	23,10
G-2	17,98	1,00E+00	3,5(2)	22,88	4,16	3,5(1)*	22,09	3,5(1)*	22,09	3,5(1)*	23,29
G-2	17,83	1,00E+00	3,5(2)	22,83	4,31	2,5(1)*	22,26	2,5(1)*	22,26	2,5(1)*	23,40
G-3	21,46	1,00E-01	2,5(1)	22,93	4,03	2,5(1)*	22,37	2,5(1)*	22,37	2,5(1)*	23,44
G-3	21,67	1,00E-01	2,5(1)	22,77	4,47	Fe200(2)	21,38	TS(1)	23,20	CP(1)	24,10
G-4	24,92	1,00E-02	2,5(2)	22,58	5,10	Fe200(2)	21,49	TS(1)	23,29	CP(1)	24,16
G-4	25,15	1,00E-02	2,5(2)	22,56	5,13	Fe200(2)	21,44	TS(1)	23,52		
G-5	28,52	1,00E-03	4,5(1)	22,52	5,30			TS(2)	22,38		
G-5	28,60	1,00E-03	4,5(1)	22,62	4,96			TS(2)	22,35		
NTC	No Ct	No Ct	4,5(2)	22,29	6,14			TS(2)	22,3		
			4,5(2)	22,30	6,11			CP(2)	22,80		
			4,5(2)	22,29	6,15			CP(2)	22,75		
			Fe200(1)	22,37	5,83						
			Fe200(1)	22,27	6,22						

gmk

Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra Ad01	Ct	Muestra Ad02	Ct	Muestra Ad03	Ct
G-1	16,88	1,00E+01	3,5(1)	24,65	6,68	3,5(1)*	24,65	3,5(1)*	25,58	3,5(1)*	25,45
G-1	17,07	1,00E+01	3,5(1)	25,12	4,92	3,5(1)*	25,12	3,5(1)*	25,60	3,5(1)*	25,55
G-2	20,52	1,00E+00	3,5(2)	24,73	6,32	2,5(1)*	24,88	2,5(1)*	25,89	3,5(1)*	25,43
G-2	20,63	1,00E+00	3,5(2)	24,85	5,86	2,5(1)*	24,91	2,5(1)*	26,22	2,5(1)*	25,71
G-3	24,04	1,00E-01	2,5(1)	24,88	5,73	Fe200(2)	23,63	TS(1)	24,38	2,5(1)*	25,48
G-3	23,67	1,00E-01	2,5(1)	24,91	5,62	Fe200(2)	24,09	TS(1)	24,34	2,5(1)*	25,80
G-4	27,73	1,00E-02	2,5(1)	24,75	6,26	Fe200(2)	23,86	TS(1)	24,31	CP(1)	25,69
NTC	No Ct	No Ct	2,5(2)	24,86	5,80			TS(2)	24,77	CP(1)	25,58
			2,5(2)	24,63	6,76			TS(2)	24,82	CP(1)	25,54
			4,5(1)	24,99	5,32			TS(2)	24,80	CP(2)	23,85
			4,5(1)	24,76	6,18					CP(2)	23,81
			4,5(1)	24,34	8,18					CP(2)	23,69
			4,5(2)	24,64	6,72						
			4,5(2)	24,53	7,19						
			Fe200(1)	23,62	13,09						
			Fe200(1)	23,54	13,77						

<i>nth</i>											
Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra Ad01	Ct	Muestra Ad02	Ct	Muestra Ad03	Ct
G-1	17,00	1,00E+01	3,5(1)	25,42	3,92	3,5(1)*	25,42	3,5(1)*	24,26	3,5(1)*	23,63
G-1	16,96	1,00E+01	3,5(1)	25,50	3,72	3,5(1)*	25,50	3,5(1)*	24,39	3,5(1)*	23,8
G-2	21,17	1,00E+00	3,5(2)	25,92	2,81	2,5(1)*	25,76	3,5(1)*	24,44	2,5(1)*	24,12
G-2	20,42	1,00E+00	3,5(2)	25,71	3,24	2,5(1)*	25,70	2,5(1)*	24,06	2,5(1)*	24,24
G-3	23,79	1,00E-01	2,5(1)	25,76	3,12	Fe200(2)	25,66	2,5(1)*	24,66	CP(1)	26,61
G-3	23,69	1,00E-01	2,5(1)	25,70	3,24	Fe200(2)	25,18	2,5(1)*	24,44	CP(1)	26,45
G-4	27,58	1,00E-02	2,5(2)	25,61	3,45	Fe200(2)	25,25	TS(1)	24,99		
G-4	27,54	1,00E-02	2,5(2)	25,38	4,03			TS(1)	25,23		
G-5	30,88	1,00E-03	4,5(1)	24,79	5,94			TS(1)	25,15		
G-5	31,06	1,00E-03	4,5(1)	24,69	6,37			TS(2)	24,45		
NTC	No Ct	No Ct	4,5(2)	24,83	5,79			TS(2)	24,21		
			4,5(2)	24,68	6,39			CP(2)	24,93		
			Fe200(1)	25,13	4,76			CP(2)	24,65		
			Fe200(1)	25,13	4,74			CP(2)	24,75		
<i>trpS</i>											
Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra Ad01	Ct	Muestra Ad02	Ct	Muestra Ad03	Ct
G-1	15,76	1,00E+01	3,5(1)	23,90	5,37	3,5(1)*	23,90	3,5(1)*	24,08	3,5(1)*	24,58
G-1	15,82	1,00E+01	3,5(1)	23,83	5,63	3,5(1)*	23,83	3,5(1)*	24,16	3,5(1)*	24,77
G-2	19,20	1,00E+00	3,5(2)	24,33	4,08	2,5(1)*	24,39	3,5(1)*	23,95	2,5(1)*	24,69
G-3	22,62	1,00E-01	3,5(2)	24,53	3,61	2,5(1)*	24,56	2,5(1)*	24,9	2,5(1)*	24,78
G-3	22,84	1,00E-01	2,5(1)	24,39	3,93	Fe200(2)	23,98	2,5(1)*	24,78	2,5(1)*	24,93
G-4	26,74	1,00E-02	2,5(1)	24,56	3,53	Fe200(2)	24,15	2,5(1)*	24,62	CP(1)	26,65
G-4	26,70	1,00E-02	2,5(2)	24,49	3,70	Fe200(2)	24,11	TS(1)	24,53	CP(1)	26,86
G-5	29,92	1,00E-03	2,5(2)	24,41	3,89			TS(1)	24,76	CP(2)	24,75
G-5	30,34	1,00E-03	2,5(2)	24,55	3,55			TS(1)	24,72	CP(2)	24,81
NTC	No Ct	No Ct	4,5(1)	22,42	13,78			TS(2)	24,84	CP(2)	24,62
			4,5(1)	22,19	16,00			TS(2)	24,85		
			4,5(2)	23,49	6,96						
			4,5(2)	23,43	7,27						
			Fe200(1)	23,37	7,55						
			Fe200(1)	23,37	7,54						

