

UCH-FC
Doc-Microbiología
U473
C.1

UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS

METABOLISMO DEL FOSFATO

EN *Acidithiobacillus ferrooxidans*:

CARACTERIZACION DE UN POSIBLE REGULON PHO.

Tesis presentada a la Universidad de Chile para optar al Grado de
Doctor en Ciencias con mención en Microbiología

Por

Mario A. Vera Véliz

Director de Tesis:

Dr. Carlos A. Jerez

Co-Director de Tesis:

Dr. Nicolás Guiliani

Noviembre de 2006



FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION

TESIS DE DOCTORADO

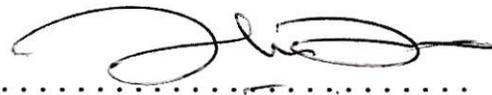
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato.

Mario Andrés Vera Véliz

Ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 8 de Noviembre de 2006.

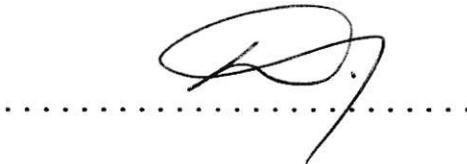
Director de Tesis:

Dr. Carlos A. Jerez



Co-Director de Tesis

Dr. Nicolás Guiliani



Comisión de Evaluación de la Tesis

Dra. Rosalba Lagos



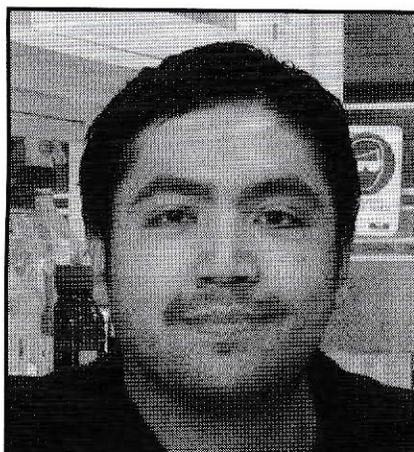
Dr. Romilio Espejo



Dr. Davor Cotoras







Nací en Santiago, tres semanas antes de la fecha prevista, en una lluviosa noche de primavera del 7 de octubre de 1977. Soy el primer hijo del matrimonio de mis padres Mario y Ximena. Crecí en un entorno de mucho amor familiar. En Noviembre de 1980, a mis 3 años de vida, vino al mundo mi hermana Ximena, mi eterna cómplice a completar nuestra familia.

Desde niño me mostré inquieto e hiperactivo, ni la violenta asma bronquial crónica, que padecí durante 10 años, logró mermar mi alegría y desbordante energía. A los cuatro años mi madre me matriculo al colegio donde me dedique a al ajedrez y a leer cuanto libro llegara a mis manos. Hacia 1989, el asma se retiró parcialmente de mi vida gracias un largo y carísimo tratamiento (aún algunas veces me vuelve a visitar), nuestro país volvía a la democracia y mi adolescencia comenzaba a delinear su camino. En 1991 ingrese al Liceo José Victorino Lastarria, donde se perfeccioné mi ajedrez, (mi pasión de aquella época), y se desarrollo mi interés por la historia, la música y las ciencias. Parte importante de este interés fue tempranamente estimulado por mi abuelo Pompeyo Véliz, profesor de historia y político, quien dejó este mundo a los 78 años en 1998.

Mi interés por la Biología y la lectura de un par de artículos sobre el DNA recombinante y sus potencialidades futuras derivó en mi ingreso en 1995 a la Universidad de Chile. Fui parte de la primera generación de estudiantes de la nueva carrera de Biotecnología. (Que cambió posteriormente de nombre a Ingeniería en Biotecnología Molecular gracias a muchas gestiones de las cuales fui parte activa en mi rol de dirigente estudiantil). Mi estadía en la Facultad de Ciencias marcó un cambio muy importante en mi visión de la vida. Me interesé por la fisiología y luego por la microbiología. Realicé mi tesis de pregrado en el laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, clonando y expresando un gen de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, una bacteria muy importante en procesos de biominería. Quedé muy interesado con el tema y decidí realizar mi doctorado en esta misma área y en el mismo laboratorio. Hoy, siendo Doctor en Ciencias, espero partir prontamente al viejo continente a desarrollar mi post doctorado con el objetivo de entender un poco más acerca de la biología de este interesante microorganismo.

Parto feliz de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile, donde permanecí durante doce años. Acá conocí al primer amor de mi vida, a grandes amigos y a un grupo de personas muy buenas e inteligentes, cuya pasión por el conocimiento y la docencia les hace renunciar muchas veces a mejores expectativas económicas, mostrando un claro ejemplo de la pasión que nos mueve en nuestras vidas. Algún día espero volver.

AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer al Dr. Carlos Jerez, director de esta tesis, por la formación recibida durante el desarrollo de mi doctorado y por su agudo e incansable espíritu científico que se vio reflejado en las constantes discusiones y en la revisión crítica de mi trabajo.

Agradezco también al Dr. Nicolás Guiliani, por co-dirigir esta tesis, por su rigurosidad científica, su amistad y su constante valoración y apoyo a mi trabajo.

A las instituciones que me otorgaron el financiamiento durante mi estadía en el programa de doctorado, a la Universidad de Chile, a CONICYT, a la Iniciativa Científica Milenio y a la Fundación Maria Ghilardi Venegas.

A todos mis compañeros y amigos del laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología y de la Unidad de Comunicación bacteriana, por su amistad, las discusiones científicas y los excelentes momentos compartidos. Especialmente deseo agradecer a los Doctores Francisco Chávez y Sergio Álvarez, a Francisco Remonsellez, Alvaro Orell y Claudio Navarro por sus acertados aportes y críticas al desarrollo de mi trabajo A Simón Beard por su entusiasmo y valioso aporte en el montaje de la técnica de macroarreglos de DNA a Pilar Cortes, Álvaro Banderas y Susana Valenzuela por su amistad y buenas vibras.

A Juan Araos por su gran dedicación en la preparación del material del laboratorio, su buen humor, sus grandes anécdotas y por sobre todo su notable calidad humana.

A mis profesores del doctorado, por la excelente formación recibida, en especial al Dr. Víctor Cifuentes, por su apoyo y al Dr. Marcelo Campos por su manera abierta de vivir la investigación.

A mis amigos y colegas, por las miles de alegrías y algunas penas que hemos vivido juntos, por siempre tener palabras de ánimo y apoyo. Un agradecimiento muy especial para, Francisco Rivera, Paola Cofré, Carolina Zúñiga, Jaime Montes, Marcela Sjöberg, Carlos Guerrero, Claudio Hetz, Mauricio Soto, Juan Carlos Vera, Francisco Remonsellez, Marly López, María Luisa Valenzuela, Carolina Pizarro, Francisco Mattar, Yurina Cifuentes, Jessica Narvárez y Marcela Vera.

Finalmente el agradecimiento más especial de todos es para mi Familia, a mis padres, Mario y Ximena, a mi hermana Ximena y a mi abuela Yolanda, por todo su amor, su comprensión y su apoyo incondicional en los momentos difíciles.



INDICE DE MATERIAS



1.	Introducción.....	1
1.1.	Biolixiviación de minerales.....	1
1.2.	Metabolismo del fosfato en las bacterias.....	4
1.2.1.	Transporte del fosfato.....	4
1.2.2.	El regulón Pho.....	5
1.2.3.	Metabolismo de los fosfonatos.....	9
1.2.4.	Metabolismo de los poliP.....	13
1.3.	Metabolismo del fosfato en <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	17
1.4.	Hipótesis de trabajo.....	22
1.5.	Objetivo general.....	22
1.5.1.	Objetivos específicos.....	23
2.	Materiales y Métodos.....	24
2.1.	Cepas y condiciones de cultivo.....	24
2.2.	Técnicas de biología molecular.....	25
2.2.1.	Extracción del DNA.....	25
2.2.2.	Purificación de amplificadores de PCR y otros fragmentos de DNA desde geles de agarosa.....	25
2.2.3.	Cuantificación del DNA.....	26
2.2.4.	Electroforesis del DNA en geles de agarosa.....	26
2.2.5.	Partidores y reacciones de PCR.....	27
2.2.6.	PCR en tiempo real.....	27
2.2.7.	Secuenciación del DNA.....	28
2.3.	Técnicas con RNA.....	30
2.3.1.	Extracción del RNA total de <i>A. ferrooxidans</i>	30
2.3.2.	Transcripción inversa.....	31
2.3.3.	Experimento de extensión del partidor.....	32

2.4.	Construcción de un miniarreglo de genes de <i>A. ferrooxidans</i>	33
2.4.1.	Diseño de los oligonucleótidos.....	33
2.4.2.	Amplificación por PCR.....	34
2.4.3.	Impresión de las membranas.....	34
2.4.4.	Hibridación y lavado de las membranas.....	36
2.4.5.	Obtención de las imágenes.....	36
2.4.6.	Normalización y tratamiento de los datos de intensidad de los macroarreglos de DNA.....	37
2.5.	Análisis de los poliP.....	38
2.5.1.	Extracción de los poliP desde células de <i>A. ferrooxidans</i> .	38
2.5.2.	Cuantificación de los poliP.....	39
2.6.	Microscopía electrónica de transmisión (MET).....	39
2.7.	Métodos bioinformáticos.....	40
3.	Resultados.....	41
3.1.	Estudio de la expresión de los genes del regulón Pho de <i>A. ferrooxidans</i> en relación a la carencia de Pi.....	41
3.1.1.	Experimentos de RT-PCR.....	41
3.2.	Estudio de la región promotora del gen <i>phoB</i>	44
3.2.1.	Experimento de extensión del partidor.....	45
3.3.	Diseño y construcción de un macroarreglo de DNA.....	47
3.4.	Cuantificación de los niveles de transcrito para los genes <i>pstS1</i> y <i>pstS2</i> mediante PCR en tiempo real.....	55
3.5.	Estudio del metabolismo de los fosfonatos (Pn) en <i>A. ferrooxidans</i>	59
3.5.1.	Cuantificación de los niveles de transcritos de los genes <i>phn</i> mediante PCR en tiempo real.	61
3.6.	Estudio de la relación entre el metabolismo de los poliP y la expresión de los genes del regulón Pho en <i>A. ferrooxidans</i>	68

4.	Discusión.....	73
4.1.	El Regulón Pho de <i>A. ferrooxidans</i>	73
4.2.	Posibles transportadores de Pi en <i>A. ferrooxidans</i>	76
4.3.	Metabolismo de los poliP.....	77
4.4.	Metabolismo de los fosfonatos en <i>A. ferrooxidans</i>	81
5.	Conclusiones.....	85
6.	Referencias.....	87
7.	Anexos.....	95



LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Esquema de las vías de entrada del fosfato en <i>E. coli</i>	7
Figura 2.	Polifosfato inorgánico.....	13
Figura 3.	Organización genética de los marcos de lectura abiertos de <i>A. ferrooxidans</i> que corresponden a los genes ortólogos a los del regulón Pho de <i>E. coli</i>	20
Figura 4.	Comparación de la estructura genética del los operones <i>phn</i> de <i>E. coli</i> y el posible operón de <i>A. ferrooxidans</i>	22
Figura 5.	Curva de crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> en presencia y carencia de Pi	41
Figura 6.	Experimento de RT-PCR cualitativo para el gen <i>ppk</i>	42
Figura 7.	Cotranscripción de los genes del regulón Pho de <i>A. ferrooxidans</i> mediante RT-PCR.	43
Figura 8.	Estudio de la región promotora del gen <i>phoB</i> de <i>A. ferrooxidans</i>	45
Figura 9.	Mapeo del sitio de inicio de la transcripción para el gen <i>phoB</i> de <i>A. ferrooxidans</i> mediante extensión del partidor.	46
Figura 10.	Diseño y construcción de un macroarreglo de genes de <i>A. ferrooxidans</i>	48
Figura 11.	Esquema de la metodología utilizada en los experimentos de macroarreglos de DNA.....	49
Figura 12.	Ejemplo de un experimento de macroarreglos de DNA.....	50
Figura 13.	Cuantificación de los cambios en los niveles de transcritos para los genes <i>pstS1</i> y <i>pstS2</i> de <i>A. ferrooxidans</i> mediante PCR en tiempo real.....	56

Figura 14.	Crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> en fosfonatos como fuentes únicas de fosfato.....	59
Figura 15.	Efecto de la concentración de Pi en el inóculo para el crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> en ión ferroso y E-Pn.....	60
Figura 16.	Crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> en tiosulfato y M-Pn.....	63
Figura 17.	Los genes <i>phn</i> de <i>A. ferrooxidans</i> se cotranscriben.....	67
Figura 18.	Niveles de poliP durante el crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> en medio con ión ferroso y sin Pi.....	68
Figura 19.	Análisis mediante TEM de la presencia de gránulos de poliP en <i>A. ferrooxidans</i> durante su crecimiento en medio sin Pi.....	69
Figura 20.	Efecto del crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> en fosfonatos sobre los niveles de poliP.....	72
Figura 21.	Efecto del crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i> en fosfonatos sobre la presencia de gránulos de poliP determinados por TEM.....	72
Figura 22.	Esquema hipotético del metabolismo del Pi en <i>A. ferrooxidans</i>	79
Figura 23.	Esquema hipotético del metabolismo de fosfonatos en <i>A. ferrooxidans</i>	82
Figura 24.	Curvas de calibración y de fusión para los genes estudiados mediante PCR en tiempo real.....	100

LISTA DE TABLAS

Tabla 1.	Comparación entre algunas de las proteínas del regulón Pho de <i>E. coli</i> con las de <i>A. ferrooxidans</i>	19
Tabla 2.	Genes <i>phn</i> en el genoma de <i>A. ferrooxidans</i>	21
Tabla 3.	Cuantificación de cambios de expresión de los genes del regulón Pho de <i>A. ferrooxidans</i> mediante macroarreglos de DNA.....	52
Tabla 4.	Cuantificación de los cambios de expresión de los genes del regulón Pho de <i>A. ferrooxidans</i> mediante macroarreglos de DNA	53
Tabla 5.	Inducción de los niveles de transcrito de los genes <i>pstS1</i> y <i>pstS2</i> de <i>A. ferrooxidans</i> en carencia de Pi.....	57
Tabla 6.	Niveles de inducción relativos de los transcritos de los genes <i>pstS1</i> y <i>pstS2</i> de <i>A. ferrooxidans</i> determinados mediante PCR en tiempo real.....	58
Tabla 7.	Cuantificación de los cambios en los niveles de transcrito para algunos genes relacionados con la utilización de fosfonatos en <i>A. ferrooxidans</i> mediante PCR en tiempo real.....	62
Tabla 8.	Cuantificación del aumento de los niveles de transcrito de los genes <i>phn</i> de <i>A. ferrooxidans</i> durante el crecimiento en M-Pn mediante macroarreglos de DNA.....	64
Tabla 9.	Cuantificación de los niveles de inducción de los transcritos de los genes <i>pho84L</i> , <i>phnG</i> y <i>phnJ</i> mediante PCR en tiempo real	65

Tabla 10.	Efecto de la ausencia de Pi sobre los niveles relativos de transcritos para los genes <i>ppk</i> , <i>ppx</i> , <i>pstS2</i> y <i>16S</i> , cuantificados mediante PCR en tiempo real	70
Tabla 11.	Oligonucleótidos utilizados en esta tesis.....	95
Tabla 12.	Curvas de calibración y de fusión obtenidas para cada gen estudiado mediante PCR en tiempo real.....	101

LISTA DE ABREVIATURAS

DMSO	Dimetil sulfóxido
GITC	Isotiocianato de guanidina
ORF	Open reading frame (marco abierto de lectura)
Pi	Fosfato inorgánico
M-Pn	Metil fosfonato
E-Pn	Etil fosfonato
NaAC	Acetato de sodio
poliP	Polifosfatos inorgánicos
(p)ppGpp	Guanosina (penta) y tetra fosfato
PPK	Polifosfato kinasa
PPK_r	PPK recombinante de <i>Escherichia coli</i>
PPX	Polifosfato exopolifosfatasa
RT-MMLV	Transcriptasa inversa MMLV
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TAE	Tris-acetato EDTA
TBE	Tris-borato EDTA
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TM	Dominio de transmembrana

RESUMEN

El microorganismo quimiolitotrófico *Acidithiobacillus ferrooxidans* es de gran importancia en la biominería. Durante el proceso de biolixiviación de minerales pueden producirse diversos tipos de estrés como cambios de pH y temperatura, además de la carencia de determinados nutrientes. En nuestro laboratorio hemos estudiado las respuestas moleculares globales de *A. ferrooxidans* frente al estrés térmico, estrés de pH y la carencia de fosfato. Este último es un nutriente esencial para todas las células y por lo tanto, la falta de este compuesto puede afectar el proceso de biolixiviación de minerales. La fuente primaria de fosfato para los microorganismos es el Pi, aunque algunos son capaces de utilizar también ésteres de fosfato (compuestos que poseen un enlace del tipo C-O-P) y fosfonatos (compuestos que poseen un enlace C-P bastante inerte). Cuando se crece *A. ferrooxidans* en carencia de Pi, los cultivos alcanzan una densidad celular menor, las células se vuelven más filamentosas y disminuyen su capacidad de oxidar ión ferroso. Como parte de esta respuesta se sintetizan varias proteínas características de este estado. Una de ellas mostró ser homóloga a la proteína PstS, que en *Escherichia coli* y otras bacterias es la proteína periplasmática de unión a fosfato y es parte del sistema genético conocido como regulón Pho, que es empleado por los microorganismos para responder frente a la carencia de Pi y captar trazas de este nutriente. A partir de la secuencia aminoacídica del extremo amino de esta proteína, aislada mediante electroforesis 2D, iniciamos la búsqueda del regulón Pho en el genoma de *A. ferrooxidans*, la cual arrojó la presencia de 23 genes homólogos a componentes del regulón Pho de *E. coli* y otras bacterias. Dentro de ellos se destacan el sistema de dos

componentes *phoB/phoR*, el sistema de transporte específico de Pi (Pst) codificado por los genes *pstSCAB-phoU*, una duplicación de parte de este sistema formada por los genes *pstS2C2A2*, y un operón *phn*. En éste se encuentra completo el grupo de genes *phnGHIJKLM*, codificantes para la C-P liasa, la cual es la principal enzima involucrada en la degradación bacteriana de los fosfonatos. Esto sugiere que *A. ferrooxidans* podría utilizar estos compuestos como fuentes alternativas de Pi.

A. ferrooxidans, así como algunos otros microorganismos es un acumulador de poliP, los cuales son polímeros lineales de muchas decenas o centenas de residuos de ortofosfato unidos por enlaces fosfoanhídrido ricos en energía, que pueden observarse frecuentemente como gránulos densos a los electrones. La principal enzima involucrada en la biosíntesis de poliP es la polifosfato quinasa (PPK) que transfiere el fosforilo terminal del ATP al poliP, mientras que la enzima exopolifosfatasa (PPX) es responsable de su hidrólisis. En *E. coli* los genes *ppk* y *ppx* se encuentran formando un operón, mientras que en *A. ferrooxidans* el gen *ppx* se encuentra río debajo del operón *pstSCAB-phoU*, y es cotranscrito con estos genes, lo que sugiere que en esta bacteria el metabolismo del poliP podría estar conectado con la expresión del regulón Pho.

Mediante el diseño y la construcción de un macroarreglo de 65 genes de *A. ferrooxidans* dentro de los cuales se incluyeron los 23 genes de regulón Pho hemos mostrado que estos genes se expresan y que sus niveles de transcrito aumentan en condiciones de carencia de Pi. Algunos de los datos se validaron mediante PCR en tiempo real, lo que nos permitió comprobar que de los dos genes *pstS*, el *pstS2* es el que muestra un mayor aumento en los niveles de transcrito en carencia de Pi, sugiriendo que esta bacteria posee transportadores específicos de Pi y que la duplicación del gen

pstS le conferiría una mayor capacidad de transporte de Pi cuando existe carencia de este ión. En el genoma de *A. ferrooxidans* no existen transportadores homólogos a Pit, el sistema de transporte de Pi de baja afinidad de *E. coli*. Se ha encontrado la presencia de un marco de lectura homólogo al sistema de transporte de Pi Pho84 de *Saccharomyces cerevisiae*, perteneciente a la superfamilia de transportadores facilitadores, el cual es activo a pH ácido en levaduras.

En esta tesis se ha demostrado que *A. ferrooxidans* es capaz de crecer sostenidamente en cultivos que contienen M-Pn o E-Pn como fuentes únicas de fosfato. Mediante RT-PCR, macroarreglos de DNA y PCR en tiempo real observamos que los genes *phn* son co-transcritos y que existe un aumento de los niveles de transcrito de estos genes cuando la bacteria se crece en fosfonatos.

Cuando se traspa un cultivo de *A. ferrooxidans* crecido en ión ferroso al mismo medio sin Pi, los poliP disminuyen a niveles menores al 10% inicial a las 72 horas de crecimiento. Mediante experimentos de PCR en tiempo real hemos mostrado que los niveles de transcrito para el gen *ppx* aumentan mas de 10 veces a las 20 y 40 h post traspaso al medio sin Pi. Esto sugiere que en *A. ferrooxidans* el metabolismo del poliP estaría ligado a la expresión del regulón Pho.

Cuando la bacteria crece con fosfonatos en lugar de Pi no es capaz de acumular poliP, lo que indica que la degradación de fosfonatos no genera un exceso de Pi que permita a la bacteria acumular este polímero de reserva. Concluimos que *A. ferrooxidans* posee un regulón Pho, donde la duplicación del gen *pstS* y la capacidad de degradar fosfonatos le podrían conferir a esta bacteria una ventaja en la captación de trazas de Pi y en el uso de fuentes alternativas de Pi.

ABSTRACT

The chemolithotrophic microorganism *Acidithiobacillus ferrooxidans* is of great importance in biomining operations. During bioleaching of ores, microorganisms are subjected to several environmental stresses such as pH and temperature changes besides the lack of some nutrients. In our laboratory we have studied the global molecular responses of *A. ferrooxidans* to thermal and pH stresses and starvation of some nutrients. Phosphate is an essential nutrient for all living cells, therefore, the lack of this compound may affect the bioleaching of ores. The primary phosphate source for the microorganisms is Pi, although some bacteria are also able to metabolize phosphate esters (compounds that possess a C-O-P bond) and phosphonates (compounds that have a very inert C-P bond). When *A. ferrooxidans* is grown in the absence of Pi the cultures reach a lower cellular density, the cells become notably filamentous and diminish their ability to oxidize ferrous iron. As part of this response, several characteristic proteins of this state are synthesized. One of these proteins was homologous to the *E. coli* PstS protein, which in this microorganism and many other bacteria is the periplasmic phosphate binding protein and is expressed as part of the genetic system known as Pho regulon, which is used by microorganisms as a response to the lack of Pi for scavenging traces of this nutrient. Based on this N-terminal sequence, isolated from 2D electrophoresis we searched for the Pho regulon genes in the *A. ferrooxidans* genome sequence. We found the presence of 23 genes homologous Pho regulon components of *E. coli* and other bacteria. Within these genes we found the two component system *phoB/phoR*, the Pst transport system encoded by genes

pstSCAB-phoU, a duplication of part of this system formed by the genes *pstS2C2A2*, and the *phn* operon, in which the gene cluster *phnGHIJKLM*, that codifies for the C-P lyase enzyme complex is complete. This is the main enzyme involved in bacterial phosphonate degradation, suggesting that *A. ferrooxidans* could use these compounds as alternative Pi sources.

A. ferrooxidans, as a few other microorganisms, is a polyP accumulating organism. PolyPs are linear polymers of several tens or hundreds of orthophosphate residues linked by phosphoanhydride bonds, which are frequently observed as electrondense granules. The main enzyme involved in polyP biosynthesis is the polyphosphate kinase (PPK), which catalyzes the transfer of the terminal phosphoryl group of ATP to polyP, while the exopolyphosphatase (PPX) is responsible for polyP hydrolysis, rendering Pi. In *E. coli* *ppk* and *ppx* genes are linked together and form an operon, whereas in *A. ferrooxidans* the *ppx* gene is located downstream of the *pstSCAB-phoU* genes and we found that in this microorganism is co-transcribed with this genes, suggesting that polyP metabolism in this microorganism could be connected with Pho regulon expression.

By means of the design and construction of a DNA macroarray containing 65 *A. ferrooxidans* genes including 23 Pho regulon genes we have shown that these genes are expressed and that their transcript levels increased in Pi starvation conditions. Some of the data were validated by real time PCR experiments which showed that of both *pstS* genes that are expressed, *pstS2* gene is the one that shows the greatest increase in its transcription level in Pi starvation, suggesting that *A. ferrooxidans* has specific Pi transporters and the *pstS* gene duplication would confer a greater ability for Pi scavenging during Pi starvation conditions. In the *A. ferrooxidans* genome we did not

find any gene homologous to the *E. coli* low affinity phosphate transport system Pit. Instead we discovered the presence of an open reading frame homologous to the *Saccharomyces cerevisiae* Pi transport system Pho84, belonging to the major facilitator super family that has its optimum Pi transport activity at acid pH in yeast.

In this thesis we have shown that *A. ferrooxidans* is able to grow in the presence of M-Pn or E-Pn as the unique Pi sources. By means of RT-PCR, DNA macroarrays and real time PCR experiments we showed that *phn* genes are co transcribed, and their expression is increased when *A. ferrooxidans* is grown in phosphonates.

When a culture of *A. ferrooxidans* grown in ferrous ion was shifted to the same medium without Pi, poliP levels decreased to ten percent of the initial value after 72 h of growth in the absence of Pi. By using real time PCR, we have shown that the transcription levels of the *ppx* gene increases more than ten times at 20 and 40 h after the shift. This indicates that in *A. ferrooxidans*, polyP metabolism could be linked to the Pho regulon expression.

When the bacterium was grown in phosphonate as the only Pi source is not able to accumulate poliP, indicating that phosphonate degradation does not generate an excess of Pi that allows the bacterium to accumulate polyP. We conclude that *A. ferrooxidans* possesses a Pho regulon, in which a *pstS* gene duplication and the ability to degrade phosphonates would confer an adaptive advantage to this microorganism for scavenging Pi traces and to use alternative Pi sources.

1. Introducción.

Los procariontes han logrado adaptarse y vivir en las mas diversas condiciones ambientales, inclusive en lugares del planeta que se considerarían como extremos para el desarrollo de las células vivas, tales como las regiones ártica y antártica, las fosas hidrotermales presentes en los fondos marinos y los ambientes geotermales. Estos microorganismos, en general, se denominan coloquialmente de acuerdo a su “característica”, por ejemplo los piezófilos resisten altas presiones, los psicrófilos son capaces de crecer en frío, al contrario de los termófilos e hipertermófilos que están adaptados a altas temperaturas, los halófilos son capaces de resistir a las altas concentraciones de sal y los acidófilos viven a pH ácidos. Durante los últimos años se ha desarrollado una gran cantidad de investigación para comprender los mecanismos adaptativos que poseen estos microorganismos para vivir en sus diversos hábitats (Abe y Horikoshi, 2001).

