

UCH-FC  
MAG - Microbiología  
B914  
C1

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

Estudios del Regulón "Quorum Sensing" de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270

Mediante Métodos Bioinformáticos y Análisis de Expresión Génica

Tesis

Entregada a la Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Microbiología

por

Alvaro Rodrigo Banderas Avalos

Octubre, 2009

Santiago – Chile

Director de Tesis: Dr. Nicolas Guiliani G.



FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE  
INFORME DE APROBACIÓN  
TESIS DE MAGISTER


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

**ALVARO RODRIGO BANDERAS AVALOS**

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Microbiología, en el examen de Defensa Privada de Tesis rendido el día 21 de Septiembre de 2009.

Director de Tesis:

Dr. Nicolás Guiliani G.

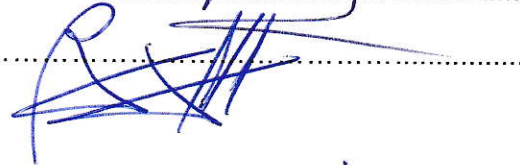


Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dra Rosa Alba Lagos



Dr. Marcelo Baeza





A Francisco Chavez E.



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco a todas las personas que me apoyaron y enseñaron en el transcurso de esta tesis.

A mi madre Mari por su empatía infinita.

A mi padre Raúl por su comprensión y apoyo.

A mi esposa Mariela por su amor y apoyo.

A mi tutor Dr. Nicolás Guiliani creer en mi y enseñarme el oficio de biólogo molecular.

Al Dr. Francisco Chavez por su constante apoyo y por contagiarme su entusiasmo por la vida.

Al Dr. Carlos Jerez por sus certeros comentarios durante los seminarios y por permitirme utilizar la instrumentación de su laboratorio

A todos mis compañeros del Laboratorio de Comunicación Bacteriana y del Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología; especialmente a Matías Castro, Alex González y Simón Beard

A Don Juan Araos por su cariño y siempre buena disposición.

A FONDECYT (proyecto 1080441) por financiar esta tesis.



## ÍNDICE DE MATERIAS



1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1. Comunicación química bacteriana .....	1
1.1.1. Autoinducción .....	1
1.1.2. "Quorum sensing" .....	2
1.1.3. Clasificación de los sistemas de "quorum sensing" .....	3
1.2. "Quorum sensing" mediado por <i>N</i> -acil homoserina lactona (AHL) o autoinductor del tipo 1 (AI-1) .....	4
1.2.1. Componentes y mecanismos moleculares generales .....	5
1.2.1.1. Síntesis y estructura de autoinductores del tipo AHL o AI-1 .....	5
1.2.1.2. Regulador transcripcional del tipo LuxR y la interacción con su sitio de unión .....	7
1.2.1.3. Transporte y acumulación de AHL .....	12
1.2.1.4. Regulación del par génico <i>I/R</i> .....	13
1.2.2. <i>A. ferrooxidans</i> y "Quorum sensing" .....	14
1.2.3. <i>A. ferrooxidans</i> .....	14
1.2.4. El sistema de QS de <i>A. ferrooxidans</i> . .....	14
1.2.5. Regulón "quorum sensing" .....	16
1.2.5.1. Expresión global en cultivos bacterianos .....	16
1.2.5.2. Estudios de expresión génica que buscan regulones QS .....	16
1.3. Hipótesis de trabajo .....	18
1.4. Objetivos .....	18

1.4.1. Objetivo General .....	18
1.4.2. Objetivos específicos .....	18
1.4.2.1. Objetivo específico 1 .....	18
1.4.2.2. Objetivo específico 2 .....	18
1.4.2.3. Objetivo específico 3 .....	18
1.4.2.4. Objetivo específico 4 .....	19
1.4.2.5. Objetivo específico 5 .....	19
2. MATERIALES Y MÉTODOS .....	20
2.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo .....	20
2.2. Técnicas de Biología Molecular .....	20
2.2.1. Extracción del ADN cromosómico .....	20
2.2.2. Purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa .....	21
2.2.3. Cuantificación de muestras de ADN y ARN .....	21
2.2.4. Electroforesis del ADN en geles de agarosa .....	22
2.2.5. Extracción de RNA total de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 .....	22
2.2.6. Sembrado de las membranas de miniarreglos de ADN .....	23
2.2.7. Marcaje sondas de ADNc .....	24
2.2.8. Hibridización, lavado y exposición de las membranas .....	25
2.2.9. PCR en tiempo real (qPCR) .....	25
2.3. Extracciones orgánicas de AHL .....	26
2.3.1. Extracción orgánica desde cultivos de <i>A. ferrooxidans</i> .....	26
2.3.1.1. Extracción desde sobrenadante .....	26
2.3.1.2. Extracción desde "precipitado celular" .....	27
2.3.1.3. Extracción desde los lavados efectuados a precipitados celulares .....	27



2.4. Detección de AHLs mediante el uso de biosensor acoplado a cromatografía en capa fina .....	28
2.4.1. Cromatografía en capa fina de fase reversa .....	28
2.4.2. Revelado con biosensor <i>A. tumefaciens</i> NTL4 (pZLR4) .....	28
2.5. Bioinformática .....	29
2.5.1. Construcción de Modelos Ocultos de Markov (HMM) .....	29
2.5.2. Análisis de los contextos genómicos de los sitios posibles de unión a la proteína AfeR .....	30
2.5.3. Herramientas Bioinformáticas .....	31
2.5.4. Diseño de oligonucleótidos .....	31
3. RESULTADOS .....	36
3.1. Búsqueda <i>in silico</i> de sitios de unión del regulador transcripcional AfeR en la secuencia nucleotídica del genoma de <i>A. ferrooxidans</i> . .....	37
3.1.1. Identificación de posibles sitios de unión de la proteína AfeR .....	39
3.1.2. Refinamiento mediante la herramienta MEME (algoritmo esperanza-maximización múltiple para la obtención de motivos). .....	41
3.1.3. Identificación de funciones génicas putativas reguladas por el regulador transcripcional AfeR. ....	45
3.2. Análisis transcripcional de un grupo de genes posiblemente relacionados con el sistema de QS de <i>A. ferrooxidans</i> mediante miniarreglos de ADN .....	52
3.2.1. Construcción del miniarreglo de ADNc. ....	52
3.2.2. Experimentos de incubación y crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> en presencia AHLs.....	53
3.2.3. Análisis transcripcional del gen <i>afeI</i> mediante qPCR.....	60
3.3. Estudios sobre la producción nativa de AHLs en cultivos de <i>A. ferrooxidans</i> ....	67





3.3.1. Producción de AHLs en respuesta a cambios en la densidad celular de <i>A. ferrooxidans</i> .....	67
4. DISCUSIÓN .....	73
4.1. Sitios de unión putativos del regulador AfeR.....	74
4.2. Transcripción del gen <i>afeI</i> y regulación de las funciones génicas putativas .....	78
4.3. Producción de la señal AHL en cultivos con distinta densidad celular.....	81
5. CONCLUSIONES.....	88
6. BIBLIOGRAFÍA .....	89
7. ANEXOS .....	95
7.1. Anexo 1. 77 ORFs seleccionados para ser impresos en la membrana de miniarreglo (modificado de formato genbank).....	95
7.2. Anexo 2. ORFs que no pudieron ser amplificados bajo las condiciones de PCR utilizadas (ausentes en el miniarreglo).....	122
7.3. Anexo 3. Versión preliminar de artículo científico basado en los resultados bioinformáticos obtenidos durante el desarrollo de esta tesis.....	126



## LISTA DE TABLAS

- Tabla 1.** Diversidad de respuestas regulatorias inducidas por el regulador transcripcional R en distintos blancos genéticos y bacterias
- Tabla 2.** Parámetros utilizados con el programa OligoArray 2.1. Se muestra la información entregada en el archivo de salida (“output”)
- Tabla 3.** Parejas de partidores utilizados para amplificar cada uno de los ORFs presentes en la membrana de miniarreglo.
- Tabla 4.** Caracterización de los PBSs seleccionados en términos de sus contextos genéticos.





## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Sistema canónico de señalización vía AHLs en *V. fischeri*.
- Figura 2.** Ejemplos de *N*-acil homoserina lactonas (AHLs).
- Figura 3.** Generación de HMM desde alineamientos hipotéticos basados en la secuencia de la *caja afe*.
- Figura 4.** Identificación de los 256 PBSs para AfeR en el genoma de *A. ferrooxidans*.
- Figura 5.** Distribución de los 265 PBSs en la secuencia genómica de *A. ferrooxidans* ATCC 23270.
- Figura 6.** Alineamiento de los 29 motivos encontrados por el algoritmo MEME.
- Figura 7.** Amplificación de genes seleccionados para el miniarreglo de ADNc.
- Figura 8.** Organización de la membrana de miniarreglo de ADN
- Figura 9.** Análisis comparativo de los niveles de transcripción del miniarreglo en presencia o ausencia de 50  $\mu$ M de la mezcla de AHLs.
- Figura 10.** Análisis densitométrico de los niveles de transcripción de los genes impresos en la membrana de miniarreglo.
- Figura 11.** Acercamiento a los cuatro cuadrantes del miniarreglo de ADN mostrando la hibridización diferencial para los ocho genes cuya expresión varía en presencia de la mezcla 1 de AHLs.
- Figura 12.** Construcción de la curva de calibración utilizada para medir el nivel de transcripción del gen *afeI* mediante qPCR.
- Figura 13.** Análisis del nivel de transcripción del gen *afeI* en cultivos crecidos en presencia o ausencia de AHLs y análogos estructurales de AHLs.
- Figura 14.** Curva de crecimiento y cambio de pH en cultivos de *A. ferrooxidans* crecidos en presencia de AHL y AHLa 134
- Figura 15.** Cuantificación de los niveles de transcripción del gen *afeI* en presencia de OH-C14-HSL y AHLa134.
- Figura 16.** AHLs presentes en el sobrenadante de cultivo de *A. ferrooxidans* en extracciones efectuadas en distintas etapas de la curva de crecimiento.
- Figura 17.** Producción de AHLs en cultivos con distinta densidad celular.
- Figura 18.** Detección de AHLs en soluciones de lavado y comparación de extracciones efectuadas a réplicas biológicas.
- Figura 19.** Relaciones entre algunos componentes del sistema de QS de *A. ferrooxidans*.

## LISTA DE ABREVIATURAS

3-oxo-C10-HSL	N-3-oxo-decanoil-L-homoserina lactona
3-oxo-C12-HSL	N-3-oxo-dodecanoil-L-homoserina lactona
3-oxo-C6-HSL	N-3-oxo-hexanoil-L-homoserina lactona
3-oxo-C8-HSL	N-3-oxo-octanoil-L-homoserina lactona
ABm	Medio AB mínimo
acrA	Bomba de eflujo del tipo RND
Acyl-ACP	Proteína cargadora de acilos acilada
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AHL	N-acil homoserina lactona
AHLa	N-acil homoserina lactona análoga
AI	Autoinductor
AI-1	Autoinductor del tipo 1
AI-2	Autoinductor del tipo 2
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
BLASTn	Herramienta de búsqueda de alineamientos locales básicos de nucleótidos
BLASTp	Herramienta de búsqueda de alineamientos locales básicos de proteínas
Bprom	Herramienta de predicción de promotores bacterianos
C10-HSL	N-decanoil-L-homoserina lactona
C12-HSL	N-dodecanoil-L-homoserina lactona
C14-HSL	N-decanoil-L-homoserina lactona
C16-HSL	N-decanoil-L-homoserina lactona
C4-HSL	N-butiril-L-homoserina lactona
C6-HSL	N-hexanoil-L-homoserina lactona
C8-HSL	N-octanoil-L-homoserina lactona
CDD	Base de datos de dominios conservados
ClustalW	Agrupamiento de alineamientos (tipo "weight")
CP	Compuesto polar
DCM	Diclorometano
dCTP	Deoxicitidina trifosfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Deoxinucleótido trifosfato

DSMZ	Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares
EDTA	Ácido etilendiamintetraacético
EPS	Sustancia exopolimérica
H3-AI	Autoinductor marcado con tritio
HdtS	Sintasa de AHLs de cadena acilo de 6, 10 y 14 carbonos
HEPES	Ácido -1-piperazineethanesulfónico-4-(2-hidroxietilo)
HMM	Modelo Oculto de Markov
Hyp_18	Proteína hipotética 18
IG	Intergénicas
LB	Luria-Bertani
LP	Palíndrome largo
MAST	Alineamiento de motivos y herramienta de búsqueda
MEME	Algoritmo esperanza-maximización múltiple para la obtención de motivos
MP	Palíndrome de tamaño medio
MTA	5'-metiltioadenosina
MultAlin	Alineamiento múltiple de secuencias con agrupamientos jerarquizados
Nra	Proteína de macrófago asociada a resistencia natural
OH-C10-HSL	N-3-hydroxydecanoil-L-homoserina lactona
OH-C12-HSL	N-3-hidroxydodecanoil-L-homoserina lactona
OH-C6-HSL	N-3-hydroxyhexanoil-L-homoserina lactona
OH-C8-HSL	N-3-hydroxyoctanoil-L-homoserina lactona
opgG	Proteína de biosíntesis de glucanos G
ORF	Marco Abierto de Lectura
PBS	Sitio de unión posible
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
petB	Citocromo B
PSSM	Matriz de puntaje de posición específica
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
QS	Quorum sensing
Rf	Factor de retención (Migración relativa)
SAM	S-adenosil metionina
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio
SP	Palíndrome pequeño
TAE	Tris-acetato-EDTA
TLC	Cromatografía en capa fina
Tm	Temperatura de desnaturación
TRIS	Trishidroximetilaminometano
Ttg2	Proteína de resistencia a tolueno, transportador similar a ABC
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-b-D-galactopiranosido

## RESUMEN

Las funciones génicas reguladas por el sistema de "quorum sensing" de *Acithiobacillus ferrooxidans* son desconocidas. Con el objetivo de comenzar a caracterizarlas, se utilizó un enfoque bioinformático para identificar un conjunto de posibles sitios de unión del regulador transcripcional AfeR en la secuencia nucleotídica del genoma de esta bacteria. Primero, se utilizaron Modelos Ocultos de Markov para modelar la secuencia de unión al regulador AfeR (caja *afe*) y encontrar secuencias similares en el genoma. Luego, algunos sitios fueron seleccionados de acuerdo a las características de su organización genética (*i. e.* la cercanía con un codón de inicio traduccional predicho). Posteriormente, ésta búsqueda se refinó utilizando una herramienta de identificación de motivos de secuencia compartido (MEME) y evaluando la presencia de promotores consenso del tipo sigma 70 en las cercanías de los sitios. Con esto, se definió un "regulón QS" putativo para *A. ferrooxidans* conformado por 75 genes. Interesantemente, estos genes incluyen al regulador transcripcional AfeR.

Con la finalidad de cuantificar la transcripción del regulón, algunos de los ORFs ubicados río abajo de los sitios de unión putativos se utilizaron para construir una membrana miniarreglo de ADNc. La transcripción diferencial de los ORFs impresos se evaluó cuando cultivos bacterianos fueron expuestos a moléculas de AHL sintéticas. De esta manera se encontró que ocho genes variaron significativamente sus niveles de transcrito en una de las condiciones probadas (50  $\mu$ M de una mezcla de AHLs).



Con el objetivo de modular específicamente la transcripción del gen *afel* a través de la alteración de la regulación transcripcional mediante AfeR, se realizó un análisis transcripcional de *afel* a través de qPCR. De esta manera, se encontró que la expresión de *afel* es reprimida 10 veces mediante el uso de un análogo estructural de la señal AHL (AHL<sub>a</sub>134).

Considerando la dificultad para modular el sistema de QS mediante la adición de moléculas exógenas, se decidió evaluar la producción de AHLs endógenas durante el crecimiento de la bacteria. Se encontró que el patrón de AHLs producido por *A. ferrooxidans* cambia durante el crecimiento. Con la finalidad de evaluar las diferencias en la producción de AHLs en dependencia con la densidad celular instantánea, se efectuaron experimentos donde cultivos inoculados con densidades celulares iniciales distintas fueron incubados por corto tiempo y no se les permitió crecer. De esta manera se observaron cambios en el patrón de producción de AHLs independientes del crecimiento y de cambios fisiológicos derivados de la curva de crecimiento. Se discute la función del QS en *A. ferrooxidans*.

## ABSTRACT

Gene functions regulated by the quorum sensing system of *Acithiobacillus ferrooxidans* are unknown. In order to start their characterization, a bioinformatic approach was used to identify potential AfeR transcriptional regulator binding sites over the whole *A. ferrooxidans* genome sequence. First, Hidden Markov Models were used to model the binding site for AfeR (*afe box*) and to find similar sequences over the genome. Then, some of the binding sites were selected according to the characteristics of their genetic organization (*i. e.* their proximity to a translational start codon). This search was refined by using a common motif identification tool (MEME) and by evaluating the presence of sigma 70 consensus bacterial promoters. In this way, a 75-gene putative quorum sensing regulon for *A. ferrooxidans* was defined. Interestingly, the AfeR transcriptional regulator is part of this set of genes.

In order to quantify the transcription of the putative regulon, some of the downstream-positioned ORFs were used to construct a cDNA miniarray membrane. Differential transcription of the printed ORFs was evaluated when bacterial cultures were exposed to synthetic AHL molecules. In this way, eight genes were found to significantly change their transcript levels in one of the tested conditions (50  $\mu$ M AHL mix).

With the aim of specifically modulate the *afeI* transcription levels by altering the AfeR-mediated transcriptional regulation, a transcriptional analysis of the *afeI* gene was performed by qPCR. In this way, a condition where the *afeI* transcription was repressed 10-fold by using a structural analog of the AHL signal (AHL<sub>a134</sub>) was found.

Considering the difficulties encountered to modulate the QS system via the addition of exogenous molecules, we decided to evaluate the production of endogenous AHL

molecules. We found that the AHL profile produced by *A. ferrooxidans* changes during growth. With the aim of evaluating the difference in AHL production in dependence with the instant cell density, we performed experiments in which cultures inoculated with different initial cell densities were incubated for short-times, and were not allowed to growth. In this way, we observed changes in the AHL production profile independent of cell growth and other growth curve-derived physiological changes. Finally, quorum sensing function in *A. ferrooxidans* is discussed.



## 1. INTRODUCCIÓN

### 1.1. Comunicación química bacteriana

La señalización a través de moléculas químicas es un factor fundamental en el establecimiento de comportamientos coordinados en grupos de bacterias. La señalización debe ser distinguida de otro tipo de intercambio de moléculas que generan respuestas fisiológicas pero donde no existe comunicación (Keller y Surette, 2006; West y col., 2006). La capacidad de producir una señal química, liberarla al medio extracelular, y transducirla a través de receptores específicos, constituye un tipo de comunicación química. La señalización célula-célula en bacterias tiene uno de sus orígenes en la descripción del fenómeno denominado autoinducción, y posteriormente generalizado en el concepto de “quorum sensing”.

#### 1.1.1. Autoinducción

Cuando células de *Vibrio fischeri* provenientes de cultivos en fase exponencial son inoculadas en medio fresco, ocurre un retraso temporal (lag) en la inducción de la luminiscencia. Este retardo está caracterizado por un breve periodo oscilatorio y una posterior caída en los valores de luminiscencia, que son recuperados a medida que la bacteria crece. Este retardo puede ser superado al efectuar el inóculo en un medio donde otro cultivo de *V. fischeri* ha crecido previamente (medio “condicionado”) (Kempner y Hanson, 1968). Este hallazgo condujo a la definición de dicho fenómeno como “autoinducción” (Nealson y col., 1970) y a la posterior caracterización e identificación estructural de la molécula responsable, la que se denominó autoinductor

(AI) (Eberhard, 1972; Eberhard y col., 1981). El AI funciona como un inductor extracelular producido por la propia célula y su acumulación en el medio de cultivo gatilla la expresión del fenotipo bioluminiscente. Crecido en un matraz, *V. fischeri* adopta este fenotipo bioluminiscente al expresar el operón *luxICDABE* sólo cuando la concentración extracelular del AI identificado como *N*-3-oxo-hexanoil-L-homoserina lactona (3-oxo-C6-HSL), alcanza una concentración suficiente capaz de inducir la activación del regulador transcripcional específico LuxR, localizado en el citoplasma. Dado que la molécula 3-oxo-C6-HSL difunde libremente a través de las membranas de *V. fischeri* (Kaplan y Greenberg, 1985), las concentraciones extra e intracelular de 3-oxo-C6-HSL se equilibran de modo que la concentración extracelular refleja la concentración citoplasmática necesaria para regular la expresión de los blancos regulatorios. De esta manera, la acumulación de 3-oxo-C6-HSL dentro de cada bacteria aumentará de manera correlativa con la densidad celular del cultivo. Esta correlación dio origen a la hipótesis de que la función natural de la señalización vía autoinductores es la de expresar fenotipos particulares en función de la densidad celular, de tal manera que solo cuando se alcanza un número determinado de bacterias o "quorum" se expresa el fenotipo.

### **1.1.2. "Quorum sensing"**

La respuesta sincrónica de un monocultivo bacteriano cerrado a la acumulación extracelular de AI ha sido denominada "quorum sensing" (QS) (Fuqua y col., 1994). El término QS es usado para definir la regulación transcripcional mediada por autoinductores y ha sido propuesto como un mecanismo general de coordinación de expresión fenotípica en respuesta a cambios en la densidad celular. En base a las evidencias antes mencionadas para la autoinducción en *V. fischeri* se ha establecido

un modelo general de funcionamiento que se ha extendido a otros sistemas donde existe señalización célula-célula. Los sistemas de QS descritos tienen distintos niveles de complejidad y los componentes moleculares que participan en el mecanismo poseen gran variabilidad.

### **1.1.3. Clasificación de los sistemas de “quorum sensing”**

Existen varios tipos de QS que han sido clasificados de acuerdo con la naturaleza del autoinductor y los diferentes mecanismos que controlan su síntesis y la respuesta celular que gatillan. De acuerdo con el tipo de autoinductor secretado se pueden clasificar los distintos tipos de QS en, a lo menos, tres grandes grupos.

#### QS mediado por *N*-acil homoserina lactonas (AHL)

Es el primer sistema descrito y el más estudiado. Las AHLs son usadas como moléculas de comunicación por varias bacterias Gram-negativas, sin embargo los mecanismos de síntesis y transducción de la señal son variables. El QS mediado por AHL más común es aquel que usa una proteína de la familia Lux I como sintasa y una proteína de la familia Lux R como regulador transcripcional específico. En bacterias como *Vibrio fischeri*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Agrobacterium tumefaciens*, la forma en que se llevan a cabo los mecanismos moleculares mediados por las proteínas I y R, se ha descrito con alto nivel de detalle. En la siguiente sección se analizará en extenso este tipo de señalización.

#### QS mediado por oligopéptidos modificados

Este tipo de comunicación es característica de bacterias Gram-positivas. Otra diferencia notable con la señalización mediada por AHLs, además de la naturaleza química del autoinductor, es que la transducción de la señal ocurre a través de un sistema de dos componentes que involucra un receptor de membrana y una posterior



cascada de fosforilación que termina en una regulación transcripcional diferencial (Miller y Bassler, 2001).

#### QS mediado por furanosil borato diester (AI-2)

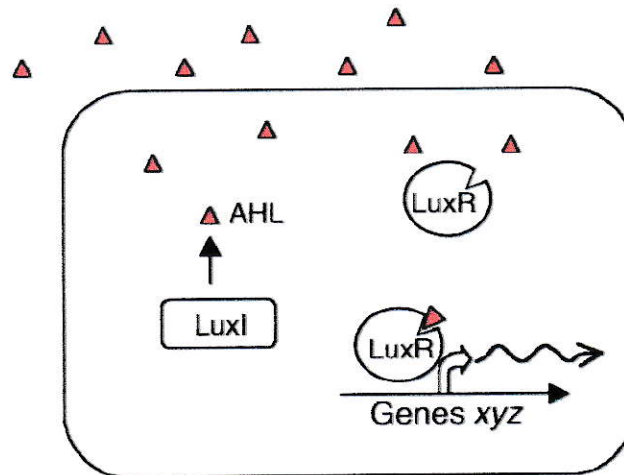
Inicialmente descrito en *Vibrio harveyi*, Este sistema QS es considerado un tipo de señalización interespecie. El AI-2 es sintetizado por el producto del gen *luxS*, que está presente en una gran cantidad de bacterias tanto Gram-positivas como Gram-negativas. Las bacterias pueden poseer este sistema además de otro sistema de QS funcional (Xavier y Bassler, 2003).

Además de estos tres grupos, existen muchos otros tipos de moléculas de señalización y sistemas de detección. Por ejemplo, *V. harveyi* posee, además del QS mediado por AI-2, un sistema híbrido, donde el autoinductor es una molécula de AHL, pero la detección y transducción de ésta ocurre a través de un receptor de membrana, de manera similar a los sistemas encontrados en bacterias Gram-positivas. En bacterias del género *Myxococcus*, la formación del cuerpo frutoso se debe a la existencia de un comportamiento grupal que genera una estructura semejante a un organismo multicelular y cuyo desarrollo está regulado por las señales "A" y "C" que corresponden a una mezcla de péptidos y aminoácidos libres y a una pequeña proteína de membrana externa, respectivamente (Kaiser, 2004).

#### **1.2. "Quorum sensing" mediado por N-acil homoserina lactona (AHL) o autoinductor del tipo 1 (AI-1)**

Las AHLs pueden ser sintetizadas por al menos tres familias distintas de sintetasas y sensadas por al menos dos familias distintas de receptores. Los sistemas de QS mediado por AHL más estudiados son homólogos al sistema descrito inicialmente

en *V. fischeri* y comparten los componentes básicos de éste. En este sistema la síntesis ocurre a través de una sintasa de la familia I y la respuesta es mediada por un regulador transcripcional de la familia R (Gray y Garey, 2001) (Fig. 1). A continuación se detallarán la estructura, síntesis y transducción de la molécula de AHL en sistemas del tipo *I/R*.

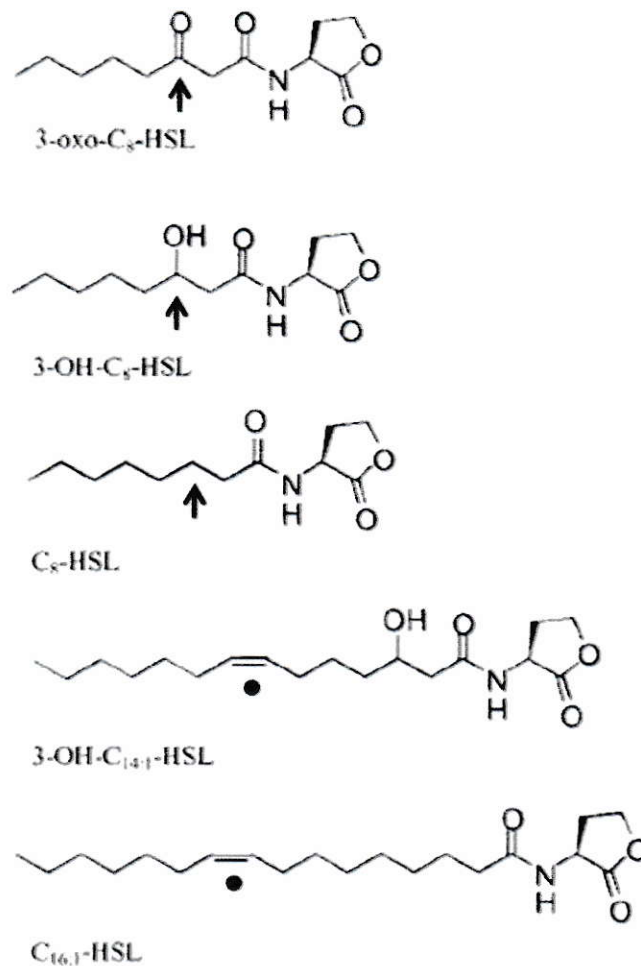


**Figura 1.** Sistema canónico de señalización vía AHLs en *V. fischeri* (Federte y Bassler, 2003). La proteína LuxI sintetiza la señal AHL. La señal difunde libremente a través de la membrana plasmática. Cuando se alcanza una concentración extracelular (e intracelular) umbral de AHL, ésta se une al regulador transcripcional LuxR, activando la transcripción de genes blanco desde un operador denominado caja *lux*.

### 1.2.1. Componentes y mecanismos moleculares generales

#### 1.2.1.1. Síntesis y estructura de autoinductores del tipo AHL o AI-1

Las moléculas de AHL son las moléculas de señalización del sistema de QS AI-1. Independientemente de su función en la comunicación célula-célula. Además, pueden servir de nutrientes (Huang y col., 2003), biosurfactantes (Daniels y col., 2006) e inhibidores de crecimiento (Wilkinson y col., 2002). La variabilidad estructural de las moléculas de AHL descritas hasta ahora, reside en el largo de la cadena acil, la sustitución en el carbono 3 de la misma, y en la presencia de insaturaciones (Fig. 2).



**Figura 2.** Ejemplos de N-acil homoserina lactonas (AHLs). Las estructuras de las distintas AHLs descritas varían en: el número de carbonos que componen la cadena acilo (4-18 carbonos), la presencia o ausencia de los grupos funcionales ceto o hidroxilo en el carbono 3 (flecha), y la presencia de insaturaciones (círculo sólido) (adaptado de González y Marketon, 2003).

Existen tres familias de enzimas, no homólogas entre sí, capaces de sintetizar la señal AHL: LuxI (Engebrecht y Silverman, 1984), AinS/LuxM (Gilson y col., 1995) y HdtS (Laue y col., 2000). Las actividades enzimáticas han sido caracterizadas solamente para de las dos primeras familias.

i) Las proteínas de la familia I, la síntesis de AHL involucra el uso de los sustratos proteína cargadora de acilos acilada ó "acyl-acyl carrier protein" (acyl-ACP) y S-adenosil metionina (SAM) (More y col., 1996; Schaefer y col., 1996). Las acyl-ACP

son conocidas también por su participación en la biosíntesis de fosfolípidos. La molécula de SAM está asociada a varias funciones metabólicas, entre ellas, ser donador de grupos metilo y participar en la regulación de la síntesis de metionina, su precursor directo (Weissbach y Brot, 1991). Se acepta que todas las proteínas pertenecientes a la familia I usan los mismos sustratos. El mecanismo de síntesis propuesto consiste en la N-acilación y la lactonización de la metionina, generándose el enlace amida entre la cadena acil y el anillo homoserina lactona. Los productos de esta reacción son: AHL, 5'-metiltioadenosina (MTA) y holo-ACP.

ii) La familia AinS/LuxM se refiere a dos proteínas homólogas entre sí (AinS de *V. fischeri* y LuxM de *V. harveyi*) capaces de sintetizar señales AHL. En *V. fischeri*, además de la antes mencionada 3-oxo-C6-HSL (producto de LuxI), se sintetiza la señal N-octanoil-homoserina lactona (C8-HSL), que es producto de la proteína AinS. En *V. harveyi*, LuxM sintetiza la señal N-(3-hidroxi-butiril)-homoserina lactona. La actividad enzimática de esta familia es equivalente a la de LuxI (Hanzelka y col., 1999), aunque ambas familias proteicas no compartan similitud.

iii) La enzima HdtS (Sintasa de AHLs de cadena acilo de 6, 10 y 14 carbonos) es responsable de la síntesis de N-(3-hidroxi-7-cis-tetradecenoil) homoserina lactona, antes conocida como *rhizobium small bacteriocin*, responsable de inhibir el crecimiento bacteriano (Wilkinson y col., 2002). Además es capaz de sintetizar AHLs de 6 y 12 carbonos.

#### **1.2.1.2. Regulador transcripcional del tipo LuxR y la interacción con su sitio de unión**

Los reguladores transcripcionales de la familia LuxR se unen a operadores denominados "lux-box" o caja lux (*Vibrio fischeri*), "tra-box" (*A. tumefaciens*) y "las-box"



(*P.aeruginosa*). Esta familia de reguladores comparten dos zonas de homología conservadas: el dominio de unión a ADN, del tipo hélice-vuelta-hélice en la fracción carboxi-terminal; y el dominio de unión a AHL, en amino-terminal. La estructura dimérica del homólogo de *A. tumefaciens* TraR acomplejada con 2 moléculas de 3-oxo-C8-HSL y unida a la caja *tra* ha sido cristalizada (Vannini y col., 2002). El mecanismo a través del cual los distintos miembros de la familia LuxR regulan la transcripción de sus genes blanco varía en cada sistema. En *A. tumefaciens*, la unión de la señal 3-oxo-C8-HSL permite la dimerización del regulador TraR y la posterior interacción de este con la caja *tra*, promoviéndose la transcripción del gen que se encuentra río abajo de ésta (Fuqua y Winans, 1996; Zhu y Winans, 2001). Este modelo de inducción es compartido por muchos sistemas sujetos a regulación por QS. Los sistemas *lux* de *V. fischeri* y las de *P. aeruginosa* también poseen proteínas R que funcionan como activadores sujetos a control positivo, es decir, que activan la transcripción en presencia de AHL. En estos sistemas, al menos para los blancos genéticos mejor caracterizados, la caja de unión de la proteína R se ubica alrededor de la posición -40 a -45 con respecto al inicio transcripcional. Sin embargo, las características de los componentes de los distintos sistemas regulatorios es diversa, y por lo tanto, las respuestas transcripcionales tienen comportamientos distintos.

Las diferencias principales radican en la dependencia de la unión del regulador a su secuencia blanco con respecto a la presencia de AHL, el tipo de unión del regulador a su secuencia blanco y la posición de la o las cajas con respecto al inicio transcripcional.

Algunos reguladores transcripcionales de la familia LuxR se unen a sus secuencias blanco en ausencia y se liberan de ellas en presencia de AHL, como es el caso de EsaR de *Pantoea stewartii* o ExpR<sub>Ecc</sub> de *Erwinia carotovora* (Andersson y col.,

2000; Minogue y col., 2002). Ambos reguladores son represores de sus blancos genéticos conocidos, pero pueden funcionar como activadores transcripcionales en sistemas genéticos artificiales al unirse a la caja *lux* e inducir la expresión del operón de bioluminiscencia de *V. fischeri*, en ausencia de AHL. Esto demuestra que la capacidad de interactuar con la RNA polimerasa para activar la transcripción está intacta, y que la activación de genes en su contexto nativo podría ocurrir (von Bodman y col., 2003). Otros reguladores, como RhIR de *P. aeruginosa* pueden unirse a sus secuencias blanco de manera independiente de AHL, y la unión de la señal AHL al dominio N-terminal favorecería las interacciones de éste con la RNA polimerasa permitiéndose la activación transcripcional (Medina y col., 2003). Evidencias genéticas muestran que RhIR puede funcionar como represor, aunque la dependencia de AHL para esta actividad no ha sido establecida directamente (Xiao y col., 2006)

Por otra parte, experimentos de retraso en gel con la proteína LasR de *P. aeruginosa* demuestran que la unión a sus secuencias blanco puede ocurrir de manera cooperativa o no cooperativa y con distintas afinidades dependiendo de la secuencia nucleotídica de éstas, y que no se requiere simetría pareja ("dyad symmetry") para que ocurra la interacción (Schuster y col., 2004).

La posición de las cajas también es variable, generalmente para sistemas en que los reguladores funcionan como activadores, éstas se encuentran cerca de la posición -40 solapando la región -35 del promotor  $\sigma_{70}$ . En el caso de los ya mencionados represores EsaR y ExpR<sub>ECC</sub>, la caja se encuentra solapando la región -10. Esto, y el hecho que estos represores puedan funcionar como activadores en otro contexto, sugiere que la posición de la caja podría ser importante para la naturaleza de la regulación. Existen algunos ejemplos donde se encuentra más de una caja del tipo *lux-box* en la zona regulatoria, como en el caso de los genes *lasB* y *hcn* o *pqsA* de *P.*

*aeruginosa* (Anderson y col., 1999; Pessi y Haas, 2000; Xiao y col., 2006). Además de la multiplicidad de cajas del tipo "*lux-box*", en las zonas regulatorias de varios genes regulados por QS, es posible encontrar una o más secuencias de unión para otros tipos de reguladores transcripcionales, incluyendo las zonas regulatorias de los genes I y R (Reverchon y col., 1998; Chatterjee y col., 2002).

Las secuencias reconocidas por estos reguladores pueden incluso estar solapadas con las cajas del tipo *lux-box*, como en el caso de la secuencia que reconoce RsaL en la zona regulatoria del gen *lasI* de *P. aeruginosa* (Rampioni y col., 2006). Esto significa que los blancos regulatorios de la proteína R no son exclusivos y que la autorregulación no es la única forma de modificar la generación de la señal AHL.

El grado de conservación entre las distintas cajas de un mismo organismo es bajo y la especificidad de los determinantes en la secuencia por un regulador determinado no es clara (Schuster y col., 2004).

En conjunto, estas evidencias sugieren que la naturaleza de la regulación ejercida por la proteína R sobre la transcripción de sus blancos genéticos depende de varios factores, entre ellos, la distancia de la caja *lux-box* al inicio transcripcional. En la tabla 1 se muestra la variabilidad que poseen los elementos regulatorios en distintos sistemas de QS.



**Tabla 1.** Diversidad de respuestas regulatorias inducidas por el regulador transcripcional R en distintos blancos genéticos y bacterias.

Bacteria	Gen regulado	Regulador transcripcional	Posición caja	Respuesta regulatoria	Referencias
<i>Vibrio fischeri</i>	<i>luxI</i>	LuxR	-42,5	Unión y activación dependiente de AHL	(Egland y Greenberg, 1999)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>lasB</i>	LasR	OP1:-42,5 OP2:-101,5	Unión y activación dependiente de AHL	(Anderson y col., 1999; Pessi y Haas, 2000; Whiteley y Greenberg, 2001)
	<i>hcn</i>	LasR	$\alpha$ :-42,5 $\beta$ :-150,5		
	<i>phzA</i>	LasR	-44,5	Represión, dependencia no determinada	
	<i>pqsA</i>	RhlR	-311	Unión independiente, activación dependiente de AHL	
	<i>rhlAB</i>	RhlR	-42		(Medina y col., 2003)
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>traA</i>	TraR	-43	activación dependiente de AHL y de la presencia de la caja	(Fuqua y Winans, 1996)
	<i>traC</i>	TraR	-43/-45		
	<i>traI</i>	TraR	-44		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>phzR</i>	phzR	-159,5	Activación dependiente de AHL	(Khan y col., 2005)
	<i>phzA</i>	phzR	-45,5		
<i>Pantoea stewartii</i>	<i>esaR</i>	EsaR	-10	desunión y desrepresión dependiente de AHL	(Minogue y col., 2002)
	<i>rcaA</i>	EsaR	+50	desrepresión dependiente de AHL	(Carrier y von Bodman, 2006)
<i>Aeromonas hydrophila</i>	<i>ahyI</i>	AhyR	-10	Unión independiente de AHL activación dependiente	(Kirke y col., 2004)
<i>Erwinia carotovora</i>	<i>rsmA</i>	<i>ExpR<sub>ecc</sub></i>	No determinado	Desactivación y desunión dependiente de AHL	(Cui y col., 2005)

### 1.2.1.3. Transporte y acumulación de AHL

La libre difusión de AHLs a través de las membranas de las bacterias que las producen, ha sido estudiada usando autoinductores marcados radiactivamente. Los trabajos demuestran que para AHLs de cadena corta (C4-HSL y oxo-C6-HSL), el equilibrio de las concentraciones intra y extracelular ocurre de manera rápida, en una proporción 1:1 y dentro de los primeros 30 segundos luego del traspaso de células cargadas con  $^3\text{H-AI}$  (autoinductor marcado con tritio) a medio fresco (Kaplan y Greenberg, 1985; Pearson y col., 1999). Para la señal 3-oxo-C12-HSL de *P. aeruginosa* el estado estacionario se alcanzó luego de 5 minutos y en una proporción 3:1 (intracelular:extracelular). Al contrario que el caso de C4-HSL, la acumulación de oxo-C12-HSL dentro de la célula de *P. aeruginosa* depende de una bomba de eflujo activo (MexAB-OprM). Cuando esta bomba de eflujo no está activa la acumulación de oxo-C-12-HSL, luego de alcanzarse el estado estacionario, es aún mayor (8:1) (Pearson y col., 1999). En el caso de las bacterias *Rhodobacter capsulatus* (C16-HSL y C14-HSL), y *Paracoccus denitrificans* (C-16-HSL), la retención de AI en la fracción celular es aún mayor. En *R. capsulatus*, la cantidad de marca que permanece asociada con las células alcanza entre el 33 y el 50% del total para C16-HSL y C14-HSL marcadas con  $^{14}\text{C}$ , respectivamente. En *P. denitrificans* cerca del 50% de la marca radiactiva (C16-HSL marcada con  $^{14}\text{C}$ ) permanece asociada a las células; mientras que *V. fischeri*, usado como control en este experimento, retiene entre el 2 y el 4% del total de la marca. Según estos valores, se estimó que la concentración de AI asociado con las células sería aproximadamente 50 veces mayor que aquella detectada en el exterior (Schaefer y col., 2002). Estos resultados sugieren una relación entre la hidrofobicidad de las señales y la retención en las células (o membranas) de las

mismas. Además, establecen una diferencia importante entre bacterias cuyas AHLs son de cadena larga y el modelo en *V. fischeri* (cadena corta) en cuanto a la homogeneidad de las concentraciones de AHL dentro y fuera del citoplasma.

#### 1.2.1.4. Regulación del par génico *I/R*

Los genes que codifican para los componentes principales de un sistema del tipo *luxI/luxR* están sujetos a regulación transcripcional. Tanto el gen *I* como el gen *R* pueden estar sujetos a autorregulación. Cuando se autorregula, el gen *R* aumenta su transcripción dependiendo de la presencia de AHL, ya sea por activación o desrepresión, como en el caso de los genes *luxR* y *esaR*, respectivamente (Shadel y Baldwin, 1992; Minogue y col., 2002). Hasta el momento, no hay reportes de autorrepresión dependiente de AHL. El gen *I* también está sujeto a autorregulación, pues la cantidad de transcrito depende directamente de la concentración de AHL. En la mayoría de los sistemas de QS descrito, la autorregulación es positiva. Por lo general existe una caja del tipo *lux-box* río arriba del inicio transcripcional del gen *I*. Se piensa que esta autorregulación positiva permite una acumulación exponencial de la señal, y que este hecho tiene que ver con la rapidez de la inducción fenotípica, como en el caso de la bioluminiscencia en *V. fischeri*. Existe al menos un ejemplo de inhibición transcripcional del gen *I* inducida por AHL. Esto ocurre con el gen *carI* de *Erwinia carotovora* (McGowan y col., 2005).

El hecho de que diversos reguladores se unen a las secuencias operadoras de los genes *I* y *R* (ver sección 1.2.1.2) significa que la autorregulación no es necesariamente la única forma de modular la expresión transcripcional de estos genes.



### **1.2.2. *A. ferrooxidans* y “Quorum sensing”**

### **1.2.3. *A. ferrooxidans***

La bacteria Gram-negativa acidófila *Acidithiobacillus ferrooxidans* es una  $\gamma$ -proteobacteria quimiolitotrófica que obtiene su energía a partir de la oxidación aeróbica de ión ferroso, azufre elemental y compuestos reducidos de azufre (Rawlings y Kusano, 1994). Por esta razón, *A. ferrooxidans* es utilizado frecuentemente en la biolixiviación de minerales en la industria minera. Este microorganismo se une a la superficie de minerales como la pirita mediante la producción de una capa de sustancia exopolimérica (EPS). Esta capa forma una matriz donde eventualmente las células se dividen y forman una biopelícula (Rawlings, 2002). Esta matriz está impregnada de especies de  $\text{Fe}^{+3}$  complejados con ácido glucurónico y sirve de espacio de reacción en donde la alta concentración de ión férrico ataca químicamente al mineral en sus enlaces covalentes. En el proceso, el ión  $\text{Fe}^{+3}$  es reducido a ión  $\text{Fe}^{+2}$  que es oxidado nuevamente por la bacteria. También en este proceso ocurre una acidificación local que contribuye a la disolución del mineral (Kinzler y col., 2003).

### **1.2.4. El sistema de QS de *A. ferrooxidans*.**

Entre las bacterias Gram-negativas que tienen un sistema de QS mediado por AHL, se incluyen las proteobacterias púrpuras fototróficas, vibrios marinos, bacterias de la rizósfera y patógenos oportunistas de plantas y animales. En estos microorganismos el QS regula múltiples funciones tales como la síntesis de exoenzimas, conjugación, síntesis de EPS, producción de antibióticos, luminiscencia y formación de biopelículas (Pirhonen y col., 1993; Fuqua y Winans, 1994; Davies y col., 1998; Dunlap, 1999; Gray y Garey, 2001; Marketon y col., 2003; McGowan y col.,



2005). Nuestro laboratorio ha sido el primero en caracterizar un sistema QS mediado por AHL en *A. ferrooxidans* (Farah y col., 2005). Hasta el momento los fenotipos regulados por este sistema aún no se conocen. Algunos de los fenotipos expresados por *A. ferrooxidans* en el proceso de biolixiviación de minerales, podrían ser regulados por QS. Por otra parte, la identificación y el control de los mecanismos involucrados en el proceso de biolixiviación podrían conducir a mejoras en los parámetros globales del proceso, tales como aumentos en el rendimiento o en la velocidad de la extracción. Por estos motivos el estudio del QS en *A. ferrooxidans* posee interés biotecnológico.