<i>rplI</i>											
Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra Ad01	Ct	Muestra Ad02	Ct	Muestra Ad03	Ct
G-1	15,13	1,00E+01	3,5(1)	21,82	12,93	3,5(1)*	21,82	3,5(1)*	21,55	3,5(1)*	21,95
G-1	15,19	1,00E+01	3,5(1)	21,62	14,74	3,5(1)*	21,62	3,5(1)*	21,48	3,5(1)*	21,91
G-3	22,21	1,00E-01	3,5(2)	22,02	11,40	2,5(1)*	22,40	3,5(1)*	21,34	2,5(1)*	21,97
G-3	22,16	1,00E-01	3,5(2)	22,03	11,29	2,5(1)*	22,23	2,5(1)*	22,14	2,5(1)*	22,15
G-4	25,78	1,00E-02	3,5(2)	21,88	12,45	Fe200(2)	21,48	2,5(1)*	22,31	2,5(1)*	22,12
G-4	25,77	1,00E-02	2,5(1)	22,40	8,87	Fe200(2)	21,41	2,5(1)*	22,29	CP(1)	24,18
G-5	29,26	1,00E-03	2,5(1)	22,23	9,92			TS(1)	20,45	CP(1)	24,32
G-5	29,25	1,00E-03	2,5(2)	22,02	11,34			TS(1)	20,65	CP(1)	24,45
NTC	No Ct	No Ct	2,5(2)	22,01	11,44			TS(1)	20,61	CP(2)	20,49
			4,5(1)	21,71	13,89			TS(2)	20,94	CP(2)	20,53
			4,5(1)	21,92	12,12			TS(2)	21,2	CP(2)	20,54
			4,5(2)	21,56	15,40			TS(2)	21,08		
			4,5(2)	21,68	14,16						
			4,5(2)	21,37	17,42						
			Fe200(1)	20,52	30,28						
			Fe200(1)	20,52	30,37						
<i>gyrA</i>											
Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra Ad01	Ct	Muestra Ad02	Ct	Muestra Ad03	Ct
G-1	18,55	1,00E+01	3,5(1)	26,25	5,63	3,5(1)*	26,25	3,5(1)*	24,82	3,5(1)*	25,76
G-1	18,53	1,00E+01	3,5(1)	26,25	5,64	3,5(1)*	26,25	3,5(1)*	24,8	3,5(1)*	25,69
G-2	21,95	1,00E+00	3,5(2)	26,50	4,79	2,5(1)*	26,83	3,5(1)*	24,59	3,5(1)*	25,94
G-2	22,04	1,00E+00	3,5(2)	26,69	4,21	2,5(1)*	27,28	2,5(1)*	24,49	2,5(1)*	25,99
G-3	25,23	1,00E-01	2,5(1)	26,83	3,82	Fe200(2)	26,36	2,5(1)*	24,79	2,5(1)*	26,48
G-3	25,66	1,00E-01	2,5(1)	27,28	2,83	Fe200(2)	26,16	2,5(1)*	24,9	2,5(1)*	26,38
G-4	28,86	1,00E-02	2,5(1)	26,38	5,18			TS(1)	25,2	CP(1)	27,38
G-4	28,24	1,00E-02	2,5(2)	26,42	5,06			TS(1)	25,07	CP(1)	27,51
G-5	32,28	1,00E-03	2,5(2)	26,38	5,19			TS(1)	24,98		
G-5	32,61	1,00E-03	4,5(1)	25,92	7,06			TS(2)	24,2		
NTC	No Ct	No Ct	4,5(1)	25,61	8,66			TS(2)	24,59		
			4,5(2)	25,67	8,33			CP(2)	24,76		
			4,5(2)	25,68	8,29			CP(2)	24,55		
			Fe200(1)	25,90	7,14						
			Fe200(1)	25,78	7,73						

<i>alaS</i>											
Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra Ad01	Ct	Muestra Ad02	Ct	Muestra Ad03	Ct
G-1	14,88	1,00E+01	3,5(1)	22,18	7,51	3,5(1)*	22,18	3,5(1)*	20,85	3,5(1)*	20,98
G-1	14,83	1,00E+01	3,5(1)	22,23	7,27	3,5(1)*	22,23	3,5(1)*	20,94	3,5(1)*	21,29
G-2	18,21	1,00E+00	3,5(2)	22,85	4,83	2,5(1)*	22,85	3,5(1)*	21,08	3,5(1)*	21,16
G-2	18,13	1,00E+00	3,5(2)	22,70	5,32	2,5(1)*	22,70	2,5(1)*	21,41	2,5(1)*	21,08
G-3	21,68	1,00E-01	2,5(1)	22,46	6,24	Fe200(2)	22,82	2,5(1)*	21,59	2,5(1)*	21,24
G-3	21,69	1,00E-01	2,5(1)	22,59	5,72	Fe200(2)	23,03	2,5(1)*	21,75	2,5(1)*	21,47
G-4	25,21	1,00E-02	2,5(2)	22,27	7,07			TS(1)	21,2	CP(1)	22,44
G-4	25,35	1,00E-02	2,5(2)	22,42	6,42			TS(1)	21,49	CP(1)	22,7
G-5	28,65	1,00E-03	4,5(1)	21,73	10,11			TS(1)	21,38	CP(1)	22,88
G-5	28,80	1,00E-03	4,5(1)	22,07	8,06			TS(2)	22,06	CP(2)	21,35
NTC	No Ct	No Ct	4,5(2)	21,86	9,25			TS(2)	21,87	CP(2)	21,2
			4,5(2)	21,72	10,19			TS(2)	21,98	CP(2)	21,27
			Fe200(1)	22,37	6,64						
			Fe200(1)	22,35	6,71						