1.1. Biolixiviación de minerales.

La biolixiviación es un proceso biogeoquímico donde participa una comunidad de microorganismos, dentro de los cuales se encuentran algunos de naturaleza quimiolitotrófica, los que son capaces de obtener su energía de la oxidación de sustratos inorgánicos como azufre y sulfuros. La comunidad está sometida a cambios bruscos de temperatura, soluciones extremadamente ácidas, presencia de minerales sulfurados y iones de metales pesados potencialmente tóxicos para las células (Dopson

y col., 2003). En tal ambiente, esta gran variedad de microorganismos prolifera y sus propiedades metabólicas se utilizan con gran beneficio para extraer metales como cobre y oro desde los minerales que los contienen, lo que ha llevado al desarrollo de un proceso biotecnológico conocido como biolixiviación o biominería (Hutchins y col., 1986; Norris, 1998; Rawlings, 2002). Este proceso es de gran importancia industrial no sólo en Chile, sino que mundialmente, además de ser de bajo grado de contaminación ambiental comparado con los métodos tradicionales de extracción de metales (Acevedo y col., 1993; Gentina y Acevedo, 1985; Rawlings, 1997). Actualmente, la biolixiviación de minerales se utiliza ampliamente en faenas mineras gracias a que permite trabajar con minerales de baja ley, cuya explotación tradicional no es rentable. En nuestro país aproximadamente el 5 % del cobre total se recupera mediante este proceso.

En general, los ambientes lixiviantes contienen grandes cantidades de sulfuros metálicos, los que son sometidos continua y simultáneamente tanto a reacciones de oxidación química como bacteriana. Como producto final de la oxidación de estos compuestos azufrados, en gran medida catalizada por la acción fisiológica de las bacterias, se liberan altas concentraciones de iones de metales pesados y se genera una gran cantidad de ácido sulfúrico, el que disminuye el pH del agua. Este fenómeno se conoce como el “drenaje ácido de mina” y puede potencialmente provocar graves problemas de contaminación, especialmente en sitios mineros abandonados (Johnson y Hallberg, 2005).

Dentro de la gran variedad de microorganismos capaces de desarrollarse en el ambiente donde ocurre la biolixiviación, existen bacterias tanto quimiolitotróficas como heterotróficas, arqueas, hongos, algas y algunos protozoos (Johnson, 1998). Una de las características más sobresalientes de los microorganismos que habitan este ambiente es su carácter acidófilo, ya que el rango de pH óptimo de crecimiento de éstos es menor a cuatro. *Acidithiobacillus ferrooxidans* (ex-*Thiobacillus ferrooxidans*) es considerado como uno de los microorganismos más importantes en el proceso de biolixiviación de minerales sulfurados y es la bacteria más estudiada dentro de las que participan en este proceso, donde ha sido empleada en la recuperación de oro, uranio y cobre, siendo este último metal el más importante (Olson y col., 2003; Rohwerder y col., 2003).

A. ferrooxidans es una bacteria Gram-negativa, acidófila, quimiolitotrófica y autotrófica, que es capaz de obtener energía tanto de la oxidación tanto del ión ferroso como de compuestos inorgánicos de azufre reducido. Una de las características de *A. ferrooxidans* es presentar crecimiento en altas concentraciones de iones metálicos. Por ejemplo, es capaz de crecer en medios que contienen 160 g/l de Fe^{2+} (Rawlings y Kusano, 1994). Las altas concentraciones de metales en el ambiente donde se desarrolla *A. ferrooxidans* hacen posible pensar que la biodisponibilidad de fosfato se vea afectada debido a la formación de precipitados, por ejemplo, con ión férrico. Como consecuencia de esto puede observarse una menor eficiencia en las faenas de biolixiviación debido a que la velocidad de crecimiento celular y la oxidación de sales ferrosas disminuyen (Tuovinen, 1990).

1.2. Metabolismo del fosfato en las bacterias.

El fosfato es un compuesto esencial para todas las células debido a que forma parte de los ácidos nucleicos y de los fosfolípidos, actúa como fuente de energía y es transferido a las proteínas para regular su función. Bajo condiciones naturales, el fosfato disponible para un microorganismo depende de la cantidad que exista en el medio ambiente así como de su biodisponibilidad, la que es dictada por el pH del medio, la presencia de metales pesados y otros factores (Wanner, 1996a). *Escherichia coli*, así como otras bacterias, es capaz de utilizar tres clases de compuestos como fuentes primarias de fósforo: **i)** fosfatos inorgánicos, los que existen en 3 formas: ortofosfato (Pi), pirofosfato (PPi) y polifosfatos (poliP), **ii)** organofosfatos, caracterizados por la presencia de un enlace éster del tipo C-O-P y **iii)** fosfonatos (Pn), que son compuestos que presentan un enlace C-P (Kononova y Nesmeyanova, 2002).

1.2.1. Transporte del fosfato.

En *E. coli*, cuando existe un exceso extracelular de fósforo, ya sea como Pi o como compuestos fosforilados, éstos ingresan al periplasma a través de porinas generales de membrana externa, tales como OmpC y OmpF. Los compuestos fosforilados generan Pi mediante su hidrólisis mediada por fosfatasas tales como la fosfatasa alcalina (PhoA) y el fosfato total del periplasma ingresa al citoplasma a través del sistema de transporte de fosfato inorgánico Pit (phosphate inorganic transporter), que se encuentra en la membrana citoplasmática. El sistema Pit consta de 2 proteínas, codificadas por los genes *pitA* y *pitB*, cuya expresión es constitutiva. Su mecanismo de transporte es

dependiente de la fuerza protón motriz y la presencia de cationes bivalentes es esencial para su actividad. Pit transporta, en simporte con un protón, complejos de metal-fosfato (MeHPO_4), los que son neutros y solubles a pH 7. Pit tiene alta velocidad y baja afinidad, con una K_m aparente de $38.2 \mu\text{M}$ para el fosfato, que ha sido medida en células completas y una velocidad máxima de 55 nmoles de Pi ingresado por minuto por miligramo de proteína (van Veen, 1997).

1.2.2. El regulón Pho.

Frente a la carencia de fósforo los microorganismos poseen sistemas genéticos cuyos productos les permiten captar trazas de Pi desde el medio. En *E. coli* y otras bacterias existe un sistema conocido como el regulón Pho, que es un conjunto de genes que aumenta coordinadamente su expresión más de cien veces frente a la carencia de fosfato (concentración menor de $4 \mu\text{M}$ de Pi para *E. coli*), mientras que su expresión se reprime cuando hay un exceso de este compuesto (Wanner, 1996a).

En *E. coli* se han descrito 38 genes que conforman el regulón Pho. Estos se encuentran organizados en ocho unidades transcripcionales, dentro de las cuales se destacan el gen *phoE*, el cual codifica para una porina de membrana externa (PhoE), que permite el ingreso de compuestos fosforilados al periplasma; el gen *phoA*, que codifica para una fosfatasa alcalina (PhoA) no específica que se ubica en el periplasma, el operón *pstSCAB-phoU*, que codifica para el sistema de transporte específico para fosfato Pst (phosphate specific transport) (Makino y col., 1988; van Veen, 1997) (Fig. 1) mas una proteína auxiliar, llamada PhoU, y el operón formado por *phoB/phoR*, que

codifica para el sistema de dos componentes donde PhoR es el sensor y PhoB el regulador de la respuesta (Wanner y Chang, 1987). Además existen dos operones *phn*, relacionados con el metabolismo de los fosfonatos (Wanner, 1994), el operón *ugp*, relacionado con el metabolismo de los gliceroles fosfato (Schweizer y Boos, 1985), además de una unidad transcripcional que codifica para una proteína que une ATP (Wanner, 1996a).

Los genes del regulón Pho se caracterizan por la presencia en su región promotora de un elemento de control llamado caja *pbo*, la cual corresponde a una secuencia consenso de 18 nucleótidos (5'- **CTGTCATA(A/T)A(T/A)CTGTCA(C/T)**-3'), ubicada aproximadamente diez nucleótidos río arriba de cada posible región -10 de los distintos promotores de estos operones. La caja *pbo* es el sitio de unión del activador transcripcional PhoB en su estado fosforilado. Algunos genes del regulón Pho de *E. coli* poseen mas de una caja Pho en su región promotora, existiendo dos para el gen *pboB* y tres para el gen *pstS* (Kimura y col., 1989; Wanner, 1996a). La activación del regulón Pho se induce por la carencia de fosfato. Se postula que el sistema Pst, en conjunto con la proteína PhoU regularía la actividad de fosforilación de la proteína PhoR, que es el sensor. PhoR en su estado fosforilado dimeriza y adquiere la actividad PhoB quinasa, que fosforila a la proteína PhoB, que en esta condición, activa la transcripción de los genes del regulón Pho (Fig 1).

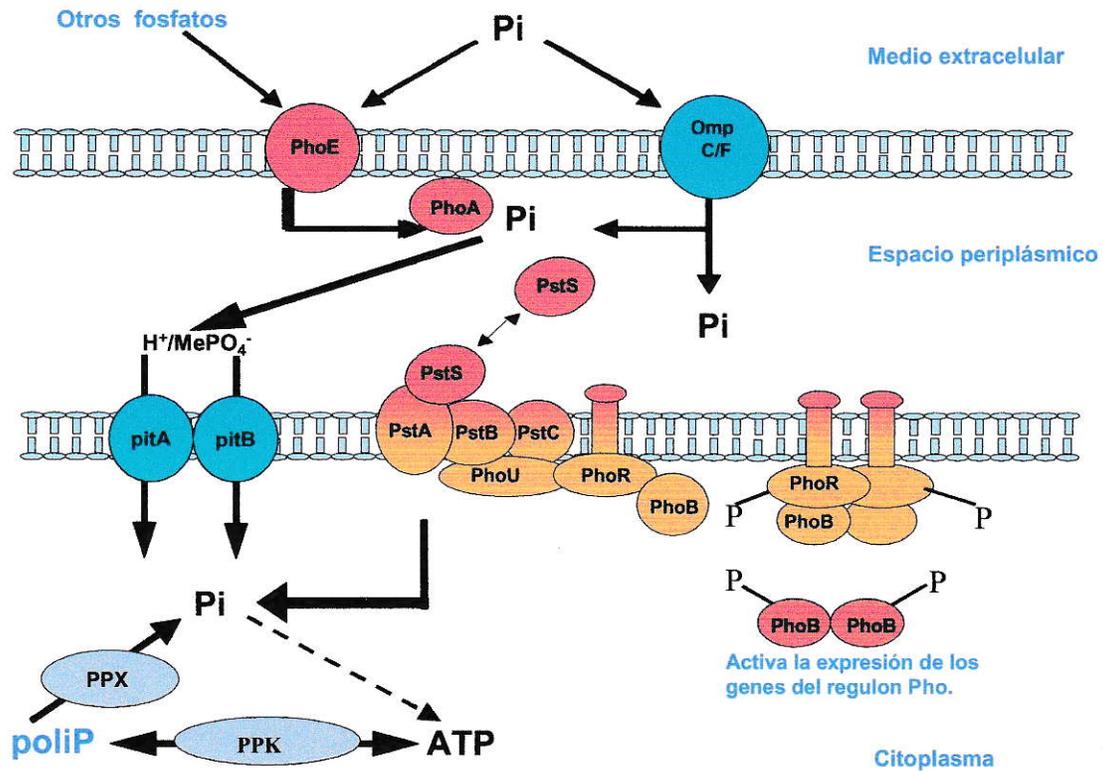


Figura 1. Esquema de las vías de entrada del fosfato en *E. coli*. Para captar fosfato del medio esta bacteria utiliza la porina de membrana externa PhoE (específica para aniones) y las porinas generales OmpC y OmpF. En el periplasma, la fosfatasa alcalina (PhoA) degrada compuestos fosforilados captados del medio y genera Pi. El Pi se une a PstS, que lo conduce al sistema de transporte Pst, ubicado en la membrana citoplasmática y formado por las proteínas PstA, PstB y PstC, más una proteína auxiliar llamada PhoU, que es un regulador negativo cuya función aun no está completamente establecida. El sistema Pst transfiere la señal al sensor PhoR. Este se autofosforila y transfiere su grupo fosfato al regulador transcripcional PhoB, el cual se activa e induce la expresión del conjunto de genes del regulón Pho. Se muestra el sistema Pit, que corresponde a un sistema de transporte de fosfato de expresión constitutiva.

En presencia de un exceso de fosfato, PhoR facilita la desfosforilación de PhoB fosforilado y se detiene la transcripción de estos genes (Wanner, 1996a).

La porina de membrana externa, codificada por el gen *phoE*, es importante en la difusión de los aniones a través de la membrana externa. Estos aniones incluyen Pi, organofosfatos, poliP, ácidos teicoicos, ácidos nucleicos y otros. Muchos de los compuestos organofosforilados no pueden atravesar la membrana citoplasmática, por lo que son hidrolizados en el periplasma por fosfatasas, dentro de las cuales se encuentra una fosfatasa alcalina no específica codificada por el gen *phoA*. En condiciones de carencia de fosfato, el Pi presente en el periplasma es incorporado al citoplasma principalmente por el sistema Pst (van Veen, 1997), el cual presenta una alta afinidad por fosfato una y baja velocidad de incorporación de este anión, con una Km de 0.4 μ M y una velocidad máxima de 15.9 nmoles de Pi por minuto por miligramo de proteína. Este sistema pertenece a la superfamilia de los transportadores ABC y consta de las proteínas PstA y PstC que son integrales de membrana y forman parte del canal. PstB es la ATPasa (a veces también llamada permeasa) y PstS (también llamada PhoS) es la proteína periplásmica de unión a Pi (Fig. 1). En *E. coli*, los genes de este sistema se encuentran formando parte de un operón junto con el gen *phoU*, que codifica para una proteína auxiliar (Wanner, 1996b). La expresión basal de este operón es necesaria para la regulación del regulón Pho. La proteína PstS se ha cristalizado y su estructura ha sido resuelta a 1.7 Å mediante difracción de rayos X. Se ha mostrado que la unión del

Pi está totalmente determinada por enlaces de hidrógeno con ocho aminoácidos presentes en su sitio de unión (Luecke y Quioco, 1990).

Existen dos tipos de controles del regulón Pho que no dependen de la concentración de fosfato. Estos están dados por: **1)** la quinasa sensora CreC, (anteriormente llamada PhoM), que puede fosforilar a PhoB (Makino y col., 1984) y **2)** el metabolito acetyl fosfato, que por una vía no conocida, también puede activar a PhoB (McCleary, 1996).

1.2.3. Metabolismo de los fosfonatos.

Como se mencionó anteriormente, los fosfonatos son compuestos que se caracterizan por tener un enlace C-P el cual es muy resistente a la hidrólisis enzimática, la descomposición térmica y otras degradaciones bioquímicas (Ternan y col., 1998).

La existencia de organofosfonatos se descubrió en los años 40 con la síntesis del ácido aminoetilfosfónico. Posteriormente, se sintetizó una serie de alquilfosfonatos y alquilfosfonatos amino sustituidos. A fines de los años cincuenta se aisló el primer organofosfonato de origen biológico, el 2-aminoetilfosfonato (2-AEP), obtenido a partir de un hidrolizado de un extracto de éter/etanol de protozoos del rumen. Luego, se demostró que este compuesto se encuentra ampliamente distribuido en organismos inferiores, donde existe como un fosfolípido, con el 2-AEP presente en lugar de su análogo 2-etanolamina fosfato. Además del 2-AEP, existen muchos otros fosfonatos de ocurrencia natural tales como los antibióticos fosfomicina (ácido 1,2-cis-epoxipropilfosfónico) aislado de cultivos de *Streptomyces fradiae* que inhibe la biosíntesis

de ácido UDP-N-acetilmurámico, esencial para la formación del peptidoglicano, el bialafos (L-alanil-L-alanil fosfinotricina), que inhibe a la enzima la glutamina sintetasa y el alafosfalin (ácido L-alanil-L-1-aminoetilfosfónico), que también inhibe la síntesis del peptidoglicano (Ternan y col., 1998).

Existen también fosfonatos de origen sintético, cuyo desarrollo se ha llevado a cabo durante los últimos 60 años. Principalmente se utilizan como herbicidas y aditivos de detergentes. A nivel comercial, el más importante es el herbicida glifosato (N-fosfonometil-glicina), que bloquea la vía del ácido shikímico para la biosíntesis de aminoácidos aromáticos en las plantas. Se han desarrollado plantas transgénicas resistentes a glifosato, las que junto con este último son comercializadas por la empresa Monsanto. La creciente abundancia de fosfonatos en el medio ambiente se ha convertido en un problema de contaminación debido al carácter tóxico de muchos de ellos y a la naturaleza inerte del enlace C-P.

En ambientes naturales, la capacidad de degradar fosfonatos es propia solamente de microorganismos, principalmente de las bacterias Gram-negativas, algunas bacterias Gram-positivas, así como también algunas levaduras y hongos (Kononova y Nesmeyanova, 2002). La amplia distribución de los fosfonatos en la naturaleza los convierte en valiosas fuentes de fósforo para sostener el crecimiento bacteriano y en algunos ambientes oligotróficos con bajos niveles de otros fosfatos los fosfonatos proveen una fracción significativa del fósforo necesario para el crecimiento celular. Por lo tanto los microorganismos que tengan capacidades degradativas de fosfonatos tienen

una importante ventaja adaptativa frente a otros que no la poseen, como se ha reportado para el caso de los diazotrofos marinos del género *Trichodesmium* (Dyhrman y col., 2006).

La ruptura del enlace C-P es realizada por varias enzimas presentes en distintos tipos de microorganismos, tales como el complejo de la C-P liasa, la fosfonatasa, fosfonoacetato hidrolasa y la fosfonopiruvato hidrolasa (Kononova y Nesmeyanova, 2002). Las últimas tres enzimas anteriormente mencionadas sólo funcionan con ciertos fosfonatos, mientras que la C-P liasa es la más importante en la degradación debido a que es capaz de romper una amplia gama de fosfonatos estructuralmente diferentes. La actividad C-P liasa en *E. coli* y varias otras bacterias sólo se ha observado en células permeabilizadas y no se ha logrado medir nunca en extractos libres de ellas (Wackett y col., 1987a; Yakovleva y col., 1998; Ternan y Quinn, 1998). La degradación de alquilfosfonatos mediante la C-P liasa genera Pi más el correspondiente hidrocarburo. Cuando *E. coli* degrada metilfosfonato se forma metano en proporción 1:1 con el fósforo intracelular formado del alquilfosfonato y dependiendo de la naturaleza de este último pueden liberarse etano, propano, butano, pentano y hexano (Ternan y col., 1998).

En *E. coli*, se han identificado los genes responsables de la degradación de los fosfonatos gracias a estudios de mutación, mapeo y clonamiento. Se les ha llamado genes *phn* (Metcalf y col., 1990; Wanner, 1992) y se ha demostrado que la base genética para la utilización de los fosfonatos está codificada en un operón de catorce genes,

denominados *phnCDEFGHIJKLMNOP* cuya expresión es controlada por un solo promotor encontrado río arriba del gen *phnC*. Estos genes conforman una de las unidades transcripcionales más largas de *E. coli*, y se ha descrito que su patrón de expresión forma parte del regulón Pho (Wackett y col., 1987b). El análisis genético posterior ha establecido que *phnC*, *phnD* y *phnE* son los constituyentes de un transportador de alquilfosfonatos en el cual *phnD* sería una proteína periplásmica, mientras que *phnC* y *phnE* serían proteínas de membrana. Los siete productos génicos codificados por los genes *phnGHIJLLM* forman parte del complejo de la C-P liasa, cuya ubicación subcelular es de membrana, mientras que los productos de *phnN* y *phnP* no son requeridos para la catálisis y podrían ser proteínas accesorias a este complejo. La proteína PhnN podría tener actividad ATPasa, mientras que las proteínas codificadas por los genes *phnF* y *phnO* no son necesarias para la catálisis y podrían tener una función regulatoria (Kononova y Nesmeyanova, 2002).

La amplia capacidad de degradación de fosfonatos mediante la C-P liasa ha llevado las investigaciones sobre la degradación de fosfonatos a **i)** la búsqueda de otros microorganismos que posean estos genes, **ii)** la descripción de las capacidades degradativas de estos últimos y **iii)** la realización de estudios acerca de la evolución de estas vías degradativas en los genomas microbianos (Huang y col., 2005).

Muchas de las bacterias en las que se han establecido capacidades para degradar fosfonatos mediante la C-P liasa son Gram-negativas, conociéndose a la fecha sólo tres representantes de bacterias Gram-positivas. Estudios recientes sugieren que esta

capacidad degradativa existe en un amplio espectro de bacterias cuyos genomas no han sido secuenciados a la fecha. En los genomas bacterianos secuenciados al año 2005 se ha mostrado que existen genes homólogos al cluster *phn* sólo en tres genomas de bacterias Gram-positivas. También existen homólogos en cuatro de los catorce genomas completos de α -proteobacteria y en once de los cuarenta y tres genomas de γ -proteobacteria. No se identificaron genes homólogos dentro de las ϵ -proteobacterias. Por otro lado los géneros *Nostoc*, *Trichodesmium*, *Chloroflexus* y *Oceanobacillus* son las únicas taxa fuera de las proteobacterias en las cuales se ha encontrado un cluster de genes *phn* (Huang y col., 2005).

1.2.4. Metabolismo de los poliP.

Los poliP inorgánicos son polímeros lineales de residuos de ortofosfato unidos por enlaces fosfoanhídrido cuya hidrólisis libera alta energía (Fig. 2). Pueden ser obtenidos *in vitro* a altas temperaturas a partir de Pi. Se encuentran en todos los seres vivos y se ha postulado que son una de las macromoléculas más antiguas e importantes en la evolución prebiótica (Kornberg y col., 1999). En algunos microorganismos, cuando se acumulan en exceso, son capaces de formar gránulos densos al paso de los electrones (Kulaev y Kulakovskaya, 2000).

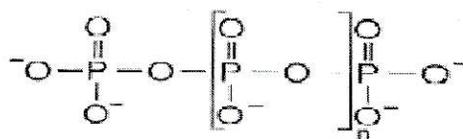


Figura 2. Polifosfato inorgánico. El valor de *n* en las cadenas más largas es de varios cientos en las bacterias.

En *E. coli* la polifosfato quinasa o polifosfato ADP fosfotransferasa (PPK) es la principal enzima responsable de la síntesis de poliP a partir de ATP. Cataliza la transferencia reversible del grupo fosforilo y del ATP al poliP (Ahn y Kornberg, 1990). La PPK es un homo tetrámero de subunidades de 80 kDa codificadas por el gen *ppk* (Akiyama y col., 1992).

No obstante, la presencia de poliP de cadena corta en un mutante *ppk* de *E. coli* sugiere que en este microorganismo existirían otras enzimas involucradas en la síntesis del poliP (Kornberg y col., 1999). La PPK de *E. coli* presenta otras actividades enzimáticas, tales como nucleósido difosfato quinasa, la cual cataliza la reacción de fosforilación de GDP y otros nucleósidos difosfato para formar nucleósidos trifosfato (Kuroda y Kornberg, 1997). También, genera guanosinas tetrafosfato, a partir de pirofosfato y GDP (Kornberg y col., 1999).

La principal enzima responsable de la degradación del poliP en *E. coli* es la exopolifosfatasa (PPX). Es un homodímero de subunidades de 58 kDa, codificado por el gen *ppx* (Akiyama y col., 1993). En *E. coli* y *Vibrio cholerae* se ha observado que los genes *ppk* y *ppx* se encuentran formando parte de un operón (Ogawa y col., 2000), mientras que en *Pseudomonas aeruginosa* se encuentran juntos pero organizados en forma convergente (Zago y col., 1999).

Se ha postulado que el poliP actúa como sustituyente del ATP en reacciones de proteínas quinasas (Kornberg y col., 1999; Kulaev y Kulakovskaya, 2000). También es una reserva de Pi, debido a que el poliP puede ser convertido a Pi por la acción de

polifosfatasas como la PPX, lo que asegura una mantención de niveles estables de este ión (Kornberg y col., 1999); su alta densidad de cargas negativas y la flexibilidad de su enlace lo convierte en un buen agente quelante de iones metálicos bivalentes tales como Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Al^{3+} , lo que se traduce en su participación en mecanismos celulares de desintoxicación (Keasling, 1997). También colabora en la mantención del pH intracelular al presentar acción tampón contra el álcali (Kornberg y col., 1999). Existen otras funciones del poliP como por ejemplo participar en la regulación de la expresión de ciertos genes tales como *rpoS*, factor sigma de fase estacionaria (Shiba y col., 1997) y de los genes SOS, sistema global de respuesta ante distintos tipos de estrés (Tsutsumi y col., 2000). Se ha observado una asociación funcional de la RNA polimerasa de *E. coli* con poliP (Kusano y Ishihama, 1997). Otra función consiste en la formación de complejos junto con el polihidroxibutirato y Ca^{2+} . Se ha demostrado *in vitro* que estos complejos forman canales de calcio no proteicos que son activados por el voltaje (Das y col., 1997). Se piensa que *in vivo* estos canales controlarían la entrada de calcio para mantener la homeostasis y evitar posibles respuestas fisiológicas derivadas del aumento de la concentración citoplasmática de este ión. Se ha propuesto que estos complejos estarían involucrados en el transporte de ADN a la célula (Reusch, 2000).

Se ha demostrado que la mutación del gen *ppk* de microorganismos patógenos tales como *P. aeruginosa* afecta su motilidad flagelar, la que es dependiente de la expresión de *rpoS* (Rashid y Kornberg, 2000; Rashid y col., 2000). Los mutantes *ppk* de *Neisseria gonorrhoeae* y *N. meningitidis* crecen menos vigorosamente que las células normales y

muestran una mayor sensibilidad al suero humano (Tinsley y Gotschlich, 1995). Uno de los mecanismos propuestos para explicar lo anterior consiste en que la PPK puede estar involucrada en la regulación del nivel de nucleósidos trifosfato y deoxinucleósidos trifosfato debido a su capacidad de regenerar nucleótidos trifosfato (Kuroda y Kornberg, 1997). Otras evidencias apuntan a que la PPK puede influenciar la estabilidad de los mRNA debido a que forma parte del degradosoma de *E. coli*, complejo de varias proteínas que está relacionado con la degradación de ARNm, en el cual su función consistiría en mantener un microambiente apropiado removiendo el poliP inhibitorio además de los nucleósidos difosfato, debido a que mediante su actividad reversa permite la regeneración de ATP (Blum y col., 1997).

En bacterias patógenas, la PPK es altamente conservada, observándose en un alineamiento de secuencias aminoacídicas la presencia de 2 regiones de alta identidad, llamadas A y B. Se ha postulado que estas podrían ser un posible blanco para antibióticos de amplio espectro (Tzeng y Kornberg, 1998).

El poliP se ha encontrado en un amplio rango de organismos pertenecientes a los 3 dominios de los seres vivos, lo que ha permitido sugerir un importante papel evolutivo. El estudio de las reacciones bioquímicas “fósiles” ha mostrado que las glucoquinasas de ciertas bacterias tienen mayor actividad al utilizar poliP como sustrato en vez de ATP. En otros procariontes filogenéticamente más “jóvenes”, la actividad de estas enzimas es más alta con ATP, mientras que las de eucariontes inferiores utilizan solamente ATP (Kulaev y Kulakovskaya, 2000). Se ha postulado que el rol energético de los poliP ha

ido decreciendo a lo largo de la evolución y las funciones regulatorias aparecerían como predominantes en los eucariontes (Kulaev y Kulakovskaya, 2000).