El sistema de QS de *A. ferrooxidans* posee los componentes básicos del sistema de *V. fischeri*. Las proteínas I y R se denominaron AfeI y AfeR, respectivamente. Los genes *afeI* y *afeR* están organizados divergentemente y existe un tercer marco de lectura en la zona intergénica denominado *orf3*. También existe una secuencia palindrómica río arriba del gen *afeI* denominada caja *afe*. Esta secuencia posee una complejidad palindrómica inusual, y se ha sugerido que ofrece 2 sitios de unión putativos para la proteína AfeR (Farah y col., 2005).

La *caja afe* ha sido alineada con otras secuencias similares pertenecientes a sistemas de QS homólogos en otras bacterias. El resultado indica que la identidad de ésta es baja (Rivas y col., 2005). *A. ferrooxidans* posee, además, al menos dos genes homólogos a la sintasa de AHL *hdtS* de *Pseudomonas fluorescens* como lo revela la anotación del genoma.

## **1.2.5. Regulón “quorum sensing”**

### **1.2.5.1. Expresión global en cultivos bacterianos**

Los cambios en la expresión génica bacteriana resultan de la capacidad de éstas de responder a cambios en las condiciones ambientales en su medio circundante. En un sistema de cultivo cerrado, una vez establecidas las condiciones iniciales, el grueso de los cambios ambientales es provocado por el crecimiento y metabolismo de la propia bacteria. Si las condiciones dentro del sistema de cultivo son homogéneas, de tal manera que en un momento determinado cada célula única está expuesta a las mismas condiciones ambientales que el resto, el cambio en la expresión génica en respuesta a dichas condiciones ocurrirá de manera sincrónica. De esta manera, las diferentes etapas de la curva de crecimiento bacteriano representan diferentes estados fisiológicos para todo el cultivo. Una forma de comparar los distintos estados fisiológicos experimentados por una bacteria en condiciones ambientales distintas, como por ejemplo cada una de las etapas de la curva de crecimiento, es retratar la expresión global de genes en las diferentes condiciones elegidas a través de experimentos de expresión global.

### **1.2.5.2. Estudios de expresión génica que buscan regulones QS**

Los reguladores de la familia LuxR son reguladores globales (Callahan y Dunlap, 2000; Antunes y col., 2007). Pueden activar o reprimir la transcripción de una fracción importante de los genes de una bacteria. Además, pueden regular su propia transcripción y la de la proteína del tipo LuxI. Un regulón es el conjunto de genes u operones controlados por el mismo regulador transcripcional.

Un regulón puede ser identificado a través de experimentos de genómica o proteómica comparativa. En el caso del QS mediado por AHL, se han efectuado ambas aproximaciones. En general, los estudios se han efectuado en cepas incapaces de generar el AI (mutante nulo de genes *l*) o de transducir la señal (mutante nulo del gen *R*). En estudios con miniarreglos de ADN efectuados en *P. aeruginosa* se evaluó la respuesta a AHLs de todos los genes del organismo en ambos tipos de mutantes, y la conclusión es que aproximadamente entre el 6 y 10% del total de ellos responde, directa o indirectamente, en algún momento de la curva de crecimiento a la inducción (Schuster y col., 2003; Wagner y col., 2003). En el caso del proteoma de mutantes nulos para los genes *l* de *P. aeruginosa* el porcentaje es de 24% (Arevalo-Ferro y col., 2003).

En *S. meliloti* se han hecho estudios proteómicos efectuando inducciones con AHLs de cadena larga en un contexto silvestre (Chen y col., 2003). En este trabajo se observó cambios significativos en la acumulación de más de 100 proteínas (1,6% del genoma). La estrategia que se usó fue de diluir y dejar crecer repetidamente cultivos de baja densidad celular para luego inducirlos con concentraciones no saturantes (sino con aquellas encontradas en sobrenadantes de cultivos normales) de AHLs. La observación de cambios significativos en la expresión de varias proteínas indica que 2 h son suficientes para que AHLs hidrofóbicas entren a la célula e induzcan cambios de expresión proteicas (también se probó 8 horas y se determinó que la respuesta se pierde al cabo de este tiempo).

Los experimentos de expresión global mencionados no pueden discriminar entre genes regulados directamente (unión de R río arriba de un gen blanco) o indirectamente (unión de R río arriba de un regulador transcripcional que, a su vez, modula la transcripción de un gen blanco).

### **1.3. Hipótesis de trabajo**

Estos antecedentes nos permiten enunciar la siguiente hipótesis:

*A. ferrooxidans* ATCC 23270 posee un regulón QS, y parte de este regulón puede ser identificado buscando secuencias de unión putativas de la proteína AfeR basadas en la homología que estas poseen con modelos construidos a partir de la caja *afe* del gen *afeI*.

### **1.4. Objetivos**

#### **1.4.1. Objetivo General**

Identificar genes que formen parte del regulón QS de *A. ferrooxidans* directamente activados por la proteína AfeR.

#### **1.4.2. Objetivos específicos**

##### **1.4.2.1. Objetivo específico 1**

Buscar y seleccionar en el genoma de *A. ferrooxidans* posibles sitios de unión para la proteína AfeR en base a la secuencia de la caja *afe* mediante herramientas bioinformáticas

##### **1.4.2.2. Objetivo específico 2**

Caracterizar bioinformáticamente los genes que acompañan a los sitios de unión seleccionados en el objetivo específico 1.

##### **1.4.2.3. Objetivo específico 3**

Desarrollar una membrana de miniarreglo de ADN con los genes seleccionados en el objetivo 2.



#### **1.4.2.4. Objetivo específico 4**

Estudiar la respuesta transcripcional tanto del grupo de genes impresos en el miniarreglo de ADN como específicamente del gen *afeI* (mediante QPCR) a la presencia de AHLs o análogos estructurales de AHL en el medio de cultivo.

#### **1.4.2.5. Objetivo específico 5**

Estudiar la relación del tipo de AHL liberado y la densidad celular utilizando el ensayo de cromatografía en capa fina acoplada a biosensor.

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

La cepa de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 se creció aeróbicamente en medio basal 9K modificado (Amaro y col., 1991) [(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 g/l; MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O 0,4 g/l; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>•3H<sub>2</sub>O g/l 0,04 g/l] suplementado con FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O (33 g/l).

La cepa de *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) (donada por el Dr. Juan González, Universidad de Texas) fue crecida en medio LB o medio AB mínimo (ABm) [en g/L, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 3; NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1; NH<sub>4</sub>Cl, 1; MgSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0,3; KCl, 0,15; CaCl<sub>2</sub>, 0,01; FeSO<sub>4</sub>•7H<sub>2</sub>O, 0,0025] (Chilton y col., 1974) suplementado con 0,5% de glucosa y 25 µg/ml de gentamicina según correspondiese.

### 2.2. Técnicas de Biología Molecular

#### 2.2.1. Extracción del ADN cromosómico

Para la extracción del ADN cromosómico de *A. ferrooxidans* se utilizó el protocolo para bacterias Gram-negativas del kit Wizard® Genomic ADN Purification kit (Promega). Este mismo se basa en un paso de lisis celular seguido de una digestión enzimática del ARN, con posterior precipitación del ADN genómico con isopropanol y solubilización en agua. Para la extracción, las células provenientes de 100 ml de un cultivo crecido en ión ferroso hasta fase estacionaria, se colectaron por centrifugación (7500 x g durante 10 min). El precipitado celular se lavó una vez con 1 ml de solución

de agua ácida (pH 1,6 ajustado con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) y dos veces con 1 ml de una solución 10 mM citrato de sodio. Este paso tiene por objetivo limpiar las células y eliminar el exceso de  $\text{Fe}^{3+}$  que presenta el cultivo. Posteriormente, el protocolo se utilizó sin modificaciones. El volumen final de resuspensión fue de 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  libre de nucleasas (Winkler Ltda.).

### **2.2.2. Purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa**

Para la extracción de las bandas de ADN desde los geles de agarosa se utilizó el Wizard® PCR Preps ADN Purification System (Promega). El método se basa en la escisión con bisturí de la banda desde el gel de agarosa y la fundición de la agarosa a  $65^\circ\text{C}$ , en presencia de una resina que une el ADN. La resina se empaca en una mini columna y luego de dos lavados con isopropanol, el ADN se eluye con agua mediante centrifugación. También, se utilizó el kit UltraFree DA (Millipore), a diferencia del kit anterior, las bandas cortadas se centrifugan directamente, quedando las moléculas de ADN en una resina preempacada.

### **2.2.3. Cuantificación de muestras de ADN y ARN**

La cuantificación del ADN doble hebra (cromosómico, plasmidial y productos de PCR) se efectuó espectrofotométricamente, mediante la lectura de la absorbancia a  $\lambda=260\text{ nm}$  ( $A_{260}$ ) ya sea una dilución 1:50 de la muestra de ADN o bien una muestra de 2  $\mu\text{l}$  en el caso de usar un espectrofotómetro del tipo Nanodrop (Thermo Scientific. Laboratorio de Ecología Molecular, Facultad de Ciencias, Universidad de Chile). Una unidad de  $A_{260}$  corresponde a 50  $\mu\text{g/ml}$  de ADN y a 40  $\mu\text{g/ml}$  de ARN. La pureza se comprobó mediante la relación  $A_{260}/A_{280}$  (Sambrook y Russell, 2001).

#### **2.2.4. Electroforesis del ADN en geles de agarosa**

Para visualizar la calidad y el tamaño del ADN cromosómico, ARN total ó de los fragmentos de PCR, se corrieron electroforesis en geles de agarosa (1% a 2%) en amortiguador TAE 0.5X (20 mM Tris-acetato pH 8,0; 0,5 mM EDTA). Cuando se usó una concentración de agarosa distinta, se indica en la figura correspondiente. Las muestras se mezclaron con amortiguador de carga 6X (0,25% p/v azul de bromofenol, 40% p/v sacarosa). La tinción se realizó durante 10 min con una solución de bromuro de etidio de concentración 0,2 µg/ml en amortiguador TAE 0,5X. Las bandas se visualizaron por la fluorescencia emitida al irradiar con luz ultravioleta de 320 nm en un transiluminador.

#### **2.2.5. Extracción de RNA total de *A. ferrooxidans* ATCC 23270**

El RNA total de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 se extrajo luego de efectuada la inducción con AHLs mediante una extracción con fenol caliente, según lo descrito previamente (Guiliani y col., 1997). Las células provenientes de los distintos cultivos con los que se efectuó cada experimento, se colectaron por centrifugación a 3500 g por 25 min a temperatura ambiente y se lavaron dos veces con el medio basal de sales DSMZ 71. El precipitado celular obtenido fue dividido en las fracciones necesarias para generar precipitados celulares de aproximadamente 10 mg. Luego, fueron resuspendidos en 400 µL de solución lisis (Acetato de Sodio, 0,02 M pH 5,5; SDS, 0,5%; EDTA, 1 mM). A continuación, se agregó 600 µL de fenol saturado ácido precalentado a 60 °C y se incubó por 7 min a 60°C agitando por inversión 14 veces vigorosamente cada 45 s. La fase acuosa fue re-extraída con fenol ácido por 7 min a 60 °C y luego 1 o 2 veces con fenol ácido/cloroformo y 2 veces con cloroformo. El RNA se precipitó con 1/10 volumen de Acetato de Sodio 3 M pH 5,2 y 2 – 3 volúmenes



etanol 100% a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  toda la noche. El RNA se precipitó por centrifugación a 15000 g por 30 minutos a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , lavado 2 veces con etanol 70% y resuspendido en agua libre de nucleasas y se trató con ADNsal libre de RNAsa (Invitrogen) en un volumen final de 200  $\mu\text{L}$  de una solución de: acetato de Sodio, 150 mM y  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM, pH 5,2 por 30 minutos a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Luego, se agregó 5 mM EDTA y la enzima se inactivó a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 15 min, se extrajo con fenol/cloroformo ácido y cloroformo y se precipitó el RNA y se resuspendió en 15  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas.

#### **2.2.6. Sembrado de las membranas de miniarreglos de ADN**

Se obtuvieron fragmentos de PCR para cada uno de los marcos de lectura seleccionados tras el análisis bioinformático. Se diseñaron partidores para que todos los fragmentos tuviesen un tamaño de aproximadamente 600 pb (ver sección 2.5.4). Cuando los marcos de lectura tenían un tamaño menor, se amplificó completamente esta región. Luego, los fragmentos se sembraron manualmente desde una placa de 96 pocillos con fondo curvo, utilizando el Multi Blot Replicator (VP409) en membranas de nylon Inmobilon-Ny+. Cada fragmento se sembró 3 veces (1,5 ng de ADN por spot) y en cuadruplicado. Las membranas se secaron al aire y luego se trataron con solución de denaturación (NaOH, 0,5 M; NaCl, 1,5 M) por 7 min sin agitación, luego de lo cual se incubaron 2 veces por 3 min en solución de neutralización (Tris-HCl, 0,5 M pH 8,0; NaCl, 1,5 M; EDTA, 1 mM) con agitación y fueron secadas al aire. Finalmente, el ADN fue entrecruzado a la membrana por irradiación con luz UV (254 nm) a  $0,12\text{ J/cm}^2$  en un Hibrilinker HL-200 (UVP Laboratory Products).

A modo de controles se incluyeron en las membranas un fragmento del gen de la expansina-1 de *Prunus persica* (tanto el fragmento *exp-1* como el mRNA de *exp-1* transcrito *in vitro* fueron donados por la Dra. Verónica Cambiazo, Laboratorio de

Bioinformática y Expresión Génica, INTA). Este control tiene por objeto introducir un mRNA con masa conocida en la mezcla a partir de la cual se sintetiza cDNA y luego es posible normalizar los datos de intensidad de cada "spot" por el valor de intensidad del promedio de las intensidades de *exp-1* (control "spiked"). 2 cuadruplicados de *exp-1* ubicados en extremos opuestos de la membrana un fragmento del gen codificante para la actina, amplificado a partir de ADNc de células CaCo2 (donado por T. Nuñez del Laboratorio de Envejecimiento, Facultad de Ciencias) y DMSO al 40% v/v.

### 2.2.7. Marcaje sondas de ADNc

La sonda marcada se obtuvo por incorporación de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP en el ADNc sintetizado a partir de 10  $\mu$ g ARN total con oligonucleótidos reversos específicos (oligonucleótidos RV de la tabla 3) para cada fragmento impreso en la membrana utilizando la transcriptasa reversa ImPromII (ARN total, 10  $\mu$ g; ARN *exp-1* transcrito in vitro, 1,5 ng; mezcla oligonucleótidos específicos, 10 pmol cada uno; dNTPs sin dCTP, 800  $\mu$ M cada uno; MgCl<sub>2</sub>, 3,5 mM; [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP o [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P]dCTP, 50  $\mu$ Ci; ARNsin, 40 U; ImProm II, 2  $\mu$ L) por 2 horas a 42 °C. El ARN total y de *exp-1* se hibridaron previamente en un volumen final de 20  $\mu$ L con la mezcla de oligonucleótidos a 70 °C por 5 minutos, puestos en hielo, y luego mezclados con el resto de los componentes de la reacción. La enzima se inactivó a 65 °C por 15 minutos y el ARN se degradó por tratamiento con NaOH (0,2 M final) a 37 °C por 15 minutos, siendo neutralizado con amortiguador HEPES (0,25 M final). Las sondas se purificaron luego utilizando las columnas S-200 HR (Amersham) según las instrucciones del fabricante y la radiactividad de 1  $\mu$ L de la elución fue cuantificada en el contador de centelleo (Packard Tri-Carb 2100 TR).

### **2.2.8. Hibridización, lavado y exposición de las membranas**

Por cada sonda obtenida se hibridaron dos membranas. Estas fueron previamente humedecidas en SSPE 2X (SSPE 10X: NaCl, 1,8 M; fosfato de sodio, 100mM pH 7,7; EDTA, 10 mM) por 5 minutos a temperatura ambiente, luego fueron pre-hibridadas en 7,5 ml solución de hibridación (SSPE, 5X; SDS, 2%; solución de Dendharts, 1X; ADN de espermatozoos de salmón, 100 µg/ml) a 65 °C por 3 – 4 h, luego de lo cual se hibridaron las membranas con 5 ml solución de hibridación fresca precalentada a 65°C con la sonda de ADNc obtenida ( $>1,5 \times 10^6$  cpm/ml solución de hibridación), denaturada previamente en agua hirviendo por 5 min, durante toda la noche. Cada lavado se realizó con 25 ml de solución SSPE 0,5X; y SDS, 0,2%. Se hicieron 2 lavados por 5 minutos a temperatura ambiente, seguidos por 2 lavados a 65 °C. Luego, las membranas fueron envueltas en saram wrap, expuestas en una pantalla K-Screen (Kodak) por 1 – 2 días y escaneados en un "PhosphorImager" (Molecular Imager FX system, Bio-Rad) utilizando el programa Quantity One 1.0 (Bio-Rad).

### **2.2.9. PCR en tiempo real (qPCR)**

Para las reacciones de qPCR, se utilizó el sistema Light Cycler (Roche). La cuantificación se efectuó de manera similar a lo efectuado anteriormente (Farah, 2005). En breve. Las reacciones de qPCR se hicieron en capilares de vidrio con un volumen final de 20 µL. Se utilizó 1 µL de una dilución 1/20 del ADNc correspondiente, 0,5 µM final de cada partidor y 1 µL de "master mix" de acuerdo a las instrucciones del proveedor del kit ADN Fast Start ADN SYBR Green I (Roche). Los partidores utilizados en las reacciones de síntesis de cDNA y en la amplificación por qPCR fueron los mismos que aquellos utilizados previamente (Farah, 2005).



Luego de la optimización de las condiciones de amplificación se construyeron las curvas de calibración a partir de diluciones seriadas de ADN genómico de *A. ferrooxidans* cuyo rango fue desde 20 ng a 20 fg. Al graficar el valor de Ct, ciclo en el cual la amplificación comienza a ser exponencial, versus el logaritmo de la concentración de ADN obtenemos una recta con pendiente negativa, mediante la cual podemos calcular el número de copias en relación con un ADNc amplificado bajo estas mismas condiciones. Para todas las reacciones, no hubo amplificación para las muestras a las que no se agregó transcriptasa reversa durante la síntesis de ADNc (control de contaminación con ADN).

### **2.3. Extracciones orgánicas de AHL**

#### **2.3.1. Extracción orgánica desde cultivos de *A. ferrooxidans***

Se efectuaron extracciones con diclorometano (DCM) a cultivos de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecido en azufre elemental tomando volúmenes variables de cultivo (se indican en cada experimento) provenientes de distintas fases de la curva de crecimiento (se indican en cada experimento) y se centrifugaron a 3500 g por 25 minutos. El sobrenadante y el "precipitado celular" se separaron para hacer extracciones independientes. Dependiendo del experimento, el "precipitado" resuspendido y/o el sobrenadante, se extrajeron con DCM.

##### **2.3.1.1. Extracción desde sobrenadante**

Las extracciones desde sobrenadantes se hicieron como fue descrito previamente (Farah y col., 2005). En breve, el sobrenadante de cultivo fue trasladado a un matraz de 1 o 2 L (dependiendo del volumen de extracción, el volumen total de solvente sumado al de solución a extraer, no debía superar un cuarto del volumen del



matraz). Se agregó 1 volumen de DCM y la mezcla se extrajo con agitación constante por 30 min. Se recuperó la fase orgánica (fase inferior), y se trasladó a una botella de vidrio. La operación se repitió en una segunda extracción. La fase recuperada se secó con  $\text{MgSO}_4$  anhidro, agregándole un par de “puntas de espátula”, y luego se filtró con algodón hidrofílico. El filtrado se evaporó a  $50^\circ\text{C}$  en un evaporador rotacional (Büchi RE-111), y, se trasladó a un tubo de vidrio ambar y se terminó de secar con  $\text{N}_2$ . Los extractos secos se disolvieron en 80 o 100  $\mu\text{l}$  de acetato de etilo a temperatura ambiente con agitación lateral (este paso es necesario pues, producto del secado con  $\text{N}_2$ , restos de extracto seco permanecen en las paredes del tubo).

#### **2.3.1.2. Extracción desde “precipitado celular”**

El precipitado se resuspendió en un volumen final de 5 ml de medio basal 9K. La resuspensión se trasladó a un tubo de ensayo y se extrajo con 1 volúmen de DCM agitando con vortex por 10 minutos, la mezcla bifásica, se dejó quieta durante 12 h con el fin de maximizar la extracción. Se efectuaron dos extracciones más con 1 volumen de DCM cada una utilizando 10 minutos de vortex al igual que en la primera, pero rescatando la fase orgánica inmediatamente esta vez. El resto del procedimiento es igual a la extracción del sobrenadante. El extracto seco se disolvió en 100  $\mu\text{l}$  de acetato de etilo.

#### **2.3.1.3. Extracción desde los lavados efectuados a precipitados celulares**

Luego de efectuado el primer lavado con 1 ml de sales DSMZ 71 (sin tiosulfato y con 0,22 mM fosfato), las células se centrifugaron a 4500 g por 10 minutos. El sobrenadante fue separado con micropipeta y luego extraído en un tubo de ensayo con 5 ml de DCM agitando en vortex durante 10 minutos. La extracción se dejó 12 horas a

temperatura ambiente y se efectuaron 2 nuevas extracciones de igual manera que en la sección anterior. El resto del procedimiento es igual a la extracción desde sobrenadante.

#### **2.4. Detección de AHLs mediante el uso de biosensor acoplado a cromatografía en capa fina**

##### **2.4.1. Cromatografía en capa fina de fase reversa**

La técnica de cromatografía en capa fina permite separar moléculas orgánicas de acuerdo a su coeficiente de partición. En el caso de las AHLs se usa una matriz hidrofóbica y una fase móvil polar, por lo que la migración de las moléculas polares será mayor que la de las apolares (Shaw y col., 1997). La hidrofobicidad de las AHLs depende principalmente del largo de la cadena acilo. Los extractos se cargaron en placas cromatográficas de fase reversa C18 (Merck). Se utilizó metanol:agua (60:40) como fase móvil. Al término de la corrida, las placas se secaron al aire y se volvieron a correr una o dos veces más, dependiendo del experimento.

##### **2.4.2. Revelado con biosensor *A. tumefaciens* NTL4 (pZLR4)**

El biosensor bacteriano *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) (Piper y col., 1993), gentilmente donado por el Dr. Juan Gonzalez (Universidad de Texas en Dallas) es incapaz de producir AHL y, por ende, expresa la  $\beta$ -galactosidasa sólo en presencia de AHLs exógenas. Posee una fusión *traG::lacZ* (*traG* es activado directamente por el complejo TraR/AHL en la cepa silvestre) y el regulador transcripcional TraR, que se produce constitutivamente.

Un cultivo crecido por 16 h a partir de una colonia aislada (LB-gentamicina 50  $\mu$ g/ml) del biosensor, fue inoculado al 1% en 50 ml de medio AB mínimo (ABm) (ver

sección 4.1) y suplementado con 0,5% glucosa. Cuando el cultivo alcanzó una densidad óptica de 0,7 fue mezclado vigorosamente con 50 ml de medio ABm-agar 1% fundido y mantenido a 45°C. Se agregó X-gal hasta una concentración final de 60 µg/ml. La mezcla se esparció uniformemente sobre la placa cromatográfica y se incubó toda la noche a 30°C. Cuando el biosensor se expone a AHLs; que son capaces de traspasar la membrana, unirse a TraR e inducir la transcripción de *lacZ*, éstas se visualizan como “manchas” azules en la matriz cromatográfica (Shaw y col., 1997). La forma de la “mancha” no necesariamente es circular, pues depende de las propiedades de migración cromatográfica de las AHLs (Shaw y col., 1997). El biosensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) detecta con mayor sensibilidad AHLs con cadenas acilo de mediana longitud (C8 a C12).

## 2.5. Bioinformática

### 2.5.1. Construcción de Modelos Ocultos de Markov (HMM)

Distintos alineamientos múltiples efectuados a partir de la secuencia del palíndromo de 30 pb localizado en la zona intergénica entre los genes *afel* y *orf3* permitieron obtener HMMs de 13 pb (TGACA-NNN-TGTCA), 18 pb (GCTGTCAA-NN-TTGACAGC) y 20 (AGCTGTCAA-NN-TTGACAGCT). Las secuencias alineadas corresponden a todas las combinaciones posibles de nucleótidos en las posiciones “N”. Además, utilizamos dos HMMs de 15 pb (Y-TGACA-(NNN)-TGTCA-R) y 30 pb (TGACA-NNN-TGTCA-NNNN-TGACA-NNN-TGTCA). En el modelo de 15 pb las secuencias alineadas se diferencian entre sí en los nucleótidos centrales y laterales. Los tres nucleótidos centrales (NNN) incluidos fueron los trímeros (AAA), (CCC), (GGG), o (TTT). Las posiciones “Y” y “R” corresponden a pirimidinas y purinas,



respectivamente. En el modelo de 30 pb las secuencias alineadas corresponden a todos los nucleótidos posibles en las posiciones "N". Los alineamientos se efectuaron utilizando ClustalW (Thompson y col., 1994), y los HMMs fueron construidos a partir de éstos utilizando "HMMER package 1.8.4 programs" (Eddy, 1998). Posteriormente, el comando *hmms* fue utilizado para encontrar "matching hits" no solapados múltiples en la secuencia genómica de *A. ferrooxidans* obtenida desde el sitio web del J. Craig Venter Institute (ex-Institute for Genomic Research) ([www.tigr.org](http://www.tigr.org)).

### **2.5.2. Análisis de los contextos genómicos de los sitios posibles de unión a la proteína AfeR**

Utilizando la secuencia disponible del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (<http://www.tigr.org>), las coordenadas entregadas por la búsqueda de cajas usando HMM, y el programa de anotación ARTEMIS versión 7 (The Sanger Centre, <http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>), se localizaron todas las cajas y se definieron los sitios de unión posibles (PBS). El contexto de cada sitio de unión fue determinado manualmente seleccionando los ORFs cercanos en base a su homología de secuencia con proteínas conocidas y dominios conservados usando el algoritmo BLASTp (Altschul y col., 1997) descargado desde el sitio de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) y/o en el servidor de EMBnet-CH/SIB (<http://www.ch.embnet.org/software/BottomBLAST.html>) y las bases de datos presentes en la base de datos de dominios conservados ó "conserved domain database" (CDD) (Marchler-Bauer y Bryant, 2004) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>). Los comienzos traduccionales fueron determinados en base a alineamientos múltiples de los homólogos con mayor identidad usando el algoritmo ClustalW (Thompson y col., 1994) desde "genome net"



(<http://align.genome.jp/>). La anotación consistió en la identificación de la función putativa, los dominios conservados, y el tipo de modelo que se encontró cerca de su inicio traduccional. Se anotó además algunos genes que no poseen cajas, pero que posiblemente están involucrados en la respuesta a AHL (ver resultados).

### 2.5.3. Herramientas Bioinformáticas

Elementos -10 y -35 de promotores de unión a  $\sigma^{70}$  consenso fueron identificados utilizando Bprom ([www.softberry.com](http://www.softberry.com)) sobre los PBSs del tipo I y del tipo II con 100 pb adicionales de cada lado. Los PBSs del tipo II fueron seleccionados para posterior caracterización solo si una predicción de Bprom ocurría en la secuencia de entrada (input). Motivos de secuencia compartidos fueron identificados usando el algoritmo MEME (Timothy et al., 1994) ([meme.sdsc.edu](http://meme.sdsc.edu)) sobre los PBSs seleccionados con 80 pb adicionales de cada lado. Alineamientos múltiples de los PBSs seleccionados y la generación de una secuencia consenso fueron efectuados utilizando MultAlin (Corpet, 1988). El algoritmo MAST (Bailey y Gribskov, 1998) fue utilizado para buscar motivos adicionales en las zonas intergénicas del genoma de *A. ferrooxidans*. La entrada para el programa MAST fue la matriz de puntaje posición-específica (PSSM) generada a partir de los motivos comunes derivados del análisis MEME

### 2.5.4. Diseño de oligonucleótidos

Se diseñaron 77 pares de nucleótidos utilizando el software OligoArray 2.1 ([http://berry.engin.umich.edu/oligoarray2\\_1/](http://berry.engin.umich.edu/oligoarray2_1/)) (Rouillard y col., 2003) que predice estructura secundaria a partir del algoritmo OligoArrayAux (<http://www.bioinfo.rpi.edu/applications/hybrid/OligoArrayAux.php>) (Markham y Zuker,

2005) y evalúa especificidad utilizando BLASTn. Los parámetros usados en la búsqueda se resumen en la tabla 2.

**Tabla 2.** Parámetros utilizados con el programa OligoArray 2.1. Se muestra la información entregada en el archivo de salida ("output").

Maximum number of oligo to design per input sequence: '5000'
Size range: '18' to '18'
Maximum distance between the 5' end of the oligo and the 3' end of the input sequence: '5000'
Minimum distance between the 5' ends of two adjacent oligos: '1'
Tm range: '65' to '80'
GC range: '45.0' to '55.0'
Threshold to reject secondary structures: '60.0'
Threshold to start to consider cross-hybridizations: '60'
Sequence to avoid in the oligo: 'GGGGG;CCCCC;TTTTT;AAAAA;AAAA;TTTT;CCCC;GGGG'

<sup>a</sup>Para mantener la fidelidad del formato de salida se mantuvo el idioma Inglés

La base de datos local generada para comprobar hibridaciones cruzadas corresponde a todos los ORFs seleccionados para ser impresos en la membrana de miniarreglo.

Como la salida del programa entrega solo secuencias en antisentido se obtuvo la secuencia reversa complementaria de forma automática para todos los partidores posibles (<http://arep.med.harvard.edu/labgc/aADNn/projects/Utilities/revcomp.html>). Luego, se obtuvo la temperatura de desnaturalización (Tm) para todos los posibles partidores usando el método de "nearest neighbour" o la fórmula  $2(A+T)+4(G+C)$  (<http://www.changbioscience.com/primo/oligo.html>). Se seleccionaron partidores separados entre sí por aproximadamente 600 pb. El listado total de los partidores usados se encuentra en la tabla 3.

**Tabla 3.** Parejas de partidores utilizados para amplificar cada uno de los ORFs presentes en la membrana de miniarreglo.

Gen	Nombre partidor (FW)	secuencia (5'-3')	Nombre partidor (RV)	secuencia (5'-3')
1	ResB-FW	AACATATCAACCTCGGGC	ResB-RV	TCCTTGGTGAACCTCGTAC
2	PetB-FW	TACCTCCATCATGCACGC	PetB-RV	TCCTGACCAATCCATGCC
3	GalU-FW	CGGCTACGGCTACATTCA	GalU-RV	TTGAGGCGTTCGACGATG
4	Tdr_-FW	CTAAACAGCCTGAAACCG	Tdr_-RV	GTGTCCGGATGTATGGAT
5	DnaA-FW	GCGGTAACCGACATATTG	DnaA-RV	GCATGGCGAAGTGAATCT
6	Ndr_-FW	TTGCTCTATCTGGTAGCC	Ndr_-RV	CCTGTTGCTGTTCCGTTG
7	hy_0-FW	GCTCCATTCTTGCTGTTT	hy_0-RV	TTGCGCTGTCCCAGTTTA
8	PheS-FW	TCGCCGCACTCAATATTC	PheS-RV	CGAAGAAGAGACGCAGAT
9	LysR-FW	CCATAATCGCATCAGCCT	LysR-RV	AGGAATAAGGACGGGCCA
10 <sup>a</sup>	hy_1-FW	TTCACGCATCGCACGTAT	hy_1-RV	TCGTAGTATGACGCGATG
11	grcX-FW	GTGCTACTCTACACCAGT	grcX-RV	ACCACCGAATGCAGCATC
12	galE-FW	CTCTGGATATCCGTGACC	galE-RV	CAGACCGTGCATTGCGT
13	sixA-FW	CTGATCTTGAGCGGGAAC	sixA-RV	TTGGGATGGGCATACCAG
14	ccmA-FW	AGTATTCCGGCCGTATTC	ccmA-RV	TCAAGAGATCGAGGGTGG
15	FhuA-FW	CAGGCAATCCCAAAGATC	FhuA-RV	GCCGCTTCTGGATTATAG
16	fkbM-FW	AAGAACCCACCATGGCGA	fkbM-RV	CCCGGCTTATTGCGTATG
17	pepC-FW	GACCCATATCCGAACTGC	pepC-RV	GTCAACGTATCCGCAAGG
18	yjgP-FW	ATCTCCTTTCTGCTGACC	yjgP-RV	AAGGACTTTGAACCCGGC
19	cyaY-FW	ATGAACCCGCAAAGCTTC	cyaY-RV	TGCACGCCAGCCAAATCT
20	hy_2-FW	TGGTCAGAAATCCATGGC	hy_2-RV	GGTACTCTGATCAGCCTC
21	Nre_-FW	CACAACAAGCTATGACATAGG	Nre_-RV	CCGTATAGCCTAAGATCATTGC
22	Nrp_-FW	GTTTGTGGACTGTTGCTG	Nrp_-RV	AGTGGCTGAGATGAAAGC
23	MobB-FW	ACGCGGATATGGATTGAG	MobB-RV	ATTGCCGGATGAATTGCG
24	trpB-FW	GGTGTATATGGGCGAGGA	trpB-RV	CAGCGCTTCTTCATCGGT
25	Zwf_-FW	GAGCAACTGCACAACCAC	Zwf_-RV	GTGTATGTCGGAAGCGGA
26	hy_3-FW	CTGGTGGATGTGCTTTGC	hy_3-RV	TGTTGTCCATTGCCCAGT
27	Cpe_-FW	AAGGACGCAAACCCAG	Cpe_-RV	GTACGGGACGAATGGGAT
28	hy_4-FW	GCCCAGAACATGATCGAC	hy_4-RV	TATTGTCCGTGGTTTGCC
29	hfq_-FW	AACATGTTCTGTGCGCA	hfq_-RV	CTTCTTCGGTGTGCTCT
30	acrA-FW	GATCGACAACAGCAACCA	acrA-RV	CTTTCCTTGCCATGGATG
31	hy_5-FW	GTCAGATAGTAGTCGCC	hy_5-RV	CCAGATCTGCAGTATCGT
32	rpoS-FW	GAATTCGACGCCATAGCC	rpoS-RV	CGTTTGCGCCAAAGATGG
33	hy_6-FW	GCTACGGATTCTCGGATT	hy_6-RV	CCCGGATTGCTTGTGTAG
34	trbF-FW	CACATCGTTTCCCGCTTC	trbF-RV	GATGTAGATGCCGAATGG
35	trbL-FW	TGACCTACAGCATCGTGC	trbL-RV	TCGTTCCGCTTATCCTGG
36	hy_7-FW	GAGAACTTCAAGCACCGC	hy_7-RV	TAACAAGACGCCAGAGGG
37	AhpC-FW	GAGCCATGCTAGAGCAGA	AhpC-RV	TTACCTTGCGCCGATGT
38	GnnA-FW	TTGATGCGTTACTGGCTG	GnnA-RV	ACGTACACCGGGAATTCC



39	hy_8-FW	AGGGCTTTCATTTGTCCG	hy_8-RV	TCTGGATGCCTTTCTGCG
40	tnp1-FW	TACCGATATGCCTCAGCC	tnp1-RV	AGCCCTAAAGCCGTGGTA
41	hepB-FW	GAGCCGCGTACATTTCGA	hepB-RV	CACCATAGCCTCGATCAG
42	wza_-FW	CTCTACGCCCAATACGTC	wza_-RV	TATCTCCCGACTTCAGGT
43	hy_9-FW	GACAAAGCCGTGATAGCC	hy_9-RV	GGCGATATCGGACTTGTC
44	traL-FW	GCAAAGATCAGGGAAGG	traL-RV	CCCACTCCTTCGTATTGC
45	nucl-FW	GCATGAAGCCCTGGATGA	nucl-RV	TCCCGGTTTCATCTGAAGC
46	OpgG-FW	GCAAAGGTGCCATCTACG	OpgG-RV	TGCAGGTTTCATGTTCCGG
47	hy10-FW	CACAGCAATACCTCCGGA	hy10-RV	AATACAGATCCTGCCGGA
48	bl-1-FW	AGGACGCCAGGATAATAG	bl-1-RV	ACTTTGGGTGATGCTGTG
49	alaS-FW	CAGCTTCTCATCACCGA	alaS-RV	GCGTCCGATCGAGAATAA
50	hesB-FW	GCAGGTGCGCAAGAGTAT	hesB-RV	TCAGTTCGTAAGCTCTC
51	rho_-FW	TTCTGCAGGATGGATTTG	rho_-RV	ACCACATCGTGCTTGTGC
52	Atp_-FW	TCTGCGTTTGCAAAGCT	Atp_-RV	GTCACCAGACAATAGCC
53	hy11-FW	TAGTGCAGTGGATAGAG	hy11-RV	GGCAGCGACATTGATATG
54	hy12-FW	GCTGCAGATCGTCTTTAC	hy12-RV	GTACAATGGTTCGGAGA
55	hy13-FW	CTTCAAGGGTGGTACCGT	hy13-RV	TGTCCATGGCGGTATCCT
56	DsbD-FW	AGCAGGTCAAGACGATCA	DsbD-RV	AAATGAAGAGCAGCCCGC
57	hy14-FW	GTATCTTCTCCCTGGCT	hy14-RV	GTCGAAGCGCATGTGTAA
58	KdsB-FW	CGAAGTGGTGGACTGCAT	KdsB-RV	CATCTGCTCCAGCGATTC
59	RecN-FW	AAAGGCCACGCTGAAGAC	RecN-RV	CTGGCAGCGTTGTCTTCT
60	argC-FW	AAGCGCATGGTGAAATC	argC-RV	CCTTGATGTGGGCGACTT
61	truB-FW	AGGCCGCTTTACGAATTG	truB-RV	CTTTCCGTCGTCCATCAC
62	L6rp-FW	CCCTAAGGGCGAAATGTC	L6rp-RV	CACGCCCTTACCCTTGTA
63	blc2-FW	TGGTTATCGACCCTGTTC	blc2-RV	GGTTCTGACAAGTGGAGT
64	mt_-FW	GTAGCCACCCACCACTTT	mt_-RV	CGGTTGAGATCGTAGCGA
65	trmH-FW	TCCTGTATGAGCCGAAA	trmH-RV	AGACCACCGCAATAGTCC
66	jexE-FW	TAATGGTAGCGATGACGG	jexE-RV	GAAATTTCTGGCGGTGC
67	ttg2-FW	GTTGCTCTGCTTGTGTG	ttg2-RV	TCCTTGGCTTTCATGTCC
68	hy15-FW	GACGAACACCATCACCAT	hy15-RV	AGGATGCTGGCCGTATAC
69	hy16-FW	GATATCGCAGACGGACAA	hy16-RV	CCCGCAGCCAACAATATC
70	md_-FW	CGACCCTGGAGTACATGA	md_-RV	GGTGTAGGCCTTCAGGAA
71	oep_-FW	GGCCAACCCGGATATACA	oep_-RV	ACGGCAATTGCAGACTGG
72	ompR-FW	CGGAAACAGATTCTGGTG	ompR-RV	GGAGATCTGCATGTGCGAT
73	nra_-FW	AGCGAAACCTTCGGGAAA	nra_-RV	AGGTGTTGCCGAGATAGG
74	AspR-FW	GGTAACGAAGGCCTGCAA	AspR-RV	ATCACCAAGTCGATCCAGC
75	hy17-FW	TCTTCTTCTGCGCGGTA	hy17-RV	GTACCGGTACCTGGAAT
76	tr_2-FW	GGTGCAGATATTGGTGTT	tr_2-RV	ATAAGACTGCAACCCGAC
77	hy18-FW	AAGGACGGTGAGCGCAAT	hy18-RV	TGTTGGCAGACGTTTGGA
78	rus-N	TGTATACACAGAACACGA	rus-R1	ATTACTTGACAACGATCT
79	popJ1N (ShyB)	CACCCGGTTTTCTC	popJ1R (ShyB))	GATGGGTAGTTGCCCAAG



80	HdtSNH <sup>2</sup> Ndel	CATGATACGCAGCATC	RTcDNAHdtS	ACACCCGCTATTCACAG
81	popM1N (mtfA)	TGCGAACAACAATCTCCG	popM1R (mtfA)	TAATGCACCACCAGCGTC
82	popN6N (wcbE)	GAATCGTCATCGACTTGC	popN6R (wcbE)	GACAACGGACGGTAATAG
83	phnJN	TATAATTTGCCTATCTC	phnJ-R1	GACCTGCGCCAAATAGCT
84	afeINH2Ndel	GATGCAGGTTATAACCGGGCC	afeICOOH	GGTTAGTCCAGATCTATCCAGCATGCA
85	orf3FW1	CATGACAGTGCAGAACG	IIG2	ATGTTGCTTCGTGGGAATC
86	afeRNH2Ndel	TGGCGTCCGAAATGGCGCGTA	afeR-RT0	TCTTGTTGACGGCGTTCAGC

<sup>a</sup> Las filas destacadas con color gris corresponden a genes que no lograron ser amplificados bajo ninguna de las condiciones ensayadas.

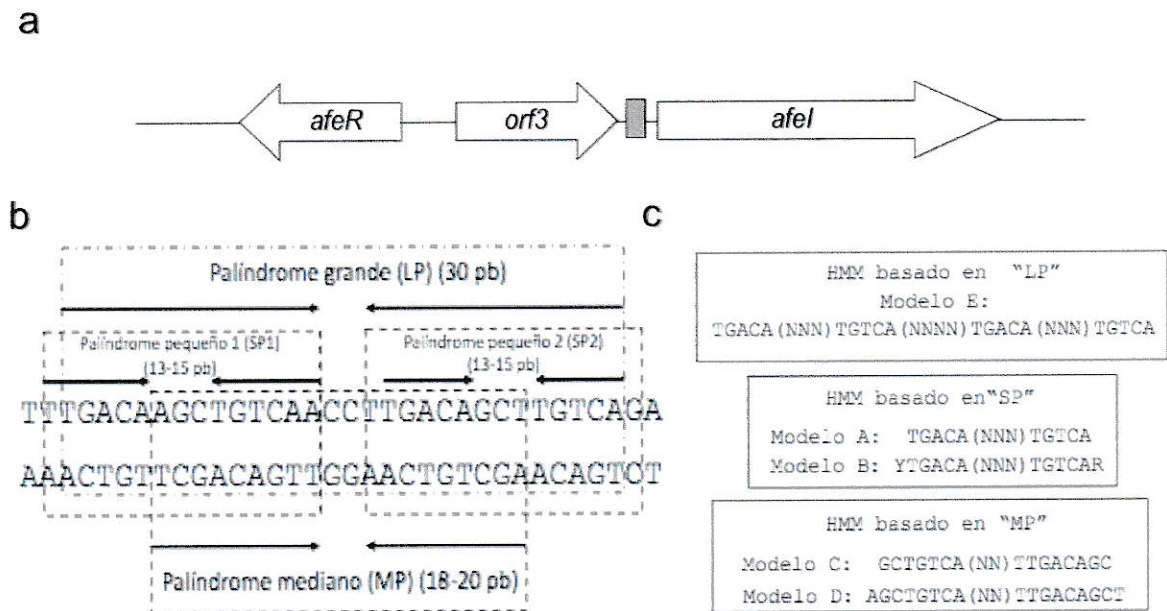
### 3. RESULTADOS

Los componentes del sistema de QS de *Acidithiobacillus ferrooxidans* han sido caracterizados previamente por nuestro laboratorio (Farah y col., 2005). Sin embargo, las funciones fisiológicas reguladas por este sistema son aún desconocidas. Por esta razón, la identificación del regulón QS de *A. ferrooxidans* es fundamental para caracterizarlas. Como aún no existe una estrategia de rutina que permita la manipulación genética de *A. ferrooxidans*, en este trabajo nos propusimos utilizar una aproximación bioinformática para alcanzar este objetivo, de manera similar a la descrita para otros microorganismos (Chambers y col., 2006). Esta estrategia se desarrolló en dos etapas. En primer lugar, se realizó una búsqueda *in silico* de sitios de unión para el regulador transcripcional AfeR, basándonos en la estructura del sitio propuesto por Farah y col. (2005). En segundo lugar, luego de identificar posibles genes regulados por AfeR, se realizaron estudios de la transcripción de este regulón hipotético, utilizando para esto macroarreglos de ADN y qPCR. Adicionalmente, y debido a las dificultades experimentales encontradas en los experimentos de transcripción, realizamos estudios sobre la producción nativa de moléculas de señalización con el fin de determinar las mejores condiciones para efectuar experimentos de modulación del sistema mediante la adición de AHLs exógenas.

### 3.1. Búsqueda *in silico* de sitios de unión del regulador transcripcional AfeR en la secuencia nucleotídica del genoma de *A. ferrooxidans*.

La caja *afe* es una secuencia palindrómica de 30 pb que se encuentra en la región intergénica entre los genes *afeI* y *orf3* del locus QS de *A. ferrooxidans*, que posee una inesperada complejidad de secuencia (Fig. 3) (Farah y col., 2005). En una primera etapa se definieron distintas zonas palindrómicas pertenecientes a la caja *afe* de acuerdo a la posición que ocupan respecto del centro de simetría y respecto del tamaño que poseen. El palíndromo de 30 pb ó “palíndromo grande”, (LP) puede ser subdividido en dos estructuras palindrómicas más pequeñas ó “palíndromos pequeños” (SP1 y SP2) de 13-15 pb (Fig. 3B). Estos palíndromos corresponden a cada mitad de la secuencia de 30 pb. Además, las secuencias SP1 y SP2 son repetidos invertidos uno del otro. Por otra parte, se definió un palidrome mediano de 18-20 pb (MP) que se ubica en la zona central de la secuencia de 30 pb (Fig 3B). A partir de cada uno de estos distintos palíndromos, se construyó una serie de modelos ocultos de Markov (HMM) diseñados para abarcar la complejidad de la secuencia de la caja *afe* y buscar secuencias similares en el genoma de *A. ferrooxidans*.