3.2 Expresión de los genes de los reguladores Fur y PhoB.

<i>fur</i>											
Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra Ad01	Ct	Muestra Ad02	Ct		
G-1	16,43	1,00E+01	3,5(1)	22,98	14,11	3,5(1)*	22,21	3,5(1)*	22,21		
G-1	16,31	1,00E+01	3,5(1)	22,91	14,71	3,5(1)*	22,04	3,5(1)*	22,04		
G-2	20,13	1,00E+00	3,5(1)	23,01	13,80	3,5(1)*	22,01	3,5(1)*	22,01		
G-2	19,80	1,00E+00	3,5(2)	23,20	12,28	2,5(1)*	22,03	2,5(1)*	22,03		
G-3	23,32	1,00E-01	3,5(2)	23,37	10,95	2,5(1)*	22,16	2,5(1)*	22,16		
G-3	23,29	1,00E-01	3,5(2)	23,59	9,55	2,5(1)*	22,23	2,5(1)*	22,23		
G-4	27,34	1,00E-02	2,5(1)	22,17	23,68	Fe200(2)	20,77	TS(1)	21,08		
G-4	27,26	1,00E-02	2,5(1)	21,91	28,08	Fe200(2)	20,82	TS(1)	21,15		
G-5	30,68	1,00E-03	2,5(1)	22,64	17,57	Fe200(2)	21,09	TS(1)	21,42		
G-5	30,59	1,00E-03	2,5(2)	22,49	19,28			TS(2)	21,54		
NTC	No Ct	No Ct	2,5(2)	22,32	21,55			TS(2)	21,48		
			4,5(1)	22,25	22,57			TS(2)	21,52		
			4,5(1)	22,13	24,30			CP(1)	22,67		
			4,5(2)	22,56	18,52			CP(1)	22,97		
			4,5(2)	22,31	21,72			CP(1)	22,92		
			4,5(2)	22,82	15,64			CP(2)	21,53		
			Fe200(1)	21,54	35,51			CP(2)	21,64		
			Fe200(1)	21,26	42,55			CP(2)	21,41		
			Fe200(1)	21,49	36,71						
<i>phoB</i>											
Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra Ad01	Ct	Muestra Ad02	Ct	Muestra Ad03	Ct
G-1	21,02	1,00E+01	3,5(1)	32,48	1,11	3,5(1)*	27,81	3,5(1)*	27,81	3,5(1)*	26,64
G-1	21,09	1,00E+01	3,5(1)	32,56	1,06	3,5(1)*	27,84	3,5(1)*	27,84	3,5(1)*	26,68
G-2	24,65	1,00E+00	3,5(2)	32,50	1,10	3,5(1)*	27,91	3,5(1)*	27,91	2,5(1)*	26,21
G-2	25,05	1,00E+00	3,5(2)	32,76	0,94	2,5(1)*	28,26	2,5(1)*	28,26	2,5(1)*	26,33
G-3	28,64	1,00E-01	2,5(1)	32,61	1,03	2,5(1)*	28,11	2,5(1)*	28,11	CP(1)	26,33
G-3	28,57	1,00E-01	2,5(1)	32,55	1,07	2,5(1)*	28,10	2,5(1)*	28,10	CP(1)	26,48
G-4	32,92	1,00E-02	2,5(2)	32,56	1,06	Fe200(2)	23,90	TS(1)	27,79		
NTC	No Ct	No Ct	2,5(2)	32,48	1,11	Fe200(2)	24,26	TS(1)	27,80		
			4,5(1)	32,03	1,45	Fe200(2)	24,11	TS(1)	27,87		
			4,5(1)	32,05	1,43			TS(2)	27,46		
			4,5(2)	31,62	1,85			TS(2)	27,31		
			4,5(2)	31,37	2,14			TS(2)	27,32		
			Fe200(1)	29,42	6,81			CP(2)	27,97		
			Fe200(1)	29,89	5,15			CP(2)	27,65		
Fe200(1)	29,22	7,65									