Un proceso de gran importancia ecológica consiste en la remoción de los iones metálicos. Algunas bacterias utilizan la hidrólisis del poliP para desintoxicarse de metales pesados que han entrado a la célula. Se ha sugerido que el poliP presente en la superficie celular sería importante en la quelación de cationes en la superficie de las células (Keasling y col., 2000). La relación existente entre el poliP y la resistencia a metales permite plantear la idea de utilizar microorganismos con el metabolismo de poliP genéticamente mejorado para biorremediar aguas contaminadas con metales pesados. Se ha encontrado que una cepa de *Pseudomonas* que contiene un plasmidio que expresa la PPK acumula grandes cantidades de poliP. Cuando este microorganismo, con poliP, fue expuesto a uranilo en un medio con carencia de fosfato hubo una remoción de este ión del medio, al parecer, formando precipitados con fosfato fuera de las células (Keasling y col., 2000).

1.3. Metabolismo del fosfato en *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

En nuestro laboratorio se ha estudiado la respuesta de *A. ferrooxidans* a la carencia de fosfato. Se ha demostrado que al cultivar *A. ferrooxidans* en un medio sin fosfato por 2 traspasos, por un lado, se reduce el crecimiento celular y el metabolismo endógeno, mientras que, por otro lado, aumentan los niveles de expresión de 25 proteínas, que podrían formar parte de un sistema de captación de fosfato similar al de bacterias heterotróficas (Seeger y Jerez, 1993). La secuencia N-terminal de una de ellas presentó

similitud con la secuencia N-terminal de la proteína PstS de *E. coli*. Al buscar en la secuencia del genoma de *A. ferrooxidans* encontramos dos genes *pstS*, los cuales denominamos *pstS1* y *pstS2* de acuerdo a su nivel de identidad con la PstS de *E. coli*. También encontramos genes homólogos a *phoB phoR, pstS, pstA, pstB, pstC, phoU*, (componentes del regulon Pho) y los genes *ppk* y *ppx*, posibles responsables del metabolismo del poliP en esta bacteria (Vera y col., 2003) (Tabla 1).

La menor disminución del crecimiento en el primer traspaso desde un medio con fosfato hacia otro sin fosfato podría ocurrir porque *A. ferrooxidans* estaría aprovechando reservas de fosfato (Seeger y Jerez, 1993). Estudios de microscopía electrónica de transmisión han mostrado que *A. ferrooxidans* acumula gránulos densos al haz de electrones al ser crecido en un medio con fosfato. Estos desaparecen en los siguientes trasposos a medios sin fosfato. Estudios de análisis de dispersión de la fluorescencia de rayos X (EDAX, “Energy Dispersive Analysis of X-ray fluorescence”), han mostrado que estos gránulos electrodensos están constituidos por fósforo y oxígeno, lo que sugiere que se trata de poliP (Alvarez y col., 2001).

La organización genética del operón donde se encuentra el gen *pstS1* de *A. ferrooxidans* es muy similar a la de *E. coli* (*pstSCAB-phoU*), salvo por la presencia del gen *ppx*, el cual se encuentra ubicado río abajo de *phoU*. En *E. coli*, los genes *ppk* y *ppx* se encuentran formando un operón, mientras que en *A. ferrooxidans* no se encuentran juntos (Fig. 3). Esto nos sugiere que la síntesis y la degradación de poliP mediante la PPX podrían ser dos procesos desacoplados y regulados de una manera diferente en

A. ferrooxidans. En esta bacteria, la síntesis podría ocurrir en condiciones de presencia de Pi (debido a que hemos observado presencia de gránulos de poliP en estas condiciones), mientras que la degradación mediada por la exopolifosfatasa ocurriría en carencia de Pi, donde se estaría expresando el gen *ppx* como parte de un posible regulón Pho, (Vera y col., 2003).

Tabla 1. Comparación entre algunas de las proteínas del regulón Pho de *E. coli* con las de *A. ferrooxidans*.

Proteína	Peso Molecular Teórico (KDa)		Punto Isoeléctrico Teórico		Identidad (%)
	<i>A. ferrooxidans</i>	<i>E. coli</i> *	<i>A. ferrooxidans</i>	<i>E. coli</i> *	
PhoB	27,8	26,4	6,6	5,4	49
PhoR	49,7	49,6	5,4	9,6	37
PstS1	36,2	37	9,4	8,3	50
PstS2	38,4		9,3		35
PstC	36,6	34,1	7	5,9	55
PstC2	34,4		8,8		36
PstA	30,5	32,3	10,4	9,9	55
PstA2	32,3		9,4		35
PstB	32,2	29	5,8	6,1	69
PhoU	26,4	27,4	5	5,1	44
PPX	53,4	58,1	7	6,7	34

* *E. coli* posee solo un gen *pstS*, *pstC* y *pstA*.

Un análisis bioinformático de las proteínas PstS1 y PstS2 de *A. ferrooxidans* muestra que la PstS1 tiene conservados siete de los ocho aminoácidos necesarios para formar puentes de hidrógeno con el fosfato, mientras que la proteína PstS2 tiene conservados seis de los residuos y sustituidos la fenilalanina 11 por leucina y la treonina 141 por ácido aspártico (Vera y col., 2003). Este cambio puede afectar alguna de las propiedades de transporte del fosfato, que se encuentra completamente determinado por enlaces de hidrógeno (Luecke y Quioco, 1990).

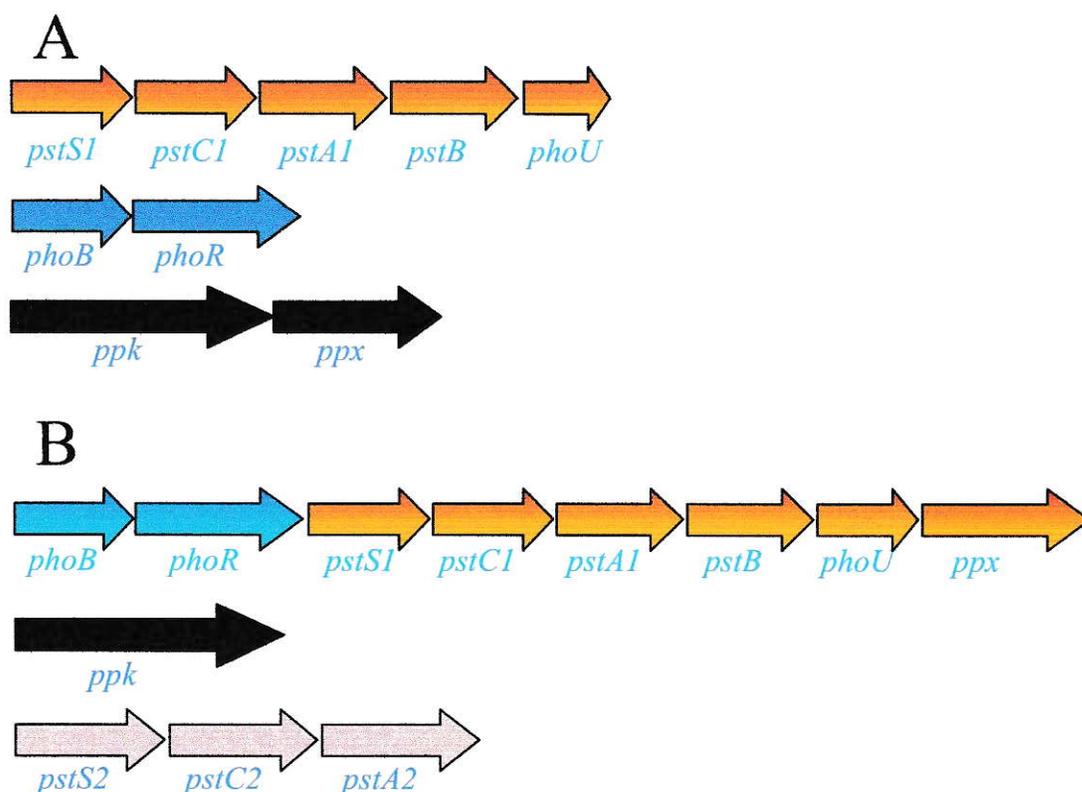


Figura 3. Organización genética de los marcos de lectura abiertos de *A. ferrooxidans* que corresponden a los genes ortólogos a los del regulón Pho de *E. coli*. **(A)** Organización de los genes del regulón Pho de *E. coli*. **(B)** Organización existente en *A. ferrooxidans*. Los marcos de lectura con un mismo color representan la posible organización en operones en ambas bacterias.

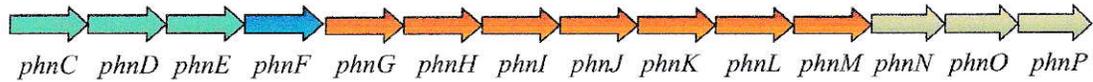
Para algunas bacterias es de vital importancia poseer capacidades alternativas de obtención de Pi. Debido a que la expresión de la C-P liasa forma parte del regulón Pho en *E. coli* iniciamos la búsqueda de los genes *phn* en el genoma de *A. ferrooxidans*. Se encontró un posible operón de genes cuyos marcos de lectura, al ser analizados mediante el programa BLASTp, mostraron ser homólogos a los genes *phn* descritos en

algunas proteobacterias (Tabla 2). Los genes se encuentran físicamente juntos en el genoma, formando un posible operón de 9,1 Kb. Se analizó la posible estructura de este operón y se comparó con el operón *phn* *E. coli* (Fig. 4).

Tabla 2. Genes *phn* en el genoma de *A. ferrooxidans*.

Gen	Mejor hit de Blast	Identidad (%)	Similitud (%)
<i>pho84L</i>	Transportador general de sustratos <i>Methanospirillum hungatei</i> JF-1	36	57
<i>phnF</i>	PhnF <i>Burkholderia pseudomallei</i> 1710b	33	52
<i>phnG</i>	PhnG <i>Rhodospirillum rubrum</i> T118	38	58
<i>phnH</i>	PhnH <i>Rhizobium etli</i> CFN 42	41	54
<i>phnI</i>	PhnI <i>Acidiphilium cryptum</i> JF-5	59	70
<i>phnJ</i>	PhnJ <i>Acidiphilium cryptum</i> JF-5	68	84
<i>phnK</i>	PhnK <i>Pseudomonas stutzeri</i>	61	73
<i>phnL</i>	PhnL <i>Sinorhizobium meliloti</i> 1021	55	72
<i>phnM</i>	PhnM <i>Pseudomonas stutzeri</i>	44	62
<i>phnN</i>	PhnN <i>Rhodobacteriales bacterium</i> HTCC2654	38	54

E. coli



A. ferrooxidans

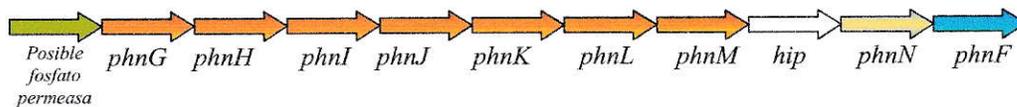


Figura 4. Comparación de la estructura genética del los operones *phn* de *E. coli* y el posible operón de *A. ferrooxidans*. Se destaca en rojo la conservación de los siete genes que formarían el complejo de la C-P liasa.

1.4. Hipótesis de trabajo.

A. ferrooxidans posee un regulón Pho, cuyos genes se inducirían en condiciones de carencia de fosfato. El metabolismo de poliP se relaciona con la expresión de este sistema debido a la ubicación del gen *ppx* río abajo del sistema *pst*. *A. ferrooxidans* posee genes *phn* que le conferirían la capacidad de degradar fosfonatos y utilizarlos como fuentes únicas de fosfato para el crecimiento.

1.5. Objetivo general.

Caracterizar el regulón Pho de *A. ferrooxidans* a nivel genético y funcional.

1.5.1. Objetivos específicos.

- Determinar si los genes del regulón Pho se expresan y si su expresión se encuentra regulada por la cantidad de Pi presente en el medio de cultivo.
- Cuantificar los niveles de expresión de los genes *pstS1* y *pstS2*, responsables de la unión de Pi en el periplasma.
- Determinar si *A. ferrooxidans* es capaz de crecer en fosfonatos como fuentes únicas de Pi y establecer si existe un aumento de el nivel de expresión de los genes *phn* en estas condiciones.
- Estudiar la relación entre el metabolismo de poliP y la expresión de los genes del regulón Pho en *A. ferrooxidans*.

2. Materiales y Métodos.

2.1. Cepas y condiciones de cultivo.

Se utilizó la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans*, la cual se creció en sendos medios con ión ferroso o tiosulfato como fuente de energía y Pi, metil fosfonato (M-Pn), etilfosfonato (E-Pn) como fuentes de fosfato.

Para el crecimiento en ión ferroso las células se cultivaron a 30°C, con agitación rotatoria (150 rpm) en un medio a pH 1,5 que contenía (g/L): FeSO₄ x 7 H₂O, 33,3; MgSO₄ x 7 H₂O, 0,4; (NH₄)₂SO₄, 0,1; y KH₂PO₄ x 3 H₂O, 0,04, lo que genera una concentración de Pi de 0,17 mM en el cultivo. Cuando se hicieron experimentos con medio de carencia de Pi, se preparó el medio anteriormente descrito sin agregar la sal de fosfato. Los cultivos en tiosulfato se realizaron en el medio DSMZ 71 con los siguientes componentes (g/L): KH₂PO₄, 3; MgSO₄ x 7 H₂O, 0,5; (NH₄)₂SO₄, 3 y CaCl₂ x 2H₂O, 0,25. La concentración de fosfato de este medio de cultivo es 22 mM y el pH final es de 4,6. El medio limitado de Pi se preparo con la misma sal de fosfato a una concentración final de 0,22 mM. El medio sin Pi se preparo con los mismos componentes descritos anteriormente y omitiendo la sal de fosfato.

El crecimiento en fosfonatos se llevó a cabo en los medios con ión ferroso o tiosulfato anteriormente descritos como fuentes de energía. En ambos casos, la sal de fosfato se reemplazó por M-Pn o E-Pn a una concentración final de 1 mM. Las curvas

de crecimiento se construyeron por conteo del número de células en una cámara Petroff-Hausser.

2.2. Técnicas de biología molecular.

2.2.1. Extracción del DNA

Para la extracción del DNA de *A. ferrooxidans* se utilizó el protocolo para bacterias Gram-negativas del kit Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega). Este mismo se basa en un paso de lisis celular seguido de una digestión enzimática del RNA, con posterior precipitación del DNA genómico con isopropanol y solubilización en agua. Para la extracción, las células provenientes de 100 mL de cultivo crecido en ión ferroso o tiosulfato se colectaron por centrifugación (7500 x g durante 10 min). Cuando los cultivos se crecieron en ión ferroso, el pellet se lavó una vez con 1 mL de solución de H₂SO₄, pH 1,75 y dos veces con 1 mL de una solución de citrato de sodio 10 mM. Este paso tiene por objetivo limpiar las células y eliminar el exceso de Fe³⁺ que presenta el cultivo. Posteriormente, el protocolo se utilizó sin modificaciones.

2.2.2. Purificación de amplificadores de PCR y otros fragmentos de DNA desde geles de agarosa.

Para la extracción de las bandas de DNA desde los geles de agarosa se utilizaron los kits Ultra free-DA® (Millipore), Wizard® PCR Preps DNA Purification System (Promega), y E.Z.N.A® gel extraction kit, (Omega BioTek). El primero consiste en una columna a la cual se le adosa un nebulizador que utiliza la ruptura del gel para extraer el

DNA desde la agarosa. Al centrifugar la columna, la fuerza centrífuga rompe la estructura del gel y conduce la agarosa a través de un orificio pequeño en el nebulizador, que rocía lo resultante del gel en el filtro, donde se retiene la muestra de DNA, la cual se recupera al eluir con agua luego de un par de lavados con isopropanol al 80 %. Los dos últimos métodos se basan en la escisión de la banda desde el gel de agarosa con bisturí y fundido de la agarosa a 65°C en presencia de una resina que une el DNA. La resina se aplica a una mini columna de silicato que retiene los ácidos nucleicos y luego de dos lavados con isopropanol, el DNA se eluye con agua mediante centrifugación.

2.2.3. Cuantificación del DNA.

La cuantificación del DNA genómico se realizó midiendo la absorbancia a 260 nm (A_{260}) de una dilución 1:50 de la solución de DNA obtenida. Una unidad de A_{260} corresponde a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de DNA en la solución. La pureza se comprobó mediante la relación A_{260}/A_{280} (Sambrook y Russell, 2001). Los productos de PCR purificados se cuantificaron estimativamente por comparación visual con estándares de concentración conocida en geles de agarosa.

2.2.4. Electroforesis del DNA en geles de agarosa.

Para visualizar la calidad y el tamaño del DNA cromosomal o de los fragmentos de PCR se utilizaron geles de agarosa al 1% en amortiguador TAE 0,5X (20 mM Tris-acetato pH 8,0; 0,5 mM EDTA). Las muestras se mezclaron con amortiguador de carga 6X (0,25 % azul de bromofenol, 40 % 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.

2.2.5. Partidores y reacciones de PCR.

Todos los partidores se diseñaron a partir de la secuencia disponible del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y se compraron a la empresa SIGMA-PROLIGO (www.proligo.com). En el anexo 1 se detallan todos los oligonucleótidos utilizados en esta tesis. Se utilizó la enzima *Taq* DNA polimerasa (Promega) y se siguieron las especificaciones del fabricante. Cada reacción de PCR se realizó en un volumen final de reacción de 50 µL y se utilizaron 40 ng de DNA genómico, 30 pmoles de cada partidor, 0,1 mM dNTPs, 5 % DMSO, y 1U de *Taq* DNA polimerasa. Para la amplificación se utilizó el siguiente programa: 3 min a 95°C, seguido de 25 a 35 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 55-62°C (de acuerdo a las parejas de partidores utilizados), 0,5- 1,5 min a 72°C (de acuerdo al tamaño esperado de los fragmentos a amplificar), para finalizar con un paso de 3 min a 72°C.

2.2.6. PCR en tiempo real.

Para las reacciones de PCR en tiempo real se utilizó el sistema Light Cycler (Roche). Todos los partidores que se utilizaron en las reacciones de PCR en tiempo real se diseñaron con el programa Light Cycler Probe Design 1.0 (Roche). Las reacciones de PCR se hicieron en capilares de vidrio con un volumen final de 20 µL. Se utilizó 1 µL de una dilución 1/20 del cDNA correspondiente, 0,5 µM final de cada partidor y 1 µL

de “master mix” de acuerdo a las instrucciones del proveedor del kit DNA Fast Start DNA SYBR Green I (Roche). El partidador reverso utilizado en las amplificaciones por PCR en tiempo real fue el mismo que se utilizó para sintetizar el cDNA. Para cada pareja de partidores se optimizó la temperatura de amplificación y se obtuvo un producto amplificado único, el cual se distinguió mediante su T_m y se verificó su tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa.

Luego de la optimización de las condiciones de amplificación se construyeron las curvas de calibración a partir de diluciones seriadas de DNA genómico de *A. ferrooxidans* cuyo rango fue desde 10 ng a 1 pg. Al graficar el valor de Ct, ciclo en el cual la amplificación comienza a ser exponencial, versus el logaritmo de la concentración de DNA obtenemos una recta con pendiente negativa, mediante la cual podemos calcular el número de copias en relación con un cDNA amplificado bajo estas mismas condiciones.

2.2.7. Secuenciación del DNA.

La secuenciación de los fragmentos de DNA se realizó utilizando el kit fmol® DNA cycle sequencing (Promega), que está basado en el método de terminación con didesoxinucleótidos. Para la reacción de marcación del partidador se siguió el protocolo descrito por el proveedor y se utilizó ATP $\gamma^{33}P$ (NEN). La mezcla se incubó por 15 min a 37°C, y por 5 min a 65°C. Para la reacción de secuenciación se utilizó una variación del protocolo indicado por el proveedor. Se secuenció un fragmento de PCR previamente purificado en gel de agarosa como templado. Se utilizaron

aproximadamente 50 ng de DNA templado en cada reacción. La mezcla de reacción se armó en un volumen final de 17 μL con 2,5 μL de partidador marcado, 6,5 μL de DNA templado 1,5 μL de DMSO al 100%, 5 μL de amortiguador 5X de secuenciación y 1,5 μL de *Taq* DNA polimerasa (15 U). Se despacharon 4,2 μL a cada tubo que ya contenía 2 μL de la mezcla correspondiente de didesoxinucleótidos. El programa de secuenciación consta de una desnaturalización inicial de 3 min a 95°C seguido por 20 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 52°C y 1 min a 72°C, para concluir con 10 ciclos de 30 s a 95°C y 1 min a 70°C. Al terminar la reacción, a cada uno de los tubos se le agregaron 3 μL de “stop solution” (10 mM NaOH, 95% formamida, 0,05% azul de bromofenol, 0,05% xilen cianol) y se desnaturalaron en el termociclador a 95°C durante 10 min para luego ponerlos inmediatamente en hielo. Se aplicaron 3 μL de cada reacción en el orden A, C, G, T en cada uno de los pocillos del gel, el cual se armó en dos pasos. Para sellar la parte inferior se preparó una solución que contenía 6 mL de DNA sequencing Gel-Mix 6 % (USB corp.) que contiene acrilamida al 5,7 % p/v, bisacrilamida 0,3 % p/v, Urea 42 % p/v y H₂O 51 % p/v, al cual se le agregaron 75 μL de persulfato de amonio al 10 % y 30 μL de TEMED. Para hacer el gel de secuenciación se tomaron 35 mL de Gel-Mix 6 %, a los que se le agregó 350 μL de APS al 10 % y 9 μL de TEMED.

Las electroforesis se corrieron a una corriente constante de 0,22 mA y a una potencia límite de 50 W. Se realizaron corridas cortas de 1.5 h. Al terminar cada corrida, el gel se colocó sobre papel Whatman N°3 (Advantec MFS®) y se secó con vacío y calor durante 3 h para luego exponerlo en un cassette de phosphorimager K-Screen

(Kodak) por 24 h, el que posteriormente se escaneó en un phosphorimager (Molecular Imager FX system, Bio-Rad) a una resolución de 50 μm /pixel para obtener imágenes en formato TIFF. El análisis de las imágenes obtenidas posterior al escaneado se realizó con el software Quantity One 1.0 (Bio-Rad).

2.3. Técnicas con RNA.

2.3.1. Extracción del RNA total de *A. ferrooxidans*.

El RNA total de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 se extrajo durante la fase exponencial temprana de crecimiento (de acuerdo a la situación de presencia o carencia de Pi y la fuente de energía el número de células varía entre 0,5 – 2 x 10⁸ células/mL), salvo en las situaciones que se indican en la sección de resultados. Se modificó el protocolo de extracción con fenol caliente (Guiliani y col., 1997). Las células se colectaron por centrifugación a 5500 x g por 10 min a temperatura ambiente y se lavaron dos veces con solución de H₂SO₄, pH 1,7. Para la obtención del RNA se tomaron fracciones de 10 mg (peso húmedo) de pellet de células y se resuspendieron en 300 μL de solución de lisis (acetato de sodio 0,02 M pH 5,5; SDS, 0,5 %; EDTA, 1 mM). A cada una de las resuspensiones se le agregó 600 μL de fenol saturado ácido precalentado a 65 °C y esta mezcla se incubó durante 7 min a 65°C con agitación por inversión cada 45 s. Luego de centrifugar por 4 min a 12700 x g, la fase acuosa se re-extrajo nuevamente con el mismo volumen de fenol ácido por 7 min a 65°C. Luego se realizó una extracción con 600 μL de fenol ácido/cloroformo a temperatura ambiente y dos extracciones con 600

μL de cloroformo, centrifugando durante 4 min a 12700 x g entre cada uno de los pasos anteriormente descritos. El RNA se precipitó con 1/10 de volumen de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y 2 a 3 volúmenes de etanol absoluto a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante toda la noche o alternativamente a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 h. Luego de la precipitación, el RNA se recuperó por centrifugación a 12700 x g durante 30 min a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, se lavó 2 veces con etanol al 70% y se resuspendió en 100 μL de agua libre de nucleasas. Para eliminar los restos de DNA presentes en la preparación, el RNA se trató por 30 min a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ con 30 U de DNAsa I FPLC pure (Amersham) en un volumen final de 200 μL en presencia de 6 mM MgCl_2 . La enzima se inactivó con la adición de EDTA a una concentración final de 10 mM y una posterior incubación por 15 min a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Luego de la digestión del DNA, el RNA se extrajo una vez con 400 μL de fenol/cloroformo ácido y dos veces con 400 μL de cloroformo. Luego se precipitó con acetato de sodio 3 M pH 5,2 de la forma anteriormente descrita. Después de dos lavados con etanol al 70% este se resuspendió en 40 μL de agua libre de nucleasas. El estado físico se observó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1%. Para determinar la concentración del RNA se midió la A_{260} de una dilución 1/500 y se utilizó la relación $1\text{ OD}_{260} = 40\text{ }\mu\text{g RNA/mL}$. La pureza de éste se estimó por la razón de las absorbancias a 260/280 nm.

2.3.2. Transcripción inversa.

Para cada una de las reacciones de transcripción inversa se utilizaron entre 0,2 y 5 μg de RNA total y entre 20 a 30 pmoles del partidor reverso respectivo. En un primer paso se juntó el RNA con el partidor en un volumen no mayor a 10 μL y esta mezcla se

incubó a 65°C por 5 min, para luego poner inmediatamente en hielo e incubar durante 2 min. Este paso tiene por objetivo permitir la desnaturación de las posibles estructuras secundarias del RNA y facilitar el acceso del partidor a su zona de hibridación. Luego se agregó la mezcla de reacción que contiene en concentración final: amortiguador MMLV 1X, dNTPs 0,8 mM y 200 U de transcriptasa inversa (RT) MMLV (Promega). La síntesis del cDNA se realizó durante 1 h a 42°C y al terminar la reacción la enzima se desnaturó al incubar por 10 min a 65°C.

2.3.3. Experimento de extensión del partidor.

Para definir el sitio de inicio de la transcripción del gen *phoB* se realizó un experimento de extensión del partidor. Este consiste en sintetizar cDNA marcado radiactivamente con el uso de un partidor que hibrida entre 100-150 pb río abajo del posible sitio de inicio de la transcripción. En paralelo, con este mismo partidor se secuencia un fragmento de DNA que contenga esta zona. Luego de correr los productos de ambas reacciones en un gel de secuenciación de DNA, la lectura de la secuencia nos indica el (los) sitio(s) de inicio de la transcripción cuando coinciden la(s) banda(s) proveniente(s) de la reacción de extensión del partidor con las de la reacción de secuencia.

Se utilizó el partidor *phoBPE*. La reacción de marcación se realizó en un volumen de 10 μ L con 25 pmoles de partidor, 1 μ L de $\gamma^{33}\text{P}$ ATP y 10 U de la enzima T4 polinucleótido quinasa (New England Biolabs). La mezcla se incubó a 37°C por 15 min y se inactivó por 5 min a 65°C. La reacción de extensión del partidor se realizó con 5

μL del partidor marcado y 10 μg de RNA total de *A. ferrooxidans* extraído a partir de un cultivo en tiosulfato crecido en condiciones de carencia de Pi. El volumen de esta mezcla fue de 10 μL y se incubó durante 5 min a 65°C para poner inmediatamente después en hielo. Posteriormente, se agregaron 5 μL de 10 mM dNTPs, 1 μL de inhibidor de ribonucleasa RNAsin® (Promega), 3 μL de H₂O libre de nucleasas, 1 μL de la enzima ImProm II RT (Promega) y 5 μL de amortiguador para ésta. La reacción se incubó a 42°C por 1 h y la enzima se inactivó por 10 min a 65°C. Finalmente, se agregaron 5 μL de DNA “stop solution” (10 mM NaOH, 95% formamida, 0,05% azul de bromofenol, 0,05% xilen cianol). El producto de esta reacción se guardó a -20°C para su posterior corrida en un gel de secuenciación de DNA.