A partir de las secuencias “SP”, se diseñaron los HMMs “A” y “B” (Fig. 3C). Mientras que con la secuencia “MP” se diseñó los HMMs del tipo “C” y “D”. Finalmente, a partir de las secuencia “LP”, se diseñó el HMM de tipo “E”. Todos estos modelos fueron utilizados para buscar secuencias similares en todo el genoma de *A. ferrooxidans*, asumiendo que cualquier acierto o “hit” es un sitio de unión posible (PBS, “possible binding site”) para la proteína AfeR. Un PBS se definió como un fragmento de la secuencia genómica donde uno o más aciertos de cualquier secuencia predicha por HMM se encuentra en cualquiera de las dos hebras.



**Figura 3.** Generación de HMMs desde alineamientos hipotéticos basados en la secuencia de la caja *afe*. **a.** Locus QS de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. El rectángulo de color gris corresponde al sitio de la caja *afe*. **b.** Diferentes estructuras palindrómicas encontradas en la caja *afe*. Las flechas denotan los nucleótidos que presentan palindromía perfecta. Nótese que las secuencias SP1 y SP2 son repetidos invertidos. **c.** Representación de los alineamientos efectuados para generar los distintos HMMs.



### 3.1.1. Identificación de posibles sitios de unión de la proteína AfeR

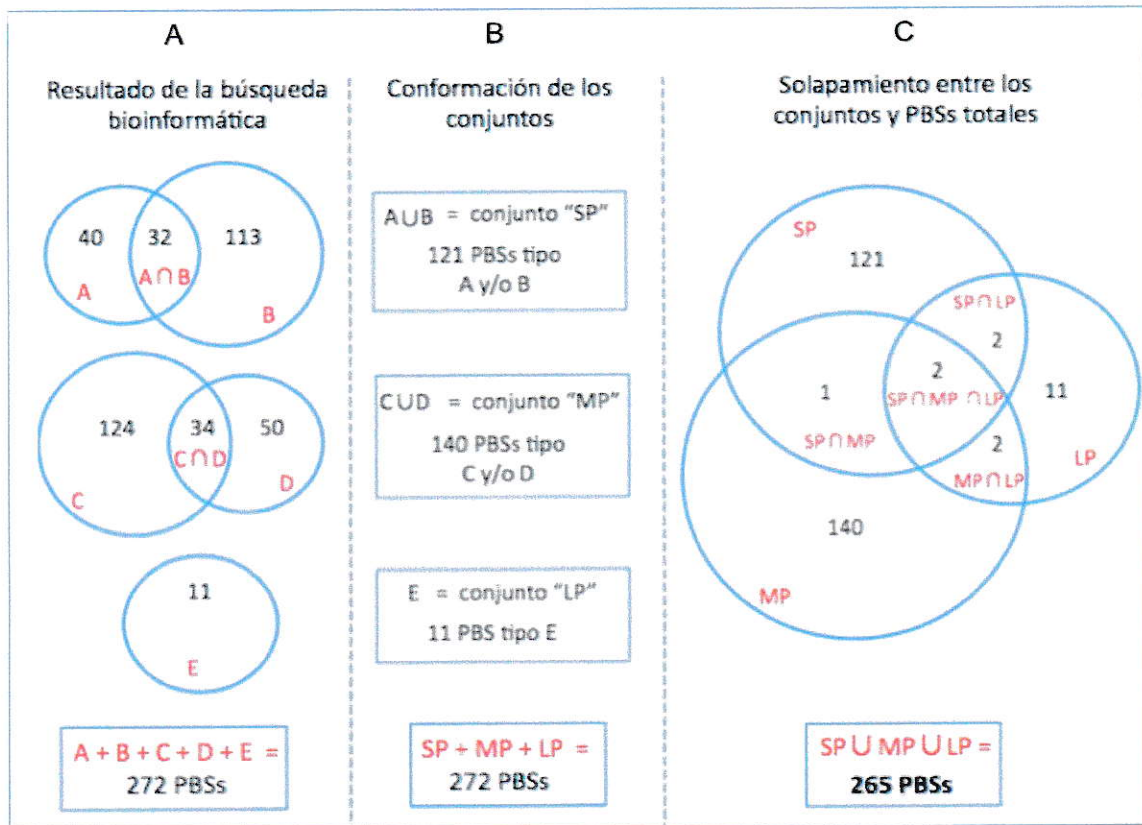
La búsqueda bioinformática efectuada en base a los distintos HMMs construídos, permitió la identificación de 338 PBS para la proteína AfeR (Fig. 4A). Como se observa, se obtuvieron 40 PBSs y 113 PBSs correspondientes a “hits” de los modelos “A” y “B”, respectivamente. De estos 153 PBSs, 32 correspondieron a solapamientos. Además, dos PBSs basados en el modelo “B”, se encontraron separados entre sí por un solo nucleótido, por lo que se consideró ambos “hits” como un solo PBS. Este análisis de los resultados positivos obtenidos con los HMMs de tipo “A” y “B” permitió definir el conjunto “SP” que posee 121 PBSs (Fig.4B).

Un análisis similar con los resultados obtenidos para los HMMs de tipo “C” y “D” permitió definir el conjunto MP, el cual está conformado por 140 PBSs. Finalmente, se definió un tercer conjunto llamado “LP”. Este corresponde a los resultados positivos obtenidos con el HMM tipo “E” y posee 11 PBSs (Fig. 4B).

Al analizar si existía algún grado de solapamiento entre los tres conjuntos (SP, MP y LP), se encontraron 5 sitios “dobles” ( $1 MP \cap SP + 2 MP \cap LP + 2 LP \cap SP$ ) y dos sitios “triples” ( $SP \cap MP \cap LP$ ).

Todos estos estudios bioinformáticos permitieron entonces identificar un número total de 265 PBSs (Fig. 4C).

Luego, se realizó el análisis de los contextos génicos de cada PBSs. Los PBS fueron agrupados en 3 grupos funcionales diferentes en base a su cercanía respectiva con un codón de inicio traduccional predicho y suponiendo que la probabilidad de funcionar como sitio regulador de la transcripción aumenta si éste se encuentra en las cercanías del sitio de unión de la ARN polimerasa (Fig. 5A).



**Figura 4.** Identificación de los 256 PBSs para AfeR en el genoma de *A. ferrooxidans*. En el panel de la izquierda se presentan los diagramas de Venn correspondientes a los resultados obtenidos a partir de los distintos tipos de HMMs. El número de sitios de unión putativos para cada tipo de modelo (conjuntos A, B, C, D y E) se muestran con números negros. La intersección de los conjuntos representa los "hits" que se encuentran solapados en el mismo locus. En el panel central se definen los conjuntos SP, MP y LP; la unión de los conjuntos representa el total de sitios de unión putativos del tipo SP (AUB) y MP (CUD). El conjunto "LP" es igual al conjunto "E", pues éste último consta de los resultados positivos encontrados a partir de un modelo único. En el panel de la derecha se muestra la intersección de los conjuntos SP, MP y LP. Ésta representa el número de sitios en el genoma donde se encontró un solapamiento de las secuencias de los "hits". En la parte inferior de cada panel se indica el número de PBSs para cada análisis. El número final es de 265 PBSs.

Los PBSs del “Tipo I” (33) y “Tipo II” (51) se encontraron distribuidos en proporción muy similar entre los conjuntos SP, MP y LP. Los PBSs del “Tipo III” se encontraron casi igualmente distribuidos entre los conjuntos (Fig 5B). Un parámetro de densidad arbitrario, *i.e.* “PBSs por megabase de regiones de ADN posible para cada conjunto” fue calculado para indagar si los PBSs tenían algún tipo de “preferencia” de por las regiones IG. La figura 5C muestra que los PBS son más densos en las regiones IG “sentido” que en otras regiones y que esto ocurre por una “preferencia” de los PBSs basados en el modelo “SP” y no por los PBS basados en el modelo MP. Los PBSs basados en el modelo “LP” también resultaron ser más densos en regiones IG pero los valores de densidad son bajos comparados con los otros modelos. Los sitios dobles y triples fueron excluidos de este análisis.

Con el objetivo de caracterizar más aún el contexto genético en el cual se encuentra cada uno de los 84 PBSs pertenecientes a los grupos del Tipo I y del Tipo II, se utilizó la herramienta MEME para buscar motivos regulatorios en común.

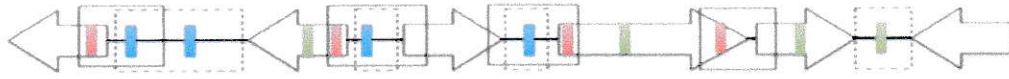
### **3.1.2. Refinamiento mediante la herramienta MEME (algoritmo esperanza-maximización múltiple para la obtención de motivos).**

Con el objetivo de refinar la búsqueda bioinformática efectuada, se utilizaron los 84 PBS del tipo I y II, incluyendo sus contexto génico próximo (80 nucleótidos río arriba y 80 río abajo de cada PBS) como entrada para el programa MEME (Timothy et al., 1994).

La herramienta MEME fue utilizada como una estrategia de validación dado que busca motivos en común en un conjunto de secuencias nucleotídicas. Por esta razón, la secuencia palindrómica ubicada río arriba del gen *afeI* no fue usada en la entrada de

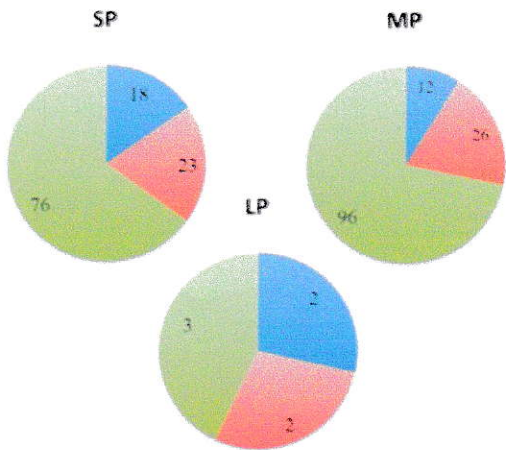


A

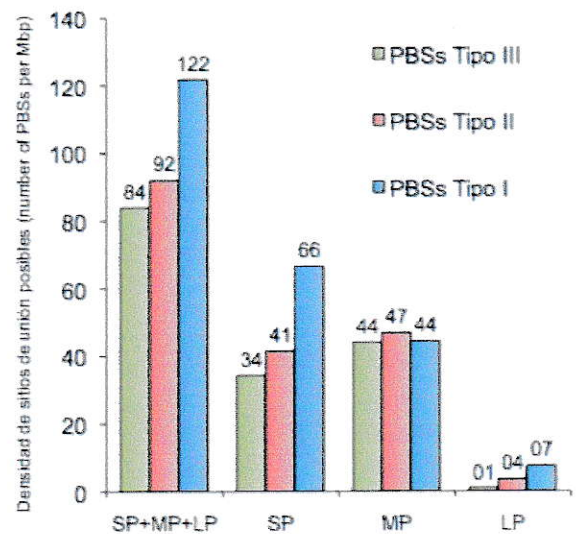


Tipo de PBS	Definición Funcional
PBSs del "tipo I"	Son 33 y están localizados en una zona intergénica (zonas IG) o que solapan con una región intergénica que posee un sitio de unión traduccional predicho en su proximidad (IG "sentido").
PBSs del "tipo II"	Son 51 y se encuentran 200 pb río arriba y 50 pb río abajo de un codón de inicio de la traducción predicho, pero no dentro de una región IG.
PBSs del "tipo III"	Consiste de los 181 PBSs que no son parte de los grupos "Tipo I" o "Tipo II." Todos los PBSs pertenecientes al conjunto "Tipo III" fueron descartados como sitios de unión probables, debido a que su ubicación hace improbable la regulación del inicio de la transcripción.

B



C



**Figura 5.** Distribución de los 265 PBSs en la secuencia genómica de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. **A.** Definición y representación de la ubicación de los PBSs (rectángulos coloreados) pertenecientes a los conjuntos "Tipo I" (azul), "Tipo II" (rojo) y "Tipo III" (verde). Las cajas con línea punteada representan zonas intergénicas. Las cajas con línea continua indican las "zonas de 250 pb" permitidas (ver texto). **B.** Distribución en los conjuntos Tipo I (azul), Tipo II (rojo) y Tipo III (verde), de los PBSs basados en modelos SP, MP y LP. No se contabilizan los sitios dobles y triples (7 sitios, incluyendo 1 del tipo I). **C.** Densidad comparada de los PBSs basados en los modelos SP, MP y LP para cada uno de los tres conjuntos posibles. Las densidades fueron calculadas dividiendo el número de PBSs en cada grupo por el número total de bases en el genoma de *A. ferrooxidans* disponible para cada grupo [*i. e.* pb intergénicas totales en el genoma (total IG) para el Tipo I; suma de todas las "zonas de 250 pb" en el genoma menos las pb intergénicas totales en el genoma para el Tipo II; y pb totales en el genoma menos la suma de las "zonas de 250 pb" en el genoma para el tipo III].



esta búsqueda. Este análisis permitió identificar un motivo de 18 pb en la gran mayoría de los PBSs pertenecientes al conjunto MP. El motivo encontrado es el mismo que fue detectado por los HMMs C y/o D para este conjunto. Por otra parte, al utilizar como entrada las secuencias pertenecientes al conjunto "SP", no se identificó un motivo en común MEME de 13-14 pb. Interesantemente, el motivo de 18 bp pudo ser identificado en algunas de las secuencias de entrada pertenecientes al conjunto SP. Éstos se encontraron cerca, o bien, solapando la secuencia SP correspondiente. Estos nuevos motivos no fueron detectados como PBSs basados en MP en la búsqueda HMM previa. En total, de las 84 entradas, 29 motivos MEME fueron encontrados.

Los PBSs seleccionados que también compartían el motivo de 18 pb MEME (29 PBSs), incluyendo los nuevos localizados en las entradas que contenían SPs fueron alineadas y una secuencia consenso fue generada utilizando MultAlin (Corpet, 1988) (Fig. 6).

La salida del programa MEME provee una matriz de puntaje posición-específica (PSSM) para el motivo predicho. La PSSM generada para el motivo de 18 pb MEME fue utilizado como entrada para el programa MAST (motif alignment and search tool) (Bailey y Gribskov, 1998). La base de datos utilizada para esta nueva búsqueda fue el conjunto de regiones intergénicas del genoma de *A. ferrooxidans*. De esta manera, siete nuevos motivos fueron encontrados. El e-value más bajo correspondió al palíndrome MP perteneciente al gen *afeI*. Dos de estos motivos se localizaron en regiones intergénicas entre ORFs convergentes. Otros dos motivos corresponden a aquellos localizados río arriba del gen *afeR* y río arriba de AFE\_0966 (anotada como una proteína asociada a virulencia).

```

1          10          18
|-----+-----|
GCTGCCAATGGCCAGC
GCCGCCAGATTGCCAGC
GCAGCCCAATGTGACAGC
GCAGTCAATGCTGCCCGC
GCAGGCCATGCTGACAC
GCGGTCAGTATCGCCAGC
TCGGTCATGATTGACTGC
GCTATCATGTTTGACAGA
GCGAGCAGGATTGACAGA
GCTATCCTGCTCGACAGC
CCTGCCAGTCTTGACAGT
ACTGCCATTTTTGGCAGC
ACTGACCATGTTGACAGA
ACCGTCTATTTTGACAGG
TCCGTCATTGTTGATAGA
TTTTTCAAATCGACAGC
ATTATCAAGTTGACCGA
CTGATCGATATTGACAGC
CGTATCCATATCGACAGA
GATGGTGATGTTGACAGC
GCTTGCCGCATTGGCAGG
AGTGTCAACCCTGACAGG
TCTGTCTACTGGGACAGC
GAGGTCARCCGGGACAGC
GCTGTAAACGTGGCAGT
GATTTCAAGGGTGGCAGC
CGCTTCAAGCTTGCCAGC
ACCAGCAATATCGCCCGC
ACTAGCCACCCTGCCCGT
.ctgtCaa..tGCaGc

```

Figura 6. Alineamiento de los 29 motivos encontrados por el algoritmo MEME. Una secuencia consenso se incluye al final de la lista. Los nucleótidos con un nivel de identidad igual o mayor a 90% o más se destacan en rojo. Los iguales ó mayores a 50% en azul y los menores a 50%, en negro. En el consenso sólo se incluyen los nucleótidos rojos y azules.

Un nuevo motivo fue encontrado en la región intergénica río arriba del ORF AFE\_1580 (anotada como "nifW protein"). Finalmente otro nuevo motivo se localizó entre los ORFs divergentes AFE\_0308 y AFE\_0309, anotados como "glyoxalase family protein" y "Ada family-ADN-3-methyladenine glycosylase II transcriptional regulator", respectivamente.

### **3.1.3. Identificación de funciones génicas putativas reguladas por el regulador transcripcional AfeR.**

En base a los resultados obtenidos mediante los diferentes análisis bioinformáticos realizados (identificación de PBSs, el refinamiento mediante el algoritmo MEME y búsqueda de promotores tipo sigma 70 cercanos), se seleccionaron como posibles sitios de unión para el regulador transcripcional AfeR todos los 33 PBSs del "Tipo I" y los 29 PBSs del "Tipo" cuya posición solapó (o casi solapó) un promotor consenso del tipo Sigma 70. Es decir, se seleccionaron 62 PBSs

Estos 62 PBSs seleccionados permitieron identificar 75 genes que podrían conformar el regulón QS de *A. ferrooxidans* y entonces, ser regulados por AfeR (tabla 4).



**Tabla 4.** Caracterización de los PBSs seleccionados en términos de sus contextos genéticos.

PBS	Tipo de HMM	Inicio	Fin	Motivo MEME <sup>a</sup>	Divergón	Solapaje Bprom <sup>b</sup>	locus TIGR <sup>c</sup>	Nº de gen	TIGR Common Name <sup>d</sup>	TIGR Gene Symbol	Mainrole	TIGR subrole
1	SP	4054	4066	NO	NO	US -35	AFE_0003	1	cytochrome c-type biogenesis protein ResB, putative	ND	Energy metabolism	Electron transport
2	SP	6274	6288	NO	NO	-35	AFE_0005	2	ubiquinol--cytochrome c reductase, cytochrome b subunit	petB-1	Energy metabolism	Electron transport
3	SP	313239	313253	NO	NO	NP	AFE_0313	3	cell division topological specificity factor MinE	minE	Cellular processes	Cell division
4	SP	333302	333316	NO	NO	DS -10	AFE_0333	4	membrane protein	ND	Cell envelope	Other
5	SP	550420	550434	NO	SI	US -35	AFE_0570	5	HP <sup>f</sup>			
						DS -10	AFE_0571	6	transcriptional regulator, LysR family	ND	Regulatory functions	DNA interactions
6	SP	600304	600318	NO	SI	NP	AFE_0634	7	ISAfe4, transposase orf1	ND	Mobile and extrachromosomal element functions	Transposon functions
						-35	AFE_0635	8	acetyltransferase, GNAT family	ND	Unknown function	Enzymes of unknown specificity
7	SP	737549	737561	NO	NO	DS -10	AFE_0784	9	phosphohistidine phosphatase SixA	sixA	Regulatory functions	Protein interactions
8	SP	768189	768201	NO	NO	-10	AFE_0817	10	phosphonate metabolism protein PhnJ	phnJ	Central intermediary metabolism	Phosphorus compounds
9	SP	850160	850174	NO	SI	-35	AFE_0896	11	cytosol aminopeptidase	pepA	Protein fate	Degradation of proteins, peptides, and glycopeptides
						US -35	AFE_0897	12	YjgP/YjgQ family protein	ND	Unknown function	General
10	SP	885280	885294	NO	NO	-10	NA <sup>g</sup>	13	HP			



Tabla 4 (continuación)

11	SP	951716	951730	NO	SI	NP	NA	14	COG0778 Nitroreductase			
						NP	AFE_0998	15	HP			
12	SP	1028996	1029008	NO	NO	-10	AFE_1069	16	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	zwf	Energy metabolism	Pentose phosphate pathway
13	SP	1106757	1106769	cerca	NO	NP	AFE_1148	17	HP			
14	SP	1586581	1586593	NO	NO	DS -10	AFE_1682	18	HP			
15	SP	1607994	1608008	NO	NO	NP	AFE_1705	19	transposon, orf2	ND	Mobile and extrachromosomal element functions	Transposon functions
16	SP	1709293	1709307	NO	NO	DS -10	AFE_1834	20	HP			
17	SP	1850688	1850702	cerca	NO	DS -10	AFE_1992	21	HP			
18	SP	1850704	1850718	OL	NO	-10			HP			
19	SP	1889085	1889099	cerca	SI	NP	AFE_2049	22	HP			
						US -35	AFE_2050	23	transcriptional regulator, putative	ND	Regulatory functions	DNA interactions
20	SP	1953995	1954009	NO	NO	NP	AFE_2112	24	alanyl-tRNA synthetase	alaS	Protein synthesis	tRNA aminoacylation
21	SP	2106084	2106098	NO	NO	NP	AFE_2274	25	HP			
22	SP	2178993	2179005	NO	SI	-10	AFE_2347	26	sigma-54 dependent transcriptional regulator	ND	Regulatory functions	DNA interactions
						-10	AFE_2348	27	oxidoreductase alpha (molybdopterin) subunit	ND	Unknown function	Enzymes of unknown specificity
23	SP	2213517	2213531	NO	NO	NP	AFE_2384	28	ABC transporter, ATP-binding protein	ND	Transport and binding proteins	Unknown substrate
24	SP	2294265	2294277	OL	NO	US -35	AFE_2469	29	ErfK/YbiS/YcfS/YnhG family	ND	Unknown function	General
25	SP	2447800	2447814	NO	NO	DS -10	AFE_2633	30	argininosuccinate synthase	argG	Amino acid biosynthesis	Glutamate family

Tabla 4 (continuación)

26	SP	2701136	2701148	NO	SI	US -35	AFE_2917	31	RND efflux system, outer membrane lipoprotein, NodT family	ND	Transport and binding proteins	Unknown substrate
						US -35	AFE_2918	32	DNA-binding response regulator	ND	Regulatory functions	DNA interactions
27	SP	2703256	2703270	NO	NO	NP	AFE_2920	33	metal ion transporter, NRAMP family	ND	Transport and binding proteins	Cations and iron carrying compounds
28	SP	2918334	2918348	NO	SI	US -35	AFE_3141	34	type III restriction-modification system, Res subunit	ND	DNA metabolism	Restriction/modification
						-35	AFE_3142	35	HP			
29	SP	2925935	2925949	NO	NO	-10	AFE_3150	36	transposase, interruption-N	ND	Disrupted reading frame, Mobile and extrachromosomal element functions	Transposon functions
30	MP	208975	208992	SI	NO	DS -10	AFE_0196	37	SpoVR like family protein	ND	Unknown function	General
31	MP	307438	307455	SI	NO	-35	AFE_0305	38	FMN reductase, NADPH-dependent	ND	Unknown function	Enzymes of unknown specificity
32	MP	321301	321319	NO	NO	-10	AFE_0319	39	HP			
33	MP	330306	330323	SI	NO	NP	AFE_0330	40	HP			
34	MP	756920	756939	SI	SI	-10	AFE_0804	41	ABC transporter, ATP-binding protein, authentic frameshift	ND	Transport and binding proteins	Unknown substrate
						NP	AFE_0806	42	TonB-dependent receptor	ND	Transport and binding proteins	Cations and iron carrying compounds
35	MP	917735	917752	SI	NO	NP	AFE_0966	43	virulence-associated protein, putative	ND	Cellular processes	Pathogenesis
36	MP	950356	950375	SI	NO	NP	AFE_0996	44	HP			
37	MP	1204235	1204252	SI	NO	NP	AFE_1253	45	RNA polymerase sigma-70 factor family	ND	Transcription	Transcription factors



Tabla 4 (continuación)

38	MP	1334629	1334646	SI	NO	DS -10	AFE_1391	46	conjugal transfer protein	ND	Cellular processes	Conjugation
39	MP	1426583	1426602	SI	NO	DS -10	AFE_1498	47	HP			
40	MP	1629125	1629142	SI	NO	DS -10	AFE_1727	48	glycosyl transferase, group 1 family protein	ND	Cell envelope	Biosynthesis and degradation of surface polysaccharides and lipopolysaccharides
41	MP	1629185	1629202	NO	NO	-35						
42	MP	1927552	1927571	SI	SI	-35	AFE_2090	49	sigma-54 dependent transcriptional regulator	ND	Regulatory functions	DNA interactions
						US -35	AFE_2091	50	metallo-beta-lactamase family protein	ND	Unknown function	Enzymes of unknown specificity
43	MP	1931479	1931498	SI	NO	-10	AFE_2095	51	HP			
44	MP	2212783	2212799	NO	NO	-10	AFE_2382	52	transcription termination factor Rho	rho	Transcription	Transcription factors
45	MP	2283085	2283104	SI	NO	NP	AFE_2457	53	HP			
46	MP	2285219	2285236	cerca	NO	DS -10	AFE_2461	54	membrane protein, putative	ND	Cell envelope	Other
47	MP	2323662	2323679	NO	SI	NP	AFE_2493	55	thiol:disulfide interchange protein DsbD	dsbD	Energy metabolism, Protein fate	Electron transport, Protein folding and stabilization
						US -35	AFE_2494	56	conserved hypothetical protein	ND	Hypothetical proteins	Conserved
48	MP	2396408	2396425	SI	NO	-35	AFE_2573	57	HP			
49	MP	2457694	2457713	SI	NO	NP	AFE_2644	58	tRNA pseudouridine synthase B	truB	Protein synthesis	tRNA and rRNA base modification
50	MP	2557188	2557207	SI	NO	-35	AFE_2759	59	metallo-beta-lactamase family protein	ND	Unknown function	Enzymes of unknown specificity
51	MP	2573669	2573686	SI	NO	NP	AFE_2777	60	ribonuclease T	rnt	Transcription	RNA processing

Tabla 4 (continuación)

52	MP	2581112	2581129	SI	NO	DS -10	AFE_2787	61	RNA methyltransferase, TrmH family, group 2	ND	Protein synthesis	tRNA and rRNA base modification
53	MP	2590876	2590893	SI	NO	DS -10	AFE_2795	62	glycosyl transferase, group 2 family protein	ND	Cell envelope	Biosynthesis and degradation of surface polysaccharides and lipopolysaccharides
54	MP	2659033	2659053	SI	NO	-10	AFE_2865	63	toluene tolerance protein, putative	ND	Cellular processes	Detoxification
55	MP	2665264	2665281	SI	SI	US -35	AFE_2873	64	integral membrane protein	ND	Cell envelope	Other
						-10	AFE_2874	65	HP			
56	MP	2742909	2742926	SI	NO	NP	AFE_2968	66	aspartyl-tRNA synthetase	aspS	Protein synthesis	tRNA aminoacylation
57	MP	2968437	2968456	SI	NO	US -35	AFE_3204	67	HP			
58	MP	456793	456822	NO	SI	-35	AFE_0467	68	ribonucleotide-diphosphate reductase, alpha subunit	nrdA	Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides	2'-Deoxyribonucleotide metabolism
						DS -10	AFE_0468	69	tldD protein	tldD	Regulatory functions	Other
59	MP	1646735	1646764	NO	NO	DS -10	AFE_1742	70	polysaccharide biosynthesis/export domain protein	ND	Cell envelope; Transport and binding proteins	Biosynthesis and degradation of surface polysaccharides and lipopolysaccharides; Carbohydrates, organic alcohols, and acids
60	MP	2022594	2022623	NO	SI	DS -10	AFE_2189	71	HP			
						-35	AFE_2190	72	translation elongation factor P	efp	Protein synthesis	Translation factors
61	MP	2203825	2203854	NO	NO	NP	AFE_2374	73	YCII-related domain protein	ND	Unknown function	General



Tabla 4 (continuación)

62	MP-LP	1047761	1047789	SI	SI	-35	AFE_1095	74	HP			
						-35	AFE_1096	75	autoinducer-binding transcriptional regulator, LuxR family	ND	Regulatory functions	DNA interactions

<sup>a</sup> Secuencias de los PBSs seleccionados con regiones de 80 pb adicionales de cada lado fueron utilizadas como entradas para el programa MEME para buscar motivos de secuencia compartidos. "NO" quiere decir que ningún motivo fue encontrado por el programa MEME. "SI" quiere decir que MEME encontró el PBS correspondiente como el motivo en común. "cerca" quiere decir que el motivo fue encontrado dentro de la secuencia de entrada pero que no es el PBS correspondiente. "OL" quiere decir que el motivo en común solapa el PBS correspondiente, pero no es la misma secuencia.

<sup>b</sup> Los PBSs seleccionados con regiones de 100 pb de cada lado fueron utilizados como entrada para la herramienta de predicción Bprom para la búsqueda de promotores consenso del tipo  $\sigma^{70}$ . "-35" quiere decir que el PBS solapó el elemento -35 predicho. "-10" quiere decir que el PBS solapó el elemento -10 predicho. "DS -10" significa que el PBS predicho se encontró río abajo del elemento -10 predicho. "US -35" quiere decir que el PBS se ubicó río arriba del elemento -35 predicho. "NP" quiere decir que no hubo predicción de promotor of  $\sigma^{70}$  para el PBS correspondiente. La ausencia de promotores solapando muchos de los PBSs no indica necesariamente que éstos no existen, sino que indica que no pudieron ser detectados por la herramienta de predicción Bprom.

<sup>c</sup> Identidad del ORF asignada por TIGR. "NA" quiere decir que el ORF no fue anotado como tal en TIGR.

<sup>d</sup> Identidad del product génico asignado por TIGR. "HP" quiere decir que el producto génico es una proteína hipotética o una proteína hipotética conservada.

<sup>e</sup> Nombre del gen asignado por TIGR. "ND" significa que no hay datos disponibles

<sup>f</sup> Las proteínas hipotéticas no tienen roles o subroles TIGR

<sup>g</sup> Los ORFs no anotados fueron curados manualmente.

### **3.2. Análisis transcripcional de un grupo de genes posiblemente relacionados con el sistema de QS de *A. ferrooxidans* mediante miniarreglos de ADN**

Con el objetivo de comparar los niveles de expresión de los genes que podrían conformar el regulón QS de *A. ferrooxidans*, en presencia y ausencia de AHLs, se construyó una membrana de miniarreglo de ADN. Los 75 genes identificados mediante el análisis bioinformático descrito en la sección anterior (tabla 4) representan el conjunto “ideal” de genes para ser analizados. Sin embargo, algunos de éstos no están presentes en la membrana de miniarreglo de ADN dado que la construcción de ésta, se efectuó al momento de tener los resultados para solamente 4 de los 5 HMMs utilizados en este estudio (HMMs “A”, “B”, “C” y “D”, sección 2.5.1). Más aún, en el momento de efectuar la selección de genes, la anotación del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 no se encontraba disponible, razón por la cual, una serie de ORFs no fueron identificados como tales. Esta selección, por otra parte, se efectuó previamente a la búsqueda de promotores consenso sigma 70, lo que implica un “filtro” menos y, por ende, más PBSs. El total de genes seleccionados para ser impresos, tomando las consideraciones antes expuestas, es de 80 ORFs (Anexo 1).

#### **3.2.1. Construcción del miniarreglo de ADNc.**

Hasta este momento, se habían seleccionado 80 genes para ser impresos en el miniarreglo. Éstos poseían un PBS del tipo I o II en la cercanía de su inicio traduccional predicho. Por otra parte, en base a antecedentes provenientes de la literatura, se habían agregado otros seis genes. Tres de éstos tienen relación con la producción de sustancias exopoliméricas, lo cual está regulado por QS en diferentes bacterias Gram negativa (Parsek y Greenberg, 2005): *manC* (manosa-1-fosfato-guanidil-

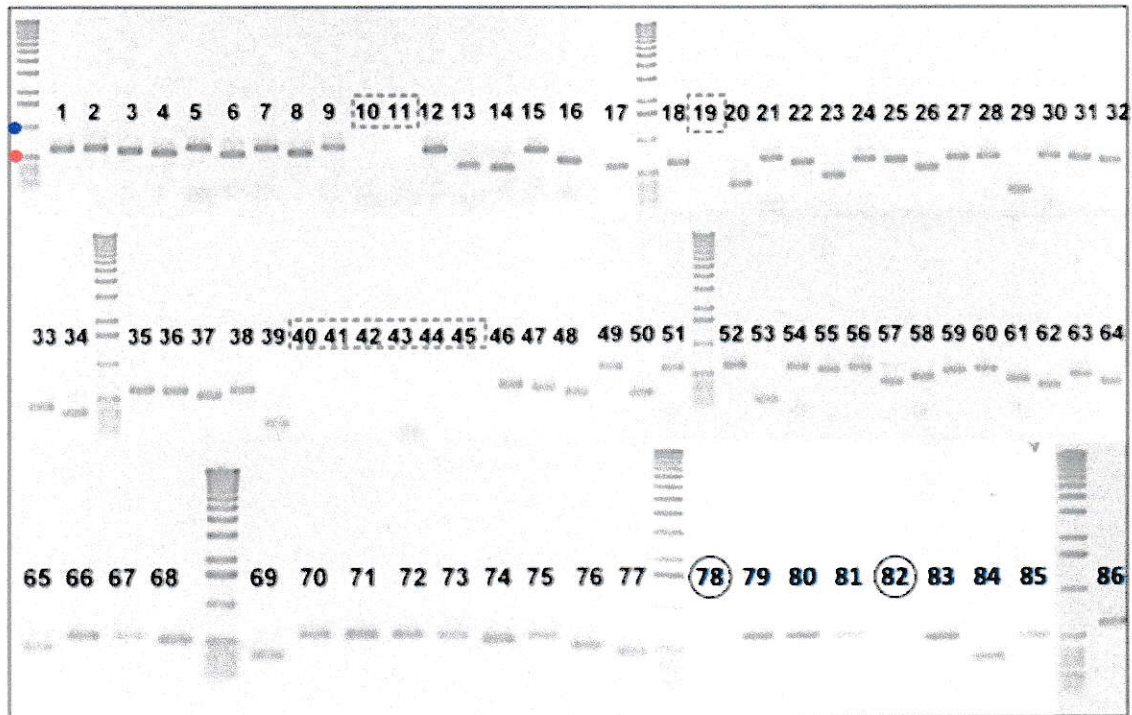
transferasa), *galE* (UDP-galactosa 4-epimerasa) y *wza* (proteína periplásmica con un dominio de transporte de polisacáridos). De ellos, *hfq* (chaperona de unión a ARN, regula transcritos relacionados con QS en *Vibrios* y *Pseudomonas*) (Lenz y col., 2004; Sonnleitner y col., 2006) y *hdtS* (que codifica una proteína capaz de sintetizar *N*-acil homoserina lactona, y posee varias actividades fosfato acil transferasa) (Laue y col., 2000), son reguladores de componentes de sistemas de QS en otras bacterias (Laue y col., 2000; Lenz y col., 2004). Por último, y aunque no hayan referencias que lo relacionen con QS, se decidió amplificar el gen de la proteína rusticianina, una de las proteínas más abundantes de *A. ferrooxidans* y fundamental en la oxidación del ión ferroso (Ramirez y col., 2004). Por lo tanto, el total de genes seleccionados para ser amplificados e impresos en la membrana de miniarreglo fue de 86 (tabla 3). La información completa de la anotación de estos 86 genes se presenta en los anexos 1 y 2.

De los 86 genes mencionados, 77 fueron amplificados por PCR con éxito (Fig. 7; Anexo 1). Mientras que nueve no pudieron ser amplificados bajo las condiciones utilizadas (Anexo 2). Para cada gen con amplificación exitosa, se obtuvieron fragmentos de aproximadamente 600 pb utilizando la enzima *Taq* ADN polimerasa. Los genes cuyo tamaño fue inferior a 600 pb se amplificaron por completo. Estos 77 genes fueron finalmente impresos en la membrana de miniarreglo (Fig. 8, celdas amarillas, azules y rojas).

### **3.2.2. Experimentos de incubación y crecimiento de *A. ferrooxidans* en presencia AHLs**

Con el objetivo de estudiar si la represión de estos genes es regulado por QS, se decidió incubar células de *A. ferrooxidans* con una mezcla de AHLs sintéticas de





**Figura 7.** Amplificación de los 86 genes seleccionados para ser impresos en el miniarreglo de ADNc. El número que se indica en cada carril equivale a los indicados anteriormente (Tabla 3). Los carriles que no tienen número corresponden a estándares de peso molecular (1 kb DNA ladder, Invitrogen). Los puntos azul y rojo indican las bandas del estándar de 1018 pb y 506 pb, respectivamente. Todos los fragmentos amplificados poseen el tamaño esperado. Aquellos carriles que se encuentran enmarcados en rectángulos con línea punteada, corresponden a los 9 genes que no lograron ser amplificados en ninguna de las condiciones probadas (anexo 2). Aquellos carriles cuyos números se encuentran encerrados en un círculo, fueron amplificados en una reacción posterior (no mostrado).



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	<i>exp-1</i>	<i>ResB</i> (1)	<i>PetB</i> (2)	<i>ManC</i> (3)	<i>Tdr</i> (4)	<i>SpoVR</i> (5)	<i>Ndr</i> (6)	<i>hyp_0</i> (7)	<i>PheS</i> (8)	<i>LysR</i> (9)	<i>galE</i> (12)
B	<i>AFE0053</i>	<i>SixA</i> (13)	<i>ccmA</i> (14)	<i>FhuA</i> (15)	<i>fkbM</i> (16)	<i>PepC</i> (17)	<i>yjgP/Q</i> (18)	<i>hyp_2</i> (20)	<i>Nre</i> (21)	<i>PldC-2</i> (22)	<i>MobB</i> (23)
C	<i>AFE1360</i>	<i>TrpB</i> (24)	<i>Zwf</i> (25)	<i>ThiJ/Pfpl</i> (26)	<i>DacB</i> (27)	<i>hyp_4</i> (28)	<i>Hfq</i> (29)	<i>AcrA-1</i> (30)	<i>hyp_5</i> (31)	<i>RpoS</i> (32)	<i>hyp_6</i> (33)
D	<i>AFE1373</i>	<i>TrbF</i> (34)	<i>TrbL</i> (35)	<i>hyp_7</i> (36)	<i>AhpC</i> (37)	<i>GnnA</i> (38)	<i>hyp_8</i> (39)	<i>OpgG</i> (46)	<i>RocR</i> (47)	<i>GloB</i> (48)	<i>AlaS</i> (49)
E	<i>AFE1379</i>	<i>HesB</i> (50)	<i>Rho</i> (51)	<i>Atp</i> (52)	<i>hyp_11</i> (53)	<i>hyp_12</i> (54)	<i>hyp_13</i> (55)	<i>DsbD</i> (56)	<i>hyp_14</i> (57)	<i>KdsB</i> (58)	<i>RecN</i> (59)
F	<i>AFE1852</i>	<i>ArgC</i> (60)	<i>TruB</i> (61)	<i>RplF</i> (62)	<i>β-lac2</i> (63)	<i>RibT</i> (64)	<i>TrmH</i> (65)	<i>WcaA</i> (66)	<i>Ttg2</i> (67)	<i>hyp_15</i> (68)	<i>hyp_16</i> (69)
G		<i>AcrA-2</i> (70)	<i>TolC</i> (71)	<i>OmpR</i> (72)	<i>Nra</i> (73)	<i>AspR</i> (74)	<i>hyp_17</i> (75)	<i>Tr_2</i> (76)	<i>hyp_18</i> (77)	<i>Rus</i> (78)	<i>ShyB</i> (79)
H		<i>plsC/hdtS1</i> (80)	<i>mtfA</i> (81)	<i>wcbE</i> (82)	<i>PhnJ</i> (83)	<i>AfeI</i> (84)	<i>Orf3</i> (85)	<i>AfeR</i> (86)	<i>Actina</i>	<i>DMSO 40%</i>	<i>exp-1</i>

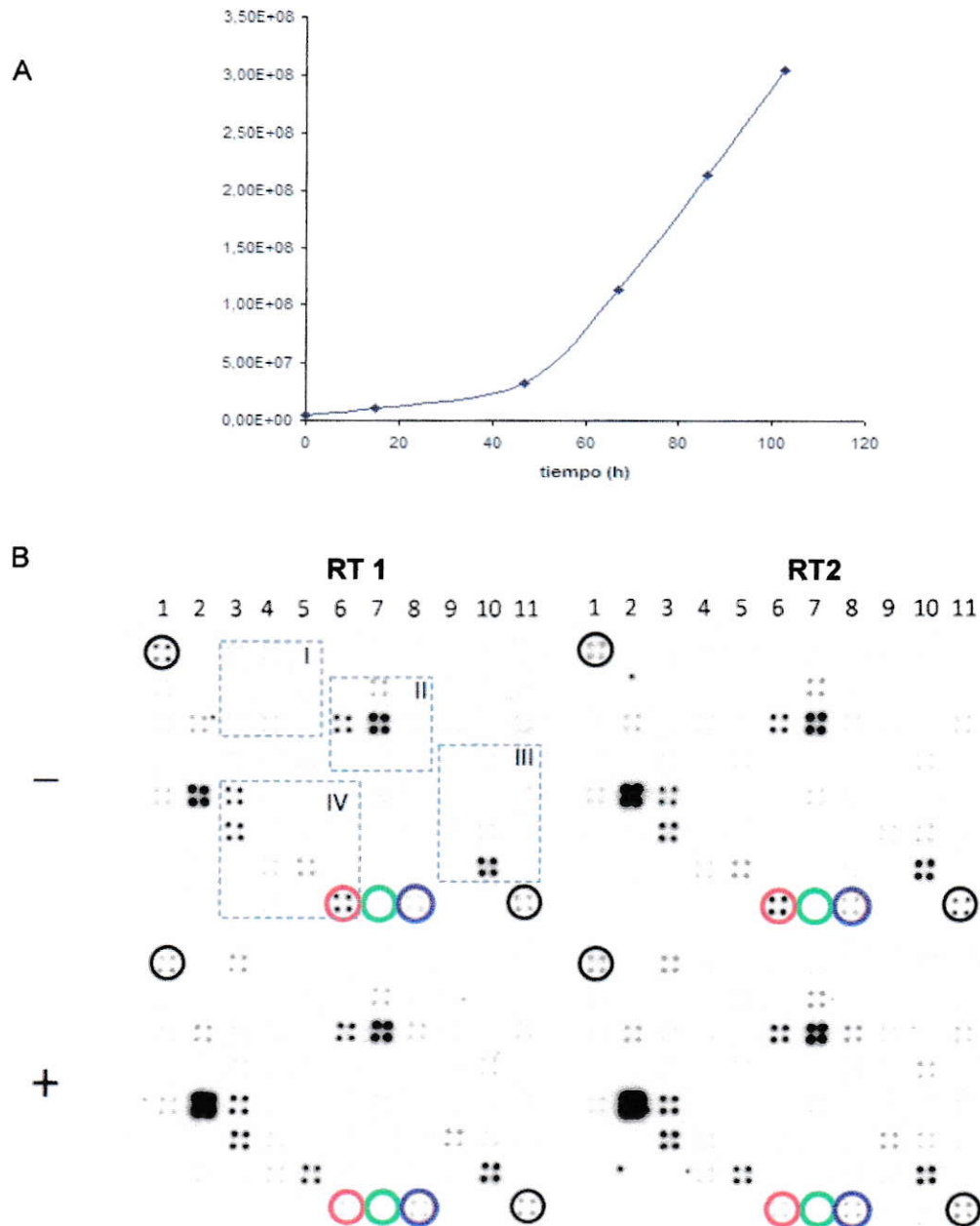
**Figura 8.** Organización de la membrana del miniarreglo de ADN. Las celdas con fondo amarillo corresponden a genes seleccionados tras el análisis bioinformático. Las celdas destacadas en azul corresponden a genes que han sido relacionados con QS en otros microorganismos pero que no poseen PBS alguno en su cercanía. Las celdas destacadas en rosado corresponden a genes no relacionados con este experimento (Tesis de doctorado de Lina Ruiz). Los números en la parte inferior de cada gen corresponden a aquellos utilizados en la Tabla 3. Las celdas destacadas en verde corresponden a controles. Actina = Control negativo, amplicón correspondiente al gen *act* obtenido a partir de células CaCo2. DMSO 40% = control negativo corresponde a la solución en la cual los fragmentos se encuentran disueltos. *exp-1* corresponde al cADN del gen de la expansina-1 de *Prunus persica*. Éste control corresponde al control de normalización utilizado en la cuantificación de los diferentes "spots" en el miniarreglo.

cadena lateral larga con y sin sustituciones en el carbono 3. Las células de *A. ferrooxidans* se crecieron en medio tiosulfato DSMZ 71 hasta fase exponencial (Fig. 9A). Luego, fueron recolectadas y lavadas 3 veces para eliminar las moléculas de AHLs endógenas. Posteriormente, estas células fueron concentradas hasta  $1 \times 10^{10}$  células/ml en un volumen final de 6 ml y expuestas a 50  $\mu$ M de la mezcla 1 de AHLs (C10, C12, C14, C16, oxo-C10, oxo-C12, oxo-C14 y oxo-C16) durante 5 horas. Las células fueron contadas antes y después de la incubación, no observándose crecimiento. Una vez finalizada la incubación, las células fueron colectadas y se efectuaron las extracciones de ARNs totales. A partir de estos ARNs se sintetizaron las sondas de ADNc marcadas radiactivamente. Estas sondas fueron utilizadas para hibridizar las membranas del miniarreglo de ADN (Fig. 9B).