3.3 Expresión de los genes de los transportadores de Fe⁺².

<i>mntH</i>											
Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra Ad01	Ct	Muestra Ad02	Ct	Muestra Ad03	Ct
G-1	15,91	1,00E+01	3,5(1)	20,41	30,20	3,5(1)*	18,67	3,5(1)*	18,67	3,5(1)*	17,09
G-1	14,78	1,00E+01	3,5(1)	20,36	31,23	3,5(1)*	18,61	3,5(1)*	18,61	3,5(1)*	16,99
G-2	18,43	1,00E+00	3,5(2)	20,73	24,29	3,5(1)*	18,6	3,5(1)*	18,60	3,5(1)*	17,12
G-3	21,87	1,00E-01	3,5(2)	20,92	21,32	2,5(1)*	18,84	2,5(1)*	18,84	2,5(1)*	16,75
G-3	22,00	1,00E-01	2,5(1)	21,03	19,74	2,5(1)*	18,66	2,5(1)*	18,66	2,5(1)*	16,86
G-4	25,47	1,00E-02	2,5(1)	20,60	26,41	2,5(1)*	18,82	2,5(1)*	18,82	2,5(1)*	16,90
G-4	25,66	1,00E-02	2,5(2)	20,59	26,62	Fe200(2)	21,82	TS(1)	18,85	CP(1)	19,37
G-5	28,82	1,00E-03	2,5(2)	20,34	31,58	Fe200(2)	21,95	TS(1)	18,59	CP(1)	19,28
G-5	28,79	1,00E-03	4,5(1)	20,60	26,50			TS(1)	18,55	CP(1)	19,37
NTC	No Ct	No Ct	4,5(1)	21,17	18,03			TS(2)	18,76		
			4,5(2)	20,67	25,23			TS(2)	18,91		
			4,5(2)	20,56	27,28			TS(2)	18,66		
			Fe200(1)	24,76	1,58			CP(2)	18,42		
			Fe200(1)	24,87	1,47			CP(2)	18,36		
			Fe200(1)	24,69	1,66			CP(2)	18,52		
<i>feoB</i>											
Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra Ad01	Ct	Muestra Ad02	Ct		
G-1	21,78	1,00E+01	3,5(1)	28,18	23,24	3,5(1)*	23,65	3,5(1)*	23,65		
G-1	21,46	1,00E+01	3,5(1)	28,31	21,46	3,5(1)*	23,60	3,5(1)*	23,60		
G-3	30,15	1,00E-01	3,5(1)	28,51	19,11	3,5(1)*	23,50	3,5(1)*	23,50		
G-4	33,61	1,00E-02	3,5(2)	28,96	14,64	2,5(1)*	23,80	2,5(1)*	23,80		
G-5	37,15	1,00E-03	3,5(2)	29,02	14,21	2,5(1)*	24,03	2,5(1)*	24,03		
NTC	No Ct	No Ct	2,5(1)	28,92	15,01	2,5(1)*	23,80	2,5(1)*	23,80		
			2,5(1)	29,23	12,52	Fe200(2)	26,89	TS(1)	25,13		
			2,5(2)	28,63	17,80	Fe200(2)	26,90	TS(1)	25,32		
			2,5(2)	28,82	15,96			TS(1)	25,23		
			2,5(2)	28,80	16,12			TS(2)	25,52		
			4,5(1)	28,58	18,31			TS(2)	25,62		
			4,5(1)	28,41	20,31			CP(1)	25,33		
			4,5(2)	28,31	21,54			CP(1)	25,48		
			4,5(2)	28,41	20,25			CP(1)	25,4		
			Fe200(1)	30,45	6,14			CP(2)	25,31		
Fe200(1)	30,88	4,76			CP(2)	25,43					
Fe200(1)	31,27	3,79			CP(2)	25,49					

3.4 Expresión de los genes de los transportadores de Fe⁺³.

<i>omr1</i>											
Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra Ad01	Ct	Muestra Ad02	Ct	Muestra Ad03	Ct
G-1	19,57	1,00E+01	3,5(1)	31,51	0,49	3,5(1)*	29,09	3,5(1)*	29,09	3,5(1)*	28,44
G-2	22,82	1,00E+00	3,5(1)	31,97	0,36	3,5(1)*	28,97	3,5(1)*	28,97	3,5(1)*	28,48
G-2	22,9	1,00E+00	3,5(2)	31,30	0,55	3,5(1)*	29,33	3,5(1)*	29,33	2,5(1)*	27,68
G-3	26,63	1,00E-01	3,5(2)	31,94	0,37	2,5(1)*	28,59	2,5(1)*	28,59	2,5(1)*	27,44
G-3	26,66	1,00E-01	2,5(1)	31,89	0,38	2,5(1)*	28,71	2,5(1)*	28,71	2,5(1)*	27,18
G-4	30,58	1,00E-02	2,5(1)	31,85	0,39	Fe200(2)	28,85	TS(1)	26,68	CP(1)*	30,52
G-5	34,16	1,00E-03	2,5(2)	32,91	0,20	Fe200(2)	28,82	TS(1)	27,21	CP(1)*	30,46
G-5	33,85	1,00E-03	2,5(2)	32,36	0,29	Fe200(2)	28,78	TS(1)	27,51		
NTC	No Ct	No Ct	4,5(1)	30,97	0,68			TS(2)	28,04		
			4,5(1)	30,75	0,79			TS(2)	27,89		
			4,5(2)	31,27	0,56			CP(2)	27,42		
			4,5(2)	31,25	0,57			CP(2)	27,79		
			Fe200(1)	33,06	0,18						
<i>omr2</i>											
Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra Ad01	Ct	Muestra Ad02	Ct	Muestra Ad03	Ct
G-1	14,99	1,00E+01	3,5(1)	23,41	3,51	3,5(1)*	23,84	3,5(1)*	23,84	3,5(1)*	23,84
G-1	14,73	1,00E+01	3,5(1)	23,65	3,00	3,5(1)*	23,88	3,5(1)*	23,88	3,5(1)*	23,88
G-2	18,13	1,00E+00	3,5(1)	23,56	3,19	3,5(1)*	23,93	3,5(1)*	23,93	3,5(1)*	23,93
G-2	18,16	1,00E+00	3,5(2)	24,08	2,26	2,5(1)*	24,20	2,5(1)*	24,2	2,5(1)*	24,2
G-3	21,63	1,00E-01	3,5(2)	23,83	2,66	2,5(1)*	24,29	2,5(1)*	24,29	2,5(1)*	24,29
G-3	21,87	1,00E-01	3,5(2)	24,17	2,14	2,5(1)*	24,14	2,5(1)*	24,14	2,5(1)*	24,14
G-4	25,24	1,00E-02	2,5(1)	23,12	4,24	Fe200(2)	22,61	TS(1)	23,28	CP(1)	24,86
G-4	25,45	1,00E-02	2,5(1)	23,27	3,83	Fe200(2)	20,90	TS(1)	23,35	CP(1)	24,98
G-5	29,00	1,00E-03	2,5(1)	22,96	4,71	Fe200(2)	21,62	TS(1)	23,41		
G-5	28,83	1,00E-03	2,5(2)	23,00	4,59			TS(2)	24,14		
NTC	No Ct	No Ct	2,5(2)	23,08	4,34			TS(2)	24		
			2,5(2)	23,12	4,24			CP(2)	24,89		
			4,5(1)	22,80	5,23			CP(2)	25,83		
			4,5(1)	23,07	4,39						
			4,5(1)	23,08	4,36						
			4,5(2)	23,63	3,04						
			4,5(2)	23,45	3,41						
			Fe200(1)	20,19	28,66						
			Fe200(1)	20,50	23,36						
			Fe200(1)	20,37	25,43						