2.4. Construcción de un miniarreglo de genes de *A. ferrooxidans*.

2.4.1. Diseño de los oligonucleótidos.

La primera etapa en la construcción del miniarreglo de genes de *A. ferrooxidans* fue la selección de los genes y el diseño de los partidores para amplificar los fragmentos de PCR que finalmente se imprimieron en las membranas. El diseño de los partidores se realizó con el programa Web Primer (<http://seq.yeastgenome.org/cgi-bin/web-primer>), a partir de las secuencias de los ORFs seleccionados del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (www.tigr.org). Se seleccionaron los partidores cuyos valores de T_m estuvieron en el rango de entre 58 a 62°C y que produjeran productos de amplificación de entre 550-600 pares de bases (pb) desde el inicio de cada gen. En el

caso que los ORFs fueron de menor tamaño, se diseñaron partidores para amplificarlos completamente. Todos los fragmentos se amplificaron con los partidores N y R1 del gen respectivo.

2.4.2. Amplificación por PCR.

Las condiciones de amplificación y de reamplificación fueron similares para todos los genes y consistieron en una desnaturación inicial de 3 min a 95°C seguidos por 30 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a (50-54°C), 1 min a 72°C seguido por 3 min a 72°C. Luego de una primera purificación en gel los fragmentos se reamplificaron para eliminar la presencia de DNA genómico e imprimir fragmentos de una mayor pureza. Para esto se hizo una dilución 1/50 del primer producto de PCR que se utilizó como templado en la segunda reacción. Luego de la segunda purificación, los productos de PCR se diluyeron a una concentración final de 0,5 ng/ μ L en DMSO al 40%.

2.4.3. Impresión de las membranas.

Los fragmentos de PCR anteriormente purificados se colocaron en una placa de ELISA y se sembraron manualmente con el copiador de colonias VP 381 (V&P scientific) sobre las membranas de nylon Inmobilon-NY+ (Millipore). Cada fragmento de DNA fue impreso en cuadruplicado y tres veces por mancha, con lo que se imprimieron 1,5 ng de DNA finales por cada mancha.

Luego de la impresión de los fragmentos, las membranas se secaron al aire, y se trataron con la solución de desnaturalización (NaOH 0,5 M, NaCl 1,5 M) por 7 min. Después de este tratamiento, las membranas se incubaron dos veces con agitación por

3 min con la solución de neutralización (Tris-HCL 0.5 M pH 8, NaCl 1.5 M, EDTA 1 mM) y luego se secaron al aire. Finalmente, el DNA se entrecruzó a la membrana mediante irradiación con luz UV (254 nm) a una potencia total de 0,12 J/cm² en un horno de hibridación Hibrilinker HL-200 (UVP Laboratory Products).

Los cDNAs marcados radiactivamente se generaron por incorporación de α -³²P dCTP mediante transcripción reversa del RNA total. Para ello se utilizó una mezcla que contenía un oligonucleótido reverso para cada ORF. Como control externo para posteriormente normalizar los valores de cada membrana a cada reacción de marcación se le agregó el RNA transcrito *in vitro* del gen *exp-1* de *Prunus persica*, (gentilmente cedido por la Dra. Verónica Cambiazo del Laboratorio de Bioinformática y Expresión Génica del INTA, Universidad de Chile). La mezcla de reacción contenía 4-10 μ g de RNA total, 1,5 ng de RNA de *exp-1*, 10 pmoles de cada uno de los oligonucleótidos reversos específicos, 600 μ M de la mezcla de dNTPs sin dCTP, 3,5 mM MgCl₂; 50 μ Ci de α -³²P dCTP (NEN), 40 U del inhibidor de ribonucleasas RNAsin® (Promega), y 2 μ L de la transcriptasa inversa ImProm II™ RT (Promega) en un volumen final de 50 μ L. La reacción se incubó por 2 h a 42 °C. A la hora de reacción se agregaron nuevamente 2 μ L de la enzima. Luego la enzima se inactivó durante 10 min a 65 °C y el RNA se degradó por tratamiento con NaOH 0,2 M por 15 min a 37 °C. Posteriormente, el pH se neutralizó con amortiguador HEPES (0,25 M final). Las sondas radiactivas se purificaron con las columnas de cromatografía de centrifugación Microspin™ S-200

(Amersham Biosciences). La cantidad de radiactividad incorporada (en cpm/ μ L) se midió contando 1 μ L de la sonda purificada en un contador de centelleo.

2.4.4. Hibridación y lavado de las membranas.

Para cada sonda sintetizada se hibridaron dos membranas. Estas fueron previamente humedecidas en amortiguador SSPE 2X (SSPE 10X: NaCl, 1,8 M; fosfato de sodio, 100 mM pH 7,7; EDTA, 10 mM) durante 5 min a temperatura ambiente y posteriormente pre-hibridadas en 7,5 mL de solución de hibridación (SSPE, 5X; SDS, 2%; solución de Dendhardt's, 1X; DNA de esperma de salmón, 100 μ g/mL) a 65 °C por 2 h. La hibridación se realizó con 5 mL de la solución de hibridación fresca precalentada a 65°C a la cual se le agregó la sonda de cDNA desnaturada previamente en agua hirviendo por 5 min. Se colocó una cantidad entre 1,5-2,5 x 10⁶ cpm/mL de solución de hibridación. Las membranas se incubaron con agitación rotatoria a 65°C durante toda la noche.

Luego de finalizada la hibridación se recuperó la sonda y cada lavado se realizó con 25 mL de solución de lavado (SSPE, 0,5X; SDS, 0,2%). Se hicieron 2 lavados con agitación por 5 min a temperatura ambiente seguidos por 2 lavados de 20 min cada uno con agitación a 65 °C.

2.4.5. Obtención de las imágenes.

Las membranas hibridadas se envolvieron en papel celofán y se expusieron en una pantalla K-Screen (Kodak) por tiempos variables de entre 1 a 2 días, la que posteriormente se escaneó en un PhosphorImager (Molecular Imager FX system, Bio-

Rad) a una resolución de 50 μm /pixel para obtener imágenes en formato TIFF. El análisis de las imágenes obtenidas con el escaneado se realizó con el software Quantity One 1.0 (Bio-Rad) y la cuantificación de las señales de las manchas se realizó con el software VersArray 1.0 (BioRad) gentilmente facilitado por la Dra. Verónica Cambiazo del Laboratorio de Bioinformática y expresión génica del INTA, Universidad de Chile. Para ello se construyó una grilla de cuantificación utilizando el método de búsqueda automática de grillas del programa, al cual posteriormente se le asignaron los nombres de los genes correspondientes para cada cuadruplicado de manchas. Se cuantificaron los parámetros de intensidad cruda (IC), intensidad del ruido (IFX), intensidad neta (IN) y desviación estándar del ruido. Las tablas obtenidas se transformaron a formato Excel para su análisis posterior.

2.4.6. Normalización y tratamiento de los datos de intensidad de los macroarreglos de DNA.

Las intensidades netas (IN), correspondientes a la intensidad cruda promedio de la señal (IC) menos el valor de su fondo local promedio (IFX), obtenidas para cada mancha se normalizaron por la intensidad neta promedio de las 8 manchas de *exp-1* presentes en cada membrana, gen que fue utilizado como control de marcaje y de hibridación, obteniendo la intensidad neta relativa (INR). Las INR de todas las réplicas para cada mancha en cada condición se promediaron obteniendo la intensidad neta relativa promedio (INRX). Para cada condición las INRX fueron calculadas con al

menos 8 datos de intensidad para cada mancha. El coeficiente de variación para cada gen se calculó dividiendo la desviación estándar de las INRX por el valor de INRX.

2.5. Análisis de los poliP.

2.5.1. Extracción de los poliP desde células de *A. ferrooxidans*.

La extracción de poliP se realizó según métodos descritos (Ault-Riché y col., 1998). Se colectaron por centrifugación las células provenientes de 25-50 mL de cultivo. Las células sedimentadas se resuspendieron en 300 μ L de 4 M isotiocianato de guanidina (GITC), 50 mM Tris-HCl pH 7,0 y la mezcla se incubó a 95°C por 3 min para conseguir una lisis rápida. Se reservó una alícuota de 10 μ L de esta fracción para la determinación de proteínas. A cada tubo se agregó 30 μ L de 10% SDS y luego de incubar a 95°C durante 2 min, se agregó 300 μ L de 50% etanol y 5 μ L de microperlas de vidrio Glassmilk® (Bio 101). Luego de agitación por vortex y de incubar 30 s a 95°C, los tubos se centrifugaron a 13700 x g durante 1 min. El poliP unido a las perlas, se lavó resuspendiendo por vortex en 200 μ L de “amortiguador New Wash” frío (5 mM Tris-HCl pH 7.5, 50 mM NaCl, 5 mM EDTA, 50 % etanol) y se centrifugó a 13700 x g durante 1 min. El sedimento que contenía el poliP, DNA y RNA unido a Glassmilk®, se resuspendió en 100 μ L de una solución que contenía 50 mM Tris-HCl (pH 7,0), 5 mM MgCl₂, 5 μ g/mL DNAsa y 5 μ g/mL RNAsa y se incubó a 37°C por 30 min. Inmediatamente se agregó 200 μ L de amortiguador “New Wash” frío para lavar el poliP unido al Glassmilk y eliminar los productos de la degradación de los ácidos

nucleicos. Se centrifugó a 13700 x g y se realizó un lavado más. El poliP unido al Glassmilk® se eluyó en dos pasos resuspendiendo el sedimento por vortex en 50 µL de agua cada vez, incubando 2 min a 95°C y centrifugando a 13700 x g para tomar el sobrenadante. El poliP soluble recuperado en esta fracción (100 µL) se congeló a -20°C para su posterior análisis.

2.5.2. Cuantificación de los poliP.

La reacción se realizó según en base a la actividad reversa de la PPK recombinante de *E. coli* (PPK_r) en exceso de ADP (Ault-Riché y col., 1998). El ensayo se realizó en un volumen final de 50 µL en amortiguador 50 mM Hepes-KOH (pH 7,2), 40 mM (NH₄)₂SO₄, 4 mM MgCl₂, 0,1 mM ADP, 3000 unidades de PPK_r y 5 µL de la solución de poliP. La incubación se realizó 90 min a 37°C. La reacción se detuvo por calentamiento (2 min a 95°C) y luego la mezcla se diluyó 1/20, 1/50, 1/200 y 1/500. Alícuotas de 50 µL de estas diluciones se ensayaron con 50 µL de luciferasa (Boehringer), en placas de 96 pocillos. El ATP generado por la PPK se cuantificó midiendo la luz emitida en un luminómetro Lumi/96 de Bioscan.

2.6. Microscopía electrónica de transmisión (MET).

Se colectaron células de *A. ferrooxidans* y se lavaron con una solución diluida de H₂SO₄ pH 1,75. Luego, se resuspendieron a una DO₆₀₀ de 0,25 y 10 µL de esta suspensión se montaron sobre grillas cubiertas con Formvar durante 2 min, dos veces (Gonzalez y Jensen, 1998). El exceso de líquido se absorbió con papel de filtro y las

grillas se secaron al aire. Las células se observaron sin tinción con un microscopio electrónico de transmisión Philips Tecnai 12 a 80 kV.

2.7. Métodos bioinformáticos.

Para el diseño de todos los partidores se utilizó la secuencia del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (<http://www.tigr.org>). Los marcos de lectura abiertos y sus secuencias aminoacídicas se analizaron con el programa ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). El análisis de las identidades y similitudes en los bancos de datos se realizó mediante los programas BLASTP y PSI-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) (Altschul y col., 1997). Se utilizaron diferentes tipos de matrices (BLOSUM y PAM). Los alineamientos múltiples se realizaron utilizando el programa ClustalW (<http://align.genome.jp>) y se editaron con el programa BOXSHADE 3.21 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html). Todos los partidores que se utilizaron en las reacciones de PCR en tiempo real fueron diseñados con el programa Light Cyler Probe Design 1.0 (Roche).

3. Resultados

3.1. Estudio de la expresión de los genes del regulón Pho de *A. ferrooxidans* en relación a la carencia de Pi.

3.1.1. Experimentos de RT-PCR.

Con el objeto de estudiar si los genes del regulón Pho de *A. ferrooxidans* se expresan y si su expresión se encuentra regulada por la cantidad de Pi presente en el medio de cultivo se crecieron las bacterias con 22 mM Pi, condición de fosfato suficiente y con 0,22 mM Pi, condición que planteamos como posible carencia de Pi (Fig. 5). Se observa que en esta condición el crecimiento del cultivo se detiene a una densidad celular menor, correspondiente a 5×10^7 células/mL (Fig. 5A).

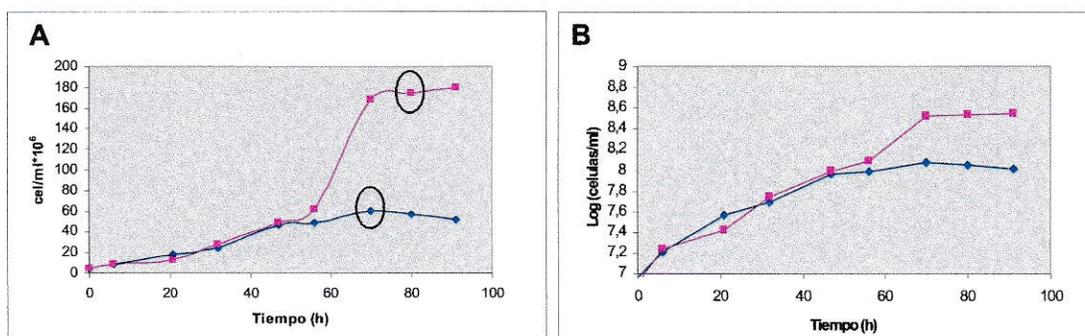


Figura 5. (A) Curva de crecimiento de *A. ferrooxidans* en presencia y carencia de Pi. Los cuadrados rosados muestran el crecimiento en 22 mM Pi, mientras que los rombos azules muestran el crecimiento 0,22 mM Pi. En los círculos se muestran los puntos de la curva en los cuales se tomaron las células para realizar las extracciones de RNA. (B) Gráfico semi-logarítmico de los datos mostrados en (A).

Al analizar el grafico semi logarítmico mostrado en la figura 5B notamos que la velocidad de crecimiento en la parte lineal es similar. Para la condición de crecimiento en 22 mM Pi, se calculó un tiempo generacional de 16,5 h, mientras que para la el crecimiento en 0,22 mM Pi este fue de 14,6 h. La mantención y el leve aumento observado en la velocidad de crecimiento puede explicarse porque aún hay presencia de Pi en el cultivo que crece en 0,22 mM Pi junto con la posible utilización de las reservas de poliP para el crecimiento de *A. ferrooxidans*.

Para evaluar la expresión del gen *ppk* se tomó RNA extraído de los cultivos mostrados en la figura 5. Se hizo RT-PCR de acuerdo a lo descrito en la sección de materiales y métodos. Luego de realizar el experimento observamos que el gen se expresa en condiciones de presencia y carencia de Pi (Fig. 6).

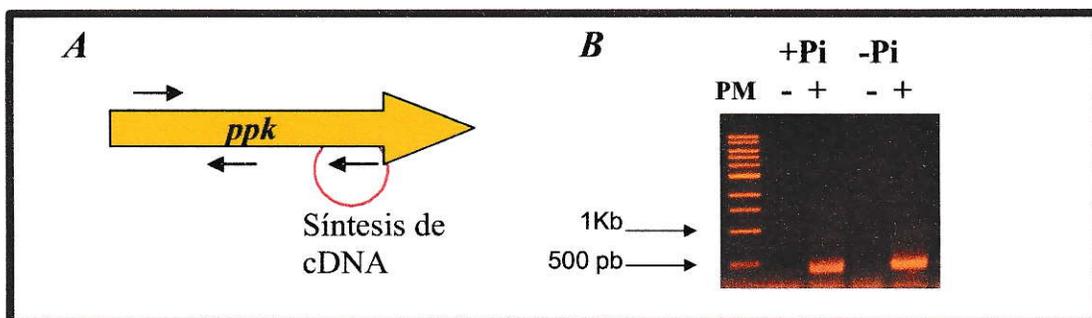


Figura 6. Experimento de RT-PCR cualitativo para el gen *ppk*. **(A)** Diseño experimental. La síntesis del cDNA se realizó con el partidor *ppk14nd*, (círculo rojo) y 1 μ g de RNA total para cada condición. La reacción de PCR se realizó con la pareja de partidores *ppkNH2* y *ppk17Nd*, que amplificó un fragmento de 452 pb del gen *ppk*. **(B)** Resultado del experimento de RT-PCR con el cDNA sintetizado a partir de RNA extraído de cultivos crecidos con fosfato (+Pi), luego de un traspaso a medio limitado de fosfato (-Pi). Los símbolos (+) y (-), corresponden a la reacción con transcriptasa inversa y a sus respectivos controles sin transcriptasa inversa. Resultado luego de 35 ciclos de PCR. **PM**, marcador de estándares de peso molecular NEB 1Kb DNA ladder.

Para averiguar si los 8 genes comprendidos desde *phoB* a *ppx* se expresan al menos como una unidad transcripcional, decidimos hacer un experimento de cotranscripción (Fig. 7).

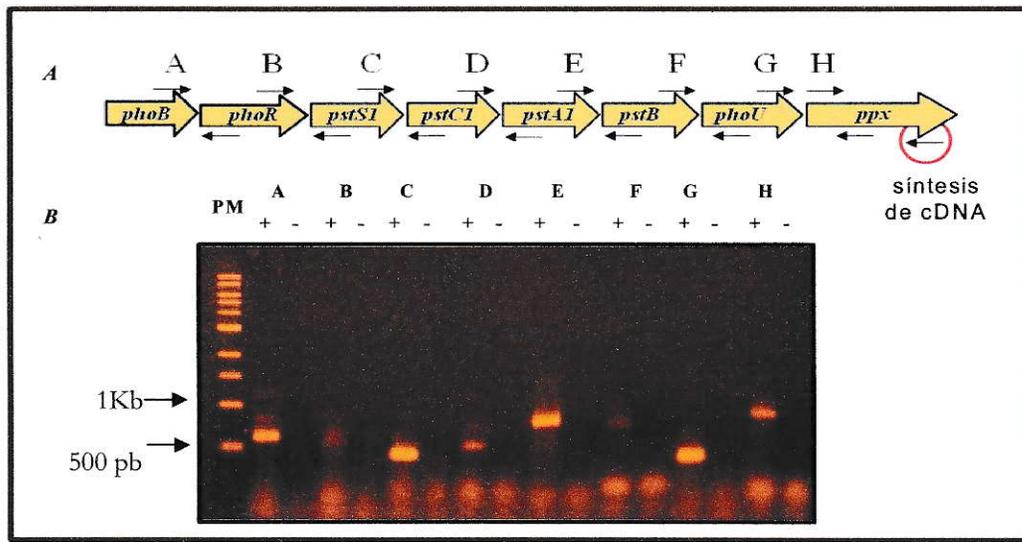


Figura 7. Cotranscripción de los genes del regulón Pho de *A. ferrooxidans* mediante RT-PCR. **(A)** Diseño experimental. Organización de los genes y partidores utilizados en el experimento. La síntesis de cDNA se realizó con el partidor *ppx* 4r, (círculo rojo) y 5 µg de RNA total extraído en la condición de carencia de Pi. La posterior amplificación por PCR se realizó con las parejas de partidores convergentes entre dos genes adyacentes. (A; *AfphoBD1-AfphoRR2*; B; *AfphoRD1-AfpstS1R1*, C; *AfpstS1D1-AfpstC1R2*, D; *AfpstC1D1-AfpstA1R1*, E; *AfpstA1D1-AfpstBR2*, F; *AfpstBD1-AfphoUR1*, G; *AfphoUD1-ppk6r*, H; *ppx1d-ppx4r*, esperándose amplificadas de 583 pb, 573 pb, 406 pb, 420 pb, 621 pb, 678 pb, 440 pb y 808 pb, respectivamente. **(B)** Resultado de la amplificación por PCR utilizando el cDNA sintetizado a partir del gen *ppx* como templado. Para cada pareja de partidores se incluyó un control negativo sin transcriptasa inversa (-), que descarta la presencia de DNA cromosómico en la preparación del RNA. **PM**, marcador de estándares de peso molecular NEB 1Kb DNA ladder.

Para este experimento se tomó el RNA extraído del cultivo crecido en tiosulfato como fuente de energía y carencia de Pi (0,22 mM Pi). El cDNA se sintetizó con un partidador ubicado en el gen *ppx*. Si existiese un mRNA policistrónico que codifique para los 8 genes deberíamos poder obtener amplificadores de PCR con cada una de las parejas de partidadores convergentes ubicados en genes adyacentes cuando utilizamos el cDNA sintetizado anteriormente como templado. Como se observa en la figura 7 se obtuvo un amplificado de PCR para el tamaño esperado en todas las condiciones, lo que nos indica la existencia de al menos un mensajero policistrónico que comprende los ocho genes, desde *phoB* a *ppx*.

3.2. Estudio de la región promotora del gen *phoB*.

PhoB es el regulador transcripcional de los genes del regulón Pho. Mediante análisis bioinformático observamos que las regiones río arriba de los genes *phoB* y *pstS1* de *A. ferrooxidans* muestran una alta identidad a nivel de secuencias nucleotídicas, lo que podría sugerir la existencia de una posible caja Pho y daría cuenta de posibles sitios de unión de PhoB (Fig. 8).

la secuencia correspondiente al inicio de la traducción del gen *phoB* y el partidor reverso *phoBPE* mencionado anteriormente (Fig. 9).

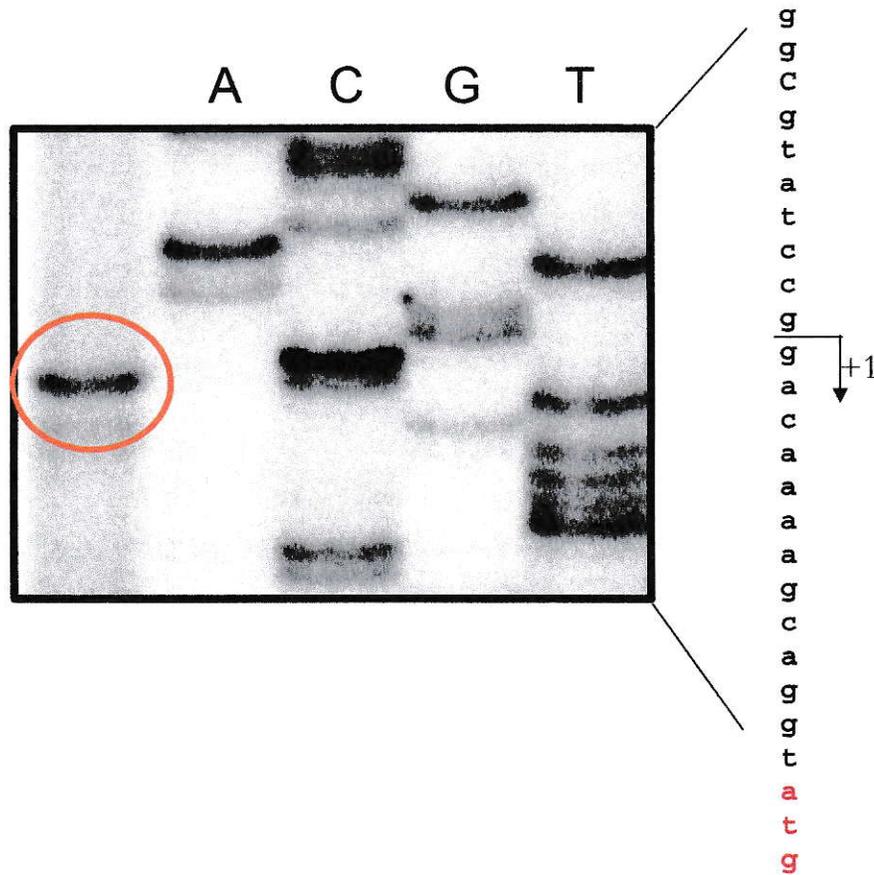


Figura 9. Mapeo del sitio de inicio de la transcripción para el gen *phoB* de *A. ferrooxidans* mediante extensión del partidor. Para la síntesis de cDNA se utilizaron 10 µg de RNA total proveniente de células crecidas en tiosulfato y en carencia de Pi. La flecha muestra el sitio de inicio de la transcripción y en rojo se muestra el posible codón de inicio de la traducción.

Como puede observarse, el inicio de la transcripción corresponde a la guanina que se encuentra ubicada 13 pb río arriba del codón que codificaría para la primera metionina de la proteína PhoB (marcado en rojo) de acuerdo a nuestro análisis bioinformático previo. Este sitio de inicio de la transcripción determinado experimentalmente da cuenta de la existencia de un promotor, cuya posición es congruente con la existencia de una posible caja *pho* que se encontraría en la región -35 del gen *phoB* de *A. ferrooxidans*.

3.3. Diseño y construcción de un macroarreglo de DNA.

Con el objetivo de estudiar los cambios en la expresión de los genes del regulón Pho de *A. ferrooxidans* se diseñó y construyó un macroarreglo de DNA. Para ello se imprimieron los productos de PCR amplificados con partidores diseñados a partir de la secuencia disponible del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 de acuerdo a lo que se describe en materiales y métodos. Se incluyeron como controles los genes que codifican para las proteínas GroEL, DnaK y rusticianina de *A. ferrooxidans*, que ya han sido estudiadas. También se incluyó un control externo de hibridación que nos permite normalizar los datos obtenidos entre distintas membranas (Fig. 10).

Se optimizó la cantidad de DNA a imprimir y las condiciones de hibridación y lavados de las membranas para obtener señales de hibridación detectables y cuantificables.

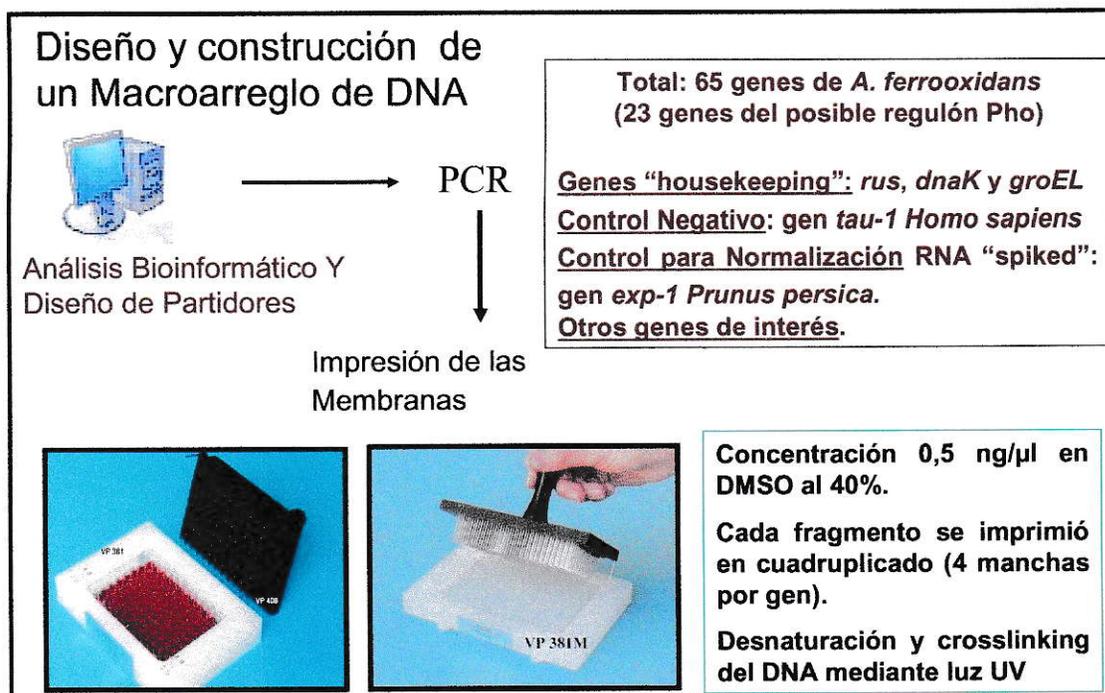


Figura 10. Diseño y construcción de un macroarreglo de genes de *A. ferrooxidans*.