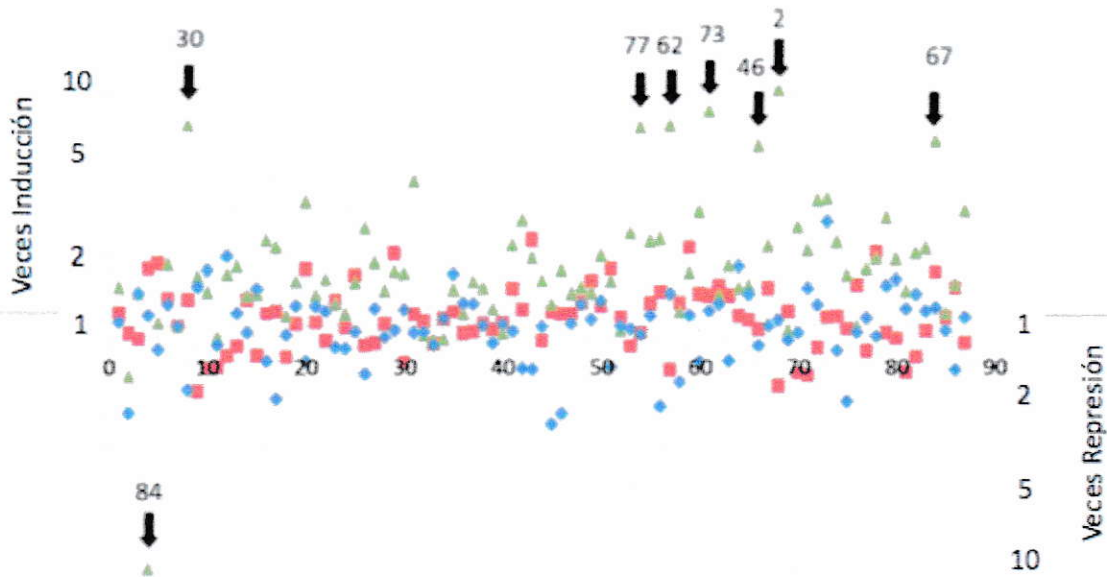
Luego de revelar los resultados obtenidos utilizando el Molecular Image FX (Biorad), se realizó un análisis densitométrico (Versarray, Biorad). Posteriormente, se normalizaron los datos en base al promedio de las intensidades del ARN spiked (*exp-1*) en cada membrana (Fig. 10). Las series de puntos rojos y azules representan la variación experimental técnica. La serie verde representa la variación normalizada entre la condición control y la condición experimental. Asumiendo que una variación de 5 veces era biológicamente significativa, fue posible identificar siete genes cuya expresión fue inducida en presencia de la mezcla de AHLs y un gen cuya expresión fue reprimida (Fig. 10).

Los "spots" correspondientes a estos ocho genes antes mencionados se encuentran dentro de los cuadrantes I, II, III y IV (Fig. 9), y se presentan con una ampliación mayor en la figura 11. Los genes *petB*, *acrA*, *rpIF* y *nra* poseen modelos del tipo SP. Los genes *opgG*, *ttg2* y *hyp\_18* poseen modelos del tipo MP.





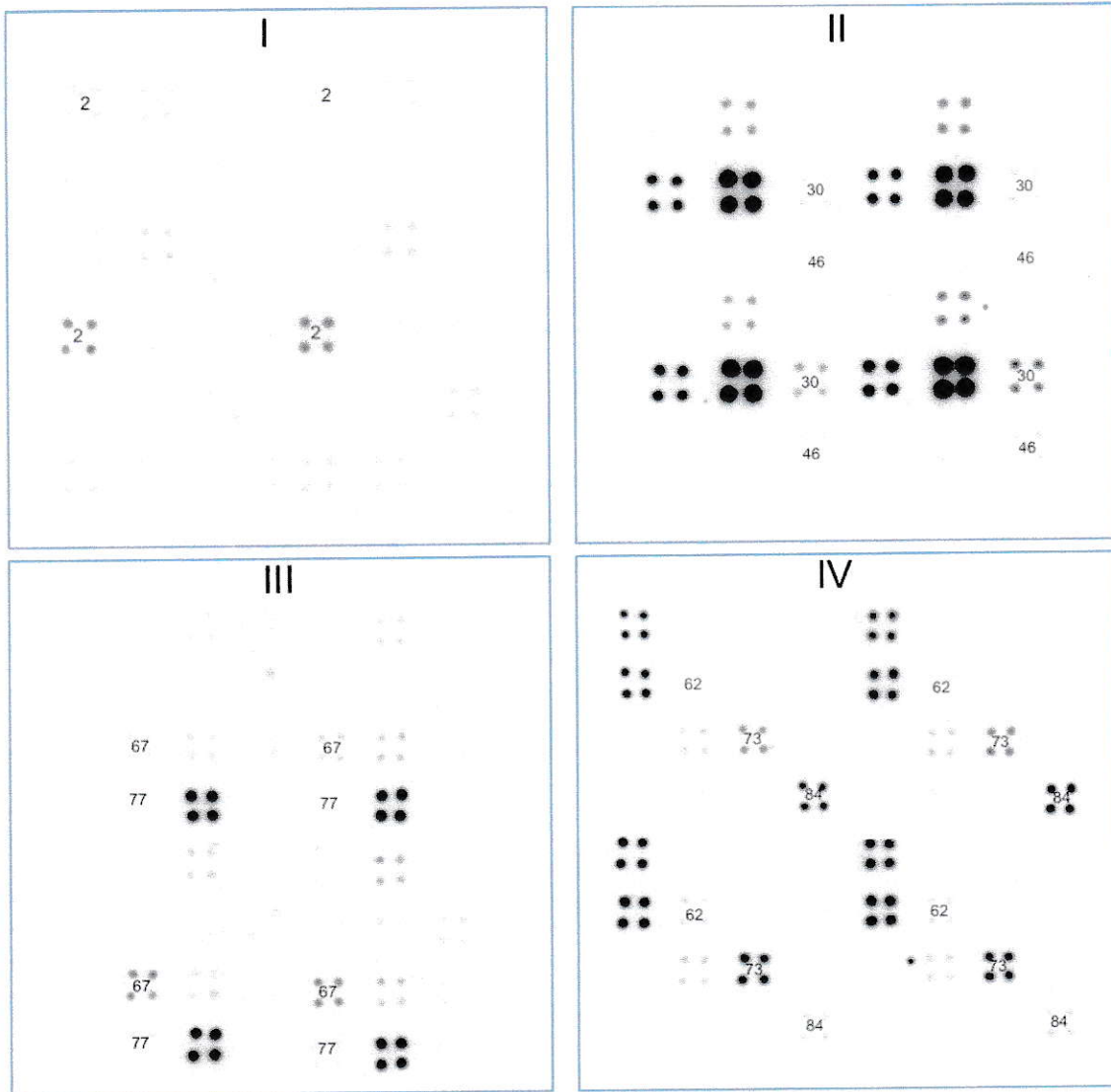
**Figura 9.** Análisis comparativo de los niveles de transcripción del miniarreglo en presencia o ausencia de 50  $\mu\text{M}$  de la mezcla de AHLs. **A.** Crecimiento del cultivo a partir del cual se colectaron las células que fueron incubadas o no en presencia de la mezcla 1 de AHLs. La flecha indica el momento en el cual las células fueron colectadas para su posterior incubación. **B.** Membranas de miniarreglo de ADN mostrando el resultado de las hibridaciones efectuadas con las sondas de cDNA marcadas sintetizadas a partir de ARNs totales extraídos de células inducidas (+) o no (-). Se presentan los resultados obtenidos con 2 réplicas técnicas (RT). Los círculos azul, rojo y verde, corresponden a los fragmentos de los genes *afeR*, *afeI*, y *orf3*, respectivamente. El círculo negro corresponde al fragmento *exp-1* (spiked). En la membrana superior izquierda se indican los cuadrantes que se observan con más detalle en la figura 11.



Número	Gen	Nivel de Expresión (veces)	HMM	Actividad
84	<i>afeI</i>	(10,7)	NC	Sintasa de <i>N</i> -acil homoserina lactona
30	<i>acrA</i>	(6,9)	SP	Bomba de eflujo del tipo RND
77	<i>hyp_18</i>	(6,7)	MP	Proteína hipotética número 18
62	<i>rplF</i>	(6,9)	SP	Proteína ribosómica L6
73	<i>nra</i>	(7,9)	SP	Proteína de Macrófago asociada a resistencia natural
46	<i>opgG</i>	(5,6)	MP	Proteína de Biosíntesis de Glucanos
2	<i>petB</i>	(9,8)	SP	Citocromo B
67	<i>ttg2</i>	(5,9)	MP	Proteína de resistencia a tolueno, similar a transportador ABC

**Figura 10.** Cuantificación densitométrica de los niveles de transcripción de los genes impresos en la membrana de miniarreglo. Los puntos azules y rojos representan el nivel de variación para las intensidades normalizadas de las replicas técnicas RT1 y RT2 de la muestra AHL(+), y, RT1 y RT2 de la muestra AHL (-), respectivamente. Los triángulos verdes representan el nivel de variación para la comparación del promedio de las intensidades normalizadas de las réplicas AHL (+) y las réplicas AHL (-). En el panel inferior se muestra la identidad y función de los resultados positivos. Los números corresponden a los genes presentes en el listado de la tabla 3 y la figura 8. Los genes que poseen PBSs basados en "MP" se destacan en azul; los genes con PBSs basados en "SP" se destacan en amarillo. Los genes mencionados poseen el identificador "induced" en la tabla anexa 1. <sup>a</sup> Flecha que apunta hacia abajo indica represión; flecha apuntando hacia arriba indica inducción. NC. No Corresponde, ya que los HMMs se basaron en esta secuencia





**Figura 11.** Acercamiento a los cuatro cuadrantes del miniarreglo de ADN mostrando la hibridación diferencial para los ocho genes cuya expresión varía en presencia de la mezcla 1 de AHLs. Las letras corresponden a los puntos indicados con las mismas en la figura 10. **Cuadrante I:** 2. *petB* (citocromo B). **Cuadrante II:** 30. *acrA* (bomba de eflujo del tipo RND); 46. *opgG* (proteína de biosíntesis de glucanos G). **Cuadrante III:** 77. *hyp\_18* (Proteína hipotética 18); 67. *ttg2* (proteína de resistencia a tolueno, transportador similar a ABC). **Cuadrante IV:** 84. *afel*; 62. *rplF* (proteína ribosomal L6); 73. *nra* (proteína de macróago asociada a resistencia natural).

### 3.2.3. Análisis transcripcional del gen *afel* mediante qPCR

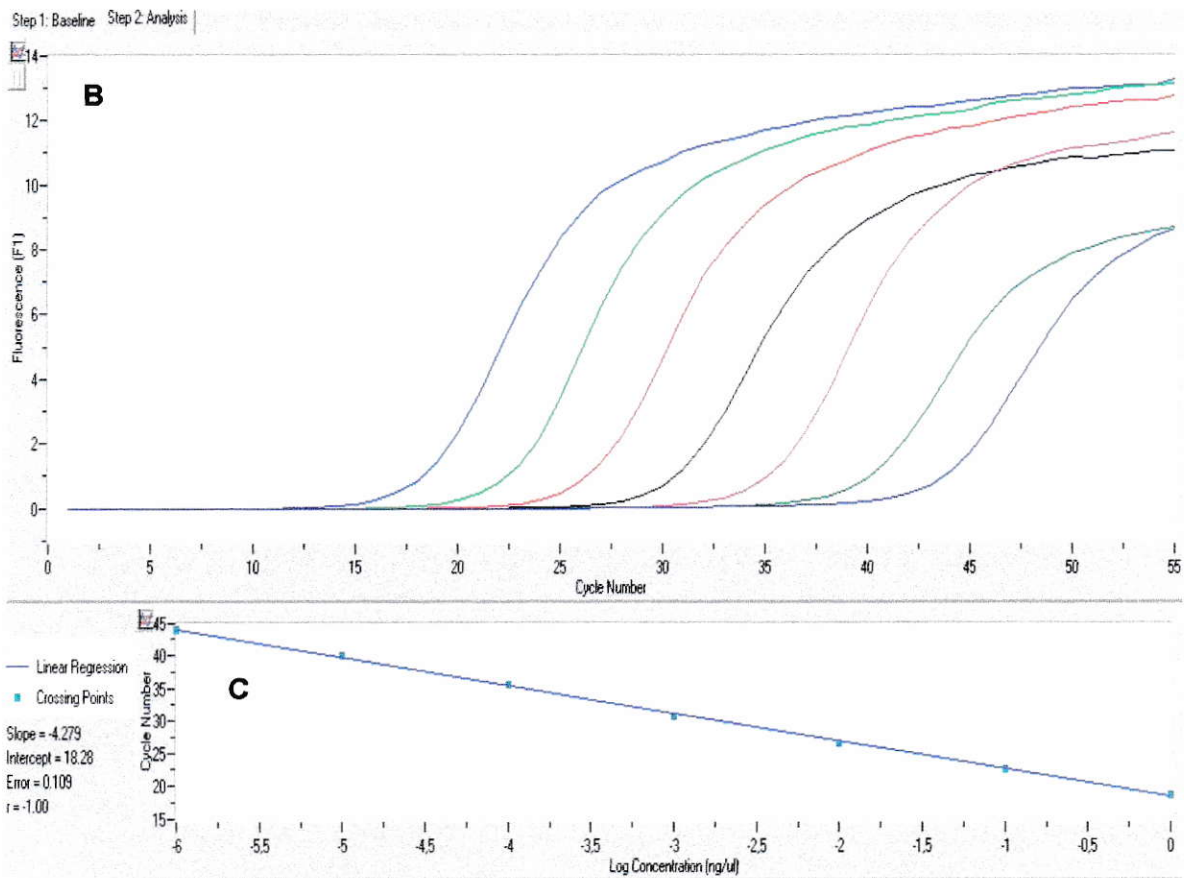
La dificultad para obtener cambios significativos en la expresión de los genes que componen el miniarreglo cuando se utilizó la mayoría de las condiciones probadas, la producción de AHLs endógenas por parte de la cepa, y el resultado sorpresivo de la represión de *afel*, nos hizo decidir que era necesario definir condiciones experimentales que permitan modular específicamente la expresión de *afel* de una manera dependiente de AfeR.

Por eso, antes de proseguir con los experimentos de miniarreglo, nos propusimos entonces estudiar en más detalle el comportamiento transcripcional de *afel* mediante qPCR cuando cultivos de *A. ferrooxidans* son crecidos en presencia de AHLs ó análogos estructurales de AHLs individuales.

El primer paso para el desarrollo de los experimentos de qPCR fue la construcción de una curva de calibración con masas conocidas de ADN genómico de *A. ferrooxidans* (Fig. 12). Debido que en el cromosoma existe sólo una copia del gen *afel*, interpolaciones de la curva de calibración permiten determinar el número de copias del transcrito *afel* en muestras de ARN extraído desde cultivos de *A. ferrooxidans*. De esta manera, se comparó el nivel de transcrito del gen *afel* cuando cultivos fueron crecidos en presencia o ausencia de diferentes AHLs sintéticas o de una mezcla de 2 análogos estructurales de AHL (Fig. 13). Primero, los cultivos se crecieron en presencia de C14, OH-C14, oxo-C14 y una mezcla de los análogos AHLa106 y AHLa134 (Frezza y col., 2006). Además, con el objetivo de registrar el crecimiento, se midió el cambio de densidad celular y de pH en el tiempo (Fig. 13A).

**A**

Nombre	Concentración calculada (ng/μl)	masa (ng) (20 μl final)	número de copias del gen <i>afeI</i>	Punto de cruce (ciclo)
ADNg-20 ng	8,68E-01	1,74E+01	5,31E+06	18,54
ADNg- 2 ng	9,63E-02	1,93E+00	5,89E+05	22,63
ADNg-0,2 ng	1,15E-02	2,31E-01	7,06E+04	26,57
ADNg-20 pg	1,31E-03	2,61E-02	7,99E+03	30,62
ADNg- 2 pg	9,48E-05	1,90E-03	5,80E+02	35,49
ADNg-0,2 pg	8,00E-06	1,60E-04	4,89E+01	40,09
ADNg-20 fg	1,05E-06	2,10E-05	6,41E+00	43,86

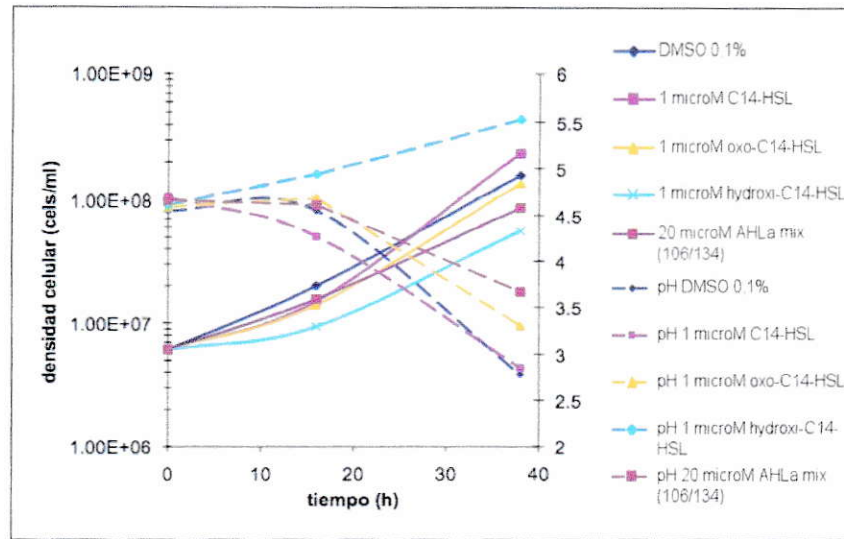
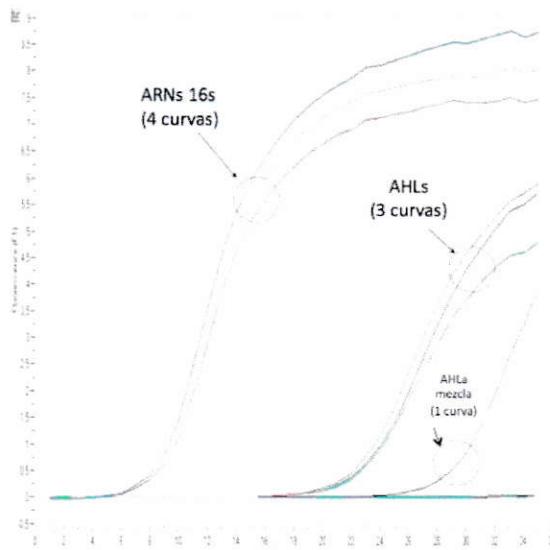
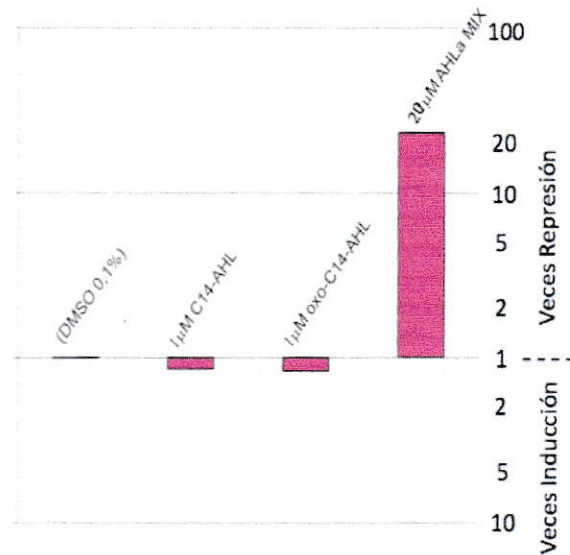


**Figura 12.** Construcción de la curva de calibración utilizada para medir el nivel de transcripción del gen *afeI* mediante qPCR. **A.** Determinación del punto de cruce para cada masa de ADN genómico utilizadas. La última columna muestra el número de copias del transcrito *afeI* considerando que existe una copia de éste en el cromosoma de *A. ferrooxidans*. **B.** Curvas de amplificación obtenidas para las diferentes muestras de ADNg. **C.** Regresión lineal para el gráfico de "punto de cruce" ("crossing point") v/s logaritmo en base 10 de la concentración de ADN cromosómico, generado por las curvas en B.



Se observa que en el cultivo crecido en presencia de OH-C14-HSL se aprecia un leve aumento en los valores en la magnitud de tiempo muestreado. Por otra parte, este cultivo permanece en fase de latencia (lag) al cabo del tiempo muestreado.

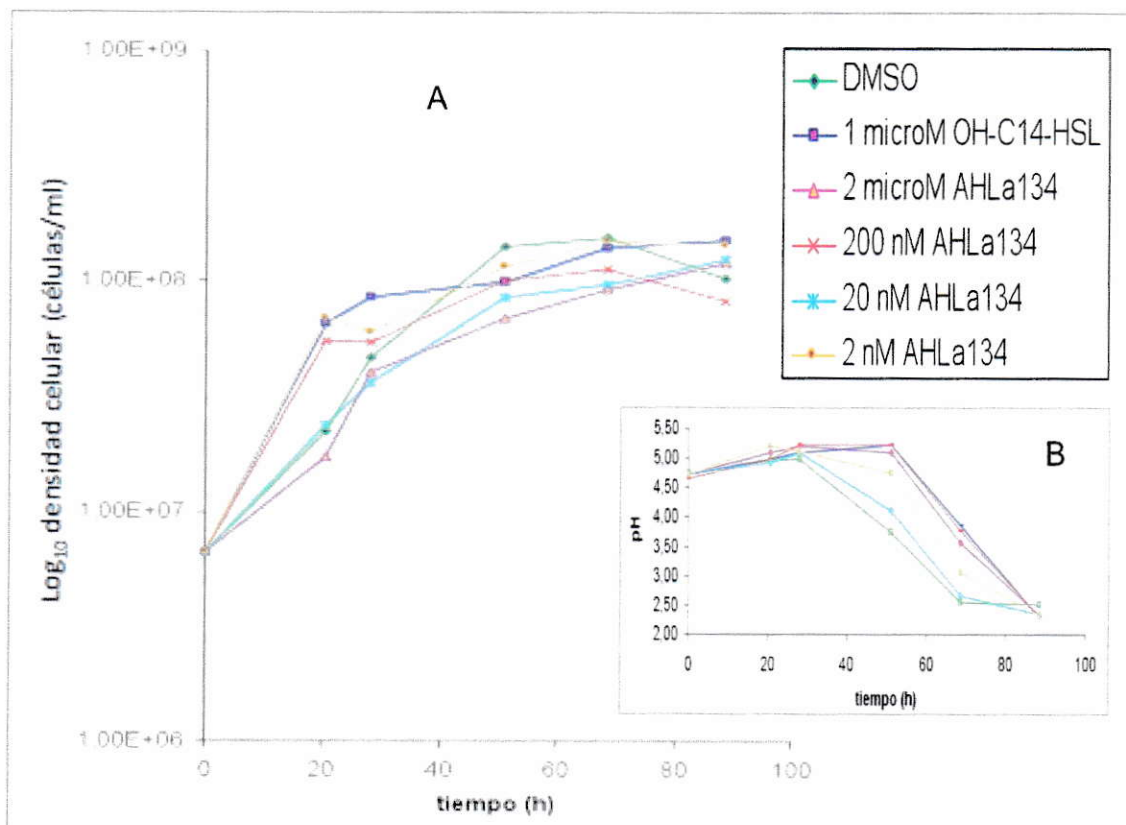
El ARN total se extrajo desde cada una de las muestras antes mencionadas. Posteriormente, se sintetizó ADNc a partir de todas ellas, exceptuando la muestra correspondiente al cultivo con OH-C14-HSL, pues en este caso la masa de ARN fue insuficiente para efectuar la síntesis. Luego, se procedió a cuantificar el nivel de transcrito de *afeI* mediante qPCR (Fig 13B). Utilizando la curva de calibración, y luego de normalizar el número de copias de transcrito obtenido por el número de copias del ARNr 16s, se obtuvo las veces de cambio del nivel de transcrito respecto de la muestra control (cultivo crecido en presencia de 0,1% DMSO) (Fig. 13C). La presencia de una mezcla 20  $\mu$ M de 2 análogos estructurales a AHLs (AHLa mix) induce una disminución en el nivel de transcrito de 23 veces respecto del control. Por otro lado, y en comparación con el ensayo control (DMSO 0,1%), los resultados obtenidos con las moléculas C-14-HSL y oxo-C14-HSL sugieren que no hay cambios significativos en los niveles de transcripción. Considerando que la represión se obtuvo utilizando una mezcla de análogos y con una concentración alta, se decidió probar el efecto de diferentes concentraciones del análogo AHLa134. El experimento es similar al anterior, pero ésta vez se varió la concentración de AHLa134 entre 2 nM y 2  $\mu$ M. Además, se creció un cultivo en presencia de 1  $\mu$ M OH-C14-HSL.

**A****B****C**

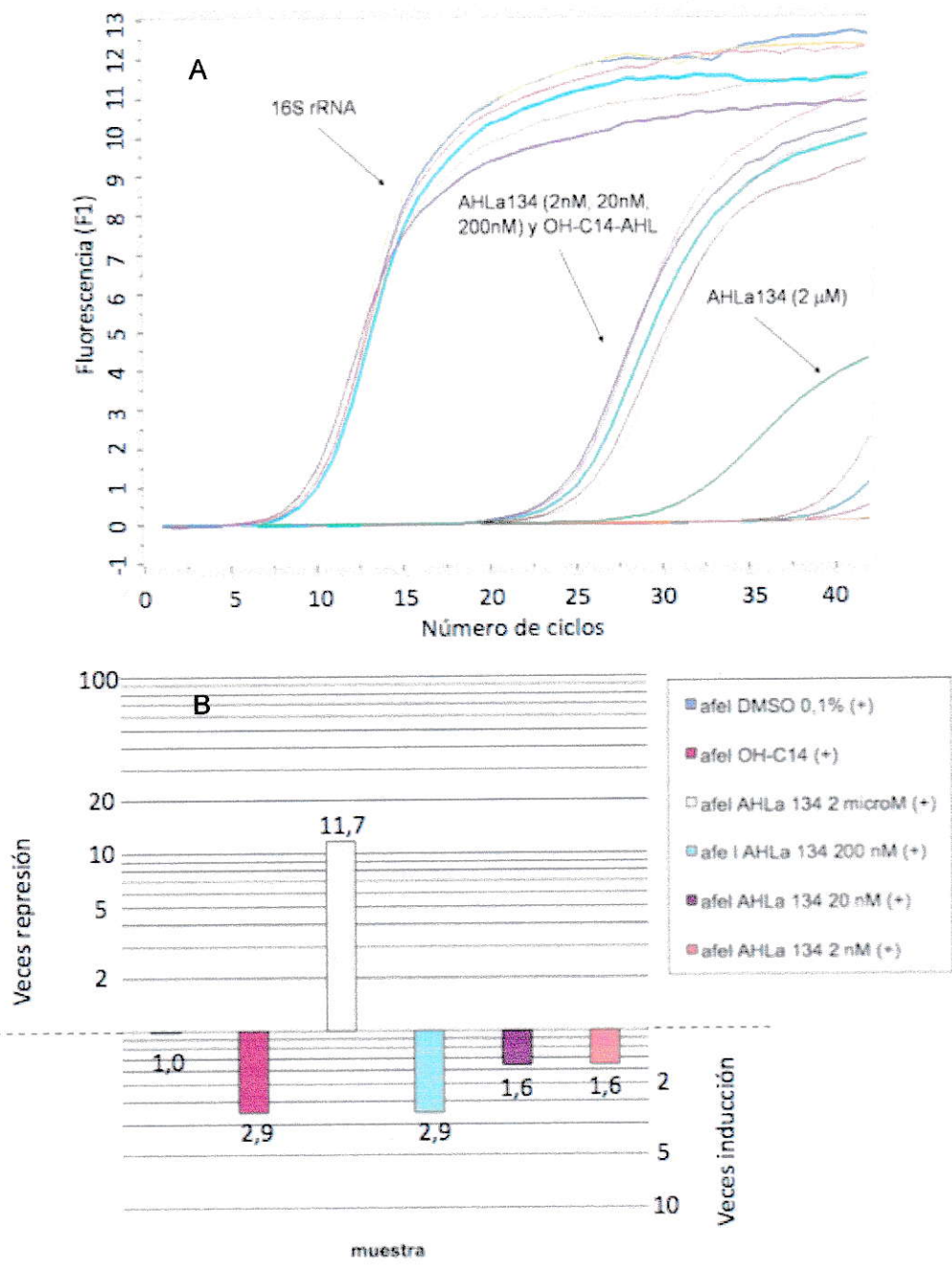
**Figura 13.** Análisis del nivel de transcripción del gen *afeI* en cultivos crecidos en presencia o ausencia de AHLs y análogos estructurales de AHLs. **A.** Curvas de crecimiento y pH para los cultivos crecidos en presencia de 1  $\mu\text{M}$  de distintas AHLs y una mezcla de análogos estructurales de AHL (20  $\mu\text{M}$ ). La extracción de ARNs se efectuó tras colectar las células en el último punto de las curvas mostradas (flecha). **B.** Curvas de amplificación para el transcrito *afeI* en cada una de las condiciones detalladas en A; el grupo de curvas de la izquierda corresponde a la amplificación del ARNr 16S efectuado para todas las muestras y que se utilizó para normalizar los datos obtenidos para *afeI*. El grupo de curvas denotado "AHLs" corresponde a la condición control (DMSO 0,1%), 1  $\mu\text{M}$  C14-HSL y 1  $\mu\text{M}$  oxo-C14-HSL. La curva denotada "AHLa mix" corresponde al crecimiento en presencia de 20  $\mu\text{M}$  de una mezcla de análogos estructurales a AHL. La cantidad de ARNs extraído desde el cultivo crecido en presencia de OH-C14-HSL no fue suficiente para la síntesis de ADNc. **C.** Niveles de inducción y represión para el transcrito *afeI* (en escala logarítmica) en distintas condiciones de crecimiento comparadas con el nivel de transcripción del control (DMSO 0,1%). El nivel de represión para la condición "20  $\mu\text{M}$  AHLa mix" es de exactamente de 23 veces.

Tomando en cuenta el retardo en el inicio del crecimiento observado en el cultivo con OH-C14-HSL, los cultivos crecieron durante 80 horas, 1 $\mu$ M OH-C14-HSL y permitir, en consecuencia, efectuar los experimentos de qPCR con una masa suficiente de ARN. El crecimiento se cuantificó midiendo el cambio de la densidad celular y del pH de los cultivos en el tiempo (Fig. 14). Los distintos cultivos tuvieron un crecimiento similar (Fig. 14A). Además, en todos ellos hubo una disminución en los niveles de pH hasta aproximadamente 2,5 (Fig. 14B). Una vez finalizado el crecimiento (80 h), se extrajo el ARN total de los cultivos y se cuantificó el nivel de transcrito de *afeI* (Fig.15). Las curvas de amplificación para cada una de las condiciones probadas, muestran un comportamiento similar de la transcripción de *afeI* respecto de la condición control tanto para el cultivo donde se utilizó OH-C14-HSL como para la mayoría de las concentraciones en las cuales se utilizó la molécula AHL<sub>134</sub>. Para OH-C14-HSL (1 $\mu$ M) y AHL<sub>134</sub> (200 nM) ocurrió una inducción de 2,9 veces (Fig. 15B). Mientras que para AHL<sub>134</sub> (20 y 2 nM) ocurrió una inducción de 1,6 veces. Por otra parte, cuando la concentración de AHL<sub>134</sub> fue de 2  $\mu$ M, ocurrió una disminución de 12 veces en el nivel del transcrito *afeI* respecto de la condición control (DMSO 0,1%).





**Figura 14.** Curva de crecimiento y cambio de pH en cultivos de *A. ferrooxidans* crecidos en presencia de AHL y AHLa 134. **A.** Curva de crecimiento en escala logarítmica de *A. ferrooxidans* crecido en distintas concentraciones de AHLa134 y en 1 $\mu$ M de OH-C14-HSL. **B.** Cambio de pH durante el crecimiento para las mismas muestras tomadas en A.



**Figura 15.** Cuantificación de los niveles de transcripción del gen *afeI* en presencia de OH-C14-HSL y AHL134. **A.** Curvas de amplificación de qPCR para cultivos de *A. ferrooxidans* crecidos en presencia de distintas concentraciones del análogo 134 ("AHL134") y en presencia de 1 μM OH-C14-HSL. La identidad y concentración de las moléculas utilizadas en el experimento se indican en la figura. El grupo de curvas de la izquierda corresponde a la amplificación del rARN 16s efectuado para todas las muestras y que se utilizó para normalizar los datos obtenidos para *afeI*. En el grupo del centro las curvas se mencionan en orden de izquierda a derecha **B.** Represión relativa de los niveles de transcrito de *afeI* para las distintas condiciones comparadas con el nivel de transcripción del control (DMSO 0,1%). Los niveles de represión para cada muestra se indican en cada barra.

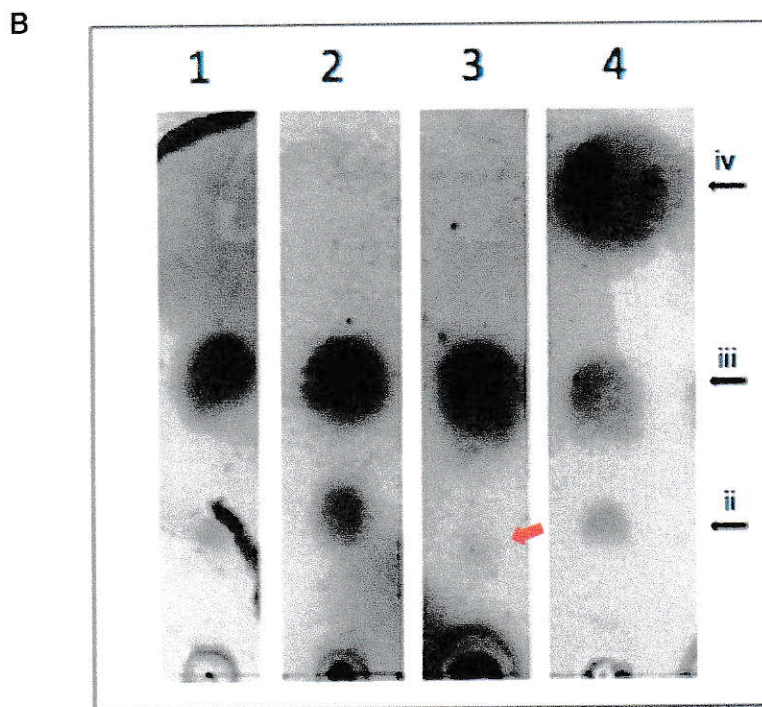
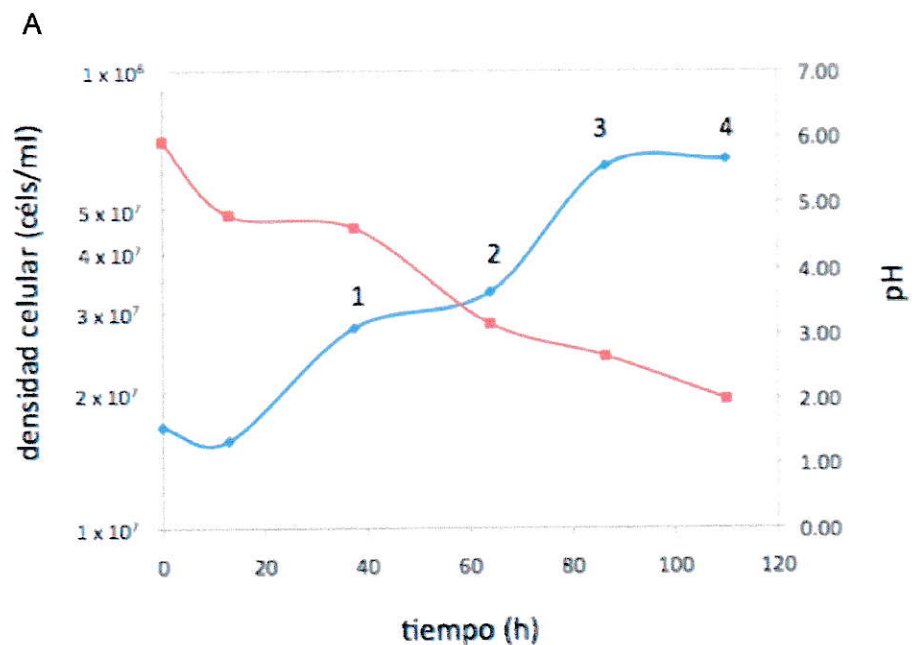
### **3.3. Estudios sobre la producción nativa de AHLs en cultivos de *A. ferrooxidans***

Los experimentos de transcripción anteriores se desarrollaron utilizando células con un “background” genético nativo (cepa ATCC 23270). Esto implica que las células producen varias AHLs mediante la actividad de Afel (Farah y col., 2005). Nos propusimos optimizar el tiempo en el cual deben ser efectuadas las inducciones minimizando la producción de AHLs nativas. Con este objetivo, primero determinamos la presencia de AHLs en distintas etapas de la curva de crecimiento de *A. ferrooxidans* mediante la técnica de cromatografía en capa fina acoplada al biosensor *A. tumefaciens* NTL4(pZLR4) (Shaw y col., 1997). Luego, estudiamos la relación entre la densidad celular y la producción de AHLs efectuando determinaciones de AHL en cultivos con distintas concentraciones iniciales de bacteria que fueron, además, incubados por tiempos cortos. Con esto se minimizaron los efectos de los cambios de pH y de cambios metabólicos derivados del crecimiento sobre la producción de AHLs.

#### **3.3.1. Producción de AHLs en respuesta a cambios en la densidad celular de *A. ferrooxidans***

Se inoculó en medio DSMZ 71 con 0,22 mM Pi con una densidad celular aproximada de  $2 \times 10^7$  células/ml, y se determinó la presencia de AHLs en muestras de sobrenadante tomadas en distintas fases de la curva de crecimiento (Fig. 16). El cultivo triplicó la densidad celular inicial y el pH disminuyó 3 veces de manera proporcional durante el tiempo muestreado (Fig. 16A). Se puede apreciar que el perfil de AHLs producido no es igual para las distintas muestras. Notablemente, en la muestra 4, se detecta una AHL polar ausente en las muestras anteriores (Fig. 16B). Considerando que variables microscópicas y macroscópicas cambian durante el transcurso de 1,5





**Figura 16.** AHLs presentes en el sobrenadante de cultivo de *A. ferrooxidans* en extracciones efectuadas en distintas etapas de la curva de crecimiento. **A.** Cambio en la densidad celular (línea azul) y en el pH (línea roja) durante el tiempo de incubación del cultivo. Los números corresponden a los puntos donde se efectuaron las extracciones orgánicas a los sobrenadantes. **B.** Cromatografía en capa fina acoplada a biosensor NTL4 (pZLR4) mostrando el patrón diferencial de AHLs en distintas etapas indicadas en A. Las flechas indican las señales detectadas. La menor migración de la mancha inferior en la muestra "3" (flecha roja), es artefactual. La identidad de las moléculas es: ii, OH-C10-HSL; iii, OH-C8-HSL; iv, Compuesto polar (CP) (Seminario de Título A. Banderas, 2008).

generaciones, incluyendo la densidad celular, la disminución del pH del medio y las oscilaciones en la expresión de distintos componentes de las redes de regulación (por ejemplo regulones relacionados con la división celular o con la adaptación a pH ácido), se decidió investigar la producción de AHLs en respuestas a cambios en la densidad celular solamente.

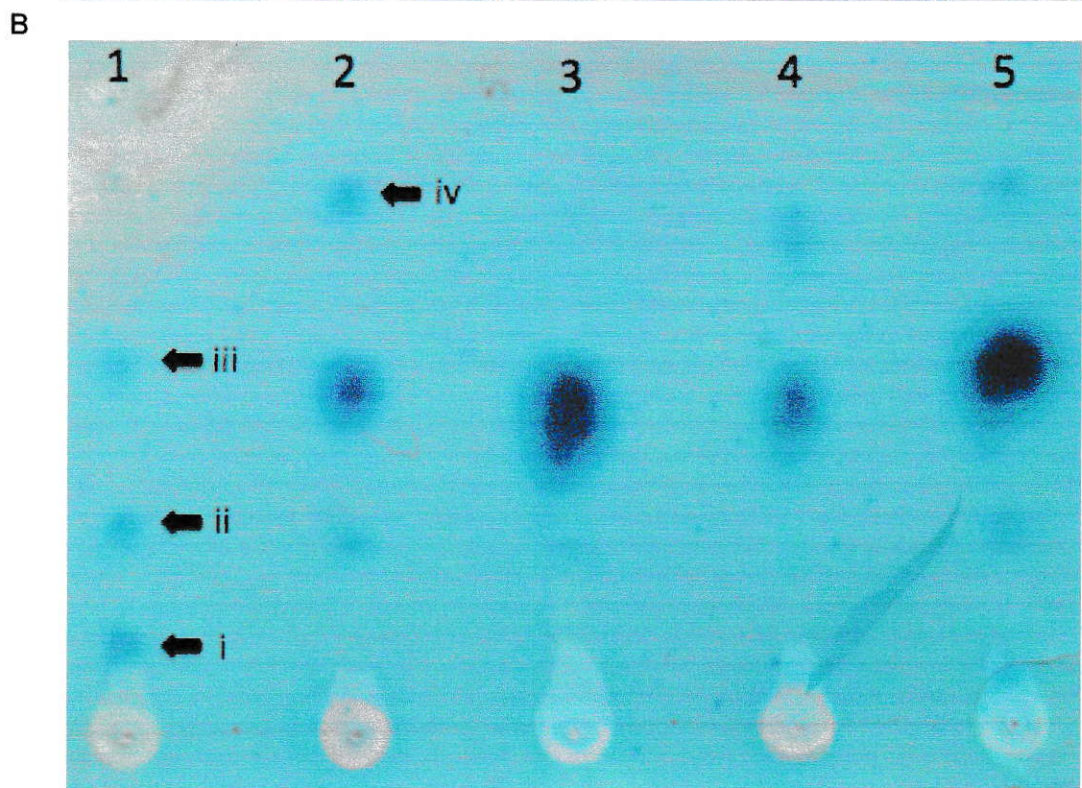
Para evitar el cambio de pH del medio de cultivo y la adquisición de nuevos estados fisiológicos por parte de las células, se decidió efectuar un experimento donde se varió la densidad celular inicial de los cultivos a ser incubados (figura 17A). Las densidades celulares calculadas fueron de  $1 \times 10^5$ ,  $5 \times 10^5$ ,  $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$  y  $1 \times 10^8$  células/ml. Para cada cultivo, se contaron las células directamente cuando éstas fueron recién inoculadas y al cabo de las 6 horas de incubación (en duplicados). A las mismas muestras utilizadas para contar, se les midió el pH (también en duplicado). Se observa que no hay cambios significativos en el pH o en la densidad celular para los distintos cultivos durante el tiempo que duró la incubación (6 h). Al cabo de transcurridas las 6 horas de incubación se efectuaron extracciones orgánicas del total del sobrenadante de cada cultivo (350 ml) y se analizó la presencia de AHLs mediante el método de CCF acoplada a biosensor. Se observa un cambio de patrón en las AHLs detectadas que, esta vez, es independiente del cambio de pH y del crecimiento (entendido como aumento en la densidad celular en el tiempo) (Fig. 17B).

Considerando que las densidades celulares de cada muestra se lograron inoculando distintos volúmenes de un concentrado de células (de aproximadamente  $1 \times 10^{10}$  células/ml), se decidió averiguar sobre la posibilidad de que el inóculo que se utilizó para cada uno de los matraces contuviese AHLs desde un inicio. Con este objetivo, se efectuaron extracciones a los 3 primeros lavados (el total fue 4 lavados) y se revelaron con el sistema biosensor (Fig. 18A).