<i>omr3</i>										
Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra Ad01	Ct	Muestra Ad02	Ct	
G-1	14,85	1,00E+01	3,5(1)	24,58	1,86	3,5(1)*	25,78	3,5(1)*	25,78	
G-1	14,87	1,00E+01	3,5(1)	24,73	1,69	3,5(1)*	25,77	3,5(1)*	25,77	
G-2	18,32	1,00E+00	3,5(1)	24,49	1,97	3,5(1)*	25,61	3,5(1)*	25,61	
G-2	18,31	1,00E+00	3,5(2)	26,53	0,53	2,5(1)*	25,37	2,5(1)*	25,37	
G-3	22,05	1,00E-01	3,5(2)	26,61	0,50	2,5(1)*	25,37	2,5(1)*	25,37	
NTC	No Ct	No Ct	3,5(2)	26,51	0,54	Fe200(2)	19,76	TS(1)	25,06	
			2,5(1)	25,11	1,32	Fe200(2)	19,79	TS(1)	25,04	
			2,5(1)	24,87	1,54	Fe200(2)	19,69	TS(1)	25,12	
			2,5(1)	25,32	1,15			TS(2)	24,52	
			2,5(2)	25,63	0,95			TS(2)	24,52	
			2,5(2)	25,72	0,89			TS(2)	24,35	
			2,5(2)	25,59	0,97			CP(1)	27,46	
			4,5(1)	25,06	1,37			CP(1)	27,69	
			4,5(1)	25,42	1,09			-->	CP(2)	24,79
			4,5(1)	25,33	1,15	Fe200(1)	20,80	21,19	CP(2)	24,99
			4,5(2)	25,51	1,02	Fe200(1)	20,86	20,46	CP(2)	24,86
4,5(2)	25,41	1,09	Fe200(1)	20,73	22,21					
<i>omr4</i>										
Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra Ad01	Ct	Muestra Ad02	Ct	
G-1	13,98	1,00E+01	3,5(1)	24,21	0,93	3,5(1)*	22,63	3,5(1)*	22,63	
G-1	14,35	1,00E+01	3,5(1)	24,04	1,04	3,5(1)*	22,61	3,5(1)*	22,61	
G-2	16,94	1,00E+00	3,5(1)	24,45	0,79	3,5(1)*	22,57	3,5(1)*	22,57	
G-3	20,56	1,00E-01	3,5(2)	25,16	0,48	2,5(1)*	22,96	2,5(1)*	22,96	
G-3	20,66	1,00E-01	3,5(2)	24,89	0,58	2,5(1)*	22,88	2,5(1)*	22,88	
G-4	24,11	1,00E-02	3,5(2)	24,78	0,63	2,5(1)*	22,88	2,5(1)*	22,88	
G-4	24,26	1,00E-02	2,5(1)	24,35	0,84	Fe200(2)	23,63	TS(1)	24,56	
G-5	27,54	1,00E-03	2,5(1)	24,35	0,84	Fe200(2)	23,75	TS(1)	24,54	
G-5	27,49	1,00E-03	2,5(1)	24,49	0,76	Fe200(2)	23,71	TS(1)	24,41	
NTC	No Ct	No Ct	2,5(2)	23,80	1,23			TS(2)	24,34	
			2,5(2)	23,63	1,38			TS(2)	24,24	
			2,5(2)	24,01	1,06			TS(2)	24,17	
			4,5(1)	23,20	1,85			CP(1)	24,89	
			4,5(1)	23,26	1,77			-->	CP(1)	24,89
			4,5(2)	23,71	1,30	Fe200(1)	25,93	0,29	CP(1)	24,9
			4,5(2)	23,69	1,32	Fe200(1)	25,41	0,41	CP(2)	24,84
4,5(2)	23,63	1,38	Fe200(1)	25,72	0,33	CP(2)	24,26			
								CP(2)	24,46	

omr5

Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra Ad01	Ct	Muestra Ad02	Ct
G-1	19,24	1,00E+01	3,5(1)	27,57	5,91	3,5(1)*	23,65	3,5(1)*	23,65
G-1	19,05	1,00E+01	3,5(1)	27,73	5,38	3,5(1)*	23,45	3,5(1)*	23,45
G-2	22,86	1,00E+00	3,5(1)	27,52	6,12	3,5(1)*	23,37	3,5(1)*	23,37
G-2	23,05	1,00E+00	3,5(2)	27,79	5,19	2,5(1)*	24,13	2,5(1)*	24,13
G-3	26,88	1,00E-01	3,5(2)	27,80	5,15	2,5(1)*	24,00	2,5(1)*	24,00
G-4	30,53	1,00E-02	3,5(2)	28,06	4,39	2,5(1)*	23,90	2,5(1)*	23,90
G-4	30,64	1,00E-02	2,5(1)	28,03	4,48	Fe200(2)	23,57	TS(1)	24,59
G-5	33,97	1,00E-03	2,5(1)	27,68	5,53	Fe200(2)	23,65	TS(1)	24,42
NTC	No Ct	No Ct	2,5(2)	27,82	5,08			TS(1)	24,59
			2,5(2)	27,77	5,25			TS(2)	24,18
			2,5(2)	27,45	6,40			TS(2)	24,29
			4,5(1)	27,31	6,94			TS(2)	24,24
			4,5(1)	27,65	5,64			CP(1)	25,32
			4,5(2)	27,73	5,37			CP(1)	25,26
			4,5(2)	27,92	4,79			CP(1)	25,29
			Fe200(1)	27,24	7,26			CP(2)	23,95
			Fe200(1)	27,26	7,16			CP(2)	23,99
									CP(2)