Tal como lo indica la figura 10, en las membranas se imprimieron 65 genes de *A. ferrooxidans*, los cuales se sembraron cada uno en cuadruplicado. De estos genes, 23 son homólogos a los genes del regulón Pho de *E. coli* y otras bacterias. El orden de la impresión de cada uno de los fragmentos de cada gen en la membrana guardó relación con su orientación física en el cromosoma de *A. ferrooxidans*, es decir si dos genes son adyacentes en el cromosoma, se imprimieron contiguos en las membranas.

Los cDNAs marcados con ^{32}P se sintetizaron a partir de 10 μg de RNA total extraído de cultivos crecidos en tiosulfato como fuente de energía en condiciones de presencia de Pi (22 mM Pi), carencia de Pi (0,22 mM) y ausencia de Pi (0 Pi). Para la

síntesis de los cDNAs se utilizó un partidor reverse para cada gen y a cada muestra de RNA a marcar se le agregó 1 ng del RNA “spiked” (Fig. 11).

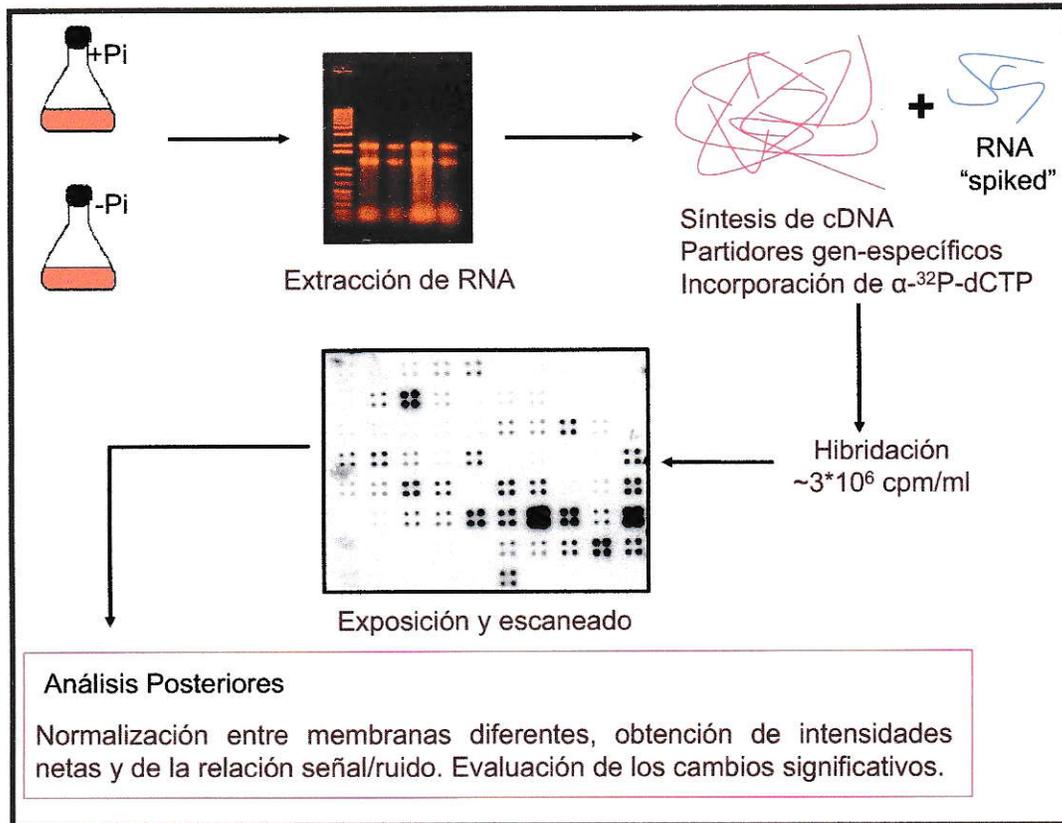


Figura 11. Esquema de la metodología utilizada en los experimentos de macroarreglos de DNA.

Para el experimento de crecimiento en carencia de Pi, cuya curva de crecimiento se muestra en la figura 5, se realizaron dos replicas biológicas (tabla 3 y tabla 4). En la figura 12 se muestran los genes que se imprimieron y un resultado de dos membranas hibridadas en las condiciones anteriormente descritas.

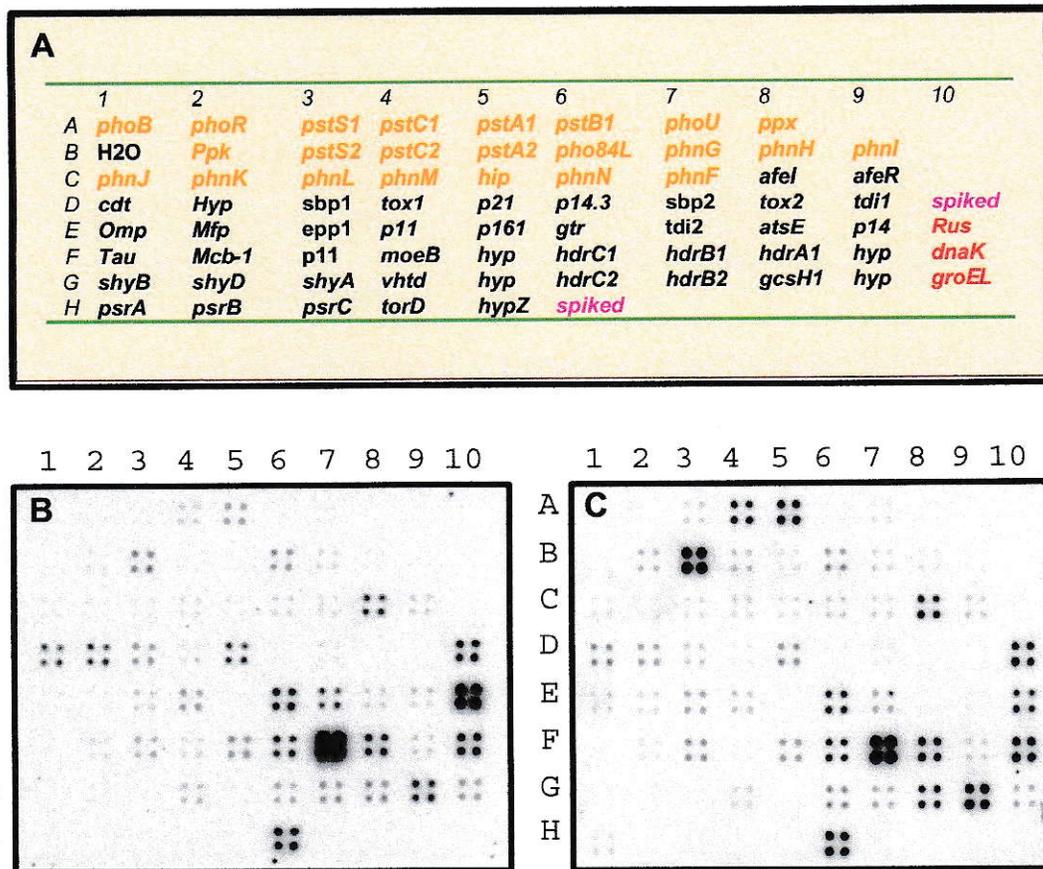


Figura 12. Ejemplo de un experimento de macroarreglos de DNA. **A.** Esquema de los genes impresos en las membranas. En color naranja se muestran los genes homólogos a componentes del regulón Pho de *E. coli*. En rojo se muestran los genes “housekeeping” seleccionados, mientras que el gen “spiked” (rosado) se imprimió en dos lugares distintos de la membrana. **B.** Membrana hibridada con cDNAs generados a partir de la condición con Pi. **C.** Membrana hibridada con cDNAs generados en la condición de carencia de Pi.

Para algunos de los genes del regulón Pho se observa un aumento en los niveles de transcritos en la situación de carencia de Pi. En esta última situación disminuyen los niveles de transcrito para los genes *rus* y *groEL*. Muchos de los otros genes impresos no varían mayormente sus niveles de expresión. La normalización de los valores de

intensidad de las manchas se realizó dividiendo los valores de IN de cada membrana por el valor de IN correspondiente a su respectivo RNA “spiked” de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. En las tablas se muestran los valores netos de aumento o disminución de los niveles de transcritos en la condición de carencia de Pi versus la presencia de Pi (Tabla 3).

En los experimentos de macroarreglos de DNA observamos distintos niveles de INR de las manchas correspondientes a las señales de hibridación de cada gen. Las manchas con valores de INRX muy bajos generan mucha inexactitud debido a su alta variación. Para descartar los genes cuyas INRX presentan una alta variación se utilizó un test de coeficiente de variación (CV). Este consiste en dividir la desviación estándar de las INRX por el valor de INRX, así un CV mayor o igual a 0,5 significa que la desviación estándar es al menos la mitad del promedio y el dato es descartado. Para valores de CV menores a 0,5 el dato se considera como válido.

Al analizar las tablas 3 y 4, determinamos que existe un aumento en los niveles de transcrito de más de tres veces para un 56,5 % y un 34,7% de los genes en cada réplica. En la tabla 3 se observa que los genes *pstC1*, *pstA1*, *phoU*, *ppk*, *pstS2*, *phnL*, *hip*, *phnN* y *phnF* presentan niveles de transcrito mayores de tres veces en la condición de carencia de Pi, siendo el gen *pstS2* el que muestra un mayor incremento en sus niveles (66 veces).

Tabla 3. Cuantificación de cambios de expresión de los genes del regulón Pho de *A. ferrooxidans* mediante macroarreglos de DNA. Se muestra el nivel de aumento o disminución de los niveles de transcrito en la situación de carencia de Pi (0,22 mM Pi) versus la situación de crecimiento con 22 mM Pi.

Gen	Imágenes		Intensidad Relativa Normalizada				Variación de Intensidades
	22mM Pi	0,22 mM Pi	22 mM Pi	CV	0,22 mM Pi	CV	0,22 mM Pi/22 mM Pi
<i>phoB</i>			0,179	0,72	0,023	1,2	0,1
<i>phoR</i>			0,013	1,04	0,031	0,91	2,3
<i>pstS1</i>			0,018	0,83	0,065	0,58	3,6
<i>pstC1</i>			0,067	0,23	0,216	0,27	3,2
<i>pstA1</i>			0,082	0,37	0,275	0,1	3,4
<i>pstB1</i>			0,042	0,77	0,038	0,67	0,9
<i>phoU</i>			0,024	0,82	0,111	0,33	4,6
<i>ppx</i>			0,009	1,42	0,042	0,71	4,7
<i>ppk</i>			0,024	0,56	0,102	0,51	4,3
<i>pstS2</i>			0,024	0,73	1,566	0,07	66,1
<i>pstC2</i>			0,016	1,23	0,050	0,51	3,2
<i>pstA2</i>			0,008	0,82	0,040	0,83	5,0
<i>phnK</i>			0,044	0,59	0,032	0,7	0,7
<i>phnG</i>			0,075	0,65	0,122	0,42	1,6
<i>phnH</i>			0,020	0,75	0,072	0,64	3,7
<i>phnI</i>			0,016	1,24	0,037	0,88	2,3
<i>phnJ</i>			0,017	1,02	0,032	0,94	2,0
<i>phnK</i>			0,044	0,59	0,032	0,7	0,7
<i>phnL</i>			0,006	1,09	0,057	0,29	9,8
<i>phnM</i>			0,031	1,06	0,090	0,27	2,9
<i>hip</i>			0,023	0,7	0,455	0,22	20,2
<i>phnN</i>			0,043	0,5	0,200	0,31	4,6
<i>phnF</i>			0,017	0,63	0,111	0,27	6,5
<i>Rus</i>			5,928	0,1	8,669	0,08	1,5
<i>dnaK</i>			1,092	0,25	6,471	0,33	5,9
<i>groEL</i>			2,02	0,31	2,84	0,24	1,4
<i>spiked</i>			1,049	0,23	0,553	0,09	-

Tabla 4. Cuantificación de los cambios de expresión de los genes del regulón Pho de *A. ferrooxidans* mediante macroarreglos de DNA, resultado de la replica biológica del experimento mostrado en la tabla 3. Se muestra el nivel de aumento o disminución de niveles de transcritos para los genes en la situación de carencia de Pi (0,22 mM Pi), versus la situación de crecimiento con 22 mM Pi.

Gen	Imágenes		Intensidad Relativa Normalizada				Variación de Intensidades
	22mM Pi	0,22mM Pi	22 mM Pi	CV	0,22 mM Pi	CV	0,22 mM Pi/22 mM Pi
<i>phoB</i>			0,005	1,16	0,059	0,21	10,9
<i>phoR</i>			0,005	0,98	0,018	1,66	3,6
<i>pstS1</i>			0,032	0,32	0,071	0,25	2,2
<i>pstC1</i>			0,172	0,15	0,800	0,27	4,7
<i>pstA1</i>			0,207	0,10	2,019	0,45	9,8
<i>pstB1</i>			0,011	0,77	0,026	0,15	2,3
<i>phoU</i>			0,008	2,00	0,186	0,34	23,0
<i>ppx</i>			0,006	0,77	0,141	0,74	24,2
<i>ppk</i>			0,014	0,74	0,173	0,40	12,1
<i>pstS2</i>			0,084	0,20	2,948	0,15	35,3
<i>pstC2</i>			0,012	0,16	0,014	2,00	1,1
<i>pstA2</i>			0,008	1,34	0,033	0,31	4,3
<i>pho84L</i>			1,663	0,06	0,530	0,22	0,3
<i>phnG</i>			0,086	0,16	0,153	0,19	1,8
<i>phnH</i>			0,015	1,18	0,032	0,30	2,1
<i>phnI</i>			0,007	0,87	0,055	1,84	8,0
<i>phnJ</i>			0,009	0,46	0,044	0,29	4,7
<i>phnK</i>			0,010	0,63	0,057	0,82	5,4
<i>phnL</i>			0,014	0,32	0,065	0,32	4,5
<i>phnM</i>			0,027	0,40	0,083	0,25	3,1
<i>hip</i>			0,012	0,52	0,1656	0,36	13,8
<i>phnN</i>			0,050	0,25	0,532	0,22	10,6
<i>phnF</i>			0,024	1,35	0,233	0,21	9,7
<i>rus</i>			10,62	0,15	4,823	0,28	2,2
<i>dnaK</i>			0,798	0,22	4,306	0,06	0,2
<i>groEL</i>			0,921	0,14	0,301	0,32	3,1
<i>spiked</i>			0,838	0,18	0,285	0,21	-

En la tabla 4 se observa que los genes *pstC1*, *pstA1*, *phoU*, *pstS2*, *pstA2*, *phnJ*, *phnL*, *phnM*, *hip* y *phnF* presentan niveles de transcritos mayores de tres veces en la condición de carencia de Pi. Nuevamente el gen *pstS2* el que muestra un mayor incremento en sus niveles (35 veces). Dentro de los genes del regulón Pho de *A. ferrooxidans* es aparentemente el que presenta también un mayor nivel de transcrito determinado por la IC de las manchas.

En ambas réplicas, para algunos genes se obtuvo que en la condición de presencia de Pi, el CV de la INRX es mayor a 0,5, debiendo ser descartados. Sin embargo, en la condición de carencia de Pi, ocurre un aumento en los niveles de sus respectivos transcritos y el valor de la INRX es mayor, lo que disminuye el CV. En esta condición el valor de INRX es aceptado. Los genes que tienen este comportamiento fueron considerados en nuestro análisis debido a que no pueden descartarse en la condición de carencia de Pi. Por lo tanto solo se descartaron los genes que en ambas condiciones mostraron valores de CV de la INRX mayores a 0,5. Un ejemplo de esto son los valores obtenidos para los genes *phoR* y *phoB*. Los valores de CV para *phoR* son mayores que 0,5 en todas las condiciones en las dos réplicas y sus cambios en los niveles de transcritos son irrelevantes debido a su alta variación y descartados. Los valores de cambio de la INRX para los niveles de transcritos del gen *phoB* se descartan en la réplica mostrada en la tabla 3, mientras que en la replica de la tabla 4, el valor de CV en la condición de presencia de Pi es mayor que 0,5, mientras que en carencia de Pi, el CV es menor que 0,5 y el valor de INRX se considera como válido.

Para el experimento de trapaso a medio sin Pi (0 Pi), se tomaron células de *A. ferrooxidans* crecidas con 22 mM Pi. El pellet de células se dividió en dos y se realizó una extracción de RNA a tiempo cero, mientras que la otra mitad de las células se lavó con el medio sin Pi y se incubó en este por 24 h. Luego se extrajo el RNA y se realizó el experimento de macroarreglos de DNA (resultados mostrados en el anexo 3). Se observó un aumento de más de 3 veces en los niveles de transcritos para los genes *pstS1*, *pstC1*, *pstA1*, *pstS2* y *pstC2*, lo que corresponde a un 22% de los genes. Nuevamente el gen *pstS2* es el que presenta una mayor INRX y un mayor aumento de sus niveles de transcrito (19 veces).

3.4. Cuantificación de los niveles de transcrito para los genes *pstS1* y *pstS2* mediante PCR en tiempo real.

Para validar los resultados obtenidos a partir de los experimentos de macroarreglos de DNA se cuantificaron los niveles de los transcritos de los genes *pstS1* y *pstS2* de *A. ferrooxidans* mediante la técnica de PCR en tiempo real. Para ello, de acuerdo a las secuencias nucleotídicas de los dos genes se diseñaron partidores que permitieron la amplificación de éstos. Luego de optimizar las condiciones de amplificación con cada uno de estos partidores se construyeron las curvas de calibración a partir de diluciones seriadas de un estándar de DNA genómico de *A. ferrooxidans* de concentración conocida. En el anexo 2 se muestran las curvas de calibración y de fusión para todos los genes cuya expresión y cambios en los niveles de transcritos fueron estudiados

mediante PCR en tiempo real en esta tesis. Se muestra también un ejemplo de cálculo de número de copias relativo al rRNA 16S, que fue utilizado para normalizar los datos en nuestros experimentos.

Para la cuantificación de los niveles de transcrito de los genes *pstS1* y *pstS2* se utilizó el mismo RNA que se marcó en el experimento de macroarreglos mostrado en la tabla 3, se sintetizó el cDNA para cada muestra y este se amplificó mediante PCR en tiempo real (Fig 13). Los valores de Ct obtenidos, así como los valores número de copias relativo y número de copias de RNA 16S se muestran en la tabla 5.

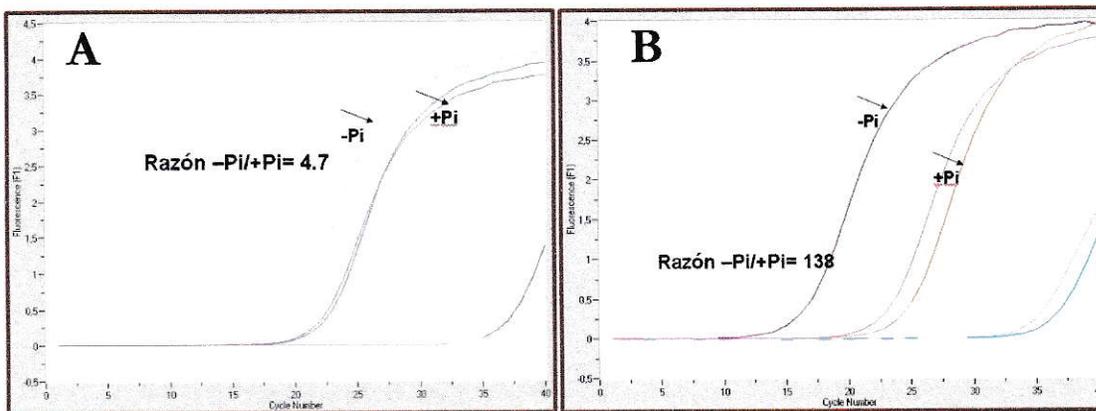


Figura 13. Cuantificación de los cambios en los niveles de transcritos para los genes *pstS1* y *pstS2* de *A. ferrooxidans* mediante PCR en tiempo real. Se cuantificaron los niveles de cDNA de *pstS1* (A) y *pstS2* (B) de *A. ferrooxidans* crecido en carencia de Pi versus presencia de Pi. Con flechas se indican las curvas correspondientes a cada muestra. Se indica la razón entre el número de copias de los cDNA de la condición de carencia de Pi versus el cultivo crecido con Pi. Los valores se normalizaron por el número de copias del gen de rRNA 16S.

La figura 13 muestra que en la condición de carencia de Pi existe un mayor nivel de transcrito para el gen *pstS2*. Los valores de Ct (tabla 5) para *pstS1* son de 22,2 y 19,7 para las condiciones de presencia y carencia de Pi respectivamente, lo que de acuerdo a la curva de calibración correspondiente se traduce en un aumento de 4,7 veces del nivel de transcrito, mientras que para el gen *pstS2* los valores de Ct son de 24,7 y 16,5 para las condiciones de presencia y carencia de Pi respectivamente, lo que se traduce en un aumento de 138 veces del nivel de transcrito en la condición de carencia de Pi. Cabe mencionar que los niveles de cDNA obtenidos luego de realizar los cálculos para cada condición se normalizaron por la cantidad de cDNA obtenida de la misma manera para el gen de rRNA 16S que se muestra en el anexo 2.

Tabla 5. Inducción de los niveles de transcrito de los genes *pstS1* y *pstS2* de *A. ferrooxidans* en carencia de Pi. Se muestra el valor de Ct, el número de copias relativo para cada muestra y el nivel de inducción en la condición de carencia de Pi versus la situación de presencia de Pi para los cultivos crecidos en tiosulfato como fuente de energía.

<i>Gen</i>	Valor de Ct (22 mM Pi)	Numero de Copias relativo 22 mM Pi	Valor de Ct (0,22 mM Pi)	Numero de Copias relativo 0,22 mM Pi	Nivel de Inducción* 0,22 mM Pi/22 mM Pi
<i>pstS1</i>	22,2	$7,5 \times 10^5$	19,7	$3,5 \times 10^6$	4,7
<i>pstS2</i>	24,7	$5,7 \times 10^5$	16,5	$7,9 \times 10^7$	138
<i>16S</i>	16,9	$2,4 \times 10^9$	17	$2,3 \times 10^9$	1

*Los niveles de inducción se encuentran normalizados por el valor del número de copias del RNA 16S.

Luego de observar que los dos genes *pstS* de *A. ferrooxidans* aumentan su nivel de transcritos en carencia de Pi y que el gen *pstS2* es el que muestra un mayor valor de aumento decidimos averiguar si este aumento se observa cuando *A. ferrooxidans* se crece en otra fuente energética y se somete a la carencia de Pi. Para ello se tomaron células de un cultivo crecido en ión ferroso con 0,17 mM Pi. Se extrajo RNA total de la mitad de las células a tiempo cero y la otra mitad se traspasó a un medio sin fosfato (0 Pi) durante 72 h. Luego de ese tiempo se extrajo el RNA total. Se midieron los niveles de cDNA para los genes *pstS1* y *pstS2* mediante PCR en tiempo real de la misma manera como se ilustró en la figura 13 (Tabla 6).

Tabla 6. Niveles de inducción relativos de los transcritos de los genes *pstS1* y *pstS2* de *A. ferrooxidans* determinados mediante PCR en tiempo real. Se muestra el nivel de inducción normalizado en la condición de 72 h de incubación en ausencia de Pi versus la condición de crecimiento en 0.17 mM Pi para cultivos crecidos con ión ferroso como fuente de energía.

Gen	Valor de Ct (+Pi)	Numero de copias (+Pi)	Valor de Ct 72 h -Pi	Numero de copias (72h - Pi)	Nivel de inducción normalizado * (72 h -Pi / +Pi)
<i>pstS1</i>	23,6	$3,2 \times 10^5$	22,5	$6,5 \times 10^5$	1.5
<i>pstS2</i>	26,1	$2,5 \times 10^5$	19,2	$1,56 \times 10^7$	60
<i>16S</i>	8,3	$1,4 \times 10^8$	8,6	$1,2 \times 10^8$	1

* Los niveles de inducción se encuentran normalizados por el valor del numero de copias del RNA 16S.

Como se muestra en la tabla 6, el gen *pstS2* muestra un aumento de los niveles de transcrito de 60 veces luego de la incubación por 72 h en medio con ión ferroso y sin Pi. Los resultados obtenidos en los experimentos mostrados en las tablas 5 y 6 nos permiten afirmar que el aumento de los niveles de transcrito de este gen se encuentra

dado por el déficit de Pi y es independiente de la fuente energética en la cual el microorganismo crece.

3.5. Estudio del metabolismo de los fosfonatos (Pn) en *A. ferrooxidans*

La presencia de los genes *phn* en el genoma de *A. ferrooxidans* y el antecedente que estos forman parte del regulón Pho en *E. coli* y en otras bacterias que los poseen nos hizo investigar si *A. ferrooxidans* posee la capacidad de crecer en fosfonatos como fuentes únicas de fosfato y de evaluar si existen cambios en los niveles de transcritos de los genes *phn* en estas condiciones. Se evaluó el crecimiento con M-Pn y E-Pn a una concentración final de 1mM en cultivos crecidos en ión ferroso como fuente de energía. El crecimiento es sostenido y capaz de mantenerse por más de tres traspasos en el mismo medio de cultivo.

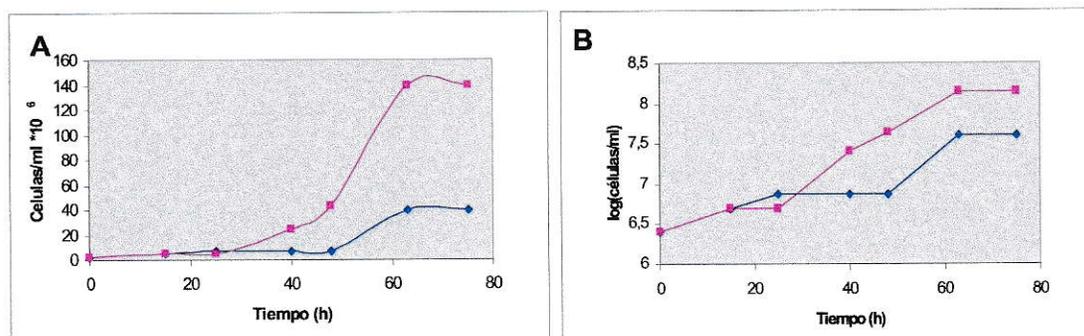


Figura 14. Crecimiento de *A. ferrooxidans* en fosfonatos como fuentes únicas de fosfato. **A)** Se evaluó el crecimiento en E-Pn 1mM (cuadros rosados) y M-Pn 1mM (rombos azules) de células crecidas utilizando ión ferroso como fuente de energía. **B)** Gráfico semi-logarítmico de las curvas mostradas en A.