A

Muestra	t= 0 h				t= 6h			
	Densidad celular (células/ml)		pH		Densidad celular (células/ml)		pH	
	a	b	a	b	a	b	a	b
1	-	-	4,56	4,52	-	-	4,38	4,31
2	-	-	4,53	4,59	-	-	4,50	4,50
3	-	-	4,53	4,51	-	-	4,54	4,54
4	$7,78 \times 10^6$	$6,67 \times 10^6$	4,52	4,48	$1,00 \times 10^6$	$6,67 \times 10^6$	4,54	4,53
5	$7,22 \times 10^7$	$6,10 \times 10^7$	4,53	4,55	$8,08 \times 10^7$	$5,92 \times 10^7$	4,81	4,88

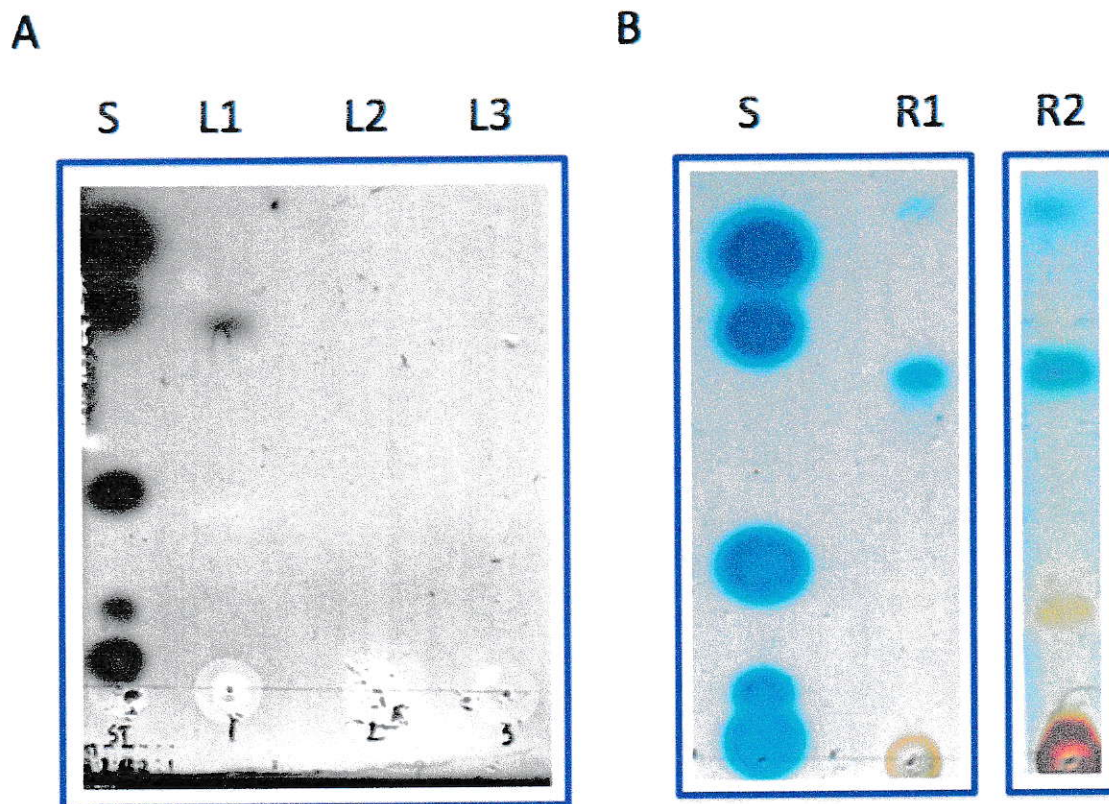


**Figura 17.** Estudio comparativo de la producción de AHLs en cultivos con distinta densidad celular. **A.** Resultados de las mediciones de la densidad celular y pH de los cultivos al inicio (t=0 h) y final (t=6 h) de la incubación. En las muestras "1", "2" y "3", la medición de la densidad celular no fue posible debido que la resolución de la cámara de conteo no da cuenta de magnitudes tan bajas (a y b son réplicas técnicas). **B.** Cromatografía en capa fina acoplada a biosensor mostrando el cambio en el patrón de AHLs detectadas en sobrenadantes de cultivo con distinta densidad celular. Las flechas indican los lugares donde se detectó una "mancha", la identidad de cada una fue inferida a partir de los valores de Rf. i. OH-C12-HSL; ii. OH-C10-HSL; iii. OH-C8-HSL; iv. Compuesto polar (CP) (Seminario de Título A. Banderas, 2008). El resto de las manchas corresponden a las mismas identificadas. Las leves diferencias en la migración son un artefacto del experimento. Los distintos carriles corresponden a extracciones efectuadas a partir de cultivos con densidades celulares iniciales calculadas crecientes. 1.  $1 \times 10^5$ ; 2.  $5 \times 10^5$ ; 3.  $1 \times 10^6$ ; 4.  $1 \times 10^7$ ; 5.  $1 \times 10^8$  (células/ml).



Es posible observar que la presencia de OH-C8-HSL es detectada sólo en el primer lavado. En los lavados posteriores, no fue posible detectar AHL alguna. Esto indica que el medio que acompaña a las células en el cultivo concentrado utilizado para inocular cada uno de los matraces del experimento de la figura 17, no contiene AHLs detectables por el sistema biosensor. Esto significa que las AHLs detectadas posteriormente son producidas *de novo*, o bien, que el volumen (1,5 ml) o tiempo de lavado (alrededor de 3 minutos) no permiten la salida de las AHLs, al contrario que cuando éstas son inoculadas, donde el tiempo y el volumen que las contiene es mucho mayor)

Por otra parte, se efectuó un control para comprobar la reproducibilidad biológica de un cultivo similar a los utilizados en el experimento de la figura 17 (Fig. 18B). Se observa que ambas réplicas biológicas presentan perfiles similares de AHLs, lo que implica que tanto la técnica de extracción como el método de cultivo son reproducibles.



**Figura 18.** Detección de AHLs en soluciones de lavado y comparación de extracciones efectuadas a réplicas biológicas. **A.** Detección de AHLs en los 3 primeros lavados efectuados a las células utilizadas para inocular matraces del experimento de la figura 16. L1, primer lavado; L2, segundo lavado; L3, tercer lavado. El cuarto lavado no fue extraído. La AHL detectada en L1 corresponde a OH-C8-HSL (Seminario de Título A. Banderas, 2008). **B.** Extracciones efectuadas a réplicas biológicas de cultivos de *A. ferrooxidans* inoculados con una densidad celular de  $1 \times 10^6$  céls/ml e incubados por 3 horas, S. estándar de AHL.

#### 4. DISCUSIÓN

Los sistemas de QS del tipo LuxI/LuxR de bacterias Gram-negativas comparten muchas características. Se habla de un “sistema de QS” cuando éste posee al menos los componentes esenciales necesarios para la generación y transducción de la señal AHL y, también, los elementos regulatorios necesarios para la expresión de fenotipos controlados por QS. Esto es, una proteína de la familia LuxI, una proteína de la familia LuxR, la señal AHL misma y las cajas del tipo *lux-box* donde se une la proteína R en la región promotora de los genes blanco. Los fenotipos regulados por sistemas de QS son muy variados. Algunos de estos son bioluminiscencia (*Vibrio fischeri*), transferencia plasmidial (*Agrobacterium tumefaciens*), expresión de factores de virulencia (*Pseudomonas aeruginosa*), nodulación (*Sinorhizobium meliloti*) y motilidad (*Erwinia chrysanthemi*) entre muchos otros. Ha sido tradicionalmente aceptado que los sistemas de QS regulan fenotipos en función de la densidad celular. Se dice que en caso de ser expresados por un número reducido de bacterias, resultarían improductivos o sub-óptimos. Dos clásicos ejemplos de esto son la bioluminiscencia producida *Vibrio fischeri* en el órgano luminiscente de su hospedador simbiótico *E. scolopes* y la virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* en pacientes con fibrosis cística (Boettcher y Ruby, 1995; Schuster y Greenberg, 2006).

Uno de los objetivos generales de nuestro laboratorio es determinar los mecanismos moleculares que regulan la formación de biopelículas en *A. ferrooxidans*. En relación con esto, se ha caracterizado previamente un sistema de QS en ésta



bacteria (Farah y col., 2005). Las funciones génicas reguladas por QS en *A. ferrooxidans* son desconocidas. En este trabajo se empleó una aproximación bioinformática para caracterizar el regulón QS, con el fin de indagar en las funciones génicas que podrían ser reguladas por este sistema en *A. ferrooxidans*. Esta estrategia fue elegida dada la imposibilidad de construir cepas de *A. ferrooxidans* deficientes en algún componente del sistema QS, pues, un sistema de transferencia de material genético eficiente para *A. ferrooxidans* aún no está disponible. En resumen, el trabajo consistió en 3 partes fundamentales. Primero, generar un listado de sitios de unión probables utilizando herramientas bioinformáticas para desarrollar un miniarreglo de ADN con los genes río abajo de éstos. Segundo, estudiar el comportamiento transcripcional del *afeI*, gen responsable de la síntesis de AHL, y de parte del regulón predicho. Tercero, y considerando los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, determinar los perfiles de producción nativa de AHLs en cultivos de *A. ferrooxidans*.

#### **4.1. Sitios de unión putativos del regulador AfeR**

Basándonos en la inusual complejidad de secuencia de la caja *afe*, se efectuó el modelamiento de ésta, y una posterior búsqueda de sitios similares en el genoma de *A. ferrooxidans*. Los HMMs fueron contruidos basados en alineamientos múltiples de secuencias hipotéticas diseñadas para mantener la arquitectura del palíndrome ubicado río arriba del gen *afeI*. No efectuamos alineamientos de *cajas-lux* conocidas para generar los HMMs debido a la baja conservación de estas secuencias (Whiteley y Greenberg, 2001) y a la importancia de la arquitectura de los módulos que conforman un elemento *cis* (Lavrrar y McIntosh, 2003). El resultado de la búsqueda arrojó un total de 265 PBSs. Aquellos PBSs basados en el modelo SP se encontraron más

concentrados en zonas intergénicas que los PBSs basados en el modelo MP. Esto puede ser interpretado como una "preferencia" del modelo SP por encontrarse localizado zonas intergénicas y, por lo tanto, aumentando la probabilidad de que ésta estructura cumpla algún rol en el proceso de transcripción. Por otra parte, es posible que la razón de esta preferencia resida en el hecho de que la estructura en la cual se basó el modelo SP, solapa un elemento -35 de un promotor consenso del tipo sigma 70. Ésto implica que es posible que al menos algunos "hits" del tipo SP sean realmente elementos -35. En defensa de la primera posibilidad, la herramienta de predicción Bprom encontró algunos SP del Tipo I solapando elementos -35 pero también encontró otros solapando elementos -10 y otros sin solapamiento. Por otra parte, solo los PBSs basados en modelos MP fueron encontrados como motivos comunes cuando el conjunto total de PBSs fue utilizado como entrada de la herramienta MEME. De esta manera, los PBSs basados en MP aparecen con mayor probabilidad de ser el motivo regulatorio correcto para AfeR. Esto, sumado al hecho de que tanto los modelos SP como los MP no mostraron solapamiento significativo en la búsqueda con HMM, sugiere que los determinantes necesarios para la interacción de AfeR con el ADN se encuentran dentro de los 18-20 nucleótidos centrales del palíndromo mayor "LP" (30 pb) y que los PBSs basados en SP podrían ser sitios de unión para un regulador transcripcional diferente. Es posible entonces que los PBSs basados en SP sean parte de un regulón distinto que solapa con el regulón AfeR en la regulación transcripcional de *afeI*. Existen ejemplos de elementos *cis* regulatorios múltiples ubicados río arriba de varios genes regulados por QS en otras bacterias, incluyendo las zonas regulatorias de genes *I* y *R* (Reverchon y col., 1998; Chatterjee y col., 2002). Estas secuencias regulatorias pueden solapar *cajas-lux* como es el caso del sitio de unión del regulador RsaL, ubicado río arriba del gen *lasI* de *P. aeruginosa* (Rampioni y col., 2006).

En seis de los 75 ORFs presentados en la tabla 4 se encontró más de un PBS río arriba de su inicio traduccional predicho. Cinco ORFs presentaron dos PBSs y un ORF presentó tres PBSs. La proteína hipotética AFE\_1148, los genes divergentes AFE\_2049 (conserved domain protein) y AFE\_2050 (putative transcriptional regulator), así como el ORF AFE\_2469 (ErfK-YbiS-YcfS-YnhG family protein), presentaron tanto un modelo basado en SP y un motivo de 18 pb predicho por MEME. Además, en el caso de AFE\_2469, los dos PBSs se encuentran solapados. Finalmente, AFE\_1727 (group 1 glycosyl transferase family protein) posee 2 PBSs basados en MP río arriba de su codón de inicio. El gen AFE\_1992 (proteína hipotética) posee 2 PBSs basados en SP y un motivo MEME de 18-pb solapando uno de estos. En relación con esto, existen ejemplos donde más de una *caja-lux* se encuentra río arriba de genes controlados por QS. Este es el caso de *lasB*, *hcn* y *pqsA* de *P. aeruginosa* (Anderson y col., 1999; Pessi y Haas, 2000; Xiao y col., 2006).

El tipo de regulación ejercida sobre los blancos de la proteína AfeR son aún desconocidos, AfeR puede activar la transcripción desde el promotor de *afeI* en presencia de AHLs (Rivas y col., 2005), pero la dependencia de AHLs para la unión debe aún ser determinada. Los ORFs regulados putativamente por la proteína AfeR descritos en este estudio tienen sus PBSs respectivos localizados en diversas posiciones relativas a promotores  $\sigma^{70}$  predichos. Algunos de ellos solapan elementos -35 y otros solapan elementos -10. Proteínas de la familia LuxR tales como TraR, LasR y LuxR generalmente se unen a una *caja-lux* ubicada en la posición -40 a -45 (solapando el elemento-35 del promotor tipo  $\sigma^{70}$ ) en presencia de AHL y, en consecuencia, activan la transcripción de sus blancos regulatorios. Por otra parte, algunos reguladores de la familia LuxR se unen a sus secuencias blanco en ausencia



de AHL y se liberan en presencia de AHL, como es el caso de EsaR de *Pantoea stewartii* ó ExpR<sub>Ecc</sub> de *Erwinia carotovora*, siendo entonces represores de la transcripción (Andersson y col., 2000; Minogue y col., 2002). En estos casos, la ubicación de la *caja-lux* solapa el elemento-10 del promotor  $\sigma^{70}$ . En los resultados presentados en este trabajo, sin embargo, no se aprecia una relación clara entre la ubicación de los PBSs y el nivel expresión de los 8 genes que cambiaron en el experimento de miniarreglo. Además, ninguno de los PBSs encontrados presentaron una complejidad de secuencia similar a la del palíndromo río arriba de *afeI*, y tampoco presentaron simetría pareja perfecta. Esta última característica no es un requisito que deban poseer las cajas *lux* para ser capaces de interactuar con sus reguladores cognados. Esto ha sido demostrado para varios genes regulados por QS en *P. aeruginosa* (Schuster y col., 2004). Los reguladores antes mencionados (EsaR ExpR<sub>Ecc</sub>) pueden funcionar como activadores de la transcripción en construcciones genéticas artificiales donde la posición del elemento *cis* es cambiada hacia un solapamiento con el elemento -35 (manteniendo la dependencia de la ausencia de AHL) (von Bodman y col., 2003). Esto demuestra que la capacidad de interactuar con la ARN polimerasa y activar la transcripción permanece intacta, y que la activación o represión de otros genes en su contexto nativo puede ocurrir dependiendo de la posición de la *caja-lux*.

Interesantemente, algunas de las funciones génicas asociadas a los motivos MEME de 18 bp han sido relacionadas con QS en otras bacterias. En primer lugar, la proteína AfeR (regulador maestro de QS). Segundo, AFE\_0806 (TonB-dependent receptor) ha sido implicado en la producción de AHLs en *P. aeruginosa*. De hecho, mutantes de delección de este gen muestran una disminución en la producción de AHL (Abbas y col., 2007). También tienen este motivo, proteínas con actividad glicosil

transferasa, sugiriendo que el QS pueda cumplir algún rol en la formación de sustancias exopoliméricas involucradas en la adhesión a superficies. Por otra parte, un regulador transcripcional dependiente de sigma 54 también posee un motivo MEME, esto es consistente con el hecho de que AfeR es un regulador global de la transcripción, que puede activar o reprimir genes de manera indirecta. En el mismo locus que el regulador transcripcional dependiente de sigma 54, pero en la orientación opuesta se encuentra un gen codificante para una metalo- $\beta$ -lactamasa. Interesantemente hay otra metalo- $\beta$ -lactamasa entre los miembros del regulón hipotético. Hasta donde sabemos, no existen reportes de moléculas con el anillo  $\beta$ -lactámico en el nicho de *A. ferrooxidans*, por lo tanto, la función que estas proteínas podrían cumplir en este nicho es desconocida. La validación experimental de los sitios es necesaria.

#### **4.2. Transcripción del gen *afeI* y regulación de las funciones génicas putativas**

La relación entre las funciones putativas descritas gracias al análisis bioinformático y la posible regulación de éstas por el sistema de QS, fue estudiada utilizando un miniarreglo de ADN. Se compararon los niveles de transcripción del grupo de genes seleccionados en condiciones experimentales donde se intentó modular la actividad de la proteína AfeR y, consecuentemente, la transcripción del gen *afeI*. Así, se logró reprimir la expresión del gen *afeI* utilizando una mezcla de distintas AHLs sintéticas. Otras condiciones experimentales fueron probadas con el fin de caracterizar más esta respuesta. Estas condiciones incluyeron concentraciones más bajas de la misma mezcla 1 y de una segunda mezcla donde se incluyeron AHLs con sustituciones hidroxilo (resultados no mostrados). Sin embargo, en ninguna de estas condiciones se logró modificar significativamente la expresión de *afeI* u otros genes presentes en el

miniarreglo. La principal diferencia entre estas condiciones y la que si resultó en la represión de *afeI*, es que la mezcla utilizada en ésta última, no contenía AHLs hidroxiladas. No se observó relación alguna entre el tipo de modelo que da origen a cada uno de los PBS rio abajo de los cuales se encuentran los genes que cambiaron su expresión y los niveles de expresión de los genes que cambiaron significativamente en el miniarreglo. Tampoco se observó alguna relación entre el tipo de cambio de los genes (inducción o represión) y la ubicación del PBS respecto de la predicción de la secuencia predicha de promotores tipo sigma 70.

La cantidad de genes que cambió significativamente su expresión en el miniarreglo fue baja (10%), esto puede deberse a varias razones. Una de ellas puede ser el estado fisiológico de la célula en el momento de la exposición a AHLs. Inducciones que se hacen a mutantes incapaces de generar AHLs en *P. aeruginosa* muestran que la respuesta de muchos de los genes que cambian su expresión, lo hacen con un "timing" particular. Es decir, su reacción al inductor no ocurre en el momento mismo de la inducción (a pesar de hacerse ésta con concentraciones saturantes), sino que lo hacen en etapas posteriores de la curva de crecimiento. Esto es explicado, según Schuster y col. (2004), argumentando que la cantidad de proteína receptora (R) es limitante en las etapas iniciales de la curva y que a pesar de la alta concentración de inductor, solo habrá regulación en unos pocos promotores bajo esta condición. Posteriormente se demostró, a través de ensayos de retardo en gel con la proteína LasR purificada, que para distintas "las boxes" existen diferentes afinidades de unión al regulador, sin embargo, las diferentes afinidades no guardan relación con el "timing" ni con la magnitud de la respuesta a AHL en *P. aeruginosa* (Schuster y col., 2004). El "timing" es, por lo tanto, la respuesta diferencial a la misma concentración de AHLs en contextos fisiológicos distintos y no la respuesta diferencial provocada por la



acumulación de AHLs en el entorno. Es recomendable, por ende, efectuar las inducciones en *A. ferrooxidans* de tal manera de favorecer la inducción de la mayor cantidad posible de genes regulados directamente por el complejo AfeR/AHL (genes con caja *afe*). Esto se lograría, en parte, induciendo células extraídas desde partes de la curva de crecimiento donde la expresión del gen *afeR* sea alta; es decir, fases exponencial tardía y estacionaria. La respuesta de la mayoría de los genes inducibles por AHLs en *P. aeruginosa* ocurre en fase exponencial tardía o estacionaria.

Otro punto importante es la concentración de AHLs utilizada. Esta debe ser saturante pues se desconoce la concentración adecuada para inducir el sistema en estudio, tomando en cuenta que en sobrenadantes de cultivos de *A. ferrooxidans* se encuentran concentraciones de AHLs en el rango picomolar (datos de nuestro laboratorio no publicados). Un argumento en contra del uso de AHLs a concentraciones normales características del medio de cultivo en fase exponencial tardía es que dicha concentración puede ser subestimada para AHLs de cadena larga, pues la cantidad de señal hidrofóbica en el medio no representa la cantidad de la misma señal en la célula, dado que las AHLs de cadena larga tienden a acumularse en las células, como ocurre en *Rhodobacter capsulatus* (Schaefer y col., 2002).

Otra posibilidad es que la respuesta que se observó en el experimento de miniarreglo sea independiente de AfeR. Por esta razón se decidió estudiar más en profundidad la transcripción de *afeI* cuando *A. ferrooxidans* es crecido en presencia de AHLs y análogos estructurales de AHLs. De esta manera, se logró identificar un compuesto (AHLa134) capaz de reprimir la transcripción de *afeI*. Este compuesto podrá ser utilizado para modular más específicamente el sistema de QS de *A. ferrooxidans*.

#### 4.3. Producción de la señal AHL en cultivos con distinta densidad celular.

El hecho de que los experimentos de exposición a AHLs fueron efectuados en un contexto "wild type", implica que existe una producción nativa de AHLs en toda situación donde el gen *afel* se esté expresando. Por esta razón, antes de la exposición a AHLs sintéticas, los cultivos se lavaron con medio fresco. En el caso de las AHLs polares los lavados deberían ser suficientes para lograr la difusión hacia el medio extracelular. En el caso de las AHLs más hidrofóbicas (más abundantes en el caso de *A. ferrooxidans*) los lavados no deberían ser suficientes para eliminarlas, pues lo más probable es que éstas se mantengan en el precipitado celular (Schaefer y col., 2002). Es probable, sin embargo, que luego de los lavados, la respuesta nativa a AHLs esté minimizada. Con el fin de caracterizar mejor la producción nativa de AHLs por parte de *A. ferrooxidans* se decidió efectuar los experimentos que se discuten a continuación.

Cuando cultivos con distinta densidad celular fueron incubados en medio fresco por 6 horas se observó un patrón distinto de AHLs presente en las extracciones efectuadas desde cada muestra (Fig. 17, p. 72). Se decidió efectuar este experimento tras observar que un patrón distinto de AHLs puede ser obtenido cuando se extraen muestras de sobrenadante desde las distintas fases de la curva de crecimiento de un cultivo de *A. ferrooxidans* (Fig. 16, p. 70). Esto ha sido observado en *S. meliloti* (Blosser-Middleton y Gray, 2001), sin embargo, en el ejemplo citado la explicación es que existe una regulación diferencial en la expresión de varias proteínas de la familia LuxI, dependiendo de la fase de la curva de crecimiento donde se efectuó la medición. Este no es el caso de *A. ferrooxidans*, pues esta bacteria posee sólo una copia del gen *afel* y éste es responsable de la síntesis de la totalidad de las AHLs que pueden ser detectadas. aunque *A. ferrooxidans* posee un gen *hdtS* que codifica una AHL sintasa

responsable de solamente la síntesis de C14-HSL (Rivas y col., 2007), que también es sintetizada por *ahfI*. Por esta razón se decidió aislar la variable “densidad celular” de otras variables que cambian sus valores durante el crecimiento. A medida que la bacteria crece, también el pH del cultivo baja producto de la acumulación de ácido sulfúrico. A su vez, el pH ácido aumenta la estabilidad de las AHL (Wang y col., 2007), por lo que la disminución en los valores de pH podría implicar la estabilización de AHLs que en pH más alcalinos se hidrolizan. Por otra parte, cada fase de la curva corresponde a estados fisiológicos particulares. Por ejemplo, células de fase estacionaria se encuentran generalmente expresando el factor sigma *rpoS*, y por lo tanto las redes de expresión y regulación son distintas.

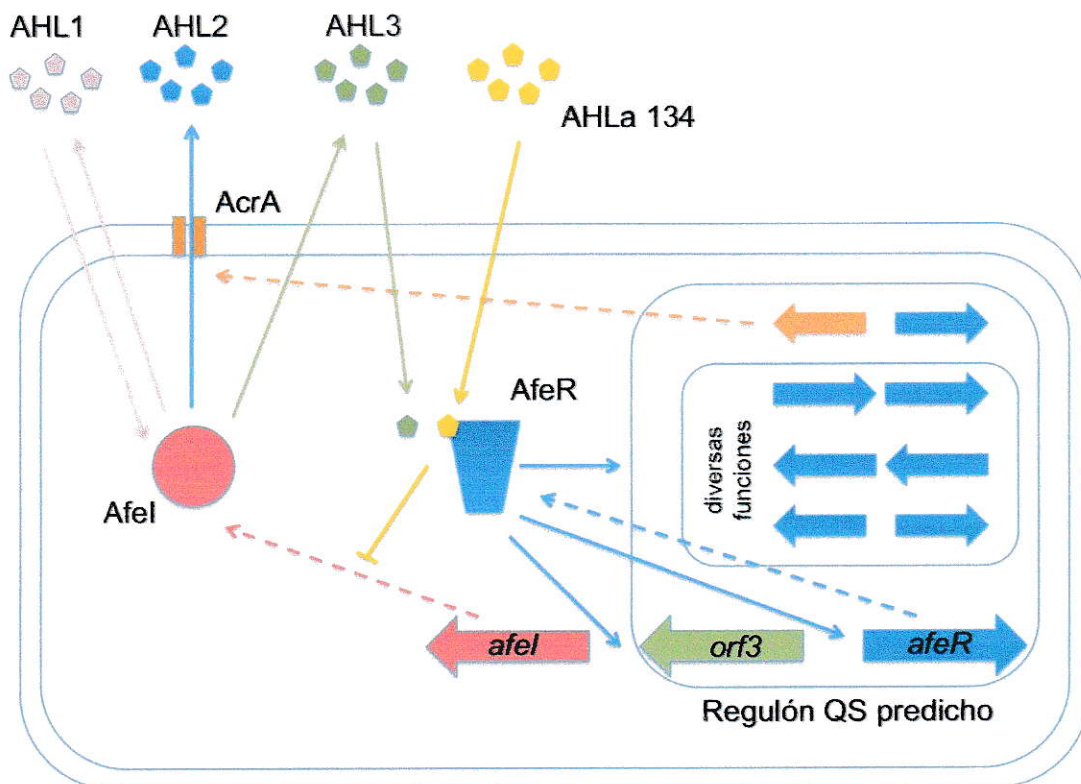
Por estas razones, se decidió efectuar el experimento de la figura 17 (p. 72). Los cultivos fueron inoculados con células provenientes de fase exponencial tardía. Se colectaron las células y se lavaron 4 veces con 1 ml de sales DSMZ 71. En la figura 18 se observa que, al menos OH-C8 (más adelante se discute la identidad de las moléculas) es liberada al medio de lavado y no puede ser detectada después del primero de éstos. Este resultado no implica que otras AHLs más hidrofóbicas puedan permanecer asociadas a las células (sección 1.2.1.3). Distintos volúmenes del cultivo concentrado ( $4 \times 10^{10}$  células/ml) y lavado fueron dispensados en 400 ml de DSMZ71 para obtener las concentraciones finales calculadas mencionadas. El resultado de las extracciones de AHLs luego de 6 horas de incubación con agitación (150 RPM) a 30 °C revela que es posible encontrar un conjunto distinto de AHLs dependiendo de la densidad celular inicial. ¿Cómo se puede explicar el patrón diferencial obtenido?. La presencia de un conjunto distinto de AHLs en cada matraz luego de las 6 horas podría implicar la secreción activa de un conjunto distinto de AHLs en función de variables microscópicas derivadas de la variable macroscópica “densidad celular”. Durante las 6



horas que dura el experimento deberían duplicarse las bacterias que, en el momento de ser inoculadas, estaban cercanas a dividirse. Los instrumentos utilizados para cuantificar este cambio son de poca resolución para captar estas pequeñas diferencias. Si comparamos el tiempo de crecimiento que tuvieron estas bacterias con el tiempo que requiere la construcción de una curva de crecimiento, nos damos cuenta que el primero es mínimo (6 horas versus 150 horas para una curva completa). Considerando las condiciones de homogeneidad tanto del inóculo como de los cultivos inoculados, es de esperar que exista la misma proporción de estados fisiológicos entre las bacterias presentes en cada matraz y, por lo tanto, la cantidad de células que lograrán duplicarse en las 6 horas es directamente proporcional a la densidad celular inicial. Para evitar variables adicionales en el análisis consideraremos sólo las dos primeras muestras (carriles 1 y 2, Fig. 17), ya que éstas fueron las que se procesaron más rápido. Esto, dado que las células de los cultivos 3, 4 y 5 fueron centrifugadas 20 minutos después que las muestras 1 y 2 (es decir estuvieron sin agitación sobre el mesón por esta cantidad de tiempo). Si comparamos los carriles 1 y 2 observamos que la señal OH-C8-HSL aumenta su intensidad. Esto es lo que esperamos de un comportamiento "normal" para un aumento de células de 5 veces. Si, por otra parte, asumimos que cada bacteria se encuentra produciendo la señal OH-C8-HSL de igual manera, ésta debería acumularse 5 veces más en el medio de cultivo, como lo indica el modelo paradigmático del QS (la concentración de AHLs aumenta de manera proporcional con la densidad celular). La detección en la muestra 2 de "CP" puede interpretarse como que se alcanzó una concentración suficiente para ser detectada por el biosensor. Si aplicamos esta misma idea a la señal OH-C12-HSL, esperaríamos que ésta se acumulara de la misma manera que lo hizo OH-C8-HSL ó, al menos, que mantuviese su intensidad (por motivos de sensibilidad por OH-C8-HSL) como lo hizo la señal

OH-C10-HSL. Sin embargo, la señal OH-C12-HSL no es detectada en la muestra 2. Existe la posibilidad de que el cambio de patrón observado sea un fenómeno fisicoquímico relacionado con las leyes de difusión donde, de alguna manera, la diferencia en las densidades celulares implique que la señal OH-C12-HSL sea “quelada” por las membranas de las células que se encuentran en mayor número en la muestra 2. Cuando se extrajo los precipitados celulares desde las muestras 1 y 2 sólo se detectó OH-C8-HSL en la muestra 1 (resultado no mostrado) y OH-C12 no fue detectado en ninguna de ellas. La pregunta es entonces si el cambio de patrón es responsabilidad de un cambio fisiológico, como por ejemplo la activación y/o represión de genes producto del cambio de densidad celular. En otras palabras, si el QS regula la secreción de las moléculas AHLs. Debemos condiderar que el cambio debiera deberse no sólo a un cambio en la expresión de la proteína AfeI, sino que necesariamente debe haber otro factor (por el hecho de que la proteína I sintetiza todas las AHLs de *A. ferrooxidans*), por ejemplo una variación en los sustratos disponibles para la síntesis de AHLs ó una selección por ciertas AHL en el momento de la secreción. La segunda alternativa es más probable, pues el hecho de que la densidad celular sea 5 veces más en la muestra 2 implica que las AHLs alcanzan una concentración extracelular tal que activan redes de regulación dependientes de AfeR que, por ejemplo, pudieran modificar la expresión de factores que modifican la secreción de algunas AHLs. Por ejemplo una bomba del tipo RND, como la que se indujo en los experimentos de miniarreglo (AcrA). En *P. aeruginosa*, estas bombas son responsables del eflujo de la señal oxo-C12-HSL).

A continuación se presenta un esquema del sistema de QS *A. ferrooxidans*, incluyendo algunos elementos hipotetizados como parte del regulón QS (Fig. 19).



**Figura 19.** Relaciones entre algunos componentes del sistema de QS de *A. ferrooxidans*. Las AHLs sintetizadas por Afel (círculo rojo) pueden salir por difusión y por transporte activo. La proteína AcrA es parte de una bomba de eflujo capaz de transportar AHLs en otros microorganismos. La transcripción de AcrA se induce cuando hay exceso de AHLs en el medio externo de la bacteria. Otros genes miembros del regulón hipotético tienen diversas funciones. Los genes divergentes *orf3* (gen verde) y *afeR* (gen azul) son también parte del regulón hipotético. Una molécula análoga a AHL (AHLa134) es capaz de unirse a la proteína AfeR y reprimir la expresión de *afeI*. La flecha punteada significa expresión genica (transcripción y traducción).



Durante el desarrollo de esta tesis se estudiaron diferentes aspectos del sistema de QS de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Primero se estudió, utilizando un enfoque bioinformático, los posibles sitios de unión para la proteína AfeR. Obviamente, los sitios predichos en este estudio deben ser validados experimentalmente. Una forma de efectuar esta validación es utilizar fusiones transcripcionales de los blancos regulatorios con un gen reportero. A la fecha, se ha logrado clonar con éxito algunos de los PBSs más probables (el conjunto MEME) en un vector que genera fusiones transcripcionales. Se logró, además, introducirlos en una cepa de *E. coli* que contiene la proteína AfeR en un segundo vector bajo el control de un promotor inducible. La existencia de sitios similares a la caja *afe*, localizados en diferentes zonas del genoma de *A. ferrooxidans* sugiere fuertemente que existe un regulón QS en esta bacteria, pues secuencias similares implican topologías similares que pueden ser reconocidas por el mismo regulador transcripcional AfeR.

En segundo término, se estudió la expresión de un grupo de genes que poseen PBSs predichos río arriba de sus inicios traduccionales y del mismo gen *afeI*. La represión observada para *afeI* cuando se utilizó una mezcla de AHLs va en contra de lo que el modelo aceptado para la activación de sintasas de AHL, por parte de proteínas de la familia R (Fuqua y col., 1996) y de los resultados de Rivas y col. (2005) donde AfeR induce la expresión de *afeI*. Sin embargo es probable que la alta concentración utilizada, 500 veces superior a la concentración biológica observada por nuestro laboratorio (dato no mostrado), pueda resultar perjudicial para la célula y los genes que aumentaron su transcripción estén respondiendo a éste hecho promoviendo el cese de la producción de AHL (mediante la represión de *afeI*) y el flujo de AHLs desde el citoplasma. Esto último podría estar siendo ejecutado, al menos en parte, por la bomba

de flujo AcrA, cuya expresión se induce y se sabe que es capaz de promover el flujo de AHLs en *P. aeruginosa* y que es controlada por una proteína de la familia LuxR en *E. coli* (Rahmati y col., 2002). Por otra parte, pero en relación con lo mismo, gracias a los experimentos de qPCR se logró una represión del gen *afeI*. Esto ocurrió solamente cuando la concentración del análogo utilizado (AHLa 134) se utilizó a una concentración de 2  $\mu$ M. Cuando se utilizaron concentraciones menores, por el contrario, se observó una inducción de la transcripción de *afeI*. Este hecho sugiere que la transcripción desde la caja *afe* río arriba de *afeI* podría depender de la concentración de la molécula que se une a AfeR.

En tercer término, se efectuaron estudios acerca del perfil de AHLs producidos por *A. ferrooxidans*. Estos estudios son importantes para determinar mejor las condiciones en las que ocurren las inducciones efectuadas con AHLs exógenas, pues nos permiten conocer el tiempo que demora la bacteria en producir AHLs endógenas. Además, el hecho de que el perfil secretado dependa de la densidad celular, en el sentido de "proximidad", más que de crecimiento, es importante en la interpretación del funcionamiento del QS en este microorganismo.

## 5. CONCLUSIONES.

- Se definió un regulón QS putativo para *A. ferrooxidans*. Siete de los genes predichos como parte de él, aumentan su nivel de transcripción cuando se reprime la expresión de *afeI* utilizando AHLs sintéticas en el medio de cultivo.
- Se encontró una molécula sintética (AHLa134), capaz de reprimir la transcripción de *afeI*. Esto ocurre, probablemente, de manera dependiente de AfeR.
- *A. ferrooxidans* libera al medio extracelular un conjunto característico de AHLs dependiendo de la densidad celular que posee el cultivo.



## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas A., Adams, C., Scully, N., Glennon, J. y O'Gara, F. **2007**. A role for TonB1 in biofilm formation and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **274**:269-78
- Altschul S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. **1997**. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**:3389-3402
- Amaro A.M., Chamorro, D., Seeger, M., Arredondo, R., Peirano, I. y Jerez, C.A. **1991**. Effect of external pH perturbations on in vivo protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **173**:910-5
- Anderson R.M., Zimprich, C.A. y Rust, L. **1999**. A second operator is involved in *Pseudomonas aeruginosa* elastase (*lasB*) activation. *J. Bacteriol.* **181**:6264-70
- Andersson R.A., Eriksson, A.R., Heikinheimo, R., Mae, A., Pirhonen, M., Koiv, V., Hyytiainen, H., Tuikkala, A. y Palva, E.T. **2000**. Quorum sensing in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: the role of *expR(Ecc)*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **13**:384-93
- Antunes L.C., Schaefer, A.L., Ferreira, R.B., Qin, N., Stevens, A.M., Ruby, E.G. y Greenberg, E.P. **2007**. Transcriptome analysis of the *Vibrio fischeri* LuxR-LuxI regulon. *J. Bacteriol.* **189**:8387-91
- Arevalo-Ferro C., Hentzer, M., Reil, G., Gorg, A., Kjelleberg, S., Givskov, M., Riedel, K. y Eberl, L. **2003**. Identification of quorum-sensing regulated proteins in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by proteomics. *Environ. Microbiol.* **5**:1350-69
- Bailey T.L. y Gribskov, M. **1998**. Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches. *Bioinformatics* **14**:48-54
- Banderas A. **2007**. "Desarrollo de herramientas para monitorear la expresión del gen *afel* de *Acidithiobacillus ferrooxidans* y sus productos. Seminario de Título. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Blosser-Middleton R.S. y Gray, K.M. **2001**. Multiple N-acyl homoserine lactone signals of *Rhizobium leguminosarum* are synthesized in a distinct temporal pattern. *J. Bacteriol.* **183**:6771-7
- Boettcher K. y Ruby, E. **1995**. Detection and quantification of *Vibrio fischeri* autoinducer from symbiotic squid light organs. *J. Bacteriol.* **177**:1053-58
- Callahan S.M. y Dunlap, P.V. **2000**. LuxR- and acyl-homoserine-lactone-controlled non-lux genes define a quorum-sensing regulon in *Vibrio fischeri*. *J. Bacteriol.* **182**:2811-22
- Carlier A.L. y von Bodman, S.B. **2006**. The *rcaA* promoter of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* features a low-level constitutive promoter and an EsaR quorum-sensing-regulated promoter. *J. Bacteriol.* **188**:4581-4
- Chambers C.E., Lutter, E.I., Visser, M.B., Law, P.P. y Sokol, P.A. **2006**. Identification of potential CepR regulated genes using a *cep box* motif-based search of the *Burkholderia cenocepacia* genome. *BMC Microbiol.* **6**:104-23

- Chatterjee J., Miyamoto, C.M., Zouzoulas, A., Lang, B.F., Skouris, N. y Meighen, E.A. **2002**. MetR and CRP bind to the *Vibrio harveyi lux* promoters and regulate luminescence. *Mol. Microbiol.* **46**:101-11
- Chen H., Teplitski, M., Robinson, J.B., Rolfe, B.G. y Bauer, W.D. **2003**. Proteomic analysis of wild-type *Sinorhizobium meliloti* responses to *N*-acyl homoserine lactone quorum-sensing signals and the transition to stationary phase. *J. Bacteriol.* **185**:5029-36
- Chilton M.D., Currier, T.C., Farrand, S.K., Bendich, A.J., Gordon, M.P. y Nester, E.W. **1974**. *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **71**:3672-6
- Corpet F. **1988**. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* **16**:10881-90
- Cui Y., Chatterjee, A., Hasegawa, H., Dixit, V., Leigh, N. y Chatterjee, A.K. **2005**. ExpR, a LuxR homolog of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, activates transcription of *rsmA*, which specifies a global regulatory RNA-binding protein. *J. Bacteriol.* **187**:4792-803
- Daniels R., Reynaert, S., Hoekstra, H., Verreth, C., Janssens, J., Braeken, K., Fauvart, M., Beullens, S., Heusdens, C., Lambrichts, I., De Vos, D.E., Vanderleyden, J., Vermant, J. y Michiels, J. **2006**. Quorum signal molecules as biosurfactants affecting swarming in *Rhizobium etli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**:14965-70
- Davies D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. y Greenberg, E.P. **1998**. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**:295-8
- Dunlap P.V. **1999**. Quorum regulation of luminescence in *Vibrio fischeri*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **1**:5-12
- Eberhard A. **1972**. Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *J. Bacteriol.* **109**:1101-5
- Eberhard A., Burlingame, A.L., Eberhard, C., Kenyon, G.L., Neilson, K.H. y Oppenheimer, N.J. **1981**. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* **20**:2444-9
- Eddy S.R. **1998**. Profile hidden Markov models. *Bioinformatics* **14**:755-63
- Egland K.A. y Greenberg, E.P. **1999**. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: elements of the *luxI* promoter. *Mol. Microbiol.* **31**:1197-204
- Engbrecht J. y Silverman, M. **1984**. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**:4154-8
- Farah C., **2005**. Caracterización del quorum sensing del tipo AI-1 en *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Seminario de Título. Facultad de Ciencias. Universidad de Chile.
- Farah C., Vera, M., Morin, D., Haras, D., Jerez, C.A. y Guilian, N. **2005**. Evidence for a functional quorum-sensing type AI-1 system in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**:7033-40
- Federle M.J. y Bassler, B.L. **2003**. Interspecies communication in bacteria. *J. Clin. Invest.* **112**:1291-9
- Fuqua C. y Winans, S.C. **1996**. Conserved *cis*-acting promoter elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes. *J. Bacteriol.* **178**:435-40
- Fuqua W.C. y Winans, S.C. **1994**. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium* Ti plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J. Bacteriol.* **176**:2796-806



- Fuqua W.C., Winans, S.C. y Greenberg, E.P. **1994**. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J. Bacteriol.* **176**:269-75
- Gilson L., Kuo, A. y Dunlap, P.V. **1995**. AinS and a new family of autoinducer synthesis proteins. *J. Bacteriol.* **177**:6946-51
- Gray K.M. y Garey, J.R. **2001**. The evolution of bacterial LuxI and LuxR quorum sensing regulators. *Microbiology* **147**:2379-87
- Guiliani N., Bengrine, A., Borne, F., Chippaux, M. y Bonnefoy, V. **1997**. Alanyl-tRNA synthetase gene of the extreme acidophilic chemolithoautotrophic *Thiobacillus ferrooxidans* is highly homologous to alaS genes from all living kingdoms but cannot be transcribed from its promoter in *Escherichia coli*. *Microbiology* **143** ( Pt 7):2179-87
- Hanzelka B.L., Parsek, M.R., Val, D.L., Dunlap, P.V., Cronan, J.E., Jr. y Greenberg, E.P. **1999**. Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein. *J. Bacteriol.* **181**:5766-70
- Huang J.J., Han, J.I., Zhang, L.H. y Leadbetter, J.R. **2003**. Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:5941-9
- Kaiser D. **2004**. Signaling in *myxobacteria*. *Annu. Rev. Microbiol.* **58**:75-98
- Kaplan H.B. y Greenberg, E.P. **1985**. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J. Bacteriol.* **163**:1210-4
- Keller L. y Surette, M.G. **2006**. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**:249-58
- Kempner E.S. y Hanson, F.E. **1968**. Aspects of light production by *Photobacterium fischeri*. *J. Bacteriol.* **95**:975-9
- Khan S.R., Mavrodi, D.V., Jog, G.J., Suga, H., Thomashow, L.S. y Farrand, S.K. **2005**. Activation of the *phz* operon of *Pseudomonas fluorescens* 2-79 requires the LuxR homolog PhzR, N-(3-OH-Hexanoyl)-L-homoserine lactone produced by the LuxI homolog PhzI, and a *cis*-acting *phz* box. *J. Bacteriol.* **187**:6517-27
- Kirke D.F., Swift, S., Lynch, M.J. y Williams, P. **2004**. The *Aeromonas hydrophila* LuxR homologue AhyR regulates the *N*-acyl homoserine lactone synthase, AhyI positively and negatively in a growth phase-dependent manner. *FEMS Microbiol. Lett.* **241**:109-17
- Laue B.E., Jiang, Y., Chhabra, S.R., Jacob, S., Stewart, G.S., Hardman, A., Downie, J.A., O'Gara, F. y Williams, P. **2000**. The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, *N*-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl)homoserine lactone, via HdtS, a putative novel *N*-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology* **146** ( Pt 10):2469-80
- Lavrrar J.L. y McIntosh, M.A. **2003**. Architecture of a fur binding site: a comparative analysis. *J. Bacteriol.* **185**:2194-202
- Lenz D.H., Mok, K.C., Lilley, B.N., Kulkarni, R.V., Wingreen, N.S. y Bassler, B.L. **2004**. The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell* **118**:69-82
- Marchler-Bauer A. y Bryant, S.H. **2004**. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucl. Acids Res.* **32**:W327-31
- Marketon M.M., Glenn, S.A., Eberhard, A. y Gonzalez, J.E. **2003**. Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* **185**:325-31



- Markham N.R. y Zuker, M. **2005**. DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. *Nucleic Acids Res.* **33**:W577-81
- McGowan S.J., Barnard, A.M., Bosgelmez, G., Sebahia, M., Simpson, N.J., Thomson, N.R., Todd, D.E., Welch, M., Whitehead, N.A. y Salmond, G.P. **2005**. Carbapenem antibiotic biosynthesis in *Erwinia carotovora* is regulated by physiological and genetic factors modulating the quorum sensing-dependent control pathway. *Mol. Microbiol.* **55**:526-45
- Medina G., Juarez, K., Valderrama, B. y Soberon-Chavez, G. **2003**. Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR transcriptional regulation of the *rhlAB* promoter. *J. Bacteriol.* **185**:5976-83
- Miller M.B. y Bassler, B.L. **2001**. Quorum sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**:165-99
- Minogue T.D., Wehland-von Trebra, M., Bernhard, F. y von Bodman, S.B. **2002**. The autoregulatory role of EsaR, a quorum-sensing regulator in *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii*: evidence for a repressor function. *Mol. Microbiol.* **44**:1625-35
- More M.I., Finger, L.D., Stryker, J.L., Fuqua, C., Eberhard, A. y Winans, S.C. **1996**. Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science* **272**:1655-8
- Nealson K.H., Platt, T. y Hastings, J.W. **1970**. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J. Bacteriol.* **104**:313-22
- Parsek M.R. y Greenberg, E.P. **2005**. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends. Microbiol.* **13**:27-33
- Pearson J.P., Van Delden, C. y Iglewski, B.H. **1999**. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J. Bacteriol.* **181**:1203-10
- Pessi G. y Haas, D. **2000**. Transcriptional control of the hydrogen cyanide biosynthetic genes *hcnABC* by the anaerobic regulator ANR and the quorum-sensing regulators LasR and RhlR in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **182**:6940-9
- Piper K.R., Beck von Bodman, S. y Farrand, S.K. **1993**. Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature* **362**:448-50
- Pirhonen M., Flego, D., Heikinheimo, R. y Palva, E.T. **1993**. A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Embo J.* **12**:2467-76
- Ramirez P., Guilian, N., Valenzuela, L., Beard, S. y Jerez, C.A. **2004**. Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds, or metal sulfides. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**:4491-8
- Rampioni G., Bertani, I., Zennaro, E., Polticelli, F., Venturi, V. y Leoni, L. **2006**. The quorum-sensing negative regulator RsaL of *Pseudomonas aeruginosa* binds to the *lasI* promoter. *J. Bacteriol.* **188**:815-9
- Rawlings D.E. **2002**. Heavy metal mining using microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* **56**:65-91
- Rawlings D.E. y Kusano, T. **1994**. Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol. Rev.* **58**:39-55
- Reverchon S., Bouillant, M.L., Salmond, G. y Nasser, W. **1998**. Integration of the quorum-sensing system in the regulatory networks controlling virulence factor synthesis in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol. Microbiol.* **29**:1407-18