omr6

Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra Ad01	Ct	Muestra Ad02	Ct	Muestra Ad03	Ct
G-1	20,21	1,00E+01	3,5(1)	34,95	0,05	3,5(1)*	33,77	3,5(1)*	33,77	3,5(1)*	28,84
G-3	26,61	1,00E-01	3,5(1)	34,91	0,05	3,5(1)*	33,85	3,5(1)*	33,85	3,5(1)*	29,34
G-3	27,54	1,00E-01	3,5(2)	35,07	0,05	3,5(1)*	33,99	3,5(1)*	33,99	3,5(1)*	29,04
G-4	30,41	1,00E-02	3,5(2)	35,17	0,05	2,5(1)*	32,95	2,5(1)*	32,95	2,5(1)*	27,93
G-4	30,91	1,00E-02	2,5(1)	34,27	0,08	2,5(1)*	32,83	2,5(1)*	32,83	2,5(1)*	27,76
G-5	33,78	1,00E-03	2,5(2)	35,61	0,03	2,5(1)*	32,99	2,5(1)*	32,99	2,5(1)*	27,88
G-5	34,07	1,00E-03	2,5(2)	34,42	0,07	Fe200(2)	30,72	TS(1)	33,42	CP(1)	31,7
NTC	No Ct	No Ct	4,5(1)	33,79	0,11	Fe200(2)	30,75	TS(1)	33,39	CP(1)	31,76
			4,5(1)	33,40	0,15			TS(2)	33,68		
			4,5(2)	32,98	0,20			TS(2)	33,66		
			4,5(2)	33,65	0,13			CP(2)	33,5		
			Fe200(1)	33,57	0,13			CP(2)	33,6		
			Fe200(1)	33,41	0,15						

<i>omr7</i>											
Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra Ad01	Ct	Muestra Ad02	Ct	Muestra Ad03	Ct
G-1	16,93	1,00E+01	3,5(1)	29,98	0,12	3,5(1)*	29,26	3,5(1)*	29,26	3,5(1)*	29,17
G-1	16,37	1,00E+01	3,5(1)	29,64	0,15	3,5(1)*	29,03	3,5(1)*	29,03	3,5(1)*	29,33
G-2	19,74	1,00E+00	3,5(2)	29,95	0,12	2,5(1)*	27,98	2,5(1)*	27,98	3,5(1)*	29,13
G-2	19,96	1,00E+00	3,5(2)	29,89	0,13	2,5(1)*	27,81	2,5(1)*	27,81	2,5(1)*	28,01
G-3	23,43	1,00E-01	2,5(1)	29,20	0,21	2,5(1)*	27,74	2,5(1)*	27,74	2,5(1)*	28,04
G-3	23,27	1,00E-01	2,5(1)	29,33	0,19	Fe200(2)	25,92	TS(1)	29,93	CP(1)	31,74
G-4	26,81	1,00E-02	2,5(2)	29,31	0,19	Fe200(2)	25,87	TS(1)	29,88	CP(1)	31,74
G-4	26,81	1,00E-02	2,5(2)	29,31	0,19	Fe200(2)	26,00	TS(2)	29,79	CP(1)	31,59
G-5	30,32	1,00E-03	4,5(1)	28,59	0,31			TS(2)	29,66		
G-5	30,42	1,00E-03	4,5(1)	28,77	0,28			CP(2)	30,02		
NTC	No Ct	No Ct	4,5(2)	25,29	0,28			CP(2)	30,31		
			4,5(2)	28,55	0,32						
			Fe200(1)	27,44	0,67						
			Fe200(1)	27,40	0,69						

<i>omr8</i>											
Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra Ad01	Ct	Muestra Ad02	Ct	Muestra Ad03	Ct
G-3	27,13	1,00E-01	3,5(1)	32,57	0,27	3,5(1)*	25,09	3,5(1)*	27,5	3,5(1)*	24,06
G-3	26,81	1,00E-01	3,5(1)	32,70	0,25	3,5(1)*	24,81	3,5(1)*	27,75	3,5(1)*	24,15
G-4	30,73	1,00E-02	3,5(2)	31,63	0,50	3,5(1)*	25,30	3,5(1)*	27,46	2,5(1)*	23,41
G-4	30,31	1,00E-02	3,5(2)	31,56	0,52	2,5(1)*	24,09	2,5(1)*	26,42	2,5(1)*	23,42
G-5	34,39	1,00E-03	2,5(1)	30,83	0,83	2,5(1)*	24,27	2,5(1)*	26,66	CP(1)	27,56
G-5	33,87	1,00E-03	2,5(1)	30,64	0,94	2,5(1)*	24,47	TS(1)	28,19	CP(1)	27,7
NTC	No Ct	No Ct	2,5(2)	29,98	1,44	Fe200(2)	25,37	TS(1)	27,93	CP(1)	27,85
			2,5(2)	31,43	0,56	Fe200(2)	25,38	TS(2)	29,25		
			2,5(2)	30,60	0,96	Fe200(2)	25,41	TS(2)	29,05		
			2,5(2)	31,39	0,58			TS(2)	29,45		
			4,5(1)	30,06	1,37			CP(2)	28,5		
			4,5(1)	30,09	1,33			CP(2)	28,8		
			4,5(2)	29,90	1,52			CP(2)	28,8		
			4,5(2)	30,11	1,32						
			4,5(2)	30,05	1,37						
			Fe200(1)	32,49	0,29						
			Fe200(1)	32,63	0,26						

omr9							
Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra Ad01	Ct
G-1	16,65	1,00E+01	3,5(1)	25,70	2,91	3,5(1)*	26,39
G-1	16,99	1,00E+01	3,5(1)	25,44	3,45	3,5(1)*	26,94
G-2	20,40	1,00E+00	3,5(1)	25,53	3,25	3,5(1)*	26,97
G-2	20,47	1,00E+00	3,5(2)	27,29	1,02	2,5(1)*	26,75
G-3	24,00	1,00E-01	3,5(2)	27,44	0,92	2,5(1)*	26,79
G-3	23,57	1,00E-01	3,5(2)	27,27	1,03	2,5(1)*	26,77
NTC	No Ct	No Ct	2,5(1)	26,18	2,12	Fe200(2)	28,85
			2,5(1)	25,96	2,44	Fe200(2)	28,99
			2,5(1)	26,54	1,67	TS(1)	29,25
			2,5(2)	26,52	1,69	TS(1)	28,75
			2,5(2)	26,54	1,67	TS(2)	30,78
			2,5(2)	26,36	1,88	TS(2)	30,16
			4,5(1)	25,99	2,40	CP(1)	30,98
			4,5(1)	25,83	2,66	CP(1)	30,75
		<---	4,5(1)	25,96	2,45	CP(2)	32,2
Fe200(1)	27,78	0,73	4,5(2)	25,84	2,65	CP(2)	32,8
Fe200(1)	28,08	0,60	4,5(2)	25,77	2,78		
Fe200(1)	27,64	0,80	4,5(2)	25,99	2,40		