De la figura 14 observamos que el crecimiento es menor en M-Pn con respecto a E-Pn, donde la densidad celular llega a entre $1-2 \times 10^8$ células/mL. Al observar el gráfico semi-logarítmico notamos que la parte lineal de aumento del crecimiento para la condición de cultivo en presencia de E-Pn es muy pequeña, por lo tanto no se determino una velocidad de crecimiento.

Como *A. ferrooxidans* es una bacteria acumuladora de poliP y estos pueden utilizarse en el crecimiento, decidimos averiguar si existe una diferencia en el crecimiento en fosfonatos debida a la condición de carencia o presencia de Pi de la cual proviene el inóculo. Se traspasaron células crecidas en ión ferroso con fosfato suficiente a un medio sin fosfato durante 72 h y con esas células se inoculó un cultivo en E-Pn 1mM. De la misma forma se inoculo un cultivo con células crecidas en presencia de Pi

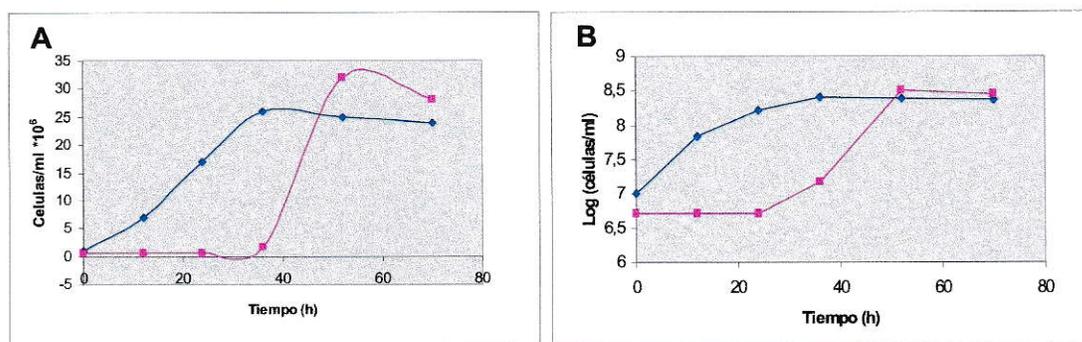


Figura 15. Efecto de la concentración de Pi en el inóculo para el crecimiento de *A. ferrooxidans* en ión ferroso y E-Pn. **A)** Se inocularon células provenientes de un cultivo crecido en presencia de Pi (rombos azules) y en carencia de Pi (cuadros rosados) en E-Pn 1 mM. **B)** Gráfico semi logarítmico de los datos mostrados en **A**.

En la figura 15 observamos que cuando el inóculo proviene de células crecidas en presencia de Pi, hay un crecimiento lineal, que podría deberse a que las bacterias

están creciendo a expensas de los poliP de reserva, mientras que cuando inoculamos con las células que fueron sometidas a la carencia de Pi, se observa un retardo en el crecimiento que podría deberse a la tasa de latencia de las bacterias que tienen una activación de la expresión de la C-P liasa.

3.5.1. Cuantificación de los niveles de transcritos de los genes *phn* mediante PCR en tiempo real.

Se decidió averiguar si en los cultivos crecidos en fosfonatos existe un aumento en los niveles de transcritos para los genes *pho84L*, *phnG* y *phnJ* mediante PCR en tiempo real. La síntesis de los respectivos cDNA se realizó con RNA extraído a partir de células de fase estacionaria de cultivos crecidos en E-Pn con ión ferroso como fuente de energía y con 0,17 mM Pi. Los resultados se muestran en la tabla 7.

Como se observa en la tabla, el gen *pho84L* es el que muestra un mayor cambio en los niveles de transcrito con respecto a la situación control del cultivo crecido en presencia de Pi. Una explicación posible es que el RNA utilizado en estos experimentos se extrajo a partir de células de la fase estacionaria de un cultivo y no se observaron grandes cambios en los niveles de transcrito para los genes *phn*.

Tabla 7. Cuantificación de los cambios en los niveles de transcrito para algunos genes relacionados con la utilización de fosfonatos en *A. ferrooxidans* mediante PCR en tiempo real. Se muestra el nivel de inducción de los genes en la condición de crecimiento en E-Pn versus 0,17 mM Pi, utilizando células crecidas en ión ferroso como fuente de energía.

<i>Gen</i>	Valor de Ct (E-Pn)	Nº copias relativo E-Pn	Valor de Ct (+Pi)	Nº copias relativo +Pi	Nivel de Inducción Normalizado (E-Pn/+Pi)
<i>pho84L</i>	33	2,7 x 10 ⁵	29,1	2,8 x 10 ⁴	6,4
<i>phnG</i>	24,5	1 x 10 ⁶	25,4	5,6 x 10 ⁵	2,9
<i>phnJ</i>	24,7	6,7 x 10 ⁵	26	2,8 x 10 ⁵	3,9
16 S	6,9	2 x 10 ⁸	7,6	3,2 x 10 ⁸	1,6

Para intentar encontrar cambios significativos, decidimos realizar cultivos crecidos en tiosulfato y M-Pn como fuente de Pi. El RNA se extrajo en la fase exponencial de la curva de crecimiento y se analizó la expresión de los genes *phn* de *A. ferrooxidans* a través de macroarreglos de DNA. Se preparó un cultivo control con 22 mM Pi y para el cultivo con fosfonato se creció un cultivo con M-Pn 1 mM como fuente de fosfato. Para el inóculo se utilizaron células crecidas previamente en este mismo medio de cultivo (Fig. 16). Se observa que el cultivo crecido con 1 mM M-Pn crece a una menor densidad celular comparado con el cultivo crecido en 22 mM Pi, el cual presenta un menor crecimiento con respecto al cultivo crecido en condiciones de fosfato suficiente. El tiempo generacional calculado para la condición de crecimiento con Pi fue de 8,7 h, mientras que para el crecimiento en 1 mM M-Pn fue de 11,3 h.

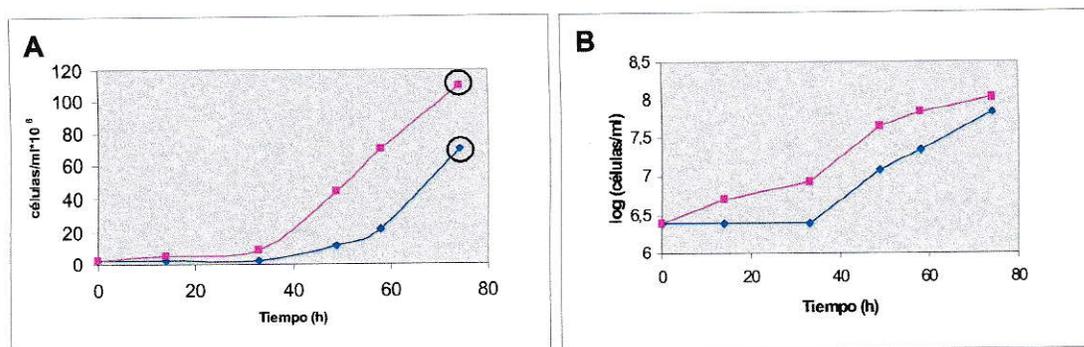


Figura 16. Crecimiento de *A. ferrooxidans* en tiosulfato y M-Pn. **A)** Se muestra el cultivo crecido en presencia de 22 mM Pi (cuadrados rosados) y M-Pn 1 mM (rombos azules). En rojo se destaca el punto donde se realizó la extracción de RNA. **B)** Grafico semi-logarítmico de las curvas mostradas en A.

El experimento de macroarreglos se llevó a cabo sobre una membrana en la cual solamente se imprimieron los genes del posible regulón *pho*, los genes *dnaK*, *groEL* y *rus* y el sistema *afeI/afeR*. La síntesis de los cDNA marcados se realizó con 4 μ g de RNA total en cada una de las condiciones. En la membrana hibridada con los cDNAs generados a partir del RNA extraído del cultivo crecido en M-Pn se observa a simple vista una inducción de todos los genes *phn*, incluido el ORF que se encuentra río debajo de los genes codificantes para la C-P liasa *phnG-M*, y que codifica para una proteína hipotética (tabla 8).

La cuantificación de los valores de INRX de las señales obtenidas revela que los niveles de transcrito de prácticamente todos los genes *phn* aumentan más de 10 veces cuando los cultivos crecen con 1 mM M-Pn al comparar con los niveles de INRX obtenidas para los cultivos que crecen con 22 mM Pi.

Tabla 8. Cuantificación del aumento de los niveles de transcrito de los genes *phn* de *A. ferrooxidans* durante el crecimiento en M-Pn mediante macroarreglos de DNA. Se comparan los niveles de transcrito en el fosfonato utilizado versus la condición control en presencia de Pi.

Gen	Manchas		Intensidad Relativa Normalizada				Variación de Intensidades M-Pn/Pi
	Pi 22 mM	M-Pn 1mM	Pi 22 mM	CV	M-Pn 1 mM	CV	
<i>phoB</i>			0,030	0,27	0,052	0,34	1,7
<i>phoR</i>			0,014	0,22	0,013	0,38	0,9
<i>pstS1</i>			0,022	0,32	0,015	0,29	0,7
<i>pstC1</i>			0,018	0,19	0,030	0,42	1,7
<i>pstA1</i>			0,037	0,24	0,051	0,29	1,4
<i>pstB1</i>			0,016	0,21	0,021	0,09	1,3
<i>phoU</i>			0,029	0,10	0,050	0,23	1,7
<i>ppx</i>			0,022	0,42	0,017	0,33	0,8
<i>ppk</i>			0,017	0,16	0,061	0,24	3,6
<i>pstS2</i>			0,027	0,40	0,259	0,14	9,6
<i>pstC2</i>			0,016	0,28	0,013	0,19	0,9
<i>pstA2</i>			0,017	0,24	0,020	0,10	1,2
<i>pho84L</i>			0,026	0,07	0,079	0,17	3,1
<i>phnG</i>			0,062	0,13	0,744	0,07	12,1
<i>phnH</i>			0,026	0,08	0,545	0,10	20,6
<i>phnI</i>			0,021	0,31	0,088	0,12	4,1
<i>phnJ</i>			0,021	0,24	0,364	0,18	17,0
<i>phnK</i>			0,150	0,09	0,781	0,05	5,2
<i>phnL</i>			0,060	0,67	1,446	0,13	24,1
<i>phnM</i>			0,026	0,31	0,065	0,20	2,5
<i>hip</i>			0,034	0,14	1,122	0,05	32,8
<i>phnN</i>			0,039	0,08	0,586	0,07	15,2
<i>phnF</i>			0,018	0,21	0,126	0,17	6,9
<i>dnak</i>			0,342	0,14	0,484	0,14	1,4
<i>groEL</i>			0,082	0,44	0,094	0,08	1,1
<i>rus</i>			0,067	0,16	0,110	0,38	1,6
<i>spiked</i>			1,49	0,06	1,121	0,03	

Cuando la bacteria crece con M-Pn, se observa que el nivel de transcrito del gen *pstS2* aumenta cerca de 10 veces, lo que nos sugiere que *A. ferrooxidans* si bien crece en M-Pn, posiblemente se encuentra en una situación de hambruna de Pi.

Para validar los datos anteriormente señalados se midió la expresión de los genes *pho84L*, *phnG* y *phnJ* mediante PCR en tiempo real. Para la síntesis del cDNA correspondiente a cada gen se utilizaron 400 ng de RNA total y la reacción de PCR se realizó en 35 ciclos a partir de una dilución 1/20 del cDNA.

Tabla 9. Cuantificación de los niveles de inducción de los transcritos de los genes *pho84L*, *phnG* y *phnJ* mediante PCR en tiempo real. Se muestran los valores de Ct y la razón del número de copias entre los cDNA provenientes del RNA extraído a partir de células crecidas en M-Pn 1mM versus aquellos RNA provenientes de células crecidas con 22 mM Pi (+Pi).

Gen	Valor de Ct (M-Pn)	Nº copias relativo (M-Pn)	Valor de Ct (+Pi)	Nº copias relativo (+Pi)	Razón* M-Pn/+Pi
<i>pho84L</i>	28,1	4,6 x 10 ⁵	31	9 x 10 ⁴	7,5
<i>phnG</i>	21	9,6 x 10 ⁶	24,9	7,8 x 10 ⁵	7,9
<i>phnJ</i>	20,9	8,1 x 10 ⁶	26,1	2,5 x 10 ⁵	22,6
16S	10,2	6,9 x 10 ⁷	9,5	4,7 x 10 ⁷	1

* Valores normalizados con respecto al RNA 16S

Los valores obtenidos mediante PCR en tiempo real revelan un aumento en los niveles de transcrito de aproximadamente 7, 8 y 23 veces para los genes *pho84L*, *phnG* y *phnJ* respectivamente (tabla 9), mientras que para estos mismos genes la técnica de macroarreglos de DNA mostró un aumento de 3, 12 y 17 veces, respectivamente. Los

resultados nos confirman que los transcritos correspondientes a los genes *phn* se encuentran presentes en una mayor cantidad cuando los cultivos crecen con M-Pn como fuentes únicas de Pi, lo cual sugiere fuertemente que se induce esta vía metabólica.

El patrón conjunto de inducción de la expresión de los genes *phn*, su ligamiento físico y la conservación del orden con respecto a otros genomas de bacteria sugieren la posible existencia de un operón que comprenda al menos los genes desde *phnG* a *phnM* codificantes para la C-P liasa de *A. ferrooxidans*. Para comprobar ello se diseñó un experimento de cotranscripción (figura 17), en el cual la síntesis de cDNA se realizó a partir del mismo RNA proveniente del cultivo en M-Pn 1 mM que se utilizó para el experimento de macroarreglos cuyo resultado se muestra en la tabla 8. El cDNA se sintetizó con un partidador ubicado en el gen *phnM*. La posterior amplificación obtenida por PCR con todas las parejas de partidores para los genes adyacentes cuando utilizamos el cDNA como templado nos indica que los genes que codifican para la C-P liasa de *A. ferrooxidans* se expresan, en nuestras condiciones experimentales, al menos como una unidad transcripcional de siete genes, comprendida desde *phnG* a *phnM*.

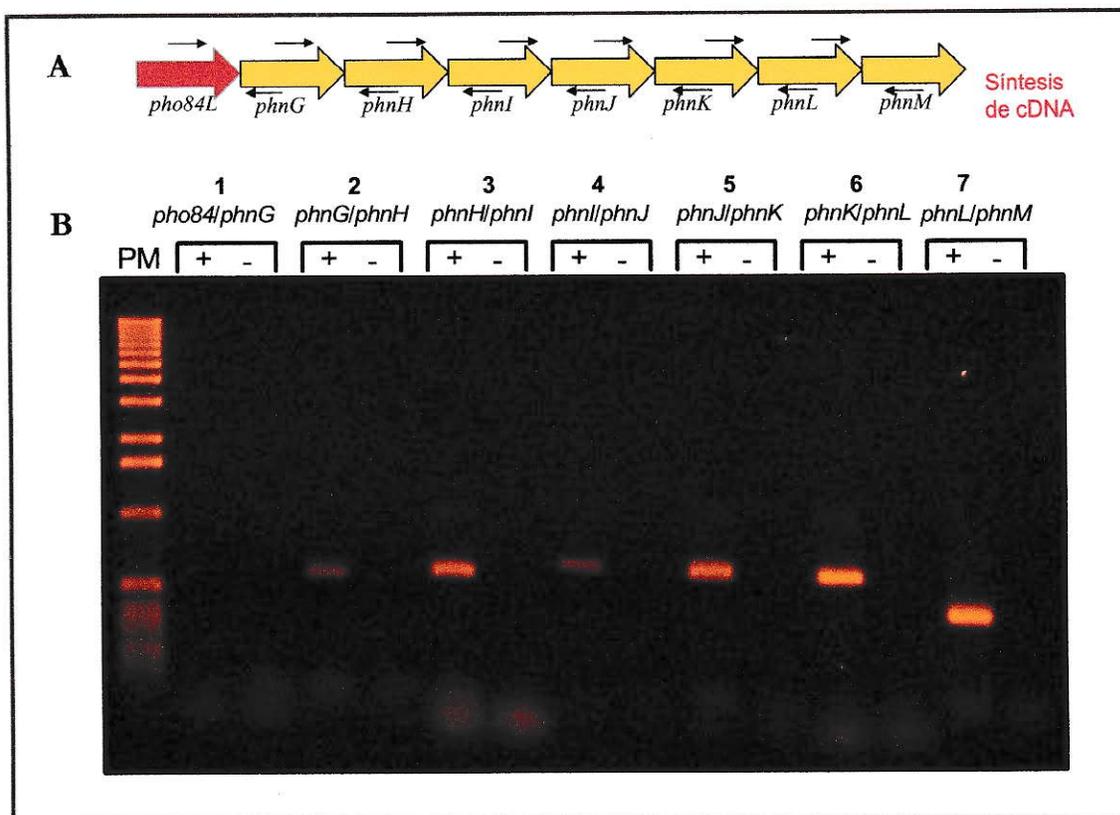


Figura 17. Los genes *phn* de *A. ferrooxidans* se cotranscriben. **A.** La síntesis de cDNA se realizó con el partidor reverso ubicado en el gen *phnM* y 1 μ g de RNA total de *A. ferrooxidans* crecido en M-Pn 1 mM. La amplificación por PCR se realizó con 1 μ L de una dilución 1/20 del cDNA como templado y cada una de las parejas de partidores señaladas, para cada pareja de genes adyacentes se utilizaron los partidores con el R1 y D1 de cada gen (anexo 1), esperándose de tamaños de amplificadas de 633, 615, 642, 714, 704, 674 y 370 pb respectivamente para **B.** Amplificación con las parejas de partidores adyacentes luego de 32 ciclos de PCR. Los signos + y - indican reacción con transcriptasa inversa y sus respectivos controles sin ella.

3.6. Estudio de la relación entre el metabolismo de los poliP y la expresión de los genes del regulón Pho en *A. ferrooxidans*.

Para intentar correlacionar la expresión de los genes del regulón Pho de *A. ferrooxidans* con los cambios en los niveles de poliP se tomaron células de un cultivo crecido en ión ferroso con 0,17 mM Pi y se inocularon en un medio sin Pi. Se midió el crecimiento y se extrajeron y cuantificaron los poliP a los tiempos indicados (Fig. 18).

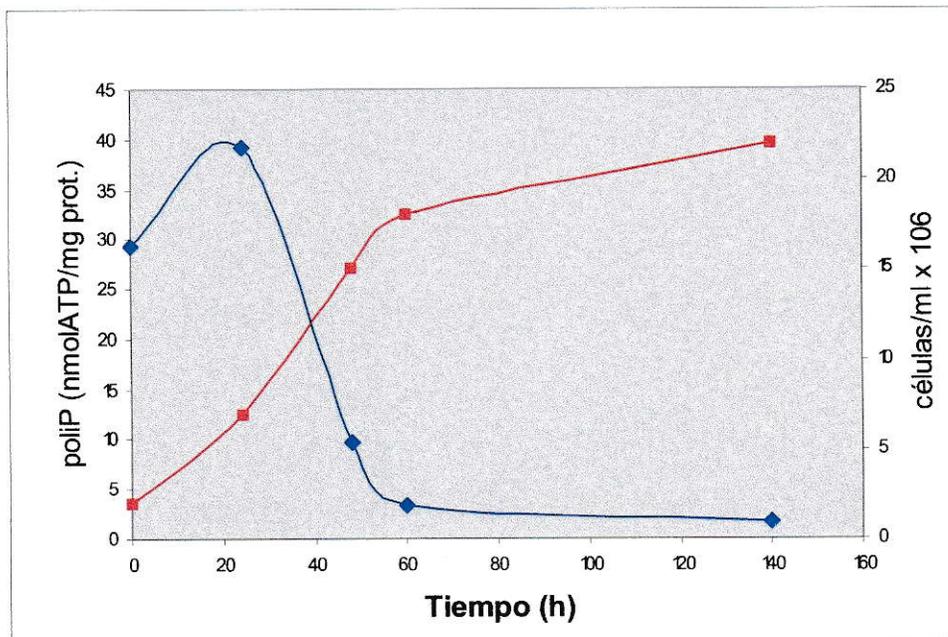


Figura 18. Niveles de poliP durante el crecimiento de *A. ferrooxidans* en medio con ión ferroso y sin Pi. Se inocularon células provenientes de un cultivo con Pi a medio sin Pi, se determinó el crecimiento (en cuadrados rojos) y los niveles de poliP (en rombos azules) a distintos tiempos de la curva de crecimiento.

Al observar la curva de crecimiento en carencia de Pi mostrada en la figura 19 notamos que el cultivo como ya es sabido es capaz de crecer a expensas del poliP durante un traspaso. Cuando medimos los niveles de poliP notamos que a las 60 h ya estos caen casi a cero, lo que nos indica que el poliP se ha utilizado para el crecimiento de *A. ferrooxidans*. Para observar la disminución del contenido de gránulos densos al haz de electrones que corresponden a los poliP, se tomaron fotografías de TEM de las células a tres tiempos del experimento (Fig. 19). Consistentemente con la medición bioquímica de los niveles de poliP notamos en las fotografías tomadas a las 60 y 140 h de crecimiento en medio sin fosfato que las células se alargan y que los gránulos densos al paso de los electrones desaparecen.

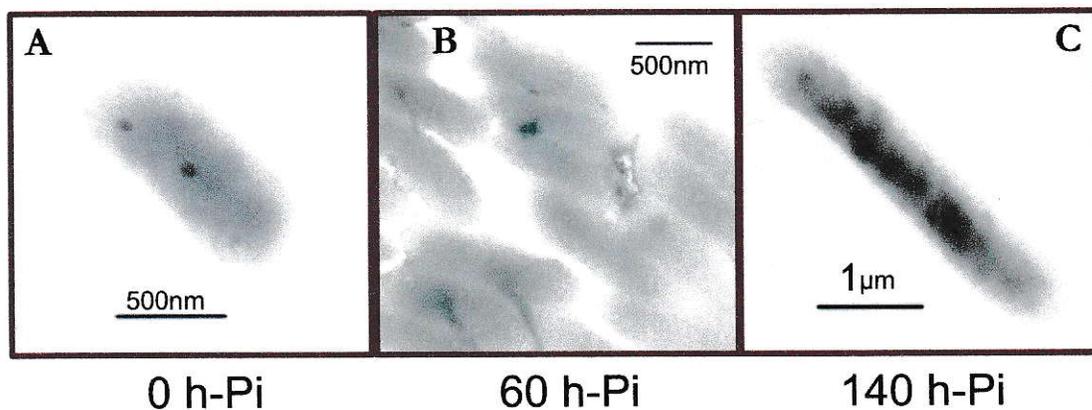


Figura 19. Análisis mediante TEM de la presencia de gránulos de poliP en *A. ferrooxidans* durante su crecimiento en medio sin Pi. Se tomaron fotos a las cero (A), sesenta (B) y ciento cuarenta horas (C) de crecimiento en carencia de Pi.

Para averiguar si existe un cambio en la expresión de los genes *ppk* y *ppx* en los tiempos en los que se degradan los poliP, se midieron los niveles de transcritos para

estos genes mediante PCR en tiempo real. Luego del traspaso de un cultivo crecido en ión ferroso al mismo medio sin Pi. Se extrajo RNA a tres tiempos; 0, 20 y 40 h post-traspaso y se midieron los niveles relativos de transcritos para los genes *ppk*, *ppx* y *pstS2*. (Tabla 10).

Tabla 10. Efecto de la ausencia de Pi sobre los niveles relativos de transcritos para los genes *ppk* y *ppx* (arriba) y *pstS2* y *16S* (abajo), cuantificados mediante PCR en tiempo real. Se muestran los valores de inducción de cada gen relativos al tiempo cero.

Tiempo post traspaso a 0 Pi (h)	<i>ppk</i>			<i>ppx</i>		
	Valor de Ct	Nº Copias relativo	Nivel de inducción	Valor de Ct	Nº Copias relativo	Nivel de inducción
0	28,8	5,3 x 10 ⁴	1	27,8	1,3 x 10 ⁵	1
20	25,5	4,4 x 10 ⁵	10,3	24,3	1,2 x 10 ⁶	11
40	24,4	8,5 x 10 ⁵	15,2	23,2	2,4 x 10 ⁶	17,1
Tiempo post traspaso a 0 Pi (h)	<i>pstS2</i>			<i>16S</i>		
	Valor de Ct	Nº Copias relativo	Nivel de inducción	Valor de Ct	Nº Copias relativo	Nivel de inducción
0	28,2	7,1 x 10 ⁴	1	9,7	6,2 x 10 ⁷	1
20	19,5	1,2 x 10 ⁷	210	10	5 x 10 ⁷	1
40	18,5	2,3 x 10 ⁷	309	9,6	6,6 x 10 ⁷	1

Como se observa en la tabla, el gen *pstS2* es el que muestra un mayor aumento en sus niveles de transcrito en la condición de ausencia de Pi y se utilizó como control positivo de respuesta frente a la ausencia carencia de Pi. Los genes *ppk* y *ppx* también aumentan sus niveles de transcrito a las 20 y 40 h post-traspaso. El aumento de los niveles de transcrito para el gen *ppx*, que codifica para una exopolifosfatasa, es consistente con la caída de los niveles de poliP en la situación de carencia de Pi. El aumento de los niveles de transcripción del gen *ppk*, que codifica para la polifosfato quinasa, podría ser consistente con esta caída de acuerdo al equilibrio que exista entre la síntesis y la degradación del poliP debido a que la PPK puede catalizar la reacción reversa de la síntesis de poliP, generando ATP.

Para averiguar si las células crecidas en fosfonatos son capaces de acumular poliP, se tomaron células en la fase estacionaria de cultivos crecidos en ión ferroso como fuente de energía y M-Pn y E-Pn 1mM como fuentes de Pi y se les determinó el contenido de poliP. Se determinó también el nivel de poliP de un cultivo crecido en ión ferroso con 0,17 mM Pi y de un cultivo sometido a ausencia de Pi durante 72 h (Fig. 20). Se observa que los cultivos crecidos en fosfonatos acumulan un muy bajo nivel de poliP al comparar con el cultivo crecido en presencia de Pi. Esto puede deberse a un problema de disponibilidad de Pi para la síntesis de ATP, que es el principal sustrato a partir del cual se genera el poliP en la célula.

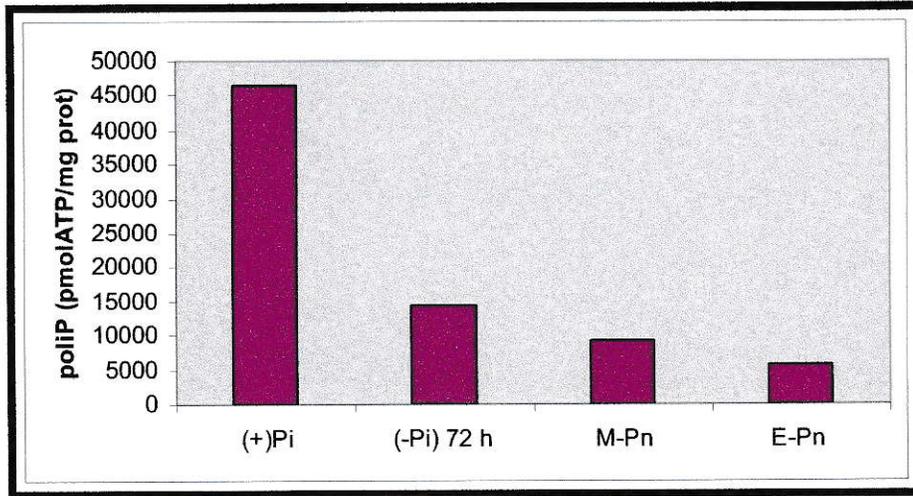


Figura 20. Efecto del crecimiento de *A. ferrooxidans* en fosfonatos sobre los niveles de poliP. De izquierda a derecha se grafican los niveles de poliP para un cultivo crecido con Pi, con 72 h de traspaso a medio sin Pi, un cultivo en M-Pn y un cultivo crecido en E-Pn 1mM. Todos los cultivos contenían ión ferroso como fuente de energía.