- Rivas M., Seeger, M., Holmes, D.S. y Jedlicki, E. 2005. A Lux-like quorum sensing system in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biol. Res.* **38**:283-97
- Rouillard J.M., Zuker, M. y Gulari, E. 2003. OligoArray 2.0: design of oligonucleotide probes for DNA microarrays using a thermodynamic approach. *Nucleic. Acids. Res.* **31**:3057-62
- Sambrook J. y Russell, D.W. 2001. *En* Cold Spring Harbor Laboratory Press (eds.), Molecular cloning : a laboratory manual.
- Schaefer A.L., Taylor, T.A., Beatty, J.T. y Greenberg, E.P. 2002. Long-chain acyl-homoserine lactone quorum-sensing regulation of *Rhodobacter capsulatus* gene transfer agent production. *J. Bacteriol.* **184**:6515-21
- Schaefer A.L., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan, J.E., Jr. y Greenberg, E.P. 1996. Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **93**:9505-9
- Schuster M. y Greenberg, E.P. 2006. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int. J. Med. Microbiol.* **296**:73-81
- Schuster M., Lostroh, C.P., Ogi, T. y Greenberg, E.P. 2003. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J. Bacteriol.* **185**:2066-79
- Schuster M., Urbanowski, M.L. y Greenberg, E.P. 2004. Promoter specificity in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing revealed by DNA binding of purified LasR. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **101**:15833-9
- Shadel G.S. y Baldwin, T.O. 1992. Positive autoregulation of the *Vibrio fischeri luxR* gene. LuxR and autoinducer activate cAMP-catabolite gene activator protein complex-independent and -dependent *luxR* transcription. *J. Biol. Chem.* **267**:7696-702
- Shaw P.D., Ping, G., Daly, S.L., Cha, C., Cronan, J.E., Jr., Rinehart, K.L. y Farrand, S.K. 1997. Detecting and characterizing *N*-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**:6036-41
- Sonnleitner E., Schuster, M., Sorger-Domenigg, T., Greenberg, E.P. y Blasi, U. 2006. Hfq-dependent alterations of the transcriptome profile and effects on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Microbiol.* **59**:1542-58
- Thompson J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic. Acids. Res.* **22**:4673-80
- Vannini A., Volpari, C., Gargioli, C., Muraglia, E., Cortese, R., De Francesco, R., Neddermann, P. y Marco, S.D. 2002. The crystal structure of the quorum sensing protein TraR bound to its autoinducer and target DNA. *Embo J.* **21**:4393-401
- von Bodman S.B., Ball, J.K., Faini, M.A., Herrera, C.M., Minogue, T.D., Urbanowski, M.L. y Stevens, A.M. 2003. The quorum sensing negative regulators EsaR and ExpR(Ecc), homologues within the LuxR family, retain the ability to function as activators of transcription. *J. Bacteriol.* **185**:7001-7
- Wagner V.E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A.I. y Iglewski, B.H. 2003. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J. Bacteriol.* **185**:2080-95



- Weissbach H. y Brot, N. 1991. Regulation of methionine synthesis in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **5**:1593-7
- West S.A., Griffin, A.S., Gardner, A. y Diggle, S.P. 2006. Social evolution theory for microorganisms. *Nat. Rev. Microbiol.* **4**:597-607
- Whiteley M. y Greenberg, E.P. 2001. Promoter specificity elements in *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing-controlled genes. *J. Bacteriol.* **183**:5529-34
- Wilkinson A., Danino, V., Wisniewski-Dye, F., Lithgow, J.K. y Downie, J.A. 2002. *N*-acyl-homoserine lactone inhibition of rhizobial growth is mediated by two quorum-sensing genes that regulate plasmid transfer. *J. Bacteriol.* **184**:4510-9
- Xavier K.B. y Bassler, B.L. 2003. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr. Opin. Microbiol.* **6**:191-7
- Xiao G., He, J. y Rahme, L.G. 2006. Mutation analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* *mvfR* and *pqsABCDE* gene promoters demonstrates complex quorum-sensing circuitry. *Microbiology* **152**:1679-86
- Zhu J. y Winans, S.C. 2001. The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**:1507-12



## 7. ANEXOS

### 7.1. Anexo 1. 77 ORFs seleccionados para ser impresos en la membrana de miniarreglo (modificado de formato genbank).

<b>ResB<sup>a</sup></b>	<b>complement(1927..3789)</b>
/gene="ResB"	
/note="Q9ZG10_THIFE Putative cytochrome c-type maturation protein ResB precursor [resB] [Thiobacillus ferrooxidans] 591 AA Score = 1153 bits (2982), Expect = 0.0 Identities= 573/574 (99%), Positives = 573/574 (99%) <sup>nb</sup>	
/note="print" <sup>c</sup>	
/note="AB" <sup>nd</sup>	
/note="DS 281bp" <sup>e</sup>	
/color=255 255 140	
/domain="pfam05140, ResB, ResB-like family. This family includes both ResB and cytochrome c biogenesis proteins. Mutations in ResB indicate that they are essential for growth. ResB is predicted to be a transmembrane protein." <sup>f</sup>	

<b>PetB</b>	<b>complement(5049..6257)<sup>f</sup></b>
/note="Q9KIW3_THIFE Putative cytochrome b precursor (EC1.10.2.2) [petB] [Thiobacillus ferrooxidans] 402 AA Score= 731 bits (1887), Expect = 0.0 Identities = 362/402 (90%), Positives = 362/402 (90%)"	
/note="print"	
/note="B"	
/note="DS 16bp "	
/note="good box"	
/note="INDUCED" <sup>g</sup>	
/gene="PetB"	
/domain="cd00284, Cytochrome_b__N, Cytochrome b (N-terminus)/b6/petB: Cytochrome b is a subunit of cytochrome bc1, an 11-subunit mitochondrial respiratory enzyme. Cytochrome b spans the mitochondrial membrane with 8 transmembrane helices (A-H) in eukaryotes. In plants and cyanobacteria, cytochrome b6 is analogous to eukaryote cytochrome b, containing two chains: helices A-D are encoded by the petB gene and helices E-H are encoded by the petD gene in these organisms. Cytochrome b/b6 contains two bound hemes and two ubiquinol/ubiquinone binding sites. The C-terminal portion of cytochrome b is described in a separate CD. cd00290, cytochrome_b_C, Cytochrome b(C-terminus)/b6/petD: Cytochrome b is a subunit of cytochrome bc1, an 11-subunit mitochondrial respiratory enzyme. Cytochrome b spans the mitochondrial membrane with 8 transmembrane helices (A-H) in eukaryotes. In plants and cyanobacteria, cytochrome b6 is analogous to eukaryote cytochrome b, containing two chains: helices A-D are encoded by the petB gene and helices E-H are encoded by the petD gene in these organisms. Cytochrome b/b6 contains two bound hemes and two ubiquinol/ubiquinone binding sites. The C-terminal domain is involved in forming the ubiquinol/ubiquinone binding sites, but not the heme binding sites. The N-terminal portion of cytochrome b, which contains both heme binding sites, is described in a separate CD. COG1290, QcrB, Cytochrome b subunit of the bc complex [Energy production and conversion]"	
/literature="Characterization of the petI and res operons of Acidithiobacillus ferrooxidans J. Bacteriol. 184 (5),1498-1501 (2002)"	
/color=255 255 140	

<b>ManC</b> <b>.complement(155243..156715)</b>
/note="Mannose-1-phosphate guanylyltransferase (EC 2.7.7.22) [cpsB] [Escherichia coli O6] 478 AA align Score = 379 bits (972), Expect = e-103 Identities = 205/481 (42%), Positives = 282/481 (58%), Gaps = 17/481 (3%)"
/note="PF01050 Mannose-6-phosphate isomerase All of the members of this Pfam entry belong to family 2 of the mannose-6-phosphate isomerases. The type II phosphomannose isomerases are bifunctional enzymes. This Pfam entry covers the isomerase domain. The guanosine diphospho-D-mannose pyrophosphorylase domain is in another Pfam entry, see NTP_transferase. Clan: Cupin fold This family is a member of the Cupin fold clan. This clan includes the following Pfam members: Pirin; MannoseP_isomer; JmjC; HgmA; GPI; EutQ; Ectoine_synth; DUF386; Cupin_5; Cupin_4; Cupin_3; Cupin_2; Cupin_1; CDO_1; Auxin_BP; Asp_Arg_Hydrox; ARD; AraC_binding; 3-HAO; PMI_type1; INTERPRO description (entry IPR001538) Mannose-6-phosphate isomerase or phosphomannose isomerase (EC:5.3.1.8) (PMI) is the enzyme that catalyzes the interconversion of mannose-6-phosphate and fructose-6-phosphate. In eukaryotes PMI is involved in the synthesis of GDP-mannose, a constituent of N- and O-linked glycans and GPI anchors and in prokaryotes it participates in a variety of pathways, including capsular polysaccharide biosynthesis and D-mannose metabolism. PMI's belong to the cupin superfamily whose functions range from isomerase and epimerase activities involved in the modification of cell wall carbohydrates in bacteria and plants, to non-enzymatic storage proteins in plant seeds, and transcription factors linked to congenital baldness in mammals PUBMED:11165500. Three classes of PMI have been defined PUBMED:8307007. The type II phosphomannose isomerases are bifunctional enzymes EC:5.3.1.8. This entry covers the isomerase region of the protein PUBMED:9507048. The guanosine diphospho-D-mannose pyrophosphorylase region is described in another InterPro entry (see INTERPRO:IPR005836)."
/note="pfam01050, MannoseP_isomer, Mannose-6-phosphate isomerase. All of the members of this Pfam entry belong to family 2 of the mannose-6-phosphate isomerases. The type II phosphomannose isomerases are bifunctional enzymes. This Pfam entry covers the isomerase domain. The guanosine diphospho-D-mannose pyrophosphorylase domain is in another Pfam entry, see pfam00483. pfam00483, NTP_transferase, Nucleotidyl transferase. This family includes a wide range of enzymes which transfer nucleotides onto phosphosugars. COG1210, GalU, UDP-glucose pyrophosphorylase [Cell envelope biogenesis, outer membrane]"
/note="print"
/note="QS related" <sup>h</sup>
/gene="manC"
/obsolete_name="galU"
/blastp_match="gij15597428 ref NP_250922.1  probable phosphomannose isomerase/GDP-mannose pyrophosphorylase [Pseudomonas aeruginosa PA01]"
/blast_score= 513 bits (1322), Expect e-144, Identities (53%)
<b>Tdr</b> <b>complement(172737..173519)</b>
/note="TonB-dependent receptor, putative"
/note="B"
/note="DS 78bp"
/note="print"
/note="good box"
/gene="Tdr"
/blastp_match="Q889S8 TonB-dependent receptor, putative [PSPTO0671] [Pseudomonas syringae (pv. tomato)]"
/blast_score=57.0 bits (136), Expect = 3e-07 Identities = (25%), Positives = (43%), Gaps = (9%)
/color=255 255 140



<b>SpoVR</b> complement(207366..208949)
/note="Conserved hypothetical protein"
/note="DS 25bp"
/note="C"
/note="print"
/note="good box"
/note="pfam04293, SpoVR, SpoVR like protein. One family member is Bacillus subtilis stage V sporulation protein R, which is involved in spore cortex formation. Little is known about cortex biosynthesis, except that it depends on several sigma E controlled genes, including spoVR."
/gene="spoVR"
/blastp_match="Q88QU1 Conserved hypothetical protein [PP0395] [Pseudomonas putida (strain KT2440)]"
/blast_score= 527 bits (1358), Expect = e-148 Identities= (53%), Positives = (68%), Gaps = (1%)
/color=255 255 140
/obsolete_name="dnaA"

<b>Ndr</b> complement(306836..307378)
/note="NADPH-dependent FMN reductase. NADPH-dependent FMN reductase (EC:1.5.1.29) reduces FMN and also reduces riboflavin and FAD, although more slowly. Members of this family catalyse the reaction NAD(P)H + FMN = NAD(P)(+) +FMNH(2)."
/note="DS 59bp"
/note="C"
/note="print"
/note="post-primer"
/note="good box"
/gene="Ndr"
/blastp_match="Q9RWP2 Hypothetical protein DR0624 [DR0624] [Deinococcus radiodurans]"
/blast_score=130 bits (327), Expect = 1e-29 Identities = (44%), Positives = (56%), Gaps = (1%)
/color=255 255 140

<b>hyp_0</b> 333293..334078
/gene="hyp_0"
/blastp_match="Q98J08 Hypothetical protein mlr2161 [MLR2161] [Rhizobium loti (Mesorhizobium loti)]"
/blast_score=99.0 bits (245), Expect = 7e-20 Identities = (28%), Positives = (38%), Gaps = (0%)
/color=255 255 140
/note="Hypothetical transmembrane protein"
/note="B"
/note="print"
/note="post-primer"



<b>PheS</b>	<b>481877..482899</b>
/note="COG0016, PheS, Phenylalanyl-tRNA synthetase alpha subunit [Translation, ribosomal structure and biogenesis] CD-Length = 335 residues, 93.1% aligned Score = 415 bits (1069), Expect = 3e-117"	
/note="print"	
/note="C"	
/note="DS 104bp"	
/note="good box"	
/gene="PheS"	
/blastp_match="gi 19386912 gb AAL87034.1  phenylalanyl-tRNA-synthetase alpha subunit [Azotobacter vinelandii]"	
/blast_score=447 bits (1149), Expect = e-124 Identities = (66%), Positives = (80%), Gaps = (0%)	
/color=255 255 140	

<b>LysR</b>	<b>550395..551321</b>
/note="Transcriptional regulator [Tbd_1717] [Thiobacillus denitrificans ATCC 25259] LysR family protein"	
/note="print"	
/note="B"	
/gene="LysR"	
/blast_score=162 bits (411), Expect = 5e-39 Identities = (35%), Positives = (55%)	
/color=255 255 140	

<b>GalE</b>	<b>complement(731427..732389)</b>
/note="UDP-galactose 4-epimerase [Acidithiobacillus ferrooxidans]"	
/note="REFERENCE 1 (residues 1 to 320) AUTHORS Barreto,M., Jedlicki,E. and Holmes,D.S. TITLE Identification of a Gene Cluster for the Formation of Extracellular Polysaccharide Precursors in the Chemolithoautotroph Acidithiobacillus ferrooxidans JOURNAL Appl. Environ. Microbiol. 71 (6), 2902-2909 (2005)"	
/note="print"	
/note="QS related"	
/gene="galE"	
/color=255 255 140	

<b>SixA</b>	<b>737687..738169</b>
/gene="sixA"	
/product="hypothetical protein [Desulfitobacterium hafni..."	
//label=ORF0700	
/color=255 255 140	
/note="DS 101bp"	
/note="AB"	
/note="print"	
/note="COG2062, SixA, Phosphohistidine phosphatase SixA [Signal transduction mechanisms]"	
/note="post-primer"	
/note="good box"	

<b>CcmA</b>	<b>complement(756302..756784)</b>
/gene="ccmA"	
/product="ABC transporter [Frankia sp. Ccl3]"	
/label=ORF0717c	
/color=255 255 140	
/note="CD"	
/note="print"	
/note="DS 135bp"	
/note="good box"	

<b>FhuA</b>	<b>757187..759508</b>
/note="TonB-dependent receptor"	
/note="CD"	
/note="DS 247bp"	
/note="print"	
/note="se imprime por ser uno de los dos divergenes alrededor de la caja, a pesar de exceder la distancia"	
/gene="FhuA"	
/blastp_match="Q8P5Q7 TonB-dependent receptor [FHUA] [Xanthomonas campestris (pv. campestris)]"	
/blast_score=94.7 bits (234), Expect = 5e-18 Identities = (21%), Positives = (37%), Gaps = (13%)	
/color=255 255 140	

<b>FkbM</b>	<b>complement(836222..837013)</b>
/gene="fkbM"	
/label=ORF0786c	
/product="Methyltransferase FkbM"	
/color=255 255 140	
/note="print"	
/note="B"	
/note="SAM-dependent methyltransferases"	

<b>PepC complement(848626..850074)</b>
/product="leucyl aminopeptidase"
/label=ORF0798c
/note="cd00433, Peptidase_M17, Cytosol aminopeptidase family, catalytic domain. Family M17 contains zinc- and manganese-dependent exopeptidases, including leucine aminopeptidase. They catalyze removal of amino acids from the N-terminus of a protein and play a key role in protein degradation and in the metabolism of biologically active peptides. They do not contain HEXXH motif (which is used as one of the signature patterns to group the peptidase families) in the metal-binding site. The two associated zinc ions and the active site are entirely enclosed within the C-terminal catalytic domain in leucine aminopeptidase. The enzyme is a hexamer, with the catalytic domains clustered around the three-fold axis, and the two trimers related to one another by a two-fold rotation. This family includes proteins from bacteria, archaea, animals and plants.."
/note="pfam00883, Peptidase_M17, Cytosol aminopeptidase family, catalytic domain. The two associated zinc ions and the active site are entirely enclosed within the C-terminal catalytic domain in leucine aminopeptidase.."
/note="B"
/note="DS 34bp"
/note="print"
/note="good box"
/gene="pepC"
/color=255 255 140

<b>YjgP/Q 850242..851360</b>
/product="permease YjgP/YjgQ [Dechloromonas aromatica RCB]."
/label=ORF0799
/note="pfam03739, YjgP_YjgQ, Predicted permease YjgP/YjgQ family. Members of this family are predicted integral membrane proteins of unknown function. They are about 350 amino acids long and contain about 6 transmembrane regions. They are predicted to be permeases although there is no verification of this.."
/note="B"
/note="print"
/note="DS 67bp"
/note="good box"
/gene="yjp/yjq"
/color=255 255 140

<b>hyp_2 complement(949734..950009)</b>
/note="hypotetical protein"
/note="print"
/note="alpha-2,3-sialyltransferase [Campylobacter coli RM2228]"
/note="220 DS"
/note="codon de inicio no esta claro se dejo ATG pero es probable que el gen sea mas largo"
/note="post-primer"
/gene="hyp_2"
/color=255 255 140
/blast_score="Score = 54.7 bits (130), Expect = 2e-06 Identities = 28/73 (38%), Positives = 39/73 (53%), Gaps = 3/73 (4%)"



<b>Nre</b>	<b>complement(951073..951750)</b>
/note="COG0778 Nitroreductase"	
/note="print"	
/note="B"	
/gene="Nre"	
/color=255 255 140	

<b>PldC-2</b>	<b>972218..972859</b>
/note="Nuclease-related protein"	
/note="DS 78bp"	
/note="AB"	
/note="print"	
/note="good box"	
/note="cd00138, PLDc, Phospholipase D. Active site motifs; The PLD superfamily includes enzymes involved in signal transduction, lipid biosynthesis, endonucleases and open reading frames in pathogenic viruses and bacteria. PLD hydrolyzes the terminal phosphodiester bond of phospholipids to phosphatidic acid and a hydrophilic constituent. Phosphatidic acid is a compound that is heavily involved in signal transduction. The common features of the family members are that they can bind to a phosphodiester moiety, and that most of these enzymes are active as bi-lobed monomers or dimers"	
/note="COG1502, CIs, Phosphatidylserine/phosphatidylglycerophosphate/cardioliipin synthases and related enzymes [Lipid metabolism]"	
/gene="PLDc2"	
/blastp_match="AAS14889 Nuclease-related protein [WD1243] [Wolbachia pipientis wMel]"	
/blast_score= 130 bits (328), Expect = 1e-29 Identities = (44%), Positives = (64%)	
/color=255 255 140	
/obsolete_name="nrp"	

<b>MobB</b>	<b>complement(974112..974606)</b>
/note="Molybdopterin-guanine dinucleotide biosynthesis protein B"	
/note="DS 153bp"	
/note="AB"	
/note="print"	
/note="good box"	
/gene="MobB"	
/blastp_match="Q7NV13 Molybdopterin-guanine dinucleotide biosynthesis protein B [MOBB] [Chromobacterium violaceum]"	
/blast_score=151 bits (381), Expect = 4e-36 Identities = (51%), Positives = (65%), Gaps = (0%)	
/color=255 255 140	

<b>TrpB</b>	<b>981195..982394</b>
/note="Tryptophan synthase beta chain"	
/note="DS 40bp"	
/note="A"	
/note="print"	
/note="good box"	
/gene="trpB"	
/blastp_match="Q8XXY0 TRPB_RALSO Tryptophan synthase beta chain (EC 4.2.1.20) [TRPB] [Ralstonia solanacearum (Pseudomonas solanacearum)]"	
/blast_score= 591 bits (1524), Expect = e-168 Identities = (71%), Positives = (82%)	
/color=255 255 140	

<b>Zwf</b>	<b>complement(1027560..1029023)</b>
/note="Glucose-6-phosphate dehydrogenase"	
/note="print"	
/note="AB"	
/gene="Zwf"	
/blastp_match="Q82X90 Glucose-6-phosphate dehydrogenase (EC 1.1.1.49) [ZWF] [Nitrosomonas europaea]"	
/blast_score=612 bits (1577), Expect = e-174 Identities = (63%), Positives = (76%), Gaps = (1%)	
/color=255 255 140	

<b>ThiJ/Pfpl</b>	<b>1043622..1044305</b>
/gene="ThiJ/Pfpl"	
/product="hypothetical protein [Magnetospirillum magneto..."	
/product="ThiJ/Pfpl [Burkholderia cenocepacia HI2424]"	
/label=ORF0970	
/note="COG4977, COG4977, Transcriptional regulator containing an amidase domain and an AraC-type DNA-binding HTH domain [Transcription]."	
/note="DS 98bp"	
/note="print"	
/note="C"	
/note="good box"	
/note="pfam01965, DJ-1_Pfpl, DJ-1/Pfpl family. The family includes the protease Pfpl. This domain is also found in transcriptional regulators. This family appears to be distantly related to Glutamine amidotransferases pfam00117"	
/color=255 255 140	
/obsolete_name="hyp_3"	



<b>DacB</b>	<b>1086478..1087980</b>
<p>/note="D-Ala-D-Ala carboxypeptidase 3 (S13) family. Proteolytic enzymes that exploit serine in their catalytic activity are ubiquitous, being found in viruses, bacteria and eukaryotes PUBMED:7845208. They include a wide range of peptidase activity, including exopeptidase, endopeptidase, oligopeptidase and omega-peptidase activity. Over 20 families (denoted S1 - S27) of serine protease have been identified, these being grouped into 6 clans (SA, SB, SC, SE, SF and SG) on the basis of structural similarity and other functional evidence PUBMED:7845208. Structures are known for four of the clans (SA, SB, SC and SE): these appear to be totally unrelated, suggesting at least four evolutionary origins of serine peptidases and possibly many more PUBMED:7845208. Notwithstanding their different evolutionary origins, there are similarities in the reaction mechanisms of several peptidases. Chymotrypsin, subtilisin and carboxypeptidase C clans have a catalytic triad of serine, aspartate and histidine in common: serine acts as a nucleophile, aspartate as an electrophile, and histidine as a base PUBMED:7845208. The geometric orientations of the catalytic residues are similar between families, despite different protein folds PUBMED:7845208. The linear arrangements of the catalytic residues commonly reflect clan relationships. For example the catalytic triad in the chymotrypsin clan (SA) is ordered HDS, but is ordered DHS in the subtilisin clan (SB) and SDH in the carboxypeptidase clan (SC) PUBMED:7845208, PUBMED:8439290. Peptidases are grouped into clans and families. Clans are groups of families for which there is evidence of common ancestry. Families are grouped by their catalytic type, the first character representing the catalytic type: S, serine; T, threonine; C, cysteine; A, aspartic; M, metallo and U, unknown. A clan that contains families of more than one type is described as being of type P. The serine, threonine and cysteine peptidases utilise the catalytic part of an amino acid as a nucleophile and form an acyl intermediate - these peptidases can also readily act as transferases. In the case of aspartic and metallopeptidases, the nucleophile is an activated water molecule. This family of serine peptidases belong to MEROPS peptidase family S13 (D-Ala-D-Ala carboxypeptidase C, clan SE). The predicted active site residues for members of this family and family S12 occur in the motif SXXK."</p>	
/note="print"	
/note="DS 75bp"	
/note="B"	
/note="good box"	
/gene="dacB"	
/blastp_match="Q8YWE7 Hypothetical protein Alr1666 [ALR1666] [Anabaena sp. (strain PCC7120)]"	
/blast_score=148 bits (373), Expect 2e-34, Identities (28%), Positives (45%), Gaps (9%)	
/color=255 255 140	
/obsolete_name="cpe"	
<b>hyp_4</b>	<b>1106764..1107528</b>
/note="AB"	
/note="print"	
<p>/note="pfam03794, HHE, Domain of Unknown function. This domain normally occurs as tandem repeats and is found in bacteria, yeast and plants. It contains two fully conserved histidines and one glutamate residue. Members of the family include DnrN, NorA and ScdA, which have been implicated in NO response and cell wall physiology.."</p>	
/color=255 255 140	
/product="Protein of unknown function HHE [Anaeromyxobacter dehalogenans 2CP-C]"	
/gene="hyp_4"	



<b>Hfq</b> <b>complement(1158054..1158317)</b>
/color=9
/product="Small nuclear ribonucleoprotein (Sm protein) [Nitrosomonas eutropha C71]"
/note="cd01716, Hfq, Hfq, an abundant, ubiquitous RNA-binding protein, functions as a pleiotrophic regulator of RNA metabolism in prokaryotes, required for transcription of some transcripts and degradation of others. Hfq binds small RNA molecules called riboregulators that modulate the stability or translation efficiency of RNA transcripts. Hfq binds preferentially to unstructured A/U-rich RNA sequences and is similar to the eukaryotic Sm proteins in both sequence and structure. Hfq forms a homo-hexameric ring similar to the heptameric ring of the Sm proteins"
/note="COG1923, Hfq, Uncharacterized host factor I protein [General function prediction only]."
/note="print"
/note="QS related"
/gene="hfq"

<b>AcrA-1</b> <b>1164701..1165789</b>
/gene="acrA"
/product="blr2860 [Bradyrhizobium japonicum] >gi 27351117..."
/label=ORF1086
/note="COG0845, AcrA, Membrane-fusion protein [Cell envelope biogenesis, outer membrane]."
/note="DS 114bp"
/note="print"
/note="B"
/note="good box"
/note="INDUCED"
/color=255 255 140

<b>hyp_5</b> <b>1172718..1174184</b>
/product="hypothetical protein [Rhodospirillum rubrum]"
/label=hyp_5
/color=255 255 140
/note="COG3025, COG3025, Uncharacterized conserved protein [Function unknown]."
/note="print"

<b>RpoS</b>	<b>1204242..1205189</b>
/product="RNA polymerase sigma factor rpoS"	
/gene="rpoS"	
/label=ORF1124	
/color=255 255 140	
/note="COG0568, RpoD, DNA-directed RNA polymerase, sigma subunit (sigma70/sigma32) [Transcription]"	
/note="pfam04542, Sigma70_r2, Sigma-70 region 2. Region 2 of sigma-70 is the most conserved region of the entire protein. All members of this class of sigma-factor contain region 2. The high conservation is due to region 2 containing both the -10 promoter recognition helix and the primary core RNA polymerase binding determinant. The core binding helix, interacts with the clamp domain of the largest polymerase subunit, beta prime. The aromatic residues of the recognition helix, found at the C-terminus of this domain are thought to mediate strand separation, thereby allowing transcription initiation. ."	
/note="pfam04539, Sigma70_r3, Sigma-70 region 3. Region 3 forms a discrete compact three helical domain within the sigma-factor. Region is not normally involved in the recognition of promoter DNA, but as some specific bacterial promoters containing an extended -10 promoter element, residues within region 3 play an important role. Region 3 primarily is involved in binding the core RNA polymerase in the holoenzyme.."	
/note="print"	
/note="C"	

<b>hyp_6</b>	<b>1206024..1206563</b>
/product="hypothetical protein Noc_1000 [Nitrosococcus oceani ATCC 19707]."	
/gene="hyp_6"	
/color=255 255 140	
/note="print"	
/note="DS 190bp"	
/note="B"	
/note="post-primer"	
/note="good box"	

<b>TrbF</b>	<b>complement(1333742..1334410)</b>
/note="Conjugal transfer protein [Nitrobacter hamburgensis X14]."	
/note="218 DS"	
/note="C"	
/note="print"	
/note="pfam04585, TrbF, Conjugal transfer protein. Family of proteins known to be involved in conjugal transfer. The TrbF protein is thought to compose part of the pilus required for transfer. ."	
/note="la distancia esta excedida, se imprimi� por estar involucrado en conjugaci�n"	
/gene="trbF"	
/color=255 255 140	

<b>TrbL complement(1385961..1387730)</b>
/note="AFO-2081 Probable TrbL [TRBL] [Oligotropha carboxidovorans (Pseudomonas carboxydovorans)]"
/note="print"
/note="AB"
/note="COG3846, TrbL, Type IV secretory pathway, TrbL components [Intracellular trafficking and secretion]"
/gene="trbL"
/blastp_match="CAG28521 Probable TrbL [TRBL] [Oligotropha carboxidovorans (Pseudomonas carboxydovorans)]"
/blast_score= 58.9 bits (141), Expect 2e-07, Identities (23%), Positives (38%), Gaps (20%)
/color=255 255 140

<b>hyp_7 complement(1466760..1467593)</b>
/note="hypothetical protein MCA0218 [Methylococcus capsulatus str. Bath]"
/note="DS 103bp"
/note="print"
/note="B"
/note="good box"
/gene="hyp_7"
/color=255 255 140

<b>AhpC complement(1529113..1529715)</b>
/product="antioxidant, AhpC/Tsa family [Methylococcus capsulatus str. Bath]."
/note="COG1225, Bcp, Peroxiredoxin [Posttranslational modification, protein turnover, chaperones]."
/note="pfam00578, AhpC-TSA, AhpC/TSA family. This family contains proteins related to alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) and thiol specific antioxidant (TSA). ."
/note="AB"
/note="DS 62bp"
/note="print"
/note="good box"
/gene="AhpC/TSA"
/color=255 255 140

<b>GnnA complement(1541762..1542703)</b>
/note="NAD+ dependent UDP-N-acetylglucosamine 3-dehydrogenase"
/note="print"
/note="CD"
/note="DS 208bp"
/gene="GnnA"
/blastp_match="Q6QHI6 NAD+ dependent UDP-N-acetylglucosamine 3-dehydrogenase [gnnA] [Thiobacillus ferrooxidans]"
/blast_score=498 bits (1283), Expect e-140 Identities (82%), Positives (82%)
/color=255 255 140



<b>hyp_8</b> complement(1586164..1586598)
/note="possible transmembrane protein [Thiobacillus denitrificans ATCC25259]."
/note="print"
/note="AB"
/note="post-primer"
/gene="hyp_8"
/color=255 255 140

<b>OpgG</b> complement(1922087..1923631)
/note="Glucans biosynthesis protein G precursor [opgG]. Periplasmic glucan biosynthesis protein, MdoG This family represents MdoG, a protein that is necessary for the synthesis of periplasmic glucans. The function of MdoG remains unknown. It has been suggested that it may catalyse the addition of branches to a linear glucan backbone."
/note="print"
/note="C"
/note="INDUCED"
/gene="OpgG"
/blastp_match="Q9F496 OPGG_ERWCH Glucans biosynthesis protein G precursor [opgG] [Erwinia chrysanthemi]"
/blast_score=350 bits (897), Expect 5e-95 Identities (38%), Positives (54%), Gaps (4%)
/color=255 255 140

<b>RocR</b>	<b>complement(1926090..1927445)</b>
/note="Sigma-54 dependent transcriptional regulator"	
/note="DS 106bp"	
/note="print"	
/note="CD"	
/note="Helix-turn-helix, Fis-type [Daro_0682] [Dechloromonas aromatica RCB]"	
/note="IPR002078 Some bacterial regulatory proteins activate the expression of genes from promoters recognized by core RNA polymerase associated with the alternative sigma-54 factor. These have a conserved domain of about 230 residues involved in the ATP-dependent PUBMED:8407777, PUBMED:2041769 interaction with sigma-54. About half of the proteins in which this domain is found (algB, dcdT, flbD, hoxA, hupR1, hydG, ntrC, pgtA and pilR) belong to signal transduction two-component systems PUBMED:2694934 and possess a domain that can be phosphorylated by a sensor-kinase protein in their N-terminal section. Almost all of these proteins possess a helix-turn-helix DNA-binding domain in their C-terminal section. The domain which interacts with the sigma-54 factor has an ATPase activity. This may be required to promote a conformational change necessary for the interaction PUBMED:1534752. The domain contains an atypical ATP-binding motif A (P-loop) as well as a form of motif B. The two ATP-binding motifs are located in the N-terminal section of the domain."	
/note="good box"	
/note="COG3829, RocR, Transcriptional regulator containing PAS, AAA-type ATPase, and DNA-binding domains [Transcription / Signal transduction mechanisms]"	
/note="COG2204, AtoC, Response regulator containing CheY-like receiver, AAA-type ATPase, and DNA-binding domains [Signal transduction mechanisms]."	
/gene="rocR"	
/blastp_match="Q88RS8 Sigma-54 dependent transcriptional regulator [PP0051] [Pseudomonas putida (strain KT2440)]"	
/blast_score=366 bits (939), Expect = e-100 Identities = (47%), Positives = (62%), Gaps = (6%)	
/color=255 255 140	
/obsolete_name="hyp_10"	

<b>GloB</b>	<b>1927721..1928485</b>
/note="Beta-lactamase-like [MflaDRAFT_0381] Methylobacillus flagellatus KT]"	
/note="DS 38bp"	
/note="print"	
/note="CD"	
/note="Apart from the B-lactamases a number of other proteins contain this domain PUBMED:7588620. These proteins include thiolesterases, members of the glyoxalase II family, that catalyse the hydrolysis of S-D-lactoyl-glutathione to form glutathione and D-lactic acid and a competence protein that is essential for natural transformation in Neisseria gonorrhoeae and could be a transporter involved in DNA uptake. Except for the competence protein these proteins bind two zinc ions per molecule as cofactor."	
/note="good box"	
/gene="gloB"	
/color=255 255 140	
/obsolete_name="bl-1"	

<b>AlaS</b>	<b>complement(1951303..1953936)</b>
/gene="alaS"	
/blastp_match="Q56273 SYA_THIFE Alanyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.7) (Alanine-tRNA ligase) (AlaRS) [ALAS] [Thiobacillus ferrooxidans]"	
/blast_score=1404 bits (3635), Expect = 0.0 Identities = (82%), Positives = (82%)	
/color=255 255 140	
/note="DS 58bp"	
/note="print"	
/note="B"	
/note="Alanyl-tRNA synthetase. Guilian, N., Bengrine, A., Borne, F., Chippaux, M. and Bonnefoy, V., Alanyl-tRNA synthetase gene of the extreme acidophilic chemolithoautotrophic Thiobacillus ferrooxidans is highly homologous to alaS genes from all living kingdoms but cannot be transcribed from its promoter in Escherichia coli"	
/note="good box"	

<b>HesB</b>	<b>complement(2197195..2197518)</b>
/note="gnl CDD 23223, pfam01521, HesB, HesB-like domain.	
This family includes HesB which may be involved in nitrogen fixation; the hesB gene is expressed only under nitrogen fixation conditions. Other members of this family include various hypothetical proteins of which some also contain NifU-like domains pfam01106 which is also involved in nitrogen fixation. In the gram-negative soil bacterium Rhizobium etli, the hesB-like gene iscN is required for nitrogen fixation."	
/note="DS 122bp"	
/note="print"	
/note="CD"	
/note="post-primer"	
/note="good box"	
/gene="hesB"	
/blastp_match="gi 53719897 ref YP_108883.1  HesB family protein [Burkholderia pseudomallei K96243]"	
/blast_score= 159 bits (401), Expect 2e-38 Identities	
(68%), Positives (84%)	
/color=255 255 140	



<b>Rho</b>	<b>complement(2211352..2212725)</b>
/product="Transcription termination factor Rho [Nitrosococcus oceani ATCC 19707]"	
/note="cd01128, rho_factor, Transcription termination factor rho is a bacterial ATP-dependent RNA/DNA helicase. It is a homohexamer. Each monomer consists of an N-terminal domain of the OB fold, which is responsible for binding to cysteine rich nucleotides. This alignment is of the C-terminal ATP binding domain."	
/note="cd01136, ATPase_flagellum-secretory_path_III, Flagellum-specific ATPase/type III secretory pathway virulence-related protein. This group of ATPases are responsible for the export of flagellum and virulence-related proteins. The bacterial flagellar motor is similar to the F0F1-ATPase, in that they both are proton driven rotary molecular devices. However, the main function of the bacterial flagellar motor is to rotate the flagellar filament for cell motility. Intracellular pathogens such as Salmonella and Chlamydia also have proteins which are similar to the flagellar-specific ATPase, but function in the secretion of virulence-related proteins via the type III secretory pathway.."	
/note="pfam00006, ATP-synt_ab, ATP synthase alpha/beta family, nucleotide-binding domain. This family includes the ATP synthase alpha and beta subunits the ATP synthase associated with flagella.."	
/note="d01120, RecA-like_NTPases, RecA-like NTPases. This family includes the NTP binding domain of F1 and V1 H+ATPases, DnaB and related helicases as well as bacterial RecA and related eukaryotic and archaeal recombinases. This group also includes bacterial conjugation proteins and related DNA transfer proteins involved in type II and type IV secretion."	
/note="DS 57bp"	
/note="C"	
/note="print"	
/note="good box"	
/gene="rho_"	

<b>Atp</b>	<b>2213456..2214172</b>
/note="ABC transporter, ATP-binding protein, putative"	
/note="print"	
/note="B"	
/gene="Atp"	
/blastp_match="Q88KH3 ABC transporter, ATP-binding protein, putative [PP2317] [Pseudomonas putida (strain KT2440)]"	
/blast_score=152 bits (385), Expect = 3e-36 Identities = (38%), Positives = (55%), Gaps = (1%)	
/color=255 255 140	

<b>hyp_11</b>	<b>2283112..2283306</b>
/product="Hypothetical conserved protein [TTC1365] [Thermus thermophilus (strain HB27 / ATCC BAA-163 / DSM 7039)]"	
/color=255 255 140	
/note="CD"	
/note="print"	
/note="DS 7bp"	
/note="post-primer"	
/note="good box"	
/gene="hyp_11"	

<b>hyp_12 complement(2284223..2285206)</b>
/product="Bll5419 protein [bll5419] [Bradyrhizobium japonicum]"
/color=255 255 140
/note="print"
/note="DS 12bp"
/note="C"
/note="This family of proteins are integral membrane proteins. These proteins are uncharacterised but contain a conserved PG motif. Some members of this family are annotated as dolichol-P-glucose synthetase and contain a Glycos_transf_2 domain."
/note="good box"
/gene="hyp_12"

<b>hyp_13 complement(2293343..2294203)</b>
/product="Hypothetical protein [MCA0606] [Methylococcus capsulatus]"
/label=hyp_13
/note="DS 61bp"
/note="A"
/note="print"
/note="ErfK/YbiS/YcfS/YnhG This family of proteins are found in a range of bacteria. Th conserved region contains a conserved histidine and cysteine, suggesting that these proteins have an enzymatic activity. Several members of this family contain peptidoglycan binding domains. So these proteins may use peptidoglycan or a precursor as a substrate."
/note="good box"
/color=255 255 140

<b>DsbD</b>	<b>complement(2321659..2323524)</b>
/note="Thioredoxin:cytochrome c biogenesis protein transmembrane region"	
/note="DS 137bp"	
/note="C"	
/note="print"	
/note="good box"	
/gene="DsbD"	
/blastp_match="Q820H6 Thioredoxin:cytochrome c biogenesis protein transmembrane region [DSBD] [Nitrosomonas europaea]"	
/blast_score=381 bits (979), Expect = e-104 Identities =(39%), Positives = (51%), Gaps = (5%)	
/color=255 255 140	

<b>hy_14</b>	<b>2323823..2324650</b>
/color=255 255 140	
/note="DS 143bp"	
/note="C"	
/note="print"	
/note="Hypothetical protein FLJ11342 (Abhydrolase domain containing 10) [ABHD10] [Homo sapiens (Human)]"	
/note="Abhydrolase domain containing 10 [ABHD10] [Bos taurus (Bovine)] "	
/note="good box"	
/product="Hypothetical protein CC1053 [CC1053] [Caulobacter crescentus]"	
/gene="hyp_14"	

<b>KdsB</b>	<b>complement(2369666..2370424)</b>
/product="putative 3-deoxy-manno-octulosonate cytidyltransferase [Neisseria gonorrhoeae FA 1090]"	
/label=ORF2287c	
/note="replace"	
/note="print"	
/note="72bp DS"	
/note="CD"	
/note="COG1212, KdsB, CMP-2-keto-3-deoxyoctulosonic acid synthetase [Cell envelope biogenesis, outer membrane]."	
/note="pfam02348, CTP_transf_3, Cytidyltransferase. This family consists of two main Cytidyltransferase activities: 1) 3-deoxy-manno-octulosonate cytidyltransferase, EC:2.7.7.38 catalysing the reaction:- CTP + 3-deoxy-D-manno-octulosonate <=> diphosphate + CMP-3-deoxy-D-manno-octulosonate, 2) acylneuraminate cytidyltransferase EC:2.7.7.43, catalysing the reaction:- CTP + N-acylneuraminate <=> diphosphate + CMP-N-acylneuraminate. NeuAc cytidyltransferase of Mannheimia haemolytica has been characterised describing kinetics and regulation by substrate charge, energetic charge and amino-sugar demand"	
/note="good box"	
/color=255 255 140	
/gene="KdsB"	



<b>RecN</b>	<b>2408896..2410572</b>
/note="DNA repair protein recN (Recombination protein N)"	
/note="DS 146bp"	
/note="C"	
/note="print"	
/note="good box"	
/gene="RecN"	
/blastp_match="Q9PB02 REC_N_XYLFA DNA repair protein recN (Recombination protein N) [REC_N] [Xylella fastidiosa]"	
/blast_score=315 bits (806), Expect = 2e-84 Identities = (34%), Positives = (49%), Gaps = (0%)	
/color=255 255 140	

<b>ArgC</b>	<b>2447807..2449003</b>
/product="Argininosuccinate synthase (EC 6.3.4.5) [argG] [Pseudomonas fluorescens (strain Pf-5 / ATCC BAA-477)]"	
/note="B"	
/note="print"	
/note="cd01999, Argininosuccinate_Synthase, Argininosuccinate synthase. The Argininosuccinate synthase is a urea cycle enzyme that catalyzes the penultimate step in arginine biosynthesis: the ATP-dependent ligation of citrulline to aspartate to form argininosuccinate, AMP and pyrophosphate . In humans, a defect in the AS gene causes citrullinemia, a genetic disease characterized by severe vomiting spells and mental retardation. AS is a homotetrameric enzyme of chains of about 400 amino-acid residues. An arginine seems to be important for the enzyme's catalytic mechanism. The sequences of AS from various prokaryotes, archaeobacteria and eukaryotes show significant similarity."	
/note="post-primer"	
/color=255 255 140	
/gene="argC"	

<b>TruB</b>	<b>complement(2456838..2457716)</b>
/product="TRNA pseudouridine synthase B [truB] [Pseudomonas fluorescens (strain Pf-5 / ATCC BAA-477)]"	
/label=ORF2392c	
/note="TruB family pseudouridylate synthase (N terminal domain). Members of this family are involved in modifying bases in RNA molecules. They carry out the conversion of uracil bases to pseudouridine. This family includes TruB, a pseudouridylate synthase that specifically converts uracil 55 to pseudouridine in most tRNAs. This family also includes Cbf5p that modifies rRNA [2]."	
/note="D"	
/note="print"	
/note="co-r 1"	
/color=255 255 140	
/gene="truB"	

<b>RplF</b>	<b>complement(2501281..2501802)</b>
/product="50S ribosomal protein L6 [Pseudomonas aeruginosa]"	
/label=ORF2441c	
/note="DS 90bp"	
/note="print"	
/note="B"	
/note="post-primer"	
/note="good box"	
/note="COG0097, RplF, Ribosomal protein L6P/L9E [Translation, ribosomal structure and biogenesis]."	
/gene="rplF"	
/obsolete_name="L6"	

<b><math>\beta</math>-lac2</b>	<b>2557384..2557992</b>
/product="Beta-lactamase-like [MflaDRAFT_1931] [Methylobacillus flagellatus KT]"	
/color=255 255 140	
/note="DS 176bp"	
/note="print"	
/note="D"	
/note="post-primer"	
/note="good box"	
/gene="b-lactamase2"	

<b>RibT</b>	<b>complement(2572978..2573580)</b>
/product="ribonuclease T [Yersinia pestis] >gi 22125847 r..."	
/label=ribonucleaseT	
/color=255 255 140	
/note="DS 88bp"	
/note="print"	
/note="C"	
/note="good box"	