omr10							
Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra Ad01	Ct
G-1	15,77	1,00E+01	3,5(1)	27,99	0,27	3,5(1)*	26,08
G-1	15,27	1,00E+01	3,5(1)	28,05	0,26	3,5(1)*	26,13
G-2	18,55	1,00E+00	3,5(2)	28,41	0,21	2,5(1)*	25,57
G-2	19,02	1,00E+00	3,5(2)	28,11	0,25	2,5(1)*	25,48
G-3	22,29	1,00E-01	2,5(1)	26,59	0,68	2,5(1)*	25,48
G-3	22,61	1,00E-01	2,5(1)	26,66	0,65	Fe200(2)	27,26
G-4	25,88	1,00E-02	2,5(1)	26,78	0,60	Fe200(2)	27,28
G-4	25,96	1,00E-02	2,5(2)	26,73	0,62	TS(1)	25,90
G-5	29,48	1,00E-03	2,5(2)	26,75	0,61	TS(1)	25,92
G-5	29,75	1,00E-03	2,5(2)	26,98	0,53	TS(1)	25,72
NTC	No Ct	No Ct	4,5(1)	25,77	1,15	TS(2)	26,14
			4,5(1)	25,92	1,05	TS(2)	26,33
			4,5(2)	25,79	1,14	TS(2)	26,29
			4,5(2)	25,79	1,14	CP(1)	28,51
			4,5(2)	26,15	0,90	CP(1)	28,29
			Fe200(1)	28,45	0,20	CP(2)	26,34
			Fe200(1)	28,17	0,24	CP(2)	25,86
			Fe200(1)	28,46	0,20	CP(2)	26,16

omr11

Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra	Ct	Cantidad (ng)	Muestra Ad01	Ct	Muestra Ad02	Ct	Muestra Ad03	Ct
G-1	16,40	1,00E+01	3,5(1)	25,74	1,19	3,5(1)*	24,00	3,5(1)*	24,91	3,5(1)*	23,82
G-2	19,58	1,00E+00	3,5(1)	25,61	1,30	3,5(1)*	23,97	3,5(1)*	24,79	3,5(1)*	23,86
G-2	19,39	1,00E+00	3,5(2)	24,55	0,28	3,5(1)*	23,77	3,5(1)*	24,65	2,5(1)*	24,5
G-3	22,82	1,00E-01	3,5(2)	28,90	0,13	2,5(1)*	23,38	2,5(1)*	24,77	2,5(1)*	23,93
G-3	22,45	1,00E-01	2,5(1)	26,53	0,68	2,5(1)*	23,57	2,5(1)*	24,80	2,5(1)*	24,2
G-4	25,94	1,00E-02	2,5(1)	25,89	1,07	2,5(1)*	23,60	2,5(1)*	24,74	CP(1)	26,26
G-4	25,70	1,00E-02	2,5(2)	22,33	1,33	Fe200(2)	21,85	TS(1)	25,40	CP(1)	26,24
G-5	29,16	1,00E-03	2,5(2)	25,89	1,07	Fe200(2)	21,81	TS(1)	25,52	CP(1)	26,26
G-5	29,63	1,00E-03	4,5(1)	25,44	1,47	Fe200(2)	21,80	TS(1)	25,08		
NTC	No Ct	No Ct	4,5(1)	25,72	1,20			TS(2)	24,96		
			4,5(2)	25,89	1,07			TS(2)	25,20		
			4,5(2)	25,68	1,24			TS(2)	25,02		
			Fe200(1)	23,85	4,54			CP(2)	25,15		
			Fe200(1)	24,18	3,59			CP(2)	24,96		
									CP(2)	25,00	

3.5 Niveles de expresión normalizados con los genes de referencia seleccionados.

Los valores de expresión de cada gen fueron normalizados mediante el programa qBase, utilizando como genes de referencia los genes *rpoC*, *map* y *era*. Valores de expresión relativos a la muestra 3,5(2). Valores representan el promedio, DE = desviación estándar