Al observar las células crecidas en M-Pn y E-Pn mediante TEM, (Fig. 21), descubrimos que estas no son capaces de acumular gránulos densos al paso de los electrones al compararlas con un cultivo crecido en presencia de Pi.

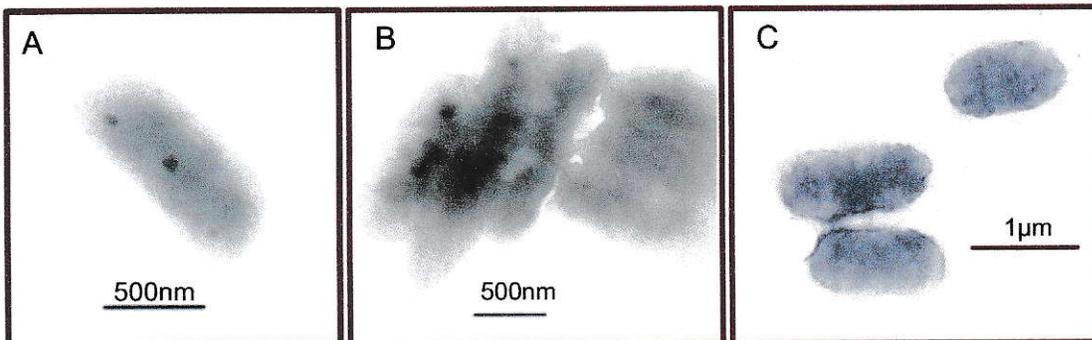


Figura 21. Efecto del crecimiento de *A. ferrooxidans* en fosfonatos sobre la presencia de gránulos de poliP determinados por TEM. Las células se crecieron con Pi (A), M-Pn 1 mM, (B) y E-Pn 1mM (C). En todos los cultivos se empleó ión ferroso como sustrato oxidable.

4. Discusión.

4.1. El Regulón Pho de *A. ferrooxidans*.

En nuestro laboratorio iniciamos la búsqueda de un regulón Pho en *A. ferrooxidans* a partir de la secuencia N-terminal de la Proteína PstS, que fue aislada de un gel bidimensional realizado con las proteínas totales extraídas en condiciones de carencia de Pi (Seeger y Jerez, 1993). A partir de este dato y con la ayuda de la secuencia, en un principio parcial y ahora ya completa del genoma de esta bacteria (www.tigr.org) hemos encontrado genes homólogos al sistema *phoB/phoR*, que se encuentran junto al sistema de transporte Pst, codificado por los genes *pstSCAB-phoU*, el cual es un subgrupo de genes pertenecientes al regulón Pho que se encuentra más ampliamente conservado entre las bacterias. En *A. ferrooxidans* existe la particularidad que el gen *ppx* se encuentra ubicado río abajo del gen *phoU* (Vera y col., 2003). También hemos encontrado que existe una duplicación truncada del sistema Pst que comprende los genes *pstS2C2A2*, y un operón *phn* donde se encuentra codificada la C-P liasa que es la principal enzima responsable de la degradación de fosfonatos en bacteria. También, podrían formar parte de este sistema el transportador de Pi codificado por el gen *pho84L* y la polifosfato quinasa, codificada por el gen *ppk*.

Mediante la técnica de macroarreglos de DNA que se diseñó e implementó en esta tesis hemos mostrado no solo que estos genes se expresan, sino también que sus niveles

de transcritos aumentan cuando las células se someten a una carencia de Pi. Algunos de los datos obtenidos fueron validados mediante la técnica de PCR en tiempo real.

Del análisis de los datos de macroarreglos de DNA observamos que los valores de intensidad de las señales obtenidas en las membranas para los distintos genes estudiados varían en cerca de tres órdenes de magnitud entre la señal más intensa y la menor de ellas. Esto guarda una estrecha relación con los niveles de transcritos existentes para cada uno de los genes presentes en la membrana. Para los genes que se encuentran ubicados en un operón se ha observado que existe variación entre los valores de intensidad de señales de hibridación, lo que podría deberse a la presencia de regiones de alta estructura secundaria en el mRNA que dificulten el acceso al partidor que dirigirá la síntesis del cDNA a su zona de hibridación correspondiente, la posible degradación de los mensajeros policistrónicos y la presencia de promotores internos y de sitios terminadores de la transcripción (Krol y Becker, 2004). Recientemente se ha descrito que para el operón *pstSCAB-phoU* de *Clostridium acetobutylicum* existen dos transcritos, que fueron caracterizados mediante Northern blot. Uno de ellos mide 4,7 kb y corresponde al mensajero de todo el operón, mientras que el otro transcrito de 1,2 kb que codifica solamente para el gen *pstS*, es el más abundante y su nivel aumenta cuando la bacteria es sometida a la carencia de Pi en un quimiostato (Fischer y col., 2006). Es posible entonces que la mayor intensidad observada en las membranas de macroarreglos de DNA para los genes *pstS* y especialmente para el gen *pstS2* de *A. ferrooxidans* sea el reflejo de la existencia de algún tipo de regulación más compleja de los

operones. Futuros experimentos de extensión del partidador y de “Northern blot” con sondas para los distintos genes involucrados nos entregarían una mayor información acerca de la expresión de los genes *pstS* y deberían entonces permitirnos entender mejor la regulación de la transcripción de estos genes.

Nuestros métodos de búsqueda no permitieron definir la existencia en *A. ferrooxidans* de dos de los elementos comunes en los regulones Pho de las bacterias. Dentro de estos, podría esperarse la existencia de marcos de lectura que codifiquen para alguna proteína de membrana externa y para alguna fosfatasa.

Se ha descrito que la proteína PhoB actúa uniéndose a las cajas “*pbo*”, que están en las regiones -35 de los genes que forman parte del regulón Pho (Kimura y col., 1989). En esta tesis hemos encontrado que las secuencias nucleotídicas de las posibles zonas promotoras de los genes *pboB* y *pstS1* de *A. ferrooxidans* tienen un alto nivel de identidad. El sitio de inicio de la transcripción del gen *pboB* da cuenta de la existencia de un promotor que sugiere que esta caja *pbo* sería funcional. Esto nos permitirá utilizar estas dos secuencias conservadas para construir un consenso de posibles cajas *pbo* y realizar un barrido en el genoma de *A. ferrooxidans* con el objeto de encontrar nuevos marcos de lectura abiertos que podrían pertenecer al regulón Pho de esta bacteria y no fueron encontrados en esta tesis.

4.2. Posibles transportadores de Pi en *A. ferrooxidans*.

A. ferrooxidans no posee transportadores de fosfato del tipo Pit, los cuales no discriminan entre Pi y Arseniato. Esto podría contribuir al alto nivel de sobrevivencia de la bacteria en ambientes con iones arseniato.

El gen *pho84L* de *A. ferrooxidans* se ubica río arriba de los genes *phn* en este microorganismo. Este codifica para una proteína homóloga a la Pho84, uno de los sistemas transportadores de Pi de *S. cerevisiae*, que funciona en condiciones ambientales ácidas (pH 4,5) en esta levadura. Pho84 pertenece a la “MFS”, que se caracterizan por funcionar potencialmente como sistemas bidireccionales de transporte (Persson y col., 2003). El análisis de los genomas disponibles de otros organismos acidófilos, arqueas acidófilas para ser más precisos, con respecto a los probables sistemas transportadores de Pi mostró como resultado la existencia en todos ellos de transportadores del tipo Pho84 (Álvarez y Jerez, 2004). Este hallazgo reafirma a Pho84L como un probable transportador de Pi perteneciente a la MFS en el acidófilo extremo *A. ferrooxidans*. La presencia de dos genes *pstS* funcionales, de los cuales el gen *pstS2* es el que más se induce en la condición de carencia de Pi puede dar cuenta de una adaptación evolutiva de esta bacteria para sobrevivir en ambientes oligotróficos de fosfato. El gen *pstS2* no se ubica en el operón *pst* canónico encontrado en todas las bacterias que poseen el regulón Pho y es el que presenta un menor porcentaje de identidad de secuencia a nivel proteico con la *PstS* de *E. coli*. Al analizar en la base de datos de COGs de NCBI observamos que se encuentran genes homólogos a *pstS* en genomas de organismos

pertenecientes a los dominios Archaea y Bacteria, encontrándose parálogos de *pstS* en los genomas de las arqueas *Halobacterium* sp., *Methanobacterium thermoautotrophicum* y en los genomas de las bacterias *Lactococcus lactis*, *Synechocystis* sp., *Escherichia coli* O157:H7 y EDL933, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Mycobacterium leprae* y *Mycobacterium tuberculosis*. En este último microorganismo se ha mostrado que existen tres genes *pstS* y mediante anticuerpos monoclonales se ha mostrado que las proteínas PstS se encuentran en la superficie de *Mycobacterium bovis* (Lefevre y col., 1997). Según estos autores, las duplicaciones del gen *pstS* en el género *Mycobacterium* podrían dar cuenta de una adaptación de este patógeno intracelular a la carencia de fosfato en sus ambientes alternativos de crecimiento, como citoplasma, fagosomas y lisosomas, donde la concentraciones de Pi y el pH pueden variar. Además, recientemente se ha reportado que el genoma del diazótrofo marino *Crocospaera watsonii* existen tres copias del gen *pstS*. Si bien no se han realizado estudios de la expresión de estos genes en el transcurso del tiempo, uno de los genes mostró un aumento en los niveles de transcrito en condiciones de carencia de Pi (Dyhrman y Haley, 2006).

4.3. Metabolismo de los poliP.

Los genes relacionados con el metabolismo de los poliP en *A. ferrooxidans* muestran una organización muy diferente a la presente en otras bacterias. El gen *ppk* está alejado del gen *ppx* en el genoma y en esta tesis se ha mostrado que se transcribe como una unidad transcripcional monocistrónica, mientras que los genes del sistema *phoBR-pstSCAB-phoU-ppx* se transcribirían juntos, al menos como una unidad transcripcional

de ocho genes. Hemos demostrado que existe un aumento de cerca de 9 y 18 veces en los niveles de transcritos del gen *ppx* a las 20 h y 40 h post traspaso al mismo medio sin Pi. Este aumento se correlaciona con la caída de los niveles de los poliP durante la respuesta a la carencia de Pi y por ende, permite posicionar a los poliP dentro del modelo de respuesta a la carencia de Pi de *A. ferrooxidans* (Fig. 22), ya que al aumentar la actividad PPX se generaría Pi a partir de poliP, el cual podría utilizarse para el crecimiento. En nuestro laboratorio se ha mostrado previamente que la actividad PPX aumenta en células crecidas sin Pi y, mediante “Western blot”, se ha detectado una mayor cantidad de la proteína PPX de *A. ferrooxidans* cuando las células se crecieron en ausencia de Pi (Álvarez, 2003). Estos resultados no excluyen la posibilidad de que haya regulaciones postraduccionales de la actividad catalítica, además de la regulación transcripcional, mediada, por ejemplo por metabolitos como el (p)ppGpp.

Cuando se traspasa un cultivo de *A. ferrooxidans* a un medio sin Pi ocurre una rápida degradación del poliP, lo que indica que en estas condiciones sus funciones son principalmente energéticas. La desaparición del poliP podría deberse **i)** a la actividad reversa de la PPK, pudiendo en este caso actuar como fuente de ATP en caso que la carencia de Pi genere una disminución en la concentración de ATP citoplasmática o **ii)** a la actividad exopolifosfatasa de la PPX, que como se mencionó anteriormente, generaría una disminución de los niveles de poliP producto de la hidrólisis, formando así un aumento de la cantidad de Pi, que podría utilizarse para la síntesis de ATP o para un transporte hacia el medio extracelular.

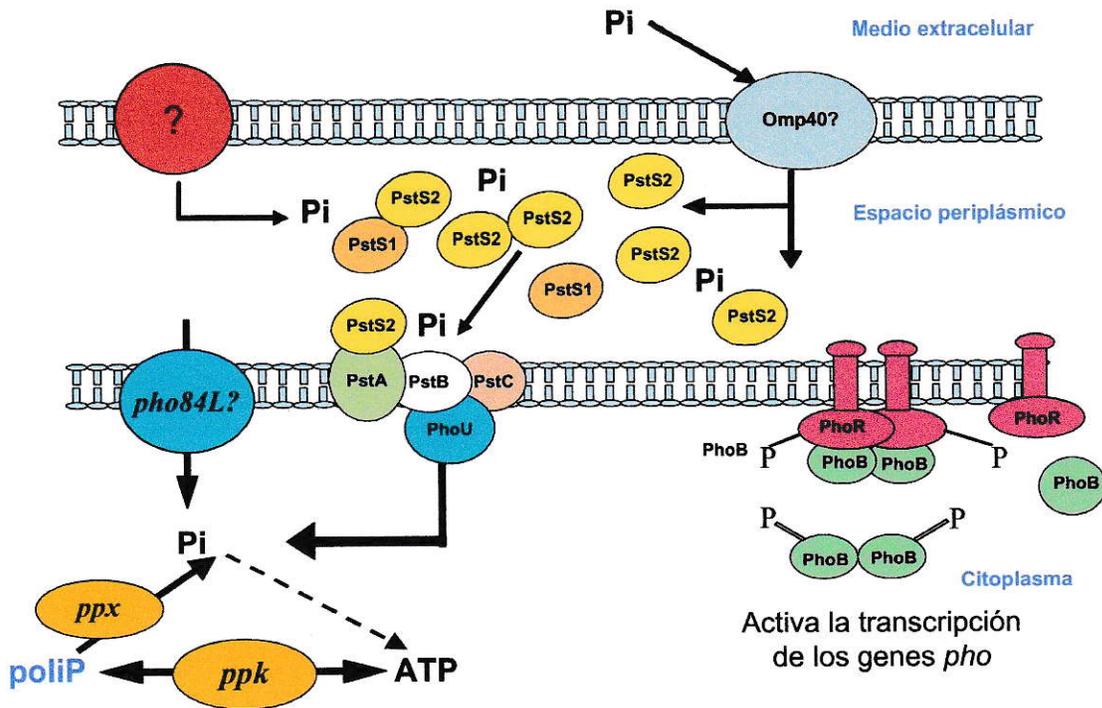


Figura 22. Esquema hipotético del metabolismo del Pi en *A. ferrooxidans*. El transporte de Pi a través de la membrana externa podría estar dado por la porina de membrana externa Omp 40 o alguna otra proteína que se encuentre bajo el control del regulón Pho. Por otro lado, para pasar la membrana interna, el Pi podría ser transportado por dos sistemas de acuerdo a su biodisponibilidad. Cuando haya fosfato suficiente, la proteína Pho84 podría contribuir al transporte de Pi, actuando en simporte con protones. En condiciones de carencia de Pi, éste sería captado en el periplasma por las proteínas PstS. Especialmente la PstS2, que se expresa en una mayor cantidad. Estas conducirían el Pi hasta el sistema de transporte activo Pst, en el cual las funciones de las proteínas PstA y PstC podrían ser cumplidas tanto por PstA1 y PstC1 como por PstA2 y PstC2. La condición de carencia de Pi activaría la expresión de estos genes a través de la activación del sistema de dos componentes formado por PhoB/PhoR. La degradación de los poliP podría estar dada por la actividad PPK en condiciones de carencia de ATP o por la actividad exopolifosfatasa de la PPX en condiciones de carencia de Pi, donde la expresión del regulón Pho tendría una influencia positiva en los niveles de expresión del gen *ppx*.

E. coli acumula poliP al inicio de la fase logarítmica de crecimiento y en la fase estacionaria. Cuando un cultivo pasa a la fase exponencial de la curva de crecimiento, el nivel intracelular de poliP cae entre 5 y 10 veces. La dinámica de acumulación y utilización del poliP muestra sin duda que las funciones prioritarias del poliP deben ser como fuente de energía y como fuente de Pi. La asociación de la acumulación de poliP con la limitación de algunos nutrientes e inclusive en situaciones de estrés, que son acompañadas de cambios bruscos en condiciones ambientales sugiere que probablemente el poliP sea un enlace entre estas situaciones y los sistemas globales de respuesta. Productos relacionados con el poliP, guanosinas tetra y pentafofato pueden proveer estas funciones. Se ha demostrado que bajo ciertas condiciones de estrés, las guanosinas tetrafofato pueden inhibir la degradación hidrolítica del poliP debido a que actúan como inhibidores de la PPX, sin afectar la función de la PPK en *E. coli* (Kornberg y col., 1999). Se ha descrito que en esta bacteria los genes *ppk* y *ppx* no forman parte del regulón Pho debido a que fusiones traduccionales con el gen *lacZ* no condijeron a un aumento de la actividad β -galactosidasa en condiciones de carencia de Pi (Morohoshi y col., 2002). Al contrario, nuestros datos sugieren que en *A. ferrooxidans* el metabolismo del poliP se encuentra ligado a la expresión del regulón Pho.

Cabe mencionar que en *Acinetobacter sp.* ADP1, el cual es un organismo acumulador de poliP, se ha demostrado que el gen *ppk* tiene 2 promotores y que uno de ellos es inducible en carencia de fosfato, aunque no se ha encontrado en este organismo una secuencia tipo caja *pho* en su región promotora (Geissdorfer y col., 1998).

4.4. Metabolismo de los fosfonatos en *A. ferrooxidans*.

En esta tesis se ha mostrado también la presencia de los genes *phnG-M*, codificantes para la C-P liasa que ha sido descrita en *E. coli* y en otras bacterias como la principal enzima involucrada en la degradación de los fosfonatos debido a su amplio rango de sustratos, que comprende desde alquil hasta aril fosfonatos (Kononova y Nesmeyanova, 2002; Parker y col., 1999; Ternan y col., 1998). Mediante la técnica de macroarreglos de DNA hemos observado un aumento leve de los niveles de transcritos de estos genes en carencia de Pi. Sin embargo, su mayor aumento (entre 10-20 veces), se observó cuando el RNA se extrajo de células que se encontraban en la fase exponencial de la curva de crecimiento con M-Pn 1 mM como fuente única de Pi (Fig. 19). Basándonos en los resultados obtenidos, proponemos un esquema hipotético del metabolismo de fosfonatos en *A. ferrooxidans* (Figura 23).

Al analizar en detalle la organización física del operón *phn* de *A. ferrooxidans* se observan algunas diferencias con respecto al operón *phn* de *E. coli* (Fig. 4): **(i)** Los genes *phnCDE* no están en *A. ferrooxidans*. En *E. coli* estos forman parte de un sistema de unión y transporte (Metcalf y Wanner, 1993), que posee no solo la capacidad de transportar fosfonatos, sino también ésteres de fosfato, fosfito y fosfato no se encuentran presentes en el genoma de *A. ferrooxidans*. Mediante el estudio de deleciones en el operón *phn* que mantuvieran el fenotipo de la actividad de la C-P liasa se llegó a la conclusión de que los genes *phnCDE* no son esenciales y que la ruptura del enlace C-P podría ocurrir en la superficie de la membrana interna, liberando el compuesto

carbonado al periplasma, lo que confirma las observaciones que *E. coli* no puede utilizar fosfonatos como fuentes únicas de carbono (Yakovleva y col., 1998).

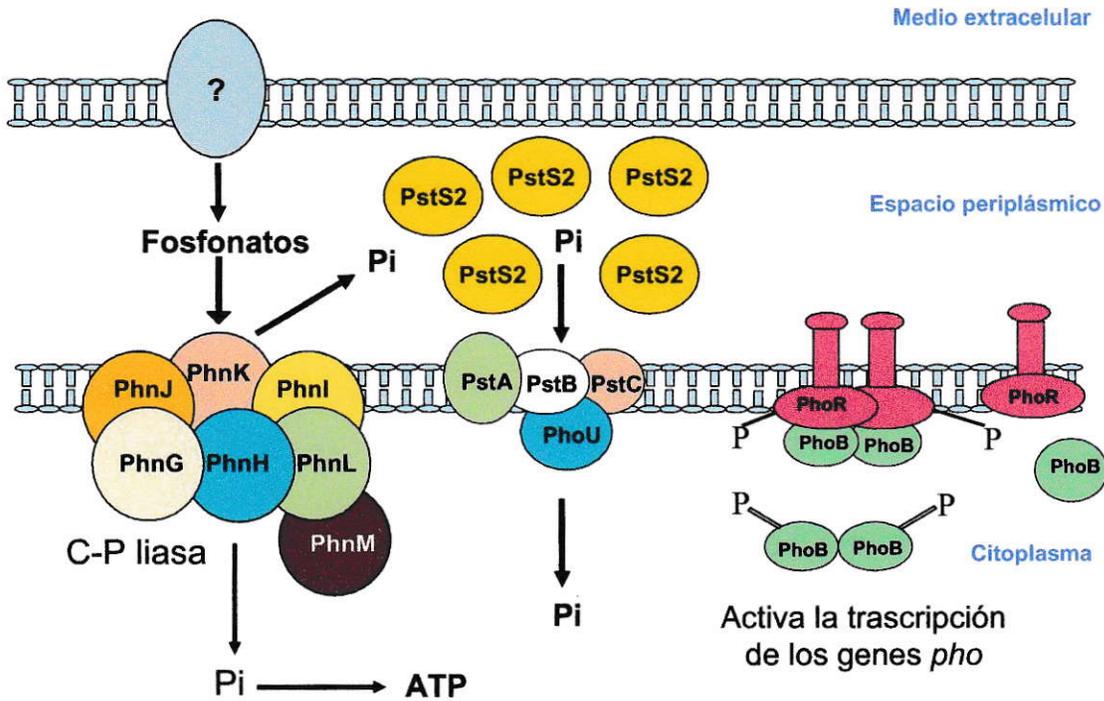


Figura 23. Esquema hipotético del metabolismo de fosfonatos en *A. ferrooxidans*. En condiciones de carencia de Pi se activaría el regulón Pho, el cual induciría la expresión de los genes *phn*, así como del gen *pstS2*. A nivel de la membrana interna, la actividad fosfonatasa del complejo de la C-P liasa permitiría liberar Pi, que podría ser transportado directamente hacia el citoplasma o desde el periplasma hacia el citoplasma por un sistema de alta afinidad de tipo Pst. El rol de la proteína PhnF no se encuentra dilucidado, pero podría actuar como un regulador transcripcional que mantenga la expresión del operón *phn* en presencia de fosfonatos.

ii) En *A. ferrooxidans* el gen *phnF* se encuentra al final del operón *phn*. El análisis de la secuencia de PhnF ha mostrado que presenta un motivo HTH, por lo que se ha sugerido que esta podría ser un regulador transcripcional. En *E. coli* el gen *phnF* se ubica río arriba de los genes de la C-P liasa (*phnG-M*) en *E. coli*. iii) En *A. ferrooxidans* no

existen genes homólogos a los genes *phnO* y *phnP* de *E. coli*. El gen *phnO* de *E. coli* codifica para una proteína que tiene secuencias en común con proteínas regulatorias y el gen *phnP* codifica para una proteína accesoria no esencial para la actividad C-P liasa. **iv)** En *A. ferrooxidans*, inmediatamente río abajo de los genes *phnG-M*, codificantes para la C-P liasa y antes de los genes *phnN* y *phnF* de existe un marco abierto de lectura codificante para una proteína hipotética. Si bien hemos demostrado que los genes *phnG-M* se expresan al menos como un operón en *A. ferrooxidans* (Fig. 17), los valores de inducción de los niveles de transcrito para el gen codificante para esta proteína hipotética, así como para los genes *phnN* y *phnF* no nos permiten descartar la posibilidad que en *A. ferrooxidans* estos tres genes sean parte de la misma unidad transcripcional. Un estudio realizado recientemente en todos los genomas completos de bacterias que poseen genes para la degradación de fosfonatos ha mostrado que el grupo de los siete genes que conforman la C-P liasa (*phnG-M*), es el que se encuentra mas ampliamente conservado a nivel del ordenamiento físico de los genes *phn* (Huang y col., 2005).

La capacidad de degradar fosfonatos le puede conferir una ventaja adaptativa a *A. ferrooxidans* para la colonización de ambientes oligotróficos frente a otras bacterias que no posean la capacidad de crecer en fosfonatos debido a que podría tener acceso a una fuente de fosfato único. Recientemente, se ha mostrado que en el genoma de la cianobacteria diazótrofa *Trichodesmium erythraeum* están presentes los genes *phn*. Dhyrman y cols. (2006) han mostrado que estos genes le conferirían la capacidad de

degradar los fosfonatos presentes en los ambientes marinos debido a que la medición de la expresión de los genes *phnD* y *phnJ* de bacterias aisladas desde “blooms” marinos mostró un mayor nivel de expresión de estos genes al compararlos con controles crecidos en el laboratorio en presencia de Pi. La C-P liasa no se encuentra codificada en los genomas de otras cianobacterias y la capacidad única de consumir fosfonatos explicaría en parte la prevalencia de este microorganismo en ambientes oligotróficos marinos donde el Pi se encuentra en concentraciones del orden de nanomolar (Dyhrman y col., 2006).

Se hace interesante investigar sobre la capacidad degradativa de fosfonatos en otros microorganismos que comparten el hábitat natural de *A. ferrooxidans*. Una búsqueda de genes ortólogos a los del operón *phn* en la bacteria *Ferroplasma acidarmanus* realizada en el marco de esta tesis dio resultados negativos. Se necesitarán más secuencias genómicas de microorganismos presentes en ambientes biohidrometalúrgicos para inferir sobre las capacidades degradativas de fosfonatos y determinar si esta es una característica única de *A. ferrooxidans*.

5. Conclusiones.

Se ha diseñado y validado la construcción de un macroarreglo de genes de *A. ferrooxidans* y se ha iniciado la caracterización del regulón Pho de *A. ferrooxidans* a nivel transcripcional. Hemos mostrado que los genes del regulón Pho de *A. ferrooxidans* se expresan y que sus niveles de transcritos aumentan en condiciones de carencia de Pi.

De los dos genes *pstS* de *A. ferrooxidans*, el gen *pstS2* es el que muestra un mayor nivel de aumento de los niveles de transcrito en la condición de carencia de Pi. La presencia de dos genes *pstS* funcionales puede dar cuenta de una adaptación evolutiva de esta bacteria para sobrevivir en ambientes oligotróficos de fosfato, así como también podría indicarnos que en una situación de carencia de Pi, la unión y el transporte de este ión puede estar dado exclusivamente por sistemas del tipo Pst .

La presencia del gen codificante para una proteína homóloga a la Pho84 de levaduras, que justamente se encuentra ubicado río arriba del operón *pbn* sugiere la presencia de otra capacidad de internalizar fosfato u organofosfatos. En condiciones de presencia de Pi, el transporte de este ión pudiese estar siendo realizado mayoritariamente por esta proteína.

A. ferrooxidans es una bacteria acumuladora de poliP. Estos son consumidos al existir carencia de Pi y hemos mostrado que en *A. ferrooxidans* el metabolismo de este polímero está relacionado con la expresión del regulón Pho debido a que el gen *ppx*, que codifica

para la exopolifosfatasa es cotranscrito con los genes del regulón Pho y su expresión aumenta cuando las células son sometidas a la carencia de Pi.