<b>TrmH</b>	<b>2581200..2581712</b>
/product="RNA methyltransferase TrmH, group 2 [AvinDRAFT_2208] [Azotobacter vinelandii AvOP]"	
/label=ORF2541	
/gene="trmH"	
/gene="SpoU rRNA Methylase family This family of proteins probably use S-AdoMet."	
/gene="The spoU gene of Escherichia coli codes for a protein that shows strong similarities to previously characterized 2'-O-methyltransferases PUBMED:9321663, PUBMED:8265370. The Pet56 protein of Saccharomyces cerevisiae has been shown to be required for ribose methylation at a universally conserved nucleotide in the peptidyl transferase center of the mitochondrial large ribosomal RNA (21S rRNA). Cells reduced in this activity were deficient in formation of functional large subunits of the mitochondrial ribosome. The Pet56 protein catalyzes the site-specific formation of 2'-O-methylguanosine on in vitro transcripts of both mitochondrial 21S rRNA and E. coli 23S rRNA providing evidence for an essential modified nucleotide in rRNA PUBMED:8266080."	
/note="DS 70bp"	
/note="print"	
/note="C"	
/note="post-primer"	
/note="good box"	



<b>WcaA</b> complement(2589816..2590796)
/product="Putative rhamnosyltransferase [Bacillus stearothermophilus]"
/label=ORF2550c
/note="DS 79bp"
/note="print"
/note="C"
/note=" family 2 Diverse family, transferring sugar from UDP-glucose, UDP-N-acetyl- galactosamine, GDP-mannose or CDP-abequose, to a range of substrates including cellulose, dolichol phosphate and teichoic acids."
/note="good box"
/note="pfam00535, Glycos_transf_2, Glycosyl transferase. Diverse family, transferring sugar from UDP-glucose, UDP-N-acetyl- galactosamine, GDP-mannose or CDP-abequose, to a range of substrates including cellulose, dolichol phosphate and teichoic acids"
/note="COG1216, Predicted glycosyltransferases [General function prediction only]"
/color=255 255 140
/gene="wcaA"
/obsolete_name="jexE"

<b>Ttg2</b> complement(2658341..2658976)
/product="Putative toluene tolerance protein [AZOSEA12180] [Azoarcus sp. (strain EbN1)]"
/label=ORF2621c
/color=255 255 140
/note="DS 56bp"
/note="print"
/note="CD"
/note="Toluene tolerance, Ttg2 Toluene tolerance is mediated by increased cell membrane rigidity resulting from changes in fatty acid and phospholipid compositions, exclusion of toluene from the cell membrane, and removal of intracellular toluene by degradation [1]. Many proteins are involved in these processes. This family is a transporter which shows similarity to ABC transporters [2]."
/note="good box"
/note="INDUCED"
/gene="ttg2"

<b>hyp_15</b> complement(2664460..2665152)
/gene="hyp_15 mb protein"
/blastp_match="gij48846276 ref ZP_00300541.1  COG1814: Uncharacterized membrane protein [Geobacter metallireducens GS-15]"
/blast_score=170 bits (430), Expect 3e-41, Identities (42%), Positives(53%)
/color=255 255 140
/note="gnl CDD 25858, pfam01988, DUF125, Integral membrane protein DUF125. This family of predicted integral membrane proteins has no known function. However it does include a protein, which may have a role in regulating calcium levels. CD-Length 176 residues, 100.0% aligned Score 68.0 bits (166), Expect 8e-13. gnl CDD 11524, COG1814, COG1814, Uncharacterized membrane protein [Function unknown] CD-Length 229 residues, 97.8% aligned, Score 76.2 bits (187), Expect 3e-15"
/note="print"
/note="C"
/note="DS 111bp"
/note="good box"



<b>hyp_16</b> 2665323..2665724
/note="pfam04241, DUF423, Protein of unknown function (DUF423). Potential integral membrane protein. CD-Length 112 residues, 87.5% aligned, Score 84.1 bits (208), Expect 5e-18"
/note="DS 41bp"
/note="C"
/note="print"
/note="post-primer"
/note="good box"
/gene="hyp_16 mb protein"
/blastp_match="gi 53803474 ref YP_114821.1  hypothetical protein MCA2407 [Methylococcus capsulatus str. Bath]"
/blast_score=100 bits (248), Expect 1e-20, Identities (45%), Positives (59%), Gaps (0%)
/color=255 255 140

<b>AcrA-2</b> complement(2695254..2697416)
/note="Putative RND efflux transporter precursor"
/note="print"
/note="C"
/gene="acrA"
/blastp_match="Q6N3B9 Putative RND efflux transporter precursor [RPA3775] [Rhodopseudomonas palustris]"
/blast_score=505 bits (1300), Expect e-141 Identities (38%), Positives (56%), Gaps (1%)
/color=255 255 140
/obsolete_name="RND"

<b>ToIC</b> complement(2699439..2701007)
/product="ABC-type export system, outer membrane channel protein [PFL_3615] [Pseudomonas fluorescens (strain Pf-5 / ATCC BAA-477)]"
/label=ORF2670c
/note="DS 128bp"
/note="A"
/note="print"
/note="pfam02321, Outer membrane efflux protein The OEP family (Outer membrane efflux protein) form trimeric channels that allow export of a variety of substrates in Gram negative bacteria. Each member of this family is composed of two repeats. The trimeric channel is composed of a 12 stranded all beta sheet barrel that spans the outer membrane, and a long all helical barrel that spans the periplasm."
/note="good box"
/note="COG1538, ToIC, Outer membrane protein [Cell envelope biogenesis, outer membrane / Intracellular trafficking and secretion]"
/gene="toIC"
/obsolete_name="oep"

<b>OmpR</b>	<b>2701216..2701923</b>
/product="Oxidative stress related two component system, transcriptional regulator [ompR] [Burkholderia pseudomallei (Pseudomonas pseudomallei)]"	
/label=ORF2672	
/note="DS 67bp"	
/note="A"	
/note="print"	
/note="post-primer"	
/note="good box"	
/color=255 255 140	
/gene="ompR"	

<b>Nra</b>	<b>2703317..2704582</b>
/note="Natural resistance-associated macrophage protein The natural resistance-associated macrophage protein (NRAMP) family consists of Nramp1, Nramp2, and yeast proteins Smf1 and Smf2. The NRAMP family is a novel family of functional related proteins defined by a conserved hydrophobic core of ten transmembrane domains [5]. This family of membrane proteins are divalent cation transporters. Nramp1 is an integral membrane protein expressed exclusively in cells of the immune system and is recruited to the membrane of a phagosome upon phagocytosis [1]. By controlling divalent cation concentrations Nramp1 may regulate the interphagosomal replication of bacteria [1]. Mutations in Nramp1 may genetically predispose an individual to susceptibility to diseases including leprosy and tuberculosis conversely this might however provide protection form rheumatoid arthritis [1]. Nramp2 is a multiple divalent cation transporter for Fe <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> and Zn <sup>2+</sup> amongst others it is expressed at high levels in the intestine; and is major transferrin-independent iron uptake system in mammals [1]. The yeast proteins Smf1 and Smf2 may also transport divalent cations [3]."	
/note="DS 46bp"	
/note="B"	
/note="print"	
/note="good box"	
/note="INDUCED"	
/gene="nra"	
/blastp_match="Q73SK8 Hypothetical protein [MAP4065] [Mycobacterium paratuberculosis]"	
/blast_score=355 bits (912), Expect 6e-97 Identities (46%), Positives (60%), Gaps (0%)	
/color=255 255 140	

<b>AspR</b>	<b>complement(2740963..2742753)</b>
/note="Aspartyl-tRNA synthetase"	
/note="DS 155bp"	
/note="C"	
/note="print"	
/note="good box"	
/gene="AspR"	
/blastp_match="Q82SQ5 SYD_NITEU Aspartyl-tRNA synthetase (EC 6.1.1.12) (Aspartate-tRNA ligase) (AspRS) [ASPS]"	
[Nitrosomonas europaea]"	
/blast_score=754 bits (1947), Expect = 0.0 Identities = (63%), Positives = (76%)	
/color=255 255 140	

<b>hyp_17</b> 2745061..2745843
/note="No significant similarity found, transmembrane region from residue 30 to 52"
/note="DS 84bp"
/note="A"
/note="print"
/note="good box"
/gene="hyp_17"
/color=255 255 140

<b>Tr_2</b> complement(2925483..2925977)
/product="IS1246, transposase [Pseudomonas putida KT2440]..."
/label=ORF2896c
/note="print"
/note="B"
/note="post-primer"
/color=255 255 140
/gene="transposase"

<b>hyp_18</b> complement(2967892..2968428)
/note="unknown"
/note="DS 8bp"
/note="CD"
/note="print"
/note="good box"
/note="INDUCED"
/gene="hyp_18"
/blastp_match="Q6N920 Possible hydrolase [RPA1730] [Rhodopseudomonas palustris]"
/blast_score=35.4 bits (80), Expect 0.43 Identities (30%), Positives (45%), Gaps (12%)
/color=255 255 140



<b>Rus</b>	<b>2954144..2954704</b>
/product="rusticyaninA1 [Acidithiobacillus ferrooxidans]"	
/label=ORF2930	
/gene="rus"	
/note="synonym: rusTA"	
/note="print"	
/note="QS related?"	

<b>ShyB</b>	<b>1946266..1947282</b>
/note="Sulphydrogenasa, similar a asrA, anaerobic sulfite reductasa: Anaerobic sulfite reduction protein A related protein [TA0046] [Thermoplasma acidophilum] Score = 103 bits (257), Expect = 4e-21"	
/note="print"	
/note="C"	
/gene="shyB"	
/blast_score=147 bits (371), Expect = 2e-34	
/blastp_match="Sulphydrogenase beta subunit [PF0891] [Pyrococcus furiosus]"	
/color=255 255 140	

<b>plsC/HdtS1 complement(504420..505145)</b>	
/color=6	
/product="acyl transfer enzyme [Acidithiobacillus ferrooxidans]"	
/label=ORF0471c	
/note="smart00563, PlsC, Phosphate acyltransferases; Function in phospholipid biosynthesis and have either glycerolphosphate, 1-acylglycerolphosphate, or 2-acylglycerolphosphoethanolamine acyltransferase activities. Tafazzin, the product of the gene mutated in patients with Barth syndrome, is a member of this family"	
/note="pfam01553, Acyltransferase, Acyltransferase. This family contains acyltransferases involved in phospholipid biosynthesis and other proteins of unknown function. This family also includes tafazzin, the Barth syndrome gene"	
/note="COG0204, PlsC, 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase [Lipid metabolism]."	
/note="print"	
/note="QS related"	
/gene="hdtS/plsC"	

<b>MtFA</b>	<b>complement(144970..150717)</b>
/note=" pfam00534, Glycos_transf_1, Glycosyl transferases group 1. Mutations in this domain may lead to disease (Paroxysmal Nocturnal haemoglobinuria). Members of this family transfer activated sugars to a variety of substrates, including glycogen, Fructose-6-phosphate and lipopolysaccharides. Members of this family transfer UDP, ADP, GDP or CMP linked sugars. The eukaryotic glycogen synthases may be distant members of this family. COG0438, RfaG, Glycosyltransferase [Cell envelope biogenesis, outer membrane]"	
/note="C"	
/note="CD"	
/note="B"	
/note="print"	
/gene="MtFA"	
/blastp_match="gij11497665 ref NP_068886.1  mannosyltransferase A (mtfA) [Archaeoglobus fulgidus DSM 4304]"	
/blast_score=830 bits (2144), Expect 0.0, Identities (39%)	
/color=255 255 140	

<b>WcbE</b>	<b>complement(105265..106839)</b>
/note="Putative glycosyltransferase WcbE "	
/note="133bp DS box"	
/note="C"	
/note="print"	
/note="good box"	
/gene="WcbE"	
/blastp_match="Q93UJ8WcbE [WCBE] [Burkholderia pseudomallei (Pseudomonas pseudomallei)]"	
/blast_score=02 bits (1032), Expect e-110, (42%), Positives (57%), Gaps (2%)	
/color=255 255 140	

<b>PhnJ</b>	<b>complement(767381..768202)</b>
/gene="phnJ"	
/product="Phosphonate metabolism PhnJ [Rhodopseudomonas palustris BisA53]"	
/label=ORF0728c	
/color=255 255 140	
/note="print"	
/note="A"	

<b>Afel</b>	<b>complement(1046614..1047162)</b>
/gene="afel"	
/product="N-Acyl homoserine lactone synthase Afel"	
/db_xref="GI:71056999"	
/note="atg 61bp DS Pal_18_20_box"	
/note="atg 55bp DS Pal_13_15_box"	
/note="print"	
/note="AB"	
/note="CD"	
/id="CAI51626.1"	
/LOCUS="AJ879454"	
/color=255 255 140	

<b>Orf3</b>	<b>complement(1047249..1047677)</b>
/gene="orf3"	
/product="hypothetical protein"	
/db_xref="GI:71057000"	
/id="CAI51627.1"	
/note="print"	
/note="CD"	
/note="atg is 35bp DS R-box"	
/note="atg is 59bp DS 18-20pal box "	
/note="good box"	
/LOCUS="AJ879454"	
/color=255 255 140	

<b>AfeR</b>	<b>1047839..1048549</b>
/label=afeR	
/product="AfeR transcriptional regulator"	
/note="atg is 151bp DS Pal_18_20_box"	
/note="ttg is 82bp DS Pal_18_20_box"	
/note="print"	
/note="CD"	
/note="good box"	
/db_xref="GI:71057001"	
/id="CAI51628.1"	
/LOCUS="AJ879454"	
/color=255 255 140	

<sup>a</sup> Función génica. Cuando fue posible se indicó el nombre de la proteína codificada. En caso contrario se utilizó un nombre alternativo. Las funciones destacadas con gris claro poseen una predicción del tipo MEME (tabla 4)

<sup>b</sup> Primer hit de BLASTp (contra base de datos no redundante)

<sup>c</sup> La palabra "print" indica que esta secuencia fue seleccionada para estar presente en el miniarreglo

<sup>d</sup> Se indica el tipo de HMM ("A", "B", "C" ó "D"). No se incluye el modelo "E", pues a la fecha de efectuado éste análisis, éste modelo aún no se desarrollaba.

<sup>e</sup> Se indica la distancia en pares de bases entre el inicio traduccional predicho y el extremo mas cercano del "hit" HMM más proximo. US = "upstream" (río arriba); DS ="downstream" (río abajo); bp "base pairs" (pares de bases)

<sup>f</sup> Se indican los "hits" en las bases de datos de dominios conservados (CDD, Pfam, COG)

<sup>g</sup> "induced" significa que la expresión de este gen se encuentra inducida en el experimento de miniarreglo (

<sup>h</sup> QS-related" significa que el gen o bien un fenotipo en el cual este gen participa ha sido relacionado con QS en algún microorganismo



7.2. Anexo 2. ORFs que no pudieron ser amplificados bajo las condiciones de PCR utilizadas (ausentes en el miniarreglo).

<b>hyp_1</b>	<b>600476..600754</b>
/gene="hyp_1"	
/product="GCN5-related N-acetyltransferase [Mmc1DRAFT_0357] [Magnetococcus sp. MC-1]"	
/label=ORF0575	
/color=255 255 140	
/note="DS 157bp"	
/note="print"	
/note="B"	
<p>/note="Acetyltransferase (GNAT) family. Histone acetylation is carried out by a class of enzymes known as histone acetyltransferases (HATs), which catalyze the transfer of an acetyl group from acetyl-CoA to the lysine E-amino groups on the N-terminal tails of histonesPUBMED:12801725. Early indication that HATs were involved in transcription came from the observation that in actively transcribed regions of chromatin, histones tend to be hyperacetylated, whereas in transcriptionally silent regions histones are hypoacetylated. The histone acetyltransferases are divided into five families. These include the Gcn5-related acetyltransferases (GNATs); the MYST (for 'MOZ, Ybf2/Sas3, Sas2 and Tip60)-related HATs; p300/CBP HATs; the general transcription factor HATs, which include the TFIID subunit TAF250; and the nuclear hormone-related HATs SRC1 and ACTR (SRC3). The GCN5-related N-acetyltransferase superfamily includes such enzymes as the histone acetyltransferases GCN5 and Hat1, the elongator complex subunit Ebp3, the mediator-complex subunit Nut1, and Hpa2 PUBMED:9175471. Many GNATs share several functional domains, including an N-terminal region of variable length, an acetyltransferase domain that encompasses the conserved sequence motifs described above, a region that interacts with the coactivator Ada2, and a C-terminal bromodomain that is believed to interact with acetyl-lysine residues. Members of the GNAT family are important for the regulation of cell growth and development. In mice, knockouts of Gcn5L are embryonic lethal. Yeast Gcn5 is needed for normal progression through the G2M boundary and mitotic gene expression. The importance of GNATs is probably related to their role in transcription and DNA repair. The yeast GCN5 (yGCN5) transcriptional coactivator functions as a histone acetyltransferase (HAT) to promote transcriptional activation. The crystal structure of the yeast histone acetyltransferase Hat1-acetyl coenzyme A (AcCoA) shows that Hat1 has an elongated, curved structure, and the AcCoA molecule is bound in a cleft on the concave surface of the protein, marking the active site of the enzyme. A channel of variable width and depth that runs across the protein is probably the binding site for the histone substrate PUBMED:9727486. The central protein core associated with AcCoA binding that appears to be structurally conserved among a superfamily of N-acetyltransferases, including yeast histone acetyltransferase 1 and Serratia marcescens aminoglycoside 3-N-acetyltransferase PUBMED:10430873."</p>	

<b>GrcX</b>	<b>complement(612560..612796)</b>
/gene="grcX"	
/product="similar to Glutaredoxin and related proteins [Deinococcus geothermalis DSM 11300]"	
/label=ORF0587c	
/color=255 255 140	
/note="COG0695, GrxC, Glutaredoxin and related proteins [Posttranslational modification, protein turnover, chaperones]."	
/note="DS 27bp"	
/note="print"	
/note="D"	

<b>CyaY</b>	<b>complement(853347..853676)</b>
/product="putative CyaY protein [Photobacterium profundumSS9]."	
/label=ORF0803c	
/gene="cyaY"	
/color=255 255 140	
/note="Frataxin, Frataxin is a nuclear-encoded mitochondrial protein implicated in Friedreich's ataxia (FRDA), an human autosomal recessive neurodegenerative disease; Frataxin is found in eukaryotes and in purple bacteria; lack of frataxin causes iron to accumulate in the mitochondrial matrix suggesting that frataxin is involved in mitochondrial iron homeostasis and possibly in iron transport; the domain has an alpha-beta fold consisting of two helices flanking an antiparallel beta sheet.."	
/note="print"	
/note="C"	

<b>Tnp1</b>	<b>complement(1607434..1607931)</b>
/gene="tnp1"	
/blastp_match="P55598 Y4OM_RHISN Hypothetical 16.8 kDa protein y4OM [y4oM] [Rhizobium sp. (strain NGR234)]"	
/blast_score=182 bits (462), Expect 2e-45 Identities (60%), Positives (75%)	
/color=255 255 140	
/note="transposase related ORF"	
/note="DS 62bp"	
/note="print"	
/note="B"	
/note="probable transposase related orf, fragment [Azoarcus sp. EbN1]."	
/note="good box"	



<b>RfaG</b>	<b>complement(1627913..1629070)</b>
/gene="rfaG"	
/color=255 255 140	
/note="glycosyl transferase 1"	
/note="pfam00534, Glycos_transf_1, Glycosyl transferases group 1. Mutations in this domain may lead to disease (Paroxysmal Nocturnal haemoglobinuria). Members of this family transfer activated sugars to a variety of substrates, including glycogen, Fructose-6-phosphate and lipopolysaccharides. Members of this family transfer UDP, ADP, GDP or CMP linked sugars. The eukaryotic glycogen synthases may be distant members of this family.."	
/note="COG0438, RfaG, Glycosyltransferase [Cell envelope biogenesis, outer membrane]."	
/note="Glycosyl transferase, group 1 [Burkholderia cenocepacia HI2424]."	
/note="essential for heterocyst maturation in Nostoc sp. PCC 7120"	
/note="print"	
/note="2C" (dos HMMs del tipo "C")	
/note="DS 54bp"	
/note="DS 114bp"	
/note="good box"	
/obsolete_name="hepB"	

<b>Wza</b>	<b>complement(1645605..1646780)</b>
/gene="wza"	
/blastp_match="Q87FS6 Capsular polysaccharide transport protein [VPA1602] [Vibrio parahaemolyticus]"	
/blast_score=133 bits (335), Expect 5e-30 Identities (27%), Positives (47%), Gaps (6%)	
/note="Capsular polysaccharide transport protein"	
/note="print"	
/note="QS related?"	

<b>hyp_9</b>	<b>complement(1673050..1675101)</b>
/product="hypothetical protein [Azoarcus sp. EbN1]"	
/gene="hyp_9"	
/color=255 255 140	
/note="DS 82bp"	
/note="C"	
/note="print"	
/note="cd01454, vWA_norD_type, norD type: Denitrifying bacteria contain both membrane bound and periplasmic nitrate reductases. Denitrification plays a major role in completing the nitrogen cycle by converting nitrate or nitrite to nitrogen gas. The pathway for microbial denitrification has been established as NO3- → NO2 → NO → N2O → N2. This reaction generally occurs under oxygen limiting conditions. Genetic and biochemical studies have shown that the first step of the biochemical pathway is catalyzed by periplasmic nitrate reductases. This family is widely present in proteobacteria and firmicutes. This version of the domain is also present in some archaeal members. The function of the vWA domain in this sub-group is not known. Members of this subgroup have a conserved MIDAS motif.."	
/note="pfam06213, CobT, Cobalamin biosynthesis protein CobT. This family consists of several bacterial cobalamin biosynthesis (CobT) proteins. CobT is involved in the transformation of precorrin-3 into cobyrinic acid. ."	
/note="good box"	



<b>TraL</b> complement(1829640..1830041)
/product="hypothetical protein Rgel02002926 [Rubrivivax gelatinosus PM1]"
/color=255 255 140
/gene="traL"
/note="pfam07178, TraL, TraL protein. This family consists of several bacterial TraL proteins. TraL is a predicted peripheral membrane protein which is thought to be involved in bacterial sex pilus assembly. The exact function of this family is unclear.."
/note="print"
/note="B"
/note="DS 198bp"
/note="good box"

<b>PLdC</b> complement(1871428..1872318)
/product="nuclease [FaciDRAFT_0329] [Ferroplasma acidarmanus Fer1]"
/note="DS 56bp"
/note="CD"
/note="print"
/note="good box"
/note="cd00138, PLDc, Phospholipase D. Active site motifs; The PLD superfamily includes enzymes involved in signal transduction, lipid biosynthesis, endonucleases and open reading frames in pathogenic viruses and bacteria. PLD hydrolyzes the terminal phosphodiester bond of phospholipids to phosphatidic acid and a hydrophilic constituent. Phosphatidic acid is a compound that is heavily involved in signal transduction. The common features of the family members are that they can bind to a phosphodiester moiety, and that most of these enzymes are active as bi-lobed monomers or dimers"
/note="COG1502, CIs, Phosphatidylserine/phosphatidylglycerophosphate/cardiolipin synthases and related enzymes [Lipid metabolism]"
/color=255 255 140
/gene="PLDc"
/obsolete_name="nucl"

1 7.3. Anexo 3. Versión preeliminar de artículo científico basado en los resultados  
2 bioinformáticos obtenidos durante el desarrollo de esta tesis.

3

4 1. TITLE PAGE

5 1a) Identification of putative gene functions regulated by the quorum sensing protein AfeR in the  
6 *Acidithiobacillus ferrooxidans* genome sequence.

7 1b) ALVARO BANDERAS and NICOLAS GUILIANI.

8 1c) Laboratorio de Comunicación Bacteriana. Departamento de Biología. Facultad de Ciencias.  
9 Universidad de Chile.

10 1d) NICOLAS GUILIANI G

11 2. ABSTRACT

12 Functions regulated by the quorum sensing (QS) system of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 are  
13 unknown. It is possible that QS regulates phenotypes related to the bioleaching process like  
14 attachment to minerals or oxidation of energetic substrates. One characteristic feature of the  
15 system is the unusual palindromic complexity of the *afe-box* (*lux-box* like element). In this study,  
16 a bioinformatic approach was used to identify putative binding sites for AfeR (a LuxR family  
17 protein). Due to the low conservation of the *lux-box* like elements among bacterial species and  
18 lack of experimental identification of AfeR binding sites in the *A. ferrooxidans* chromosome, we  
19 constructed a set of Hidden Markov Models (HMM) based on the architecture of the *afe-box*.  
20 Further characterization of the identified sequences derived from the search was done by  
21 clustering and filtering them according to their particular HMM type, their position relative to a  
22 start codon and their vicinity to a sigma 70 predicted promoter. The Multiple EM for Motif  
23 Elicitation (MEME) tool was used to confirm HMM predictions and also as a filter to further lower  
24 the size of the AfeR putative regulon. Members of the regulon include genes related to QS in  
25 other bacteria, *afeR* is one of these. Also, diverging genes (as is the case of *afeR/orf3*) are

26 frequent putative targets. Prediction of a regulon based on modeling of a single *cis* regulatory  
27 element is presented.

28 **2a) KEYWORDS**

29 *Acidithiobacillus ferrooxidans*, palindrome, transcriptional regulatory elements, regulon, quorum  
30 sensing, Hidden Markov Models. MEME.

31



31 3. TEXT

32 3a) INTRODUCTION

33 *Acidithiobacillus ferrooxidans* is an acidophilic Gram-negative autotrophic  $\gamma$ -proteobacterium that  
34 obtains its energy through the oxidation of ferrous iron and reduced inorganic sulfur compounds.  
35 *A. ferrooxidans*, along with other bacterial, archeal and eukaryotic microorganisms forms  
36 structured biofilm communities in metal-rich low pH environments, where autotrophic metabolism  
37 is the primary form of energy acquisition (Baker y Banfield, 2003). The bioleaching process that  
38 takes place in such system is employed in biomining biotechnology (Rawlings y Johnson, 2007).  
39 Understanding the physiological processes that take place when *A. ferrooxidans* interacts with  
40 its energetic substrate at a molecular level is an important issue in the rational design of  
41 bioleaching efficiency improvement strategies (Rohwerder y col., 2003).  
42 On the other hand, bacterial cell-cell communication consists on the metabolism modulation of  
43 interacting bacteria through the exchange of low-weight organic compounds or peptides that  
44 function as signals. Signaling mechanisms have a primary role in the emergence of cooperative  
45 behaviors in bacterial populations and communities (von Bodman y col., 2008). Quorum sensing  
46 (QS) is a bacterial cell-cell signaling system that can work as a gene expression coordination  
47 mechanism (Pappas y col., 2004). *N*-Acyl homoserine lactone (AHL) mediated QS (AHL-QS) is  
48 the system most intensively studied. Molecular components typical of this system include LuxR-  
49 family transcriptional regulators, 18-20 nucleotide *cis*-acting elements called *lux-boxes*, AHLs  
50 and LuxI-family AHL synthase. LuxR-family proteins are AHL-responsive global transcriptional  
51 regulators that activate or repress transcription upon interaction with *lux-boxes*. AHL-QS  
52 regulates gene expression of genes related to diverse phenotypes in many bacteria including  
53 biofilm formation, swarming motility, bioluminescence and conjugation (Whitehead y col., 2001).  
54 AHL molecules have also been implicated in phenotypes related to surface adhesion either  
55 directly as biosurfactants (Daniels y col., 2006) or as a signal for transcriptional regulation of

56 adhesion determinants (Dubern y col., 2006; Labbate y col., 2007). We are interested in  
57 determining the role of QS in *A. ferrooxidans* physiology.

58 *A. ferrooxidans* strain ATCC 23270 possesses a functional AHL-based QS system (Farah y col.,  
59 2005; Rivas y col., 2005). This bacterium has one pair of *luxI/luxR* homologs termed *afel/afeR*.  
60 The QS locus comprises the divergently organized *afel* and *afeR* genes and a third gene (*orf3*),  
61 located in the intergenic region between the latter, whose protein product is conserved among  
62 some bacterial species but has not known function. *Afel* drives the synthesis of at least 10  
63 different AHL molecules with medium or large acyl side chains (Valenzuela y col., 2007). On the  
64 other hand, the only known target of the *AfeR* protein is the *afel* upstream sequence since it  
65 promotes AHL dependent transcription in an heterologous biosensor construct in *E. coli* (Rivas y  
66 col., 2005). The *afe-box* regulatory element located upstream of *afel* is an 18-20 bp palindromic  
67 sequence with nearly perfect dyad-symmetry. It overlaps the -35 region of a sigma 70 promoter  
68 consensus sequence, like it happens in many other bacteria. The *afe-box* has the particularity of  
69 being the central fraction of a larger 30 bp palindrome with which it shares the same center of  
70 symmetry. Moreover, each half of the 30-bp sequence shows palindromy. Hence, two alternative  
71 centers of symmetry can be found in the total sequence (Farah y col., 2005). This feature may  
72 have a role in the mechanism of transcriptional regulation at the *afe-box* because different  
73 modes of binding are expected depending on sequence modules organization. This has been  
74 tested experimentally for the *fur* binding site by Lavrrar and McIntosh (Lavrrar y McIntosh, 2003).  
75 The fact that the canonical *lux-box* is only a fraction of a larger structure suggests that non-*AfeR*  
76 transcriptional regulators might also bind to the *afel* operator. Based in the modular arrangement  
77 of the *afel* operator we constructed hypothetical Hidden Markov Models from alignments of  
78 sequences designed to conserve palindromic zones and vary non-palindromic zones. This  
79 design allowed the retention of the modular nature of palindrome organization as opposed to

80 sequence conservation only. The models were used to search for putative binding sites for AfeR  
81 in the *A. ferrooxidans* ATCC 23270 genome.

82



## 82 **3b) Materials and methods**

### 83 **Construction of Hidden Markov Models (HMM)**

84 HMMs were built from different alignments performed within 30 bp palidrome located in the  
85 intergenic region between the *afeI* gene and the *orf3* open reading frame. HMMs for 13 bp  
86 (TGACA-NNN-TGTCA), 18 bp (GCTGTCAA-NN-TTGACAGC) and 20 bp (AGCTGTCAA-NN-  
87 TTGACAGCT) sequences are result of a multiple alignment of 64, 16 and 16 sequences  
88 respectively. The aligned sequences correspond to all the probable combination of nucleotidic  
89 letters in the N positions. Additionally, 15 bp (Y-TGACA-(NNN)-TGTCA-R) and 30 bp (TGACA-  
90 NNN-TGTCA-NNNN-TGACA-NNN-TGTCA) HMM ware built. In the 15 bp model the sequences  
91 aligned differed from each other at the level of central and flanking nucleotides. The three central  
92 nucleotides (NNN) included were the 3-mers (AAA), (CCC), (GGG), or (TTT). The "Y" and "R"  
93 positions correspond to pyrimidines and purines respectively. In the 30 bp model the sequences  
94 aligned correspond to all the probable nucleotides in the N positions. The alignments were  
95 performed using ClustalW (Thompson y col., 1994), and HMMs were constructed from them  
96 using the HMMER package 1.8.4 programs (Eddy, 1998). Subsequently, command *hmmls* was  
97 used for finding multiple non-overlapping matching hits in an *A. ferrooxidans* genome sequence  
98 obtained from the J. Craig Venter Institute (ex-Institute for Genomic Research) website  
99 ([www.tigr.org](http://www.tigr.org))

### 100 **Analysis of the genomic contexts of the putative AfeR binding sites.**

101 *A. ferrooxidans* annotated genome sequence was obtained from J. Craig Venter Institute  
102 ([www.jcvi.org](http://www.jcvi.org)). Sequences were further annotated and organized in sets using ARTEMIS  
103 (Rutherford y col., 2000) ([www.sanger.ac.uk](http://www.sanger.ac.uk)). The context of each PBS was further annotated  
104 based on ORF predicted product homology with known proteins using BLASTp (Altschul y col.,  
105 1997) and the conserved domain (CD) database (Marchler-Bauer y Bryant, 2004). The start  
106 codons were inferred after performing multiple alignments of the BLASTp hits that shared

107 highest identity with the respective query using the clustalW algorithm (Thompson y col., 1994).  
108 Sequence editing and formatting for further analysis was done with FeatureExtract (Wernersson,  
109 2005) (<http://www.cbs.dtu.dk/>), Sequence Manipulation Suite (Stothard, 2000)  
110 (<http://www.bioinformatics.org/sms2/index.html>), FaBox (P. VILLESEN, 2007)  
111 (<http://www.birc.au.dk/fabox/>). Consensus sigma 70 bacterial promoter -10 and -35 elements  
112 were inferred using the Bprom predictor ([www.softberry.com](http://www.softberry.com)) Type I and Type II PBS sequences  
113 with additional 100 bp flanking each side were used as input for Bprom. All Type I PBSs were  
114 further characterized. On the other hand, Type II PBSs were selected for further characterization  
115 only if a Bprom prediction occurred within the Bprom input sequence. Shared motifs were  
116 identified using the MEME motif discovery tool (Bailey y Elkan, 1994; Bailey y col., 2006)  
117 ([meme.sdsc.edu](http://meme.sdsc.edu)). The input for MEME were the selected PBSs sequences with additional 80 bp  
118 flanking each side. Multiple alignments of selected PBSs and consensus sequence generation  
119 were done using MultAlin (Corpet, 1988) (<http://bioinfo.genotoul.fr/multalin/multalin.html>). The  
120 MAST program (Bailey y Gribskov, 1998) ([meme.sdsc.edu](http://meme.sdsc.edu)) was used to search additional motifs  
121 in the intergenic regions database of the *A. ferrooxidans* genome. The input for the MAST  
122 program was the position specific scoring matrix PSSM generated from the common motif  
123 sequences derived from MEME analysis.

124

124 **3c) RESULTS**

125 **Construction of the *afe-box* models and distribution of the hits in the *A. ferrooxidans***  
126 **ATCC 23270 genome**

127 The 30 bp palindromic sequence found in the intergenic region between *afeI* and *orf3* genes of  
128 the *A. ferrooxidans* QS locus (*afe-box*) has an unexpected sequence complexity (Fig. 1a and  
129 1b). It has nearly perfect dyad symmetry (excepting the two central nucleotides). The 30 bp large  
130 palindrome (LP) can be subdivided into two shorter palindromic structures comprising each half  
131 of the sequence (SP1 and SP2). The SP1 and SP2 sequences are inverted repeats of each  
132 other. The *lux-box* consensus sequence described by Rivas *et al.* (Rivas y col., 2005) is located  
133 within the central 20 base pairs and is denoted “MP” after “medium length palindrome”. Different  
134 HMMs were constructed based on conservation of palindromic nature and symmetry (see  
135 materials and methods). Two types of models based on the SP sequences (models “A” and “B”),  
136 two other based on the MP sequence (models “C” and “D”), and one based in the LP sequence  
137 (model “E”) were built (Fig. 1c). The models were used to screen the whole genomic sequence  
138 of *A. ferrooxidans* ATCC 23270 for matches.

139 A total of 273 predicted binding sites (PBS) were identified. A PBS is defined as “a fragment of  
140 the genome sequence where 1 or more HMM hit is found in either strand”. As expected, the A  
141 and B type PBSs were often but not always overlapped. These two kinds of PBS were grouped  
142 in the “SP” set. The same overlapping occurred with the as the C and D models, these two kinds  
143 of PBSs were grouped in the “MP” set. The third set comprises the E model PBSs and thus  
144 named “LP”. Little overlapping occurred between these three sets. In total 5 double sites (1  
145  $SP \cap MP$  plus 2  $MP \cap LP$  plus 2  $LP \cap SP$ ) and 2 triple sites ( $SP \cap MP \cap LP$ ) were found. The  
146 overlapping sites were merged and each merge was considered a single PBS. This operation  
147 yielded a total of 265 unique PBSs. The 265 PBSs were further classified in three different sets  
148 according to their proximity to a predicted start codon (Fig. 2). The Type I set consists of the



149 PBSs located in intergenic (IG) regions or overlapping an IG region that have a predicted start  
150 codon in their proximity, namely “sense” IG regions (i.e. the DNA region between the stop  
151 codons of converging genes is not a “sense” IG region). The Type II set consists on the PBSs  
152 found 200 bp upstream and 50 bp downstream a predicted start codon but are not part of an IG  
153 region. Type III set consists on all PBS that are not part of Type II or Type III sets (Fig 2a).  
154 Approximately two thirds of the PBSs were part of the type III set. The rest of the PBS were  
155 nearly equally distributed between Type I and Type II sets (Fig 2b). An arbitrary density  
156 parameter, i.e. PBSs per megabase of possible DNA regions in each subset, was calculated to  
157 see if biasing of the PBSs abundance towards IG regions occurred. Figure 2c shows that the  
158 PBSs are denser in “sense” IG regions (type I) than in the other regions and that this is because  
159 of biasing of the SP based PBSs and not MP based PDBs. LP based PBSs are also denser in  
160 IG regions but density values are low compared to the other model. Double and triple sites were  
161 excluded from this analysis because of the low number of occurrences.

#### 162 **Identification of putative gene functions regulated by the AfeR transcriptional regulator**

163 All Type I PBSs were selected as possible AfeR binding sites. PBSs belonging to the Type II set  
164 were selected only if their location overlapped a consensus sigma 70 promoter or nearly did so  
165 (see materials and methods). All PBSs belonging to the Type III set were discarded as probable  
166 binding sites. Sequences of all selected PBSs plus 80 bp flanking each side were used to screen  
167 for common sequence motifs using the MEME motif discovery tool (Bailey y Elkan, 1994). The  
168 MEME tool was used as a validation strategy since it searches for common motifs in a set of  
169 nucleotidic sequences. The *afeI* upstream palindromic sequence was not used in the input for  
170 this search. The most frequent and highest scoring motif was an 18-mer that corresponded to  
171 the MP based models present in each input sequence. The MEME program found the 18 bp  
172 motif in most of the MP-containing input sequences The SP based PBSs were not detected as a  
173 MEME common motif. Interestingly some of the SP containing input sequences had the MEME

174 18 bp motif near or overlapping the corresponding SP sequence, these new motifs were not  
175 detected as MP based PBSs in the previous HMM search.

176 Table 1 summarizes the characterization of selected PBSs and the putative gene functions  
177 associated with these. The putative gene functions described are diverse and there is not a clear  
178 biasing towards a particular functional category. Selected PBSs that also shared the MEME 18  
179 bp common motif, including the new ones located in the SP-containing inputs, were aligned and  
180 a consensus sequence was generated using MultAlin (Corpet, 1988) (Fig. 3). The output from  
181 the MEME program provides a position-specific scoring matrix (PSSM) for the predicted motif.  
182 The PSSM generated for the 18 bp MEME motif was used as input for the MAST program (motif  
183 alignment and search tool) (Bailey y Gribskov, 1998). 8 motifs with e-values lower than 10 were  
184 found. The lowest e-value corresponded to the *afeI* palindrome. 2 out of 8 motifs were located in  
185 intergenic regions between converging ORFs. 2 already found motifs (present in table 1) were  
186 those located upstream the *afeR* gene and AFE\_0966 (annotated as a virulence-associated  
187 protein). 1 new motif was found in the intergenic region upstream the AFE\_1580 ORF  
188 (annotated as "nifW protein"). The other new motif was located between the diverging ORFs  
189 AFE\_0308 and AFE\_0309, wich are a glyoxalase family protein and a Ada family-DNA-3-  
190 methyladenine glycosylase II transcriptional regulator, respectively.

191 To acknowledge the broadness a *lux-box* consensus-based search, the upstream 250  
192 nucleotides from the 4 most identical sequences to the product of *afeI* in the genbank database  
193 (1 genes from *Burkholderia pseudomallei* K96243, *Burkholderia cepacia* AMMD, *Burkholderia*  
194 *thailandensis* E264, *Burkholderia ambifaria* MC40-6) were used as input for the MEME discovery  
195 tool (the *afeI* palindrome containing upstream nucleotides was also used). In all 4 sequences a  
196 18 bp motif that corresponded to a palindromic sequence similar to the *afe-box* was found. The  
197 PSSM generated was inputted in the MAST tool and the intergenic region database from *A.*  
198 *ferrooxidans* was searched for common motifs. Only the *afeI* 18-bp motif was found. On the

199 contrary, when the same database was searched using the PSSM generated from the MEME  
200 analysis of the MP-based PBSs, the number of hits was broader (see results). This suggests  
201 that using *lux-box* like sequences for the generation of HMMs in the *A. ferrooxidans* search  
202 would have yielded fewer hits, and hence a narrower search.  
203



203 **3d) DISCUSSION**

204 Functions regulated by QS in *A. ferrooxidans* are unknown. We employed a bioinformatic  
205 approach to identify possible binding sites of the AfeR protein in the *A. ferrooxidans* genome  
206 sequence with the aim of defining a putative quorum sensing regulon for this bacterium. This  
207 strategy was adopted due to the impossibility of making QS-deficient *A. ferrooxidans* mutant  
208 strains (cause of lack of an efficient transformation technique for this bacterium). This situation  
209 makes the observation of evident QS regulated phenotypes very difficult. Other strategies like  
210 comparative genomics and proteomics using chemical modulation of the AfeR activity are also  
211 suitable and are currently in development.

212 HMMs were constructed based on alignments of hypothetical sequences that took the  
213 palindromic structure located upstream of the *afeI* gene as a template. We did not perform  
214 alignments of known *lux-box* type sequences to generate the HMMs because of the low  
215 conservation of these sequences (Whiteley y Greenberg, 2001). The search yielded a total of  
216 265 PBSs. SP model-based PBSs were more concentrated on intergenic regions whereas MP  
217 model-based PBSs were not (Fig. 2). This can be interpreted as a "preference" of the SP model-  
218 based PBSs towards intergenic regions, hence raising the possibility that SP PBSs are *cis*-  
219 acting regulatory motifs. Also, it is possible that this preference is due to the overlapping of a the  
220 -35 element of sigma 70 promoter from *afeI* with the modeled SP structure, thus implying that at  
221 least some of the SP hits may actually be -35 elements. On defense of the former possibility, the  
222 Bprom predictor found some Type I SP hits overlapping -35 elements but it also found hits  
223 overlapping -10 elements and hits with no overlapping at all. On the other hand, only MP model-  
224 based PBSs were found as common motifs when all PBSs were searched with the MEME tool,  
225 making MP PBSs more likely to be the correct regulatory motif for AfeR. This data added to the  
226 fact that SP and MP based models did not show significant overlapping in the HMM search  
227 further suggests that the determinants for the AfeR interaction with DNA are enclosed within the

228 central 18 to 20 nucleotides of the large 30 bp palindrome and that the SP PBSs may be binding  
229 sites for a distinct regulator. It is possible then that SP based PBSs may be part of a distinct  
230 regulon that overlaps the AfeR regulon in the transcriptional regulation of *afeI*. There are  
231 examples of multiple regulatory *cis*-acting elements upstream of various QS-controlled genes,  
232 including the regulatory zones of I and R genes (Reverchon y col., 1998; Chatterjee y col.,  
233 2002). This regulatory sequences can overlap *lux-box* like elements as is the case of the binding  
234 site for the regulator RsaL, upstream of *lasI* from *P. aeruginosa* (Rampioni y col., 2006).

235 Among the ORFs presented in Table 1, 5 of them had two PBSs and 1 had three PBSs  
236 upstream of their predicted ATG start codon. Hypothetical protein AFE\_1148, the diverging  
237 genes AFE\_2049 (conserved domain protein) and AFE\_2050 (putative transcriptional regulator),  
238 and the ErfK-YbiS-YcfS-YnhG family protein AFE\_2469 had a SP model-based PBSs and a  
239 predicted MEME 18-bp motif. In the case of AFE\_2469 the sequences are overlapped (Table 1).

240 AFE\_1727 (a group 1 glycosyl transferase family protein) has 2 MP-based PBSs upstream its  
241 start codon. Hypothetical protein AFE\_1992 has two SP-based PBSs and a MEME 18-bp motif  
242 overlapping one of these. Examples exist where more than one *lux-box* like sequence is found  
243 upstream of QS-controlled genes. This is the case of the *lasB*, *hcn* and *pqsA* genes from *P.*  
244 *aeruginosa* (Anderson y col., 1999; Pessi y Haas, 2000; Xiao y col., 2006).

245 The type of regulation exerted over the AfeR protein targets remains unknown. AfeR can  
246 activate transcription from the *afeI* promoter in the presence of AHL (Rivas y col., 2005), but the  
247 binding dependence on AHL remains to be determined. The ORFs found to be putatively  
248 regulated by the AfeR protein in this study have their respective PBSs located in various  
249 positions relative to predicted  $\sigma^{70}$  promoters. Some of them overlap -35 elements, others overlap  
250 -10 elements and others overlap neither. Described LuxR family activators of transcription like  
251 TraR, LasR and LuxR itself generally bind a *lux-box* like element located in position -40 to -45  
252 (overlapping the -35 element of the  $\sigma^{70}$  promoter) in the presence of AHL. Some transcriptional



253 regulators of the LuxR family bind their target sequences in the absence and free their selves in  
254 the presence of AHL, as is the case of EsaR of *Pantoea stewartii* or ExpR<sub>Ecc</sub> of *Erwinia*  
255 *carotovora* (Andersson y col., 2000; Minogue y col., 2002). Both mentioned regulators are  
256 repressors of transcription. In this case the location of the *lux-box* like sequence overlaps the -10  
257 element of the  $\sigma^{70}$  promoter. The mentioned regulators can also function as activators of  
258 transcription in artificial genetic constructs were the position of the *cis*-acting element is changed  
259 to a -35 element overlap (maintaining the dependence on absence of AHL substrate) (von  
260 Bodman y col., 2003). This shows that the ability to interact with RNA polymerase and activate  
261 transcription remains intact, and that activation rather than repression of other genes in its native  
262 context can occur depending on the *lux-box* like element position.