Muestra	<i>rpoC</i>	DE	<i>map</i>	DE	<i>era</i>	DE	<i>gmk</i>	DE	<i>rplI</i>	DE	<i>trpS</i>	DE
2,5(1)	0,944	0,194	1,159	0,091	0,914	0,100	0,879	0,127	0,731	0,090	0,884	0,099
2,5(2)	0,865	0,179	1,065	0,104	1,085	0,087	0,924	0,158	0,874	0,081	0,868	0,081
3,5(1)	1,051	0,137	1,015	0,048	0,937	0,059	0,756	0,187	0,946	0,113	1,148	0,079
3,5(2)	1,000	0,136	1,000	0,049	1,000	0,065	1,000	0,133	1,000	0,093	1,000	0,107
4,5(1)	0,937	0,150	1,031	0,062	1,036	0,085	0,908	0,228	0,948	0,120	3,308	0,419
4,5(2)	0,963	0,101	1,089	0,083	0,954	0,054	0,753	0,097	0,878	0,112	1,220	0,081
Fe200(1)	0,781	0,105	1,260	0,065	1,016	0,078	1,577	0,201	1,851	0,143	1,404	0,089
Fe200(2)	0,891	0,105	0,833	0,155	1,347	0,116	1,419	0,285	1,096	0,106	0,968	0,094
CP(1)	0,678	0,124	1,519	0,128	0,971	0,075	1,451	0,146	0,335	0,038	0,507	0,065
CP(2)	1,026	0,114	1,469	0,184	0,663	0,045	2,824	0,271	2,367	0,152	1,096	0,109
TS(1)	1,177	0,159	1,602	0,165	0,531	0,070	2,679	0,273	2,403	0,249	1,072	0,123
TS(2)	0,794	0,095	1,211	0,242	1,040	0,089	2,027	0,216	1,760	0,212	0,976	0,089
Muestra	<i>gyrA</i>	DE	<i>nth</i>	DE	<i>alaS</i>	DE	<i>fur</i>	DE	<i>mntH</i>	DE	<i>feoB</i>	DE
2,5(1)	0,777	0,268	0,962	0,078	1,074	0,107	1,904	0,524	0,915	0,221	0,868	0,150
2,5(2)	1,024	0,171	1,110	0,147	1,194	0,123	1,687	0,268	1,144	0,199	1,034	0,134
3,5(1)	1,006	0,158	1,016	0,063	1,169	0,069	1,050	0,139	1,082	0,125	1,179	0,163
3,5(2)	1,000	0,182	1,000	0,115	1,000	0,089	1,000	0,180	1,000	0,147	1,000	0,105
4,5(1)	1,488	0,321	1,745	0,135	1,523	0,263	1,843	0,263	0,821	0,244	1,143	0,143
4,5(2)	1,218	0,190	1,329	0,111	1,262	0,109	1,117	0,231	0,759	0,095	0,953	0,100
Fe200(1)	1,181	0,198	1,126	0,060	0,941	0,054	2,509	0,403	0,049	0,007	0,238	0,064
Fe200(2)	0,969	0,185	1,044	0,193	0,701	0,085	2,803	0,389	0,104	0,011	0,143	0,013
CP(1)	0,627	0,083	0,325	0,036	0,266	0,025	1,600	0,207	0,358	0,031	0,690	0,068
CP(2)	1,005	0,141	0,818	0,123	1,221	0,194	2,225	0,228	1,288	0,114	0,408	0,040
TS(1)	0,874	0,112	0,754	0,110	1,170	0,125	3,148	0,439	1,277	0,171	0,526	0,055
TS(2)	1,410	0,304	1,297	0,220	1,085	0,137	2,647	0,234	1,203	0,144	0,438	0,045

Muestra	<i>phoB</i>	DE	<i>omr1</i>	DE	<i>omr2</i>	DE	<i>omr3</i>	DE	<i>omr4</i>	DE	<i>omr5</i>	DE
2,5(1)	0,940	0,090	0,781	0,101	1,651	0,230	2,320	0,421	1,324	0,157	0,928	0,175
2,5(2)	0,959	0,094	0,476	0,131	1,679	0,173	1,607	0,188	1,942	0,323	1,017	0,168
3,5(1)	0,856	0,070	0,745	0,175	1,102	0,122	2,816	0,343	1,302	0,216	0,950	0,111
3,5(2)	1,000	0,134	1,000	0,306	1,000	0,139	1,000	0,103	1,000	0,161	1,000	0,135
4,5(1)	1,211	0,095	1,385	0,213	1,688	0,225	1,950	0,305	2,753	0,270	1,095	0,196
4,5(2)	1,287	0,156	0,826	0,094	0,905	0,102	1,329	0,138	1,563	0,143	0,683	0,086
Fe200(1)	4,511	0,958	0,290	0,034	7,839	1,021	29,059	3,150	0,430	0,087	1,054	0,102
Fe200(2)	8,206	1,152	0,723	0,069	5,604	3,165	96,920	8,919	0,625	0,052	0,927	0,090
CP(1)	1,691	0,164	0,281	0,030	1,388	0,123	1,258	0,164	0,555	0,038	0,664	0,058
CP(2)	1,087	0,160	1,845	0,339	0,618	0,271	4,236	0,381	0,425	0,089	0,820	0,128
TS(1)	1,253	0,093	2,875	0,801	2,664	0,214	4,335	0,326	0,498	0,043	0,727	0,076
TS(2)	1,669	0,156	1,735	0,203	1,691	0,170	6,532	0,658	0,603	0,057	0,887	0,087
Muestra	<i>omr6</i>	DE	<i>omr7</i>	DE	<i>omr8</i>	DE	<i>omr9</i>	DE	<i>omr10</i>	DE	<i>omr11</i>	DE
2,5(1)	1,666	0,157	1,412	0,179	1,588	0,232	1,896	0,440	2,560	0,261	4,166	1,533
2,5(2)	0,996	0,570	1,352	0,150	1,451	0,671	1,586	0,227	2,296	0,277	5,723	1,358
3,5(1)	0,913	0,093	0,864	0,160	0,411	0,060	2,596	0,380	0,938	0,063	5,345	0,979
3,5(2)	1,000	0,088	1,000	0,103	1,000	0,120	1,000	0,132	1,000	0,152	1,000	0,580
4,5(1)	2,454	0,490	1,967	0,261	2,272	0,235	2,167	0,289	4,127	0,393	6,098	1,365
4,5(2)	2,280	0,738	1,551	0,197	1,814	0,216	1,737	0,238	3,047	0,445	4,063	0,816
Fe200(1)	2,200	0,228	3,815	0,379	0,384	0,057	0,513	0,098	0,669	0,084	15,459	3,691
Fe200(2)	6,632	0,602	5,565	0,598	0,462	0,072	0,484	0,073	0,541	0,040	16,365	1,640
CP(1)	0,252	0,032	0,257	0,025	0,116	0,016	0,269	0,050	0,520	0,064	1,751	0,214
CP(2)	1,190	0,118	0,390	0,064	0,306	0,045	0,055	0,018	1,365	0,229	4,238	0,425
TS(1)	1,535	0,130	0,538	0,052	0,530	0,082	0,635	0,171	1,890	0,183	3,981	0,714
TS(2)	1,308	0,122	0,617	0,073	0,251	0,042	0,244	0,080	1,475	0,146	4,915	0,607