A. ferrooxidans posee la capacidad de crecer en fosfonatos como fuentes únicas de Pi. La presencia de los genes *phn* en *A. ferrooxidans* puede conferirle una ventaja adaptativa frente a otras bacterias que no posean la capacidad de crecer en fosfonatos en la colonización de ambientes oligotróficos, debido a que podría metabolizar una fuente de fosfato alternativa.

6. Referencias

- Abe, F. y Horikoshi, K. (2001). The biotechnological potential of piezophiles. *Trends Biotechnol.* 19, 102-108.
- Acevedo, F., Gentina, J.C. y Bustos, S. (1993). Bioleaching of minerals - a valid alternative for developing countries. *J. Biotechnol.* 31, 115-123.
- Ahn, K. y Kornberg, A. (1990). Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. Purification and demonstration of a phosphoenzyme intermediate. *J. Biol. Chem.* 265, 11734-11739.
- Akiyama, M., Crooke, E. y Kornberg, A. (1992). The polyphosphate kinase gene of *Escherichia coli*. Isolation and sequence of the *ppk* gene and membrane location of the protein. *J. Biol. Chem.* 267, 22556-25561.
- Akiyama, M., Crooke, E. y Kornberg, A. (1993). An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its *ppx* gene in a polyphosphate operon. *J. Biol. Chem.* 268, 633-639.
- 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. *Nucleic Acids Res.* 25, 3389-3402.
- Alvarez, S., Vera, M., Jerez, C. A. y Guiliani, N. (2001). Polyphosphates, polyphosphate kinase activity and *ppk* gene in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 19859. *Biohydrometallurgy: Fundamentals, Technology and Sustainable Development, Part A*. Ciminelli V., and García O. (Eds.). pp. 355-362. Elsevier.
- Alvarez, S. (2003) Metabolismo de los polifosfatos inorgánicos en *Acidithiobacillus ferrooxidans*: Posible papel en la respuesta de adaptación frente a la carencia de fosfato y en la tolerancia a iones de metales pesados. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad de Chile.

- Alvarez, S. y Jerez, C.A. (2004). Copper ions stimulate polyphosphate degradation and phosphate efflux in *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 5177-5182.
- Ault-Riché, D., Fraley, C.D., Tzeng, C.M. y Kornberg, A. (1998). Novel assay reveals multiple pathways regulating stress-induced accumulations of inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 180, 1841-1847.
- Blum, E., Py, B., Carpousis, A.J. y Higgins, C.F. (1997). Polyphosphate kinase is a component of the *Escherichia coli* RNA degradosome. *Mol. Microbiol.* 26, 387-398.
- Das, S., Lengweiler, U.D., Seebach, D. y Reusch, R.N. (1997). Proof for a nonproteinaceous calcium-selective channel in *Escherichia coli* by total synthesis from (R)-3-hydroxybutanoic acid and inorganic polyphosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 9075-9079.
- Dopson, M., Baker-Austin, C., Koppineedi, P.R. y Bond, P.L. (2003). Growth in sulfidic mineral environments: metal resistance mechanisms in acidophilic microorganisms. *Microbiology* 149, 1959-1970.
- Dyhrman, S.T. y Haley, S.T. (2006). Phosphorus scavenging in the unicellular marine diazotroph *Crocospaera watsonii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1452-1458.
- Dyhrman, S.T., Chappell, P.D., Haley, S.T., Moffett, J.W., Orchard, E.D., Waterbury, J.B. y Webb, E.A. (2006). Phosphonate utilization by the globally important marine diazotroph *Trichodesmium*. *Nature* 439, 68-71.
- Fischer, R.J., Oehmcke, S., Meyer, U., Mix, M., Schwarz, K., Fiedler, T. y Bahl, H. (2006). Transcription of the *pst* operon of *Clostridium acetobutylicum* is dependent on Phosphate Concentration and pH. *J. Bacteriol.* 188, 5469-5478.
- Geissdorfer, W., Ratajczak, A. y Hillen, W. (1998). Transcription of *ppk* from *Acinetobacter sp. strain ADP1*, encoding a putative polyphosphate kinase, is induced by phosphate starvation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 896-901.

- Gentina, J.C., Acevedo, F. (1985). Microbial ore leaching in developing countries. *Trends Biotechnol.* 3, 86-89.
- Gonzalez, H. y Jensen, T.E. (1998). Nickel sequestering by polyphosphate bodies in *Staphylococcus aureus*. *Microbios.* 93, 179-185.
- 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, 2179-2187.
- Huang, J., Su, Z. y Xu, Y. (2005). The evolution of microbial phosphonate degradative pathways. *J. Mol. Evol.* 61, 682-690.
- Hutchins, S.R., Davidson, M.S., Brierley, J.A. y Brierley, C.L. (1986). Microorganisms in reclamation of metals. *Annu. Rev. Microbiol.* 40, 311-336.
- Johnson, D.B. (1998). Biodiversity and ecology of acidophilic microorganisms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 27, 307-317.
- Johnson, D.B. y Hallberg, K.B. (2005). Acid mine drainage remediation options: a review. *Sci. Total Environ.* 338, 3-14.
- Keasling, J.D. (1997). Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 829, 242-249.
- Keasling, J.D., Van Dien, S.J., Trelstad, P., Renninger, N. y McMahon, K. (2000). Application of polyphosphate metabolism to environmental and biotechnological problems. *Biochemistry (Mosc.)* 65, 324-331.
- Kimura, S., Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M. y Nakata, A. (1989). Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*: characterization of the promoter of the *pstS* gene. *Mol. Gen. Genet.* 215, 374-380.
- Kononova, S.V. y Nesmeyanova, M.A. (2002). Phosphonates and their degradation by microorganisms. *Biochemistry (Mosc.)* 67, 184-195.

- Kornberg, A., Rao, N.N. y Ault-Riché, D. (1999). Inorganic polyphosphate: a molecule of many functions. *Annu. Rev. Biochem.* 68, 89-125.
- Krol, E. y Becker, A. (2004). Global transcriptional analysis of the phosphate starvation response in *Sinorhizobium meliloti* strains 1021 and 2011. *Mol. Genet. Genomics* 272, 1-17.
- Kulaev, I. y Kulakovskaya, T. (2000). Polyphosphate and phosphate pump. *Annu. Rev. Microbiol.* 54, 709-734.
- Kuroda, A. y Kornberg, A. (1997). Polyphosphate kinase as a nucleoside diphosphate kinase in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 439-442.
- Kusano, S. y Ishihama, A. (1997). Functional interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase with inorganic polyphosphate. *Genes Cells* 2, 433-441.
- Lefevre, P., Braibant, M., de Wit, L., Kalai, M., Roeper, D., Grotzinger, J., Delville, J.P., Peirs, P., Ooms, J., Huygen, K. y Content, J. (1997). Three different putative phosphate transport receptors are encoded by the *Mycobacterium tuberculosis* genome and are present at the surface of *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Bacteriol.* 179, 2900-2906.
- Luecke, H. y Quijcho, F.A. (1990). High specificity of a phosphate transport protein determined by hydrogen bonds. *Nature* 347, 402-406.
- Makino, K., Shinagawa, H. y Nakata, A. (1984). Cloning and characterization of the alkaline phosphatase positive regulatory gene (*phoM*) of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 195, 381-390.
- Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M., Kimura, S., Nakata, A. y Ishihama, A. (1988). Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*. Activation of *pstS* transcription by PhoB protein in vitro. *J. Mol. Biol.* 203, 85-95.
- McCleary, W.R. (1996). The activation of PhoB by acetylphosphate. *Mol. Microbiol.* 20, 1155-1163.

- Metcalf, W.W. y Wanner, B.L. (1993). Evidence for a fourteen-gene, *phnC* to *phnP* locus for phosphonate metabolism in *Escherichia coli*. *Gene* 129, 27-32.
- Metcalf, W.W., Steed, P.M. y Wanner, B.L. (1990). Identification of phosphate starvation-inducible genes in *Escherichia coli* K-12 by DNA sequence analysis of *psi:lacZ*(Mu d1) transcriptional fusions. *J. Bacteriol.* 172, 3191-3200.
- Norris, P.R.y.J., D.B. (1998). Acidophilic microorganisms. En K. Horikoshi y W.D. Grant (eds.), *Extremophiles. Microbial life in extreme environments.* pp. 133-153. Wiley-Liss, New York.
- Ogawa, N., Tzeng, C.M., Fraley, C.D. y Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate in *Vibrio cholerae*: genetic, biochemical, and physiologic features. *J. Bacteriol.* 182, 6687-6693.
- Olson, G.J., Brierley, J.A. y Brierley, C.L. (2003). Bioleaching review part B: progress in bioleaching: applications of microbial processes by the minerals industries. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 63, 249-257.
- Parker, G.F., Higgins, T.P., Hawkes, T. y Robson, R.L. (1999). *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) meliloti *phn* genes: characterization and identification of their protein products. *J. Bacteriol.* 181, 389-395.
- Persson, B.L., Lagerstedt, J.O., Pratt, J.R., Pattison-Granberg, J., Lundh, K., Shokrollahzadeh, S. y Lundh, F. (2003). Regulation of phosphate acquisition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* 43, 225-244.
- Rashid, M.H. y Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate is needed for swimming, swarming, and twitching motilities of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 4885-4890.
- Rashid, M.H., Rao, N.N. y Kornberg, A. (2000). Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. *J. Bacteriol.* 182, 225-227.
- Rawlings, D.E. (1997). *Biomining: Theory, microbes and industrial processes.* Springer Verlag, Germany.

- 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.
- Reusch, R.N. (2000). Transmembrane ion transport by polyphosphate/poly-(R)-3-hydroxybutyrate complexes. *Biochemistry (Mosc.)* 65, 280-295.
- 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, 239-248.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, N.Y.
- Schweizer, H. y Boos, W. (1985). Regulation of *ugp*, the sn-glycerol-3-phosphate transport system of *Escherichia coli* K-12 that is part of the *pho* regulon. *J. Bacteriol.* 163, 392-394.
- Seeger, M. y Jerez, C.A. (1993). Phosphate-starvation induced changes in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Lett.* 108, 35-41.
- Shiba, T., Tsutsumi, K., Yano, H., Ihara, Y., Kameda, A., Tanaka, K., Takahashi, H., Munekata, M., Rao, N.N. y Kornberg, A. (1997). Inorganic polyphosphate and the induction of *rpoS* expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 11210-11215.
- Ternan, N., Mc Grath, J., Mc Mullan, G. & Quinn, J. (1998). Review: Organophosphonates: occurrence, synthesis and biodegradation by microorganisms. *World journal of Microbiology & Biotechnology* 14, 635-647.
- Ternan, N.G. y Quinn, J.P. (1998). In vitro cleavage of the carbon-phosphorus bond of phosphonopyruvate by cell extracts of an environmental *Burkholderia cepacia* isolate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248, 378-381.

- Tinsley, C.R. y Gotschlich, E.C. (1995). Cloning and characterization of the meningococcal polyphosphate kinase gene: production of polyphosphate synthesis mutants. *Infect. Immun.* 63, 1624-1630.
- Tsutsumi, K., Munekata, M. y Shiba, T. (2000). Involvement of inorganic polyphosphate in expression of SOS genes. *Biochim. Biophys. Acta* 1493, 73-81.
- Tuovinen, O. (1990). Biological fundamentals of mineral leaching processes, p. 55-77. In H.L. Ehrlich and C.L. Brierley (Eds.), *Microbial mineral recovery*. McGraw-Hill Book, N.Y.
- Tzeng, C.M. y Kornberg, A. (1998). Polyphosphate kinase is highly conserved in many bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.* 29, 381-382.
- van Veen, H.W. (1997). Phosphate transport in prokaryotes: molecules, mediators and mechanisms. *Antonie Van Leeuwenhoek* 72, 299-315.
- Vera, M., Guiliani, N., & Jerez, C.A. (2003). Proteomic and genomic analysis of the phosphate starvation response of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Hydrometallurgy* 71, 125-132.
- Wackett, L.P., Shames, S.L., Venditti, C.P. y Walsh, C.T. (1987a). Bacterial carbon-phosphorus lyase: products, rates, and regulation of phosphonic and phosphinic acid metabolism. *J. Bacteriol.* 169, 710-717.
- Wackett, L.P., Wanner, B.L., Venditti, C.P. y Walsh, C.T. (1987b). Involvement of the phosphate regulon and the *psiD* locus in carbon-phosphorus lyase activity of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 169, 1753-1766.
- Wang, X., Ghosh, S. y Guo, S.W. (2001). Quantitative quality control in microarray image processing and data acquisition. *Nucl. Acid. Res.* 29, e-75.
- Wanner, B.L. (1992). Genes for phosphonate biodegradation in *Escherichia coli*. *SAAS. Bull. Biochem. Biotechnol.* 5, 1-6.
- Wanner, B.L. (1994). Molecular genetics of carbon-phosphorus bond cleavage in bacteria. *Biodegradation* 5, 175-184.

Referencias

- Wanner, B.L. (1996a). Phosphorus assimilation and control of phosphate regulon., p. 1357-1381. En F.C. Neidhardt, R. Curtiss III, J.L. Ingraham, E.C.C. Lin, K.B. Low, B. Magasanik, W.S. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter and H.E. Umbarger (ed.), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, Second Edition, vol. I. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Wanner, B.L. (1996b). Signal transduction in the control of phosphate-regulated genes of *Escherichia coli*. *Kidney Int.* 49, 964-967.
- Wanner, B.L. y Chang, B.D. (1987). The *phoBR* operon in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 169, 5569-5574.
- Yakovleva, G.M., Kim, S.K. y Wanner, B.L. (1998). Phosphate-independent expression of the carbon-phosphorus lyase activity of *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 573-578.
- Zago, A., Chugani, S. y Chakrabarty, A.M. (1999). Cloning and characterization of polyphosphate kinase and exopolyphosphatase genes from *Pseudoonas aeruina* 8830. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2065-2071.

Anexo 1

Tabla 11. Oligonucleótidos utilizados en esta tesis.

Nombre	Secuencia
AfDnaK-N	5' atggctaaagtgatcgga 3'
AfDnaK-R1	5' gcacttcaaactgggtgtt 3'
AfGroEL-N	5' atgccagccaaacaagta 3'
AfGroEL-R1	5' tagggattctccagttcg 3'
Af-phoB-N	5' ggacgaagacaaggtatc 3'
Af-phoB-R1	5' aagcggcgaatgtggacgt 3'
Af-phoB-D1	5' ttgtgaccaatccggaac 3'
Af-phoR-N	5' ctctgggcggttgattcca 3'
Af-phoR-R1	5' aagtctgacggacctgt 3'
Af-phoR-D1	5' gcgtttttatcgggtgga 3'
Af-pstS1-N	5' tgaagatcaaggggtgtg 3'
Af-pstS1-R1	5' tgtacatatgcccgcgacg 3'
Af-pstS1-D1	5' cgctggttcctgacagcc 3'
Af-pstS2-N	5' atgctgcatcgcttgaag 3'
Af-pstS2-R1	5' tattgctccatgcagggg 3'
Af-pstS2-D1	5' tgcgccacacttcattacc 3'
Af-pstC1-N	5' atggacgatacccgcgatg 3'
Af-pstC1-R1	5' atcgcggaaataaagggg 3'
Af-pstC1-D1	5' catgtacaagtcggcgct 3'
Af-pstC2-N	5' ttgatcgttacggctagctt 3'
Af-pstC2-R1	5' tgatatgccagaaaacct 3'
Af-pstC2-D1	5' acggtggtagtgaacttt 3'
Af-pstA1-N	5' atgaatacggccaggaac 3'
Af-pstA1-R1	5' ggtctcggcactgattct 3'
Af-pstA1-D1	5' gctagtcttgagccttgt 3'
Af-pstA2-N	5' atggccagcaaggcagtt 3'
Af-pstA2-R1	5' aggaggatctgcagcgcta 3'
Af-pstA2-D1	5' catttgcgcttttc 3'
Af-pstB-N	5' atggcagcatctggcctgg 3'
Af-pstB-R1	5' tcttgagggtggcgatgg 3'
Af-pstB-D1	5' ctaatcccagcaagaagc 3'
Af-phoU-N	5' accacatatttcccagcg 3'
Af-phoU-R1	5' tgatctccaatacgctcg 3'
Af-phoU-D1	5' catcttccattggacgaggt 3'
Af-ppx-N	5' ggtagcagaagaaatcgg 3'
Af-ppx-R1	5' gcctcggcaaggatagc 3'
Af-ppx-R2	5' gaatggatcacgccgat 3'
Af-per-N	5' atgcttcagtgccgatgc 3'
Af-per-R1	5' agcaccaacccaacgact 3'
Af-per-D1	5' ggaagtttcagaagtggc 3'
Af-phnF-N	5' caccaaagtaccttacgc 3'
Af-phnF-R1	5' cgggatcgaatttatctatgg 3'
Af-phnF-D1	5' caacggatgatctatcctg 3'
Af-phnG-N	5' gaaattcgatgaagcgcc 3'
Af-phnG-R1	5' tcatgaccgcgatggttc 3'

Af-phnG-D1	5' cccgcgaaacgcagataa 3'
Af-phnH-N	5' tgatggcattggattgcc 3'
Af-phnH-R1	5' tcaggcctcctctatttc 3'
Af-phnH-D1	5' ttttctctgcctgccgag 3'
Af-phnI-N	5' atgtectacgtggcagtc 3'
Af-phnI-R1	5' taagcgttgccgacgagt 3'
Af-phnI-D1	5' atctgaaactcccgcact 3'
Af-phnJ-N	5' ataatttcgcctatctcg 3'
Af-phnJ-R1	5' gacctgcgccaaatagct 3'
Af-phnJ-D1	5' atacctggcagccctgcg 3'
Af-phnK-N	5' gagttacagttccgttcc 3'
Af-phnK-R1	5' aatccagcaaaccgcct 3'
Af-phnK-D1	5' agacgggagtaaccgatc 3'
Af-phnL-N	5' atgaacctgctcgaagtg 3'
Af-phnL-R1	5' gtttcgcctcctggatca 3'
Af-phnL-D1	5' tcgcgctatcctcagcat 3'
Af-phnM-N	5' atgacgcagggtttcagc 3'
Af-phnM-R1	5' ttttctcgctgtgggcat 3'
Af-phnM-D1	5' tctggaaggctggtcagc 3'
Af-phnN-N	5' ctaacacgctcatactgg 3'
Af-phnN-R1	5' tgctttcgtggtaaagcg 3'
Af-phnN-D1	5' ctcagtttcggacgacca 3'
Af-Hip-N	5' atgggcatccgatcgtcc 3'
RioUpPhoB	5' tcgtccagctcaggccgcagg 3'
Af-PhoB-R2	5' tggccagataatcatccg 3'
phoBPE	5' cccccaggctctggagtaccgctt 3'
ppk17Nd	5' cgcggcggcgcaacaagcgaa 3'
ppk14Nd	5' ttccagcagcagcggtagcgcct 3'
ppkNH2	5' ccatatgtctgaggtgcctgcgccggaaaagc3'
ppx1d	5' gggcagcaccgaattgatc 3'
ppx4r	5' aggcaagcgtttacgctggg 3'
ppx6r	5' ttggcccgcgatcaattcgg 3'
16S-for	5' tgggtgcctaagcgtactgagtgt 3'
16S-rev	5' ccgaagggcacttccgca 3'
AfphnGFw1	5' ggtctgggtgatccct 3'
AfphnGRv1	5' ctgctttatctgcgtttcg 3'
AfphnJFw1	5' actatgcacctacacg 3'
AfphnJRv1	5' gtcgggtgaagtcgagc 3'
Fw1-ppx	5' tttacctctgcgaccg 3'
Rev1-ppx	5' ccaactcccaaagaac 3'
Fw1-ppk	5' ttgacgaagccaataaca 3'
Rv1-ppk	5' cgtaaagggactctgc 3'
Fw2-ppk	5' caggtgtctccgatca 3'
Rv2-ppk	5' ctgctcctggttagt 3'
For1-pstS1	5' ctcaacaaagaccagc 3'
Rev1-pstS1	5' cagaacgatggaccac 3'
Fw1-pstS2	5' aagaaagaagtaacacgtag 3'
Rv1-pstS2	5' gcatcactcatgtaggc 3'

Anexo 2

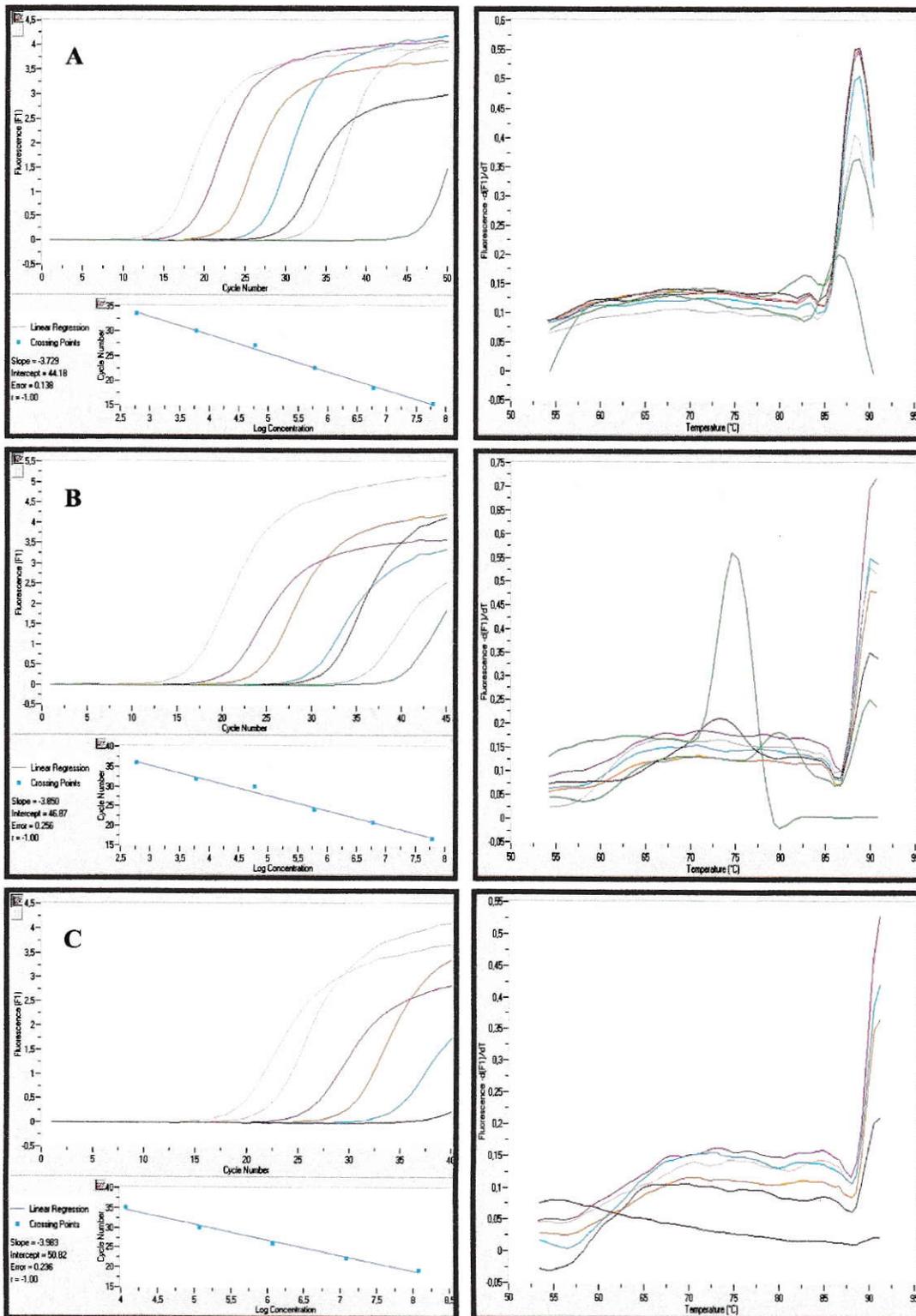
Cuantificación de los niveles de transcrito relativos al rRNA 16S mediante PCR en tiempo real.

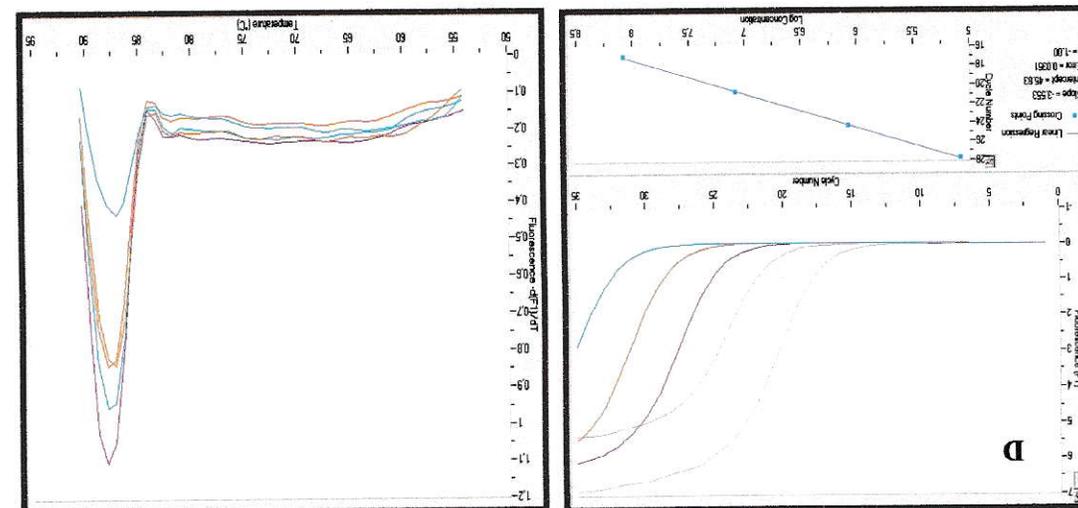
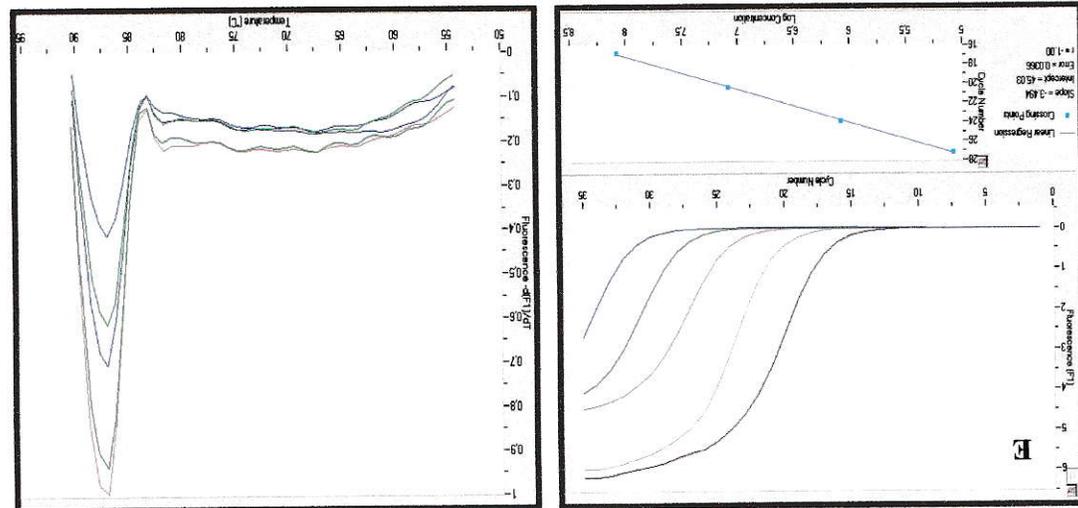