263 None of the PBSs found had similar palindromic complexity to the *afeI* upstream sequence nor  
264 perfect dyad symmetry. Dyad symmetry is not a requisite for the *lux-box* like elements to interact  
265 with their cognate regulator as demonstrated for various QS-controlled genes in *P. aeruginosa*  
266 (Schuster y col., 2004). Some of the gene functions associated to the 18 bp MEME motif have  
267 been related to QS. For example, an homolog of AFE\_0806 (a TonB-dependent receptor) has  
268 been implicated in AHL production in *P. aeruginosa*, mutants show impairment in AHL  
269 production (Abbas y col., 2007), another example is the AfeR protein, which is the master  
270 regulator of QS. 2 glycosyl transferases are present in the putative regulon, a role in biofilm  
271 formation might be expected. Sigma 54-dependent transcriptional regulator is also present, this  
272 is consistent with the fact that AfeR is a global regulator and regulates many genes indirectly. In  
273 the same locus as sigma 54-dependent transcriptional regulator, but in the opposite orientation  
274 there is a metallo- $\beta$ -lactamase gene. Interestingly there is another metallo- $\beta$ -lactamase among  
275 the hypothetical regulon. To our knowledge there are no reports of  $\beta$ -lactam antibiotics on *A.*  
276 *ferrooxidans* niche, so the function of these proteins remain to be determined for this bacterium.  
277 The gene for RNA polymerase was found, this is a very interesting target. We have observed



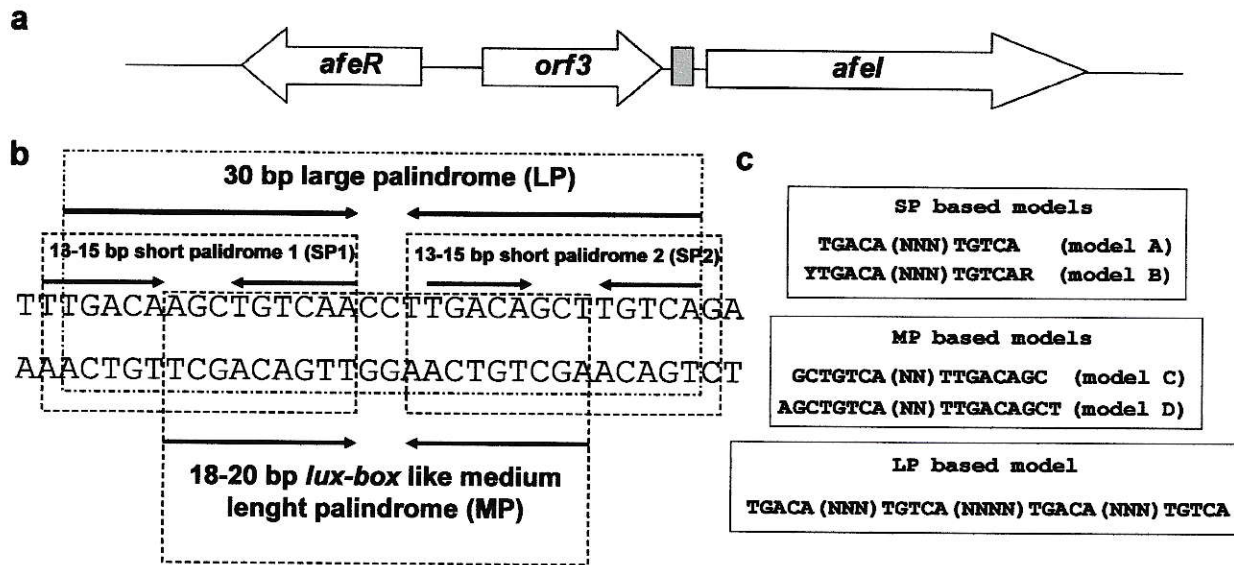
278 lower RNA yields when culturing *A. ferrooxidans* in the presence of AHL-analogs (not shown).

279 Experimental validation of the binding sites is needed. The present work provides context for the

280 design of experiments that will allow us to define the *A. ferrooxidans* QS regulon.

281

281 **Figure 1**

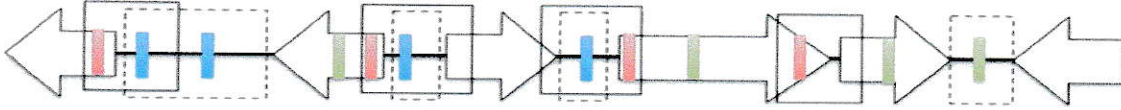


282

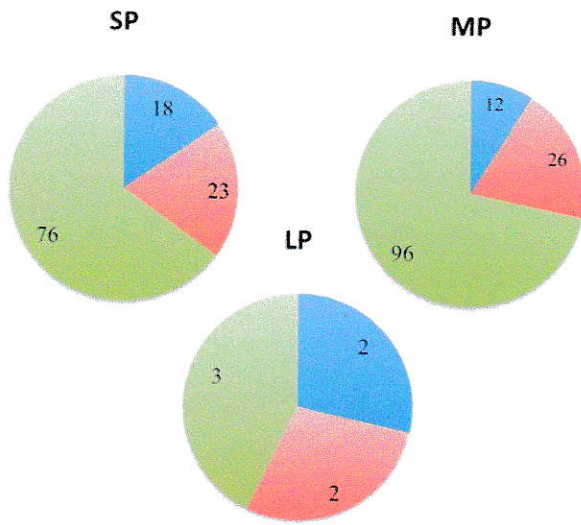
283

283 **Figure2**

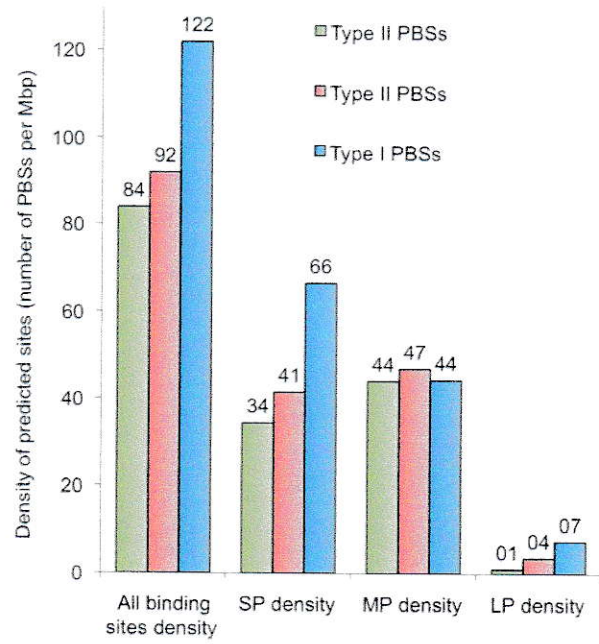
A



B



C



284

285



285 **Figure 3**

	1	10	18
	-----+-----		
1	GAGGTC	AACCGG	GACAGC
11	TCTGTC	TA	CTGGGACAGC
7	AGTGTCA	ACCCT	GACAGG
10	GCTGTAA	ACGT	GGCAGT
30	GATTTC	AAGGGT	GACAGC
afeI	GCTGTCA	AGGTT	GACAGC
2	TTTTTC	AAATC	GACAGC
16	CGTATCC	ATATC	GACAGA
28	CTGATCG	ATATT	GACAGC
24	ATTATCA	AAGTT	GACCGA
3	CCTGTG	ATGGAT	GACAGC
5	TCGGTC	ATGATT	GACTGC
18	GCTATCA	TGTTT	GACAGA
29	GCTATC	CTGCTC	GACAGC
4	GCAGCC	CAATGT	GACAGC
12	GCTGCC	CAATG	GCCAGC
13	GCTGCC	CAATG	GCCAGC
26	GCCGCC	CAGATT	GCCAGC
23	GCAGGCC	ATGCT	GACAGC
31	GCAGTCA	ATGCT	GCCCGC
8	ACCAGCA	ATATC	GCCCGC
27	GCGGTC	AGTATC	GCCAGC
6	TCCGTC	ATTGTT	GATAGA
9	ACTGACC	ATGTT	GACAGA
19	ACCGTC	TATTTT	GACAGG
17	ACTGCC	ATTTT	GACAGC
22	CCTGCC	AGTCTT	GACAGT
14	GCGAGC	AGGATT	GACAGA
15	GCGAGC	AGGATT	GACAGA
20	GCTTGCC	GCATT	GCCAGG
21	ACGGGC	AGGTT	GCTAGT
25	GATGGT	GATGTT	GACAGC
Consensus	.ctgt.caa.	.tt.GaCaGc	

286

## 5. TABLES

**Table 1.** Characterization of selected PBSs in terms of their genomic contexts

PBS ID	Start	End	MEME prediction <sup>a</sup>	Divergon	Bprom overlap <sup>b</sup>	TIGR locus <sup>c</sup>	TIGR Common Name <sup>d</sup>	TIGR Gene Symbol <sup>e</sup>	Mainrole	TIGR subrole	GO term
SP1	4054	4066	NO	NO	US -35	AFE_0003	cytochrome c-type biogenesis protein ResB, putative	ND	Energy metabolism	Electron transport	GO:0005554 GO:0017004
SP2	6274	6288	NO	NO	-35	AFE_0005	ubiquinol-cytochrome c reductase, cytochrome b subunit	petB-1	Energy metabolism	Electron transport	GO:0008121 GO:0015008 GO:0042774
SP3	313239	313253	NO	NO	NP	AFE_0313	cell division topological specificity factor MinE	minE	Cellular processes	Cell division	GO:0000910 GO:0000918
SP4	333302	333316	NO	NO	DS -10	AFE_0333	membrane protein	ND	Cell envelope	Other	GO:0000004 GO:0005554 GO:0016020
SP5	550420	550434	NO	YES	US -35	AFE_0570	HP <sup>f</sup>				
					DS -10	AFE_0571	transcriptional regulator, LysR family	ND	Regulatory functions	DNA interactions	GO:0003700 GO:0006355
SP6	600304	600318	NO	YES	NP	AFE_0634	ISAfe4, transposase orf1	ND	Mobile and extrachromosomal element functions	Transposon functions	GO:0004803 GO:0006313
					-35	AFE_0635	acetyltransferase, GNAT family	ND	Unknown function	Enzymes of unknown specificity	GO:0008080 GO:0008152
SP7	737549	737561	NO	NO	DS -10	AFE_0784	phosphohistidine phosphatase SixA	sixA	Regulatory functions	Protein interactions	GO:0000160 GO:0004271 GO:0008969 GO:0000160 GO:0004271 GO:0008969
SP8	768189	768201	NO	NO	-10	AFE_0817	phosphonate metabolism protein PhnJ	phnJ	Central intermediary metabolism	Phosphorus compounds	GO:0005554 GO:0019834
SP9	850160	850174	NO	YES	-35	AFE_0896	cytosol aminopeptidase	pepA	Protein fate	Degradation of proteins, peptides, and glycopeptides	GO:0004178 GO:0006508
					US -35	AFE_0897	YjgP/YjgQ family protein	ND	Unknown function	General	GO:0000004 GO:0005554
SP10	885280	885294	NO	NO	-10	NA <sup>g</sup>	HP				
SP11	951716	951730	NO	YES	NP	NA	COG0778 Nitroreductase				
					NP	AFE_0998	HP				
SP12	1026996	1029008	NO	NO	-10	AFE_1069	glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase	zwf	Energy metabolism	Pentose phosphate pathway	GO:0004345 GO:0006098
SP13	1106757	1106769	near	NO	NP	AFE_1148	HP				
SP14	1586581	1586593	NO	NO	DS -10	AFE_1682	HP				
SP15	1607994	1608008	NO	NO	NP	AFE_1705	transposon, orf2	ND	Mobile and extrachromosomal element functions	Transposon functions	GO:0000004 GO:0005554
SP16	1709293	1709307	NO	NO	DS -10	AFE_1834	HP				
SP17	1850688	1850702	near	NO	DS -10	AFE_1992	HP				
SP18	1850704	1850718	OL	NO	-10	AFE_2049	HP				
SP19	1889085	1889099	near	YES	NP	AFE_2050	transcriptional regulator, putative	ND	Regulatory functions	DNA interactions	GO:0006355 GO:0030528
SP20	1953995	1954009	NO	NO	NP	AFE_2112	alanyl-tRNA synthetase	alaS	Protein synthesis	tRNA aminoacylation	GO:0004813 GO:0006419
SP21	2106084	2106098	NO	NO	NP	AFE_2274	HP				
					-10	AFE_2347	sigma-54 dependent transcriptional regulator	ND	Regulatory functions	DNA interactions	GO:0003700 GO:0006355
SP22	2178993	2179005	NO	YES	-10	AFE_2348	oxidoreductase alpha (molybdopterin) subunit	ND	Unknown function	Enzymes of unknown specificity	GO:0003824 GO:0008152
SP23	2213517	2213531	NO	NO	NP	AFE_2384	ABC transporter, ATP-binding protein	ND	Transport and binding proteins	Unknown substrate	GO:0004009 GO:0006810
SP24	2294265	2294277	NO	NO	US -35	AFE_2469	EriK/YbiS/YcfS/YnhG family	ND	Unknown function	General	GO:0000004 GO:0005554
SP25	2447800	2447814	NO	NO	DS -10	AFE_2633	argininosuccinate synthase	argG	Amino acid biosynthesis	Glutamate family	GO:0004055 GO:0006528
SP26	2701136	2701148	NO	YES	US -35	AFE_2917	RND efflux system, outer membrane lipoprotein, NodT family	ND	Transport and binding proteins	Unknown substrate	GO:0006810 GO:0015562
					US -35	AFE_2918	DNA-binding response regulator	ND	Regulatory functions	DNA interactions	GO:0000158 GO:0000160 GO:0003700 GO:0006355
SP27	2703258	2703270	NO	NO	NP	AFE_2920	metal ion transporter, NRAMP family	ND	Transport and binding proteins	Cations and iron carrying compounds	GO:0030001 GO:0046873
SP28	2918334	2918348	NO	YES	US -35	AFE_3141	type III restriction-modification system, Res subunit	ND	DNA metabolism	Restriction/modification	GO:0004519
					-35	AFE_3142	HP				
SP29	2925935	2925949	NO	NO	-10	AFE_3150	transposase, interruption-N	ND	Disrupted reading frame, Mobile and extrachromosomal element functions	Transposon functions	ND



MP1	208975	208992	YES	NO	DS -10	AFE_0196	SpoVR like family protein	ND	Unknown function	General	GO:000004 GO:000554
MP2	307438	307455	YES	NO	-35	AFE_0305	FMN reductase, NADPH-dependent	ND	Unknown function	Enzymes of unknown specificity	GO:000004 GO:0008752
MP3	321301	321319	NO	NO	-10	AFE_0319	HP				
MP4	330306	330323	YES	NO	NP	AFE_0330	HP				
MP5	756920	756939	YES	YES	-10	AFE_0804	ABC transporter, ATP-binding protein, authentic frameshift	ND	Transport and binding proteins	Unknown substrate	GO:0004009 GO:0006810
					NP	AFE_0806	TonB-dependent receptor	ND	Transport and binding proteins	Cations and iron carrying compounds	GO:0005215 GO:0006810
MP6	917735	917752	YES	NO	NP	AFE_0966	virulence-associated protein, putative	ND	Cellular processes	Pathogenesis	GO:0005554 GO:0009405
MP7	950356	950375	YES	NO	NP	AFE_0996	HP				
MP8	1204235	1204252	YES	NO	NP	AFE_1253	RNA polymerase sigma-70 factor family	ND	Transcription	Transcription factors	GO:0006352 GO:0006355 GO:0016987
MP9	1334629	1334646	YES	NO	DS -10	AFE_1391	conjugal transfer protein	ND	Cellular processes	Conjugation	GO:0005554 GO:0009291
MP10	1426583	1426602	YES	NO	DS -10	AFE_1498	HP				
MP11	1629125	1629142	YES	NO	DS -10	AFE_1727	glycosyl transferase, group 1 family protein	ND	Cell envelope	Biosynthesis and degradation of surface polysaccharides and lipopolysaccharides	GO:0000271 GO:0016757
MP12	1629185	1629202	NO	NO	-35						
MP13	1927552	1927571	YES	YES	-35	AFE_2090	sigma-54 dependent transcriptional regulator	ND	Regulatory functions	DNA interactions	GO:0003700 GO:0006355
					US -35	AFE_2091	metallo-beta-lactamase family protein	ND	Unknown function	Enzymes of unknown specificity	GO:0003824 GO:0008152
MP14	1931479	1931498	YES	NO	-10	AFE_2095	HP				
MP15	2212783	2212799	NO	NO	-10	AFE_2382	transcription termination factor Rho	rho	Transcription	Transcription factors	GO:0003715 GO:0006353
MP16	2283085	2283104	YES	NO	NP	AFE_2457	HP				
MP17	2285219	2285236	near	NO	DS -10	AFE_2461	membrane protein, putative	ND	Cell envelope	Other	GO:000004 GO:000554 GO:0016020
MP18	2323662	2323679	NO	YES	NP	AFE_2493	thiol:disulfide interchange protein DsbD	dsbD	Energy metabolism, Protein fate	Electron transport, Protein folding and stabilization	GO:0006457 GO:0016020 GO:0017004 GO:0047134
					US -35	AFE_2494	conserved hypothetical protein	ND	Hypothetical proteins	Conserved	ND
MP19	2396408	2396425	YES	NO	-35	AFE_2573	HP				
MP20	2457694	2457713	YES	NO	NP	AFE_2644	IRNA pseudouridine synthase B	truB	Protein synthesis	tRNA and rRNA base modification	GO:0006400 GO:0009992
MP21	2557188	2557207	YES	NO	-35	AFE_2759	metallo-beta-lactamase family protein	ND	Unknown function	Enzymes of unknown specificity	GO:0003824 GO:0008152
MP22	2573669	2573686	YES	NO	NP	AFE_2777	ribonuclease T	mt	Transcription	RNA processing	GO:0006364 GO:0016896 GO:0042780
MP23	2581112	2581129	YES	NO	DS -10	AFE_2787	RNA methyltransferase, TrmH family, group 2	ND	Protein synthesis	IRNA and rRNA base modification	GO:0006396 GO:0008173
MP24	2590876	2590893	YES	NO	DS -10	AFE_2795	glycosyl transferase, group 2 family protein	ND	Cell envelope	Biosynthesis and degradation of surface polysaccharides and lipopolysaccharides	GO:0000271 GO:0016757
MP25	2659033	2659053	YES	NO	-10	AFE_2865	toluene tolerance protein, putative	ND	Cellular processes	Detoxification	GO:0005215 GO:0009636 GO:0005215 GO:0009636
MP26	2665264	2665281	YES	YES	US -35	AFE_2873	integral membrane protein	ND	Cell envelope	Other	GO:000004 GO:000554 GO:0016020
					-10	AFE_2874	HP				
MP27	2742909	2742926	YES	NO	NP	AFE_2968	aspartyl-IRNA synthetase	aspS	Protein synthesis	IRNA aminoacylation	GO:0004815 GO:0006422
MP28	2968437	2968456	YES	NO	US -35	AFE_3204	HP				
LP1	456793	456822	NO	YES	-35	AFE_0467	ribonucleotide-diphosphate reductase, alpha subunit	nrdA	Purines, pyrimidines, nucleosides, and nucleotides	2'-Deoxyribonucleotide metabolism	GO:0004748 GO:0005971 GO:0009265
					DS -10	AFE_0468	ltdD protein	ltdD	Regulatory functions	Other	GO:0015481 GO:0030234
LP2	1646735	1646764	NO	NO	DS -10	AFE_1742	polysaccharide biosynthesis/export domain protein	ND	Cell envelope,Transport and binding proteins	Biosynthesis and degradation of surface polysaccharides and lipopolysaccharides; Carbohydrates, organic alcohols, and acids	GO:0000004 GO:0005554
LP3	2022594	2022623	NO	YES	DS -10	AFE_2189	HP				
LP4	2203825	2203854	NO	NO	-35	AFE_2190	translation elongation factor P	efp	Protein synthesis	Translation factors	GO:0003746 GO:0006414
					NP	AFE_2374	YCII-related domain protein	ND	Unknown function	General	GO:0000004 GO:0005554
MP-LP1	1047761	1047789	YES	YES	-35	AFE_1095	HP				
					-35	AFE_1096	autoinducer-binding transcriptional regulator, LuxR family	ND	Regulatory functions	DNA interactions	GO:0003700 GO:0006355

### **Table legend.**

<sup>a</sup>Selected PBSs sequences with additional flanking 80 bp regions in each side were used as inputs for the search of common motifs using the Multiple Em for Motif Elicitation (MEME) tool (Timothy et al., 1994). “NO” means that no motif was found by MEME. “YES” means that MEME identified the corresponding PBS as the common motif. “near” means that the common motif was found within the input sequence but it is not the corresponding PBS. “OL” means that the common motif overlaps the corresponding PBS but is not the same sequence.

<sup>b</sup>Selected PBSs sequences with additional flanking 100 bp regions in each side were used as inputs for the search of putative  $\sigma^{70}$  consensus promoters using the Bprom prediction tool ([www.softberry.com](http://www.softberry.com)). “-35” means that PBS overlapped the predicted -35 element. “-10” means that PBS overlapped the predicted -10 element. “DS -10” means that the corresponding PBS was located downstream of the -10 element. “US -35” means that the corresponding PBS was located upstream of the -35 element. “NP” means that there was no prediction of  $\sigma^{70}$  promoter

<sup>c</sup>ORF identity assigned by TIGR. “NA” means that the ORF was not annotated as such in the TIGR list

<sup>d</sup>Gene product identity assigned by TIGR. “HP” means that the product is an hypothetical protein or a conserved hypothetical protein

<sup>e</sup>Gene symbol assigned by TIGR. “ND” means no data

<sup>f</sup>Hypothetical proteins do not have main or subrole assignments

<sup>g</sup>The unannotated ORFs were manually curated



## 6. LEYENDAS PARA LAS ILUSTRACIONES / FIGURAS

**Figure 1.** Generation of HMM from hypothetical alignments based on the *afe-box* sequence a. QS locus of *A. ferrooxidans* ATCC 23270. The gray colored rectangle represents the *afe-box* site. b. Sequence composition and different palindromic structures found in the *afe-box* site. The arrows denote nucleotides with perfect palindromy. Note that SP1 and SP2 sequences are inverted repeats of each other. c. Representation of the alignments performed to generate the different HMM.

**Figure 2.** Distribution of the 265 predicted binding sites in the *A. ferrooxidans* ATCC 23270 genome sequence. **a.** Hypothetical gene organization in the *A. ferrooxidans* genome showing the classification of PBSs in three sets according to their position relative to an ORF start. PBSs found in sense intergenic regions (Type I) (see text) are denoted with white rectangular blocks. Type II and Type III PBS are denoted with dark and light gray, respectively. The dashed square denotes intergenic regions. The continuous line denotes the permitted “250 bp zone” (see text) **b.** Abundance of Type I, II and III PBSs in the total set. **c.** Compared abundance of the SP, MP and LP in the three PBS types according to a calculated “density” parameter. Densities were calculated dividing the number of PBSs in each subset by the number of total bases in the *A. ferrooxidans* genome available for each subset (total intergenic bp in the genome (total IG) for Type I; sum of total “250 bp zones” in the genome minus total IG bp in the genome for Type II; and total bp in the genome minus the sum of total “250 bp zones” in the genome for type III).

### **Figure 3**

Multiple sequence alignment of selected PBSs that were also positive for the MEME common motif search (including MEME motifs found near SP type PBSs). Absolute conserved nucleotides are shown in capital letters.



#### 4. REFERENCES.

- Abbas A., Adams, C., Scully, N., Glennon, J. y O'Gara, F. 2007. A role for TonB1 in biofilm formation and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett* **274**:269-78
- Altschul S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D.J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids Res.* **25**:3389-3402
- Amaro A.M., Chamorro, D., Seeger, M., Arredondo, R., Peirano, I. y Jerez, C.A. 1991. Effect of external pH perturbations on in vivo protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J Bacteriol* **173**:910-5
- Anderson R.M., Zimprich, C.A. y Rust, L. 1999. A second operator is involved in *Pseudomonas aeruginosa* elastase (*lasB*) activation. *J Bacteriol* **181**:6264-70
- Andersson R.A., Eriksson, A.R., Heikinheimo, R., Mae, A., Pirhonen, M., Koiv, V., Hyytiainen, H., Tuikkala, A. y Palva, E.T. 2000. Quorum sensing in the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*: the role of *expR(Ecc)*. *Mol Plant Microbe Interact* **13**:384-93
- Antunes L.C., Schaefer, A.L., Ferreira, R.B., Qin, N., Stevens, A.M., Ruby, E.G. y Greenberg, E.P. 2007. Transcriptome analysis of the *Vibrio fischeri* LuxR-LuxI regulon. *J Bacteriol* **189**:8387-91
- Arevalo-Ferro C., Hentzer, M., Reil, G., Gorg, A., Kjelleberg, S., Givskov, M., Riedel, K. y Eberl, L. 2003. Identification of quorum-sensing regulated proteins in the opportunistic pathogen *Pseudomonas aeruginosa* by proteomics. *Environ Microbiol* **5**:1350-69
- Bailey T.L. y Gribskov, M. 1998. Combining evidence using p-values: application to sequence homology searches. *Bioinformatics* **14**:48-54
- Bailey T.L., Williams, N., Mistleh, C. y Li, W.W. 2006. MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucl. Acids Res.* **34**:W369-373
- Baker B.J. y Banfield, J.F. 2003. Microbial communities in acid mine drainage. *FEMS Microbiology Ecology* **44**:139-152
- Blosser-Middleton R.S. y Gray, K.M. 2001. Multiple N-acyl homoserine lactone signals of *Rhizobium leguminosarum* are synthesized in a distinct temporal pattern. *J Bacteriol* **183**:6771-7
- Boettcher K. y Ruby, E. 1995. Detection and quantification of *Vibrio fischeri* autoinducer from symbiotic squid light organs. *J. Bacteriol.* **177**:1053-1058
- Callahan S.M. y Dunlap, P.V. 2000. LuxR- and acyl-homoserine-lactone-controlled non-lux genes define a quorum-sensing regulon in *Vibrio fischeri*. *J Bacteriol* **182**:2811-22
- Carlier A.L. y von Bodman, S.B. 2006. The *rcaA* promoter of *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* features a low-level constitutive promoter and an EsaR quorum-sensing-regulated promoter. *J Bacteriol* **188**:4581-4
- Chambers C.E., Lutter, E.I., Visser, M.B., Law, P.P. y Sokol, P.A. 2006. Identification of potential CepR regulated genes using a cep box motif-based search of the *Burkholderia cenocepacia* genome. *BMC Microbiol* **6**:104
- Chatterjee J., Miyamoto, C.M., Zouzoulas, A., Lang, B.F., Skouris, N. y Meighen, E.A. 2002. MetR and CRP bind to the *Vibrio harveyi* lux promoters and regulate luminescence. *Mol Microbiol* **46**:101-11

- Chen H., Teplitski, M., Robinson, J.B., Rolfe, B.G. y Bauer, W.D. 2003. Proteomic analysis of wild-type *Sinorhizobium meliloti* responses to N-acyl homoserine lactone quorum-sensing signals and the transition to stationary phase. *J Bacteriol* **185**:5029-36
- Chilton M.D., Currier, T.C., Farrand, S.K., Bendich, A.J., Gordon, M.P. y Nester, E.W. 1974. *Agrobacterium tumefaciens* DNA and PS8 bacteriophage DNA not detected in crown gall tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**:3672-6
- Corpet F. 1988. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. *Nucl. Acids Res.* **16**:10881-10890
- Cui Y., Chatterjee, A., Hasegawa, H., Dixit, V., Leigh, N. y Chatterjee, A.K. 2005. ExpR, a LuxR homolog of *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*, activates transcription of *rsmA*, which specifies a global regulatory RNA-binding protein. *J Bacteriol* **187**:4792-803
- Daniels R., Reynaert, S., Hoekstra, H., Verreth, C., Janssens, J., Braeken, K., Fauvart, M., Beullens, S., Heusdens, C., Lambrichts, I., De Vos, D.E., Vanderleyden, J., Vermant, J. y Michiels, J. 2006. Quorum signal molecules as biosurfactants affecting swarming in *Rhizobium etli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:14965-70
- Davies D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.W. y Greenberg, E.P. 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**:295-8
- Dubern J.F., Lugtenberg, B.J. y Bloemberg, G.V. 2006. The *ppul-rsaL-ppuR* quorum-sensing system regulates biofilm formation of *Pseudomonas putida* PCL1445 by controlling biosynthesis of the cyclic lipopeptides putisolvins I and II. *J Bacteriol* **188**:2898-906
- Dunlap P.V. 1999. Quorum regulation of luminescence in *Vibrio fischeri*. *J Mol Microbiol Biotechnol* **1**:5-12
- Eberhard A. 1972. Inhibition and activation of bacterial luciferase synthesis. *J Bacteriol* **109**:1101-5
- Eberhard A., Burlingame, A.L., Eberhard, C., Kenyon, G.L., Neelson, K.H. y Oppenheimer, N.J. 1981. Structural identification of autoinducer of *Photobacterium fischeri* luciferase. *Biochemistry* **20**:2444-9
- Eddy S.R. 1998. Profile hidden Markov models. *Bioinformatics* **14**:755-63
- Egland K.A. y Greenberg, E.P. 1999. Quorum sensing in *Vibrio fischeri*: elements of the *luxI* promoter. *Mol Microbiol* **31**:1197-204
- Engbrecht J. y Silverman, M. 1984. Identification of genes and gene products necessary for bacterial bioluminescence. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**:4154-8
- Farah C., Vera, M., Morin, D., Haras, D., Jerez, C.A. y Guilian, N. 2005. Evidence for a functional quorum-sensing type AI-1 system in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* **71**:7033-40
- Federle M.J. y Bassler, B.L. 2003. Interspecies communication in bacteria. *J Clin Invest* **112**:1291-9
- Frezza M., Castang, S., Estephane, J., Soulere, L., Deshayes, C., Chantegrel, B., Nasser, W., Queneau, Y., Reverchon, S. y Doutheau, A. 2006. Synthesis and biological evaluation of homoserine lactone derived ureas as antagonists of bacterial quorum sensing. *Bioorg Med Chem* **14**:4781-91
- Fuqua C. y Winans, S.C. 1996. Conserved cis-acting promoter elements are required for density-dependent transcription of *Agrobacterium tumefaciens* conjugal transfer genes. *J Bacteriol* **178**:435-40



- Fuqua C., Winans, S.C. y Greenberg, E.P. 1996. Census and consensus in bacterial ecosystems: the LuxR-LuxI family of quorum-sensing transcriptional regulators. *Annu Rev Microbiol* **50**:727-51
- Fuqua W.C. y Winans, S.C. 1994. A LuxR-LuxI type regulatory system activates *Agrobacterium Ti* plasmid conjugal transfer in the presence of a plant tumor metabolite. *J Bacteriol* **176**:2796-806
- Fuqua W.C., Winans, S.C. y Greenberg, E.P. 1994. Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* **176**:269-75
- Gilson L., Kuo, A. y Dunlap, P.V. 1995. AinS and a new family of autoinducer synthesis proteins. *J Bacteriol* **177**:6946-51
- Gray K.M. y Garey, J.R. 2001. The evolution of bacterial LuxI and LuxR quorum sensing regulators. *Microbiology* **147**:2379-87
- Guiliani N., Bengrine, A., Borne, F., Chippaux, M. y Bonnefoy, V. 1997. Alanyl-tRNA synthetase gene of the extreme acidophilic chemolithoautotrophic *Thiobacillus ferrooxidans* is highly homologous to *alaS* genes from all living kingdoms but cannot be transcribed from its promoter in *Escherichia coli*. *Microbiology* **143** ( Pt 7):2179-87
- Hanzelka B.L., Parsek, M.R., Val, D.L., Dunlap, P.V., Cronan, J.E., Jr. y Greenberg, E.P. 1999. Acylhomoserine lactone synthase activity of the *Vibrio fischeri* AinS protein. *J Bacteriol* **181**:5766-70
- Huang J.J., Han, J.I., Zhang, L.H. y Leadbetter, J.R. 2003. Utilization of acyl-homoserine lactone quorum signals for growth by a soil pseudomonad and *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Appl Environ Microbiol* **69**:5941-9
- Kaiser D. 2004. Signaling in myxobacteria. *Annu Rev Microbiol* **58**:75-98
- Kaplan H.B. y Greenberg, E.P. 1985. Diffusion of autoinducer is involved in regulation of the *Vibrio fischeri* luminescence system. *J Bacteriol* **163**:1210-4
- Keller L. y Surette, M.G. 2006. Communication in bacteria: an ecological and evolutionary perspective. *Nat Rev Microbiol* **4**:249-58
- Kempner E.S. y Hanson, F.E. 1968. Aspects of light production by *Photobacterium fischeri*. *J Bacteriol* **95**:975-9
- Khan S.R., Mavrodi, D.V., Jog, G.J., Suga, H., Thomashow, L.S. y Farrand, S.K. 2005. Activation of the *phz* operon of *Pseudomonas fluorescens* 2-79 requires the LuxR homolog PhzR, N-(3-OH-Hexanoyl)-L-homoserine lactone produced by the LuxI homolog PhzI, and a cis-acting *phz* box. *J Bacteriol* **187**:6517-27
- Kirke D.F., Swift, S., Lynch, M.J. y Williams, P. 2004. The *Aeromonas hydrophila* LuxR homologue AhyR regulates the N-acyl homoserine lactone synthase, AhyI positively and negatively in a growth phase-dependent manner. *FEMS Microbiol Lett* **241**:109-17
- Labbate M., Zhu, H., Thung, L., Bandara, R., Larsen, M.R., Willcox, M.D., Givskov, M., Rice, S.A. y Kjelleberg, S. 2007. Quorum-sensing regulation of adhesion in *Serratia marcescens* MG1 is surface dependent. *J Bacteriol* **189**:2702-11
- Laue B.E., Jiang, Y., Chhabra, S.R., Jacob, S., Stewart, G.S., Hardman, A., Downie, J.A., O'Gara, F. y Williams, P. 2000. The biocontrol strain *Pseudomonas fluorescens* F113 produces the *Rhizobium* small bacteriocin, N-(3-hydroxy-7-cis-tetradecenoyl)homoserine lactone, via HdtS, a putative novel N-acylhomoserine lactone synthase. *Microbiology* **146** ( Pt 10):2469-80
- Lavrrar J.L. y McIntosh, M.A. 2003. Architecture of a fur binding site: a comparative analysis. *J Bacteriol* **185**:2194-202



- Lenz D.H., Mok, K.C., Lilley, B.N., Kulkarni, R.V., Wingreen, N.S. y Bassler, B.L. 2004. The small RNA chaperone Hfq and multiple small RNAs control quorum sensing in *Vibrio harveyi* and *Vibrio cholerae*. *Cell* **118**:69-82
- Marchler-Bauer A. y Bryant, S.H. 2004. CD-Search: protein domain annotations on the fly. *Nucl. Acids Res.* **32**:W327-331
- Marketon M.M., Glenn, S.A., Eberhard, A. y Gonzalez, J.E. 2003. Quorum sensing controls exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J Bacteriol* **185**:325-31
- Markham N.R. y Zuker, M. 2005. DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. *Nucleic Acids Res* **33**:W577-81
- McGowan S.J., Barnard, A.M., Bosgelmez, G., Sebahia, M., Simpson, N.J., Thomson, N.R., Todd, D.E., Welch, M., Whitehead, N.A. y Salmond, G.P. 2005. Carbapenem antibiotic biosynthesis in *Erwinia carotovora* is regulated by physiological and genetic factors modulating the quorum sensing-dependent control pathway. *Mol Microbiol* **55**:526-45
- Medina G., Juarez, K., Valderrama, B. y Soberon-Chavez, G. 2003. Mechanism of *Pseudomonas aeruginosa* RhlR transcriptional regulation of the rhlAB promoter. *J Bacteriol* **185**:5976-83
- Miller M.B. y Bassler, B.L. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annu Rev Microbiol* **55**:165-99
- Minogue T.D., Wehland-von Trebra, M., Bernhard, F. y von Bodman, S.B. 2002. The autoregulatory role of EsaR, a quorum-sensing regulator in *Pantoea stewartii* ssp. *stewartii*: evidence for a repressor function. *Mol Microbiol* **44**:1625-35
- More M.I., Finger, L.D., Stryker, J.L., Fuqua, C., Eberhard, A. y Winans, S.C. 1996. Enzymatic synthesis of a quorum-sensing autoinducer through use of defined substrates. *Science* **272**:1655-8
- Nealson K.H., Platt, T. y Hastings, J.W. 1970. Cellular control of the synthesis and activity of the bacterial luminescent system. *J Bacteriol* **104**:313-22
- P. VILLESEN. 2007. FaBox: an online toolbox for fasta sequences. *Molecular Ecology Notes* **7**:965-968
- Pappas K.M., Weingart, C.L. y Winans, S.C. 2004. Chemical communication in proteobacteria: biochemical and structural studies of signal synthases and receptors required for intercellular signalling. *Mol Microbiol* **53**:755-69
- Parsek M.R. y Greenberg, E.P. 2005. Sociomicrobiology: the connections between quorum sensing and biofilms. *Trends Microbiol* **13**:27-33
- Pearson J.P., Van Delden, C. y Iglewski, B.H. 1999. Active efflux and diffusion are involved in transport of *Pseudomonas aeruginosa* cell-to-cell signals. *J Bacteriol* **181**:1203-10
- Pessi G. y Haas, D. 2000. Transcriptional control of the hydrogen cyanide biosynthetic genes hcnABC by the anaerobic regulator ANR and the quorum-sensing regulators LasR and RhlR in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* **182**:6940-9
- Piper K.R., Beck von Bodman, S. y Farrand, S.K. 1993. Conjugation factor of *Agrobacterium tumefaciens* regulates Ti plasmid transfer by autoinduction. *Nature* **362**:448-50
- Pirhonen M., Flego, D., Heikinheimo, R. y Palva, E.T. 1993. A small diffusible signal molecule is responsible for the global control of virulence and exoenzyme production in the plant pathogen *Erwinia carotovora*. *Embo J* **12**:2467-76

- Rahmati S., Yang, S., Davidson, A.L. y Zechiedrich, E.L. 2002. Control of the AcrAB multidrug efflux pump by quorum-sensing regulator SdiA. *Mol Microbiol* **43**:677-85
- Ramirez P., Guiliani, N., Valenzuela, L., Beard, S. y Jerez, C.A. 2004. Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds, or metal sulfides. *Appl Environ Microbiol* **70**:4491-8
- Rampioni G., Bertani, I., Zennaro, E., Polticelli, F., Venturi, V. y Leoni, L. 2006. The quorum-sensing negative regulator RsaL of *Pseudomonas aeruginosa* binds to the *lasI* promoter. *J Bacteriol* **188**:815-9
- Rawlings D.E. 2002. Heavy metal mining using microbes. *Annu Rev Microbiol* **56**:65-91
- Rawlings D.E. y Johnson, D.B. 2007. The microbiology of biomining: development and optimization of mineral-oxidizing microbial consortia. *Microbiology* **153**:315-324
- Rawlings D.E. y Kusano, T. 1994. Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol Rev* **58**:39-55
- Reverchon S., Bouillant, M.L., Salmond, G. y Nasser, W. 1998. Integration of the quorum-sensing system in the regulatory networks controlling virulence factor synthesis in *Erwinia chrysanthemi*. *Mol Microbiol* **29**:1407-18
- Rivas M., Seeger, M., Holmes, D.S. y Jedlicki, E. 2005. A Lux-like quorum sensing system in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biol Res* **38**:283-97
- Rivas M., Seeger, M., Jedlicki, E. y Holmes, D.S. 2007. Second acyl homoserine lactone production system in the extreme acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol* **73**:3225-31
- Rohwerder T., Gehrke, T., Kinzler, K. y Sand, W. 2003. Bioleaching review part A: progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl Microbiol Biotechnol* **63**:239-48
- Rouillard J.M., Zuker, M. y Gulari, E. 2003. OligoArray 2.0: design of oligonucleotide probes for DNA microarrays using a thermodynamic approach. *Nucleic Acids Res* **31**:3057-62
- Rutherford K., Parkhill, J., Crook, J., Horsnell, T., Rice, P., Rajandream, M.-A. y Barrell, B. 2000. Artemis: sequence visualization and annotation. *Bioinformatics* **16**:944-945
- Sambrook J. y Russell, D.W. 2001. *En* Cold Spring Harbor Laboratory Press (eds.), Molecular cloning : a laboratory manual.
- Schaefer A.L., Taylor, T.A., Beatty, J.T. y Greenberg, E.P. 2002. Long-chain acyl-homoserine lactone quorum-sensing regulation of *Rhodobacter capsulatus* gene transfer agent production. *J Bacteriol* **184**:6515-21
- Schaefer A.L., Val, D.L., Hanzelka, B.L., Cronan, J.E., Jr. y Greenberg, E.P. 1996. Generation of cell-to-cell signals in quorum sensing: acyl homoserine lactone synthase activity of a purified *Vibrio fischeri* LuxI protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:9505-9
- Schuster M. y Greenberg, E.P. 2006. A network of networks: quorum-sensing gene regulation in *Pseudomonas aeruginosa*. *Int J Med Microbiol* **296**:73-81
- Schuster M., Lostroh, C.P., Ogi, T. y Greenberg, E.P. 2003. Identification, timing, and signal specificity of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-controlled genes: a transcriptome analysis. *J Bacteriol* **185**:2066-79
- Schuster M., Urbanowski, M.L. y Greenberg, E.P. 2004. Promoter specificity in *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing revealed by DNA binding of purified LasR. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:15833-9



- Shadel G.S. y Baldwin, T.O. 1992. Positive autoregulation of the *Vibrio fischeri* luxR gene. LuxR and autoinducer activate cAMP-catabolite gene activator protein complex-independent and -dependent luxR transcription. *J Biol Chem* **267**:7696-702
- Shaw P.D., Ping, G., Daly, S.L., Cha, C., Cronan, J.E., Jr., Rinehart, K.L. y Farrand, S.K. 1997. Detecting and characterizing N-acyl-homoserine lactone signal molecules by thin-layer chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:6036-41
- Sonnleitner E., Schuster, M., Sorger-Domenigg, T., Greenberg, E.P. y Blasi, U. 2006. Hfq-dependent alterations of the transcriptome profile and effects on quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* **59**:1542-58
- Stothard P. 2000. The sequence manipulation suite: JavaScript programs for analyzing and formatting protein and DNA sequences. *Biotechniques* **28**:1102-1104
- Thompson J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* **22**:4673-80
- Vannini A., Volpari, C., Gargioli, C., Muraglia, E., Cortese, R., De Francesco, R., Neddermann, P. y Marco, S.D. 2002. The crystal structure of the quorum sensing protein TraR bound to its autoinducer and target DNA. *Embo J* **21**:4393-401
- von Bodman S.B., Ball, J.K., Faini, M.A., Herrera, C.M., Minogue, T.D., Urbanowski, M.L. y Stevens, A.M. 2003. The quorum sensing negative regulators EsaR and ExpR(Ecc), homologues within the LuxR family, retain the ability to function as activators of transcription. *J Bacteriol* **185**:7001-7
- von Bodman S.B., Willey, J.M. y Diggle, S.P. 2008. Cell-cell communication in bacteria: united we stand. *J Bacteriol* **190**:4377-91
- Wagner V.E., Bushnell, D., Passador, L., Brooks, A.I. y Iglewski, B.H. 2003. Microarray analysis of *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing regulons: effects of growth phase and environment. *J Bacteriol* **185**:2080-95
- Wang Y.J., Huang, J.J. y Leadbetter, J.R. 2007. Acyl-HSL signal decay: intrinsic to bacterial cell-cell communications. *Adv Appl Microbiol* **61**:27-58
- Weissbach H. y Brot, N. 1991. Regulation of methionine synthesis in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* **5**:1593-7
- Wernersson R. 2005. FeatureExtract--extraction of sequence annotation made easy. *Nucl. Acids Res.* **33**:W567-569
- West S.A., Griffin, A.S., Gardner, A. y Diggle, S.P. 2006. Social evolution theory for microorganisms. *Nat Rev Microbiol* **4**:597-607
- Whitehead N.A., Barnard, A.M., Slater, H., Simpson, N.J. y Salmond, G.P. 2001. Quorum-sensing in Gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **25**:365-404
- Whiteley M. y Greenberg, E.P. 2001. Promoter specificity elements in *Pseudomonas aeruginosa* quorum-sensing-controlled genes. *J Bacteriol* **183**:5529-34
- Wilkinson A., Danino, V., Wisniewski-Dye, F., Lithgow, J.K. y Downie, J.A. 2002. N-acyl-homoserine lactone inhibition of rhizobial growth is mediated by two quorum-sensing genes that regulate plasmid transfer. *J Bacteriol* **184**:4510-9
- Xavier K.B. y Bassler, B.L. 2003. LuxS quorum sensing: more than just a numbers game. *Curr Opin Microbiol* **6**:191-7
- Xiao G., He, J. y Rahme, L.G. 2006. Mutation analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* mvfR and pqsABCDE gene promoters demonstrates complex quorum-sensing circuitry. *Microbiology* **152**:1679-86



Zhu J. y Winans, S.C. 2001. The quorum-sensing transcriptional regulator TraR requires its cognate signaling ligand for protein folding, protease resistance, and dimerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**:1507-12

Timothy L. Bailey and Charles Elkan, "Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motifs in biopolymers", *Proceedings of the Second International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, pp. 28-36, AAAI Press, Menlo Park, California, 1994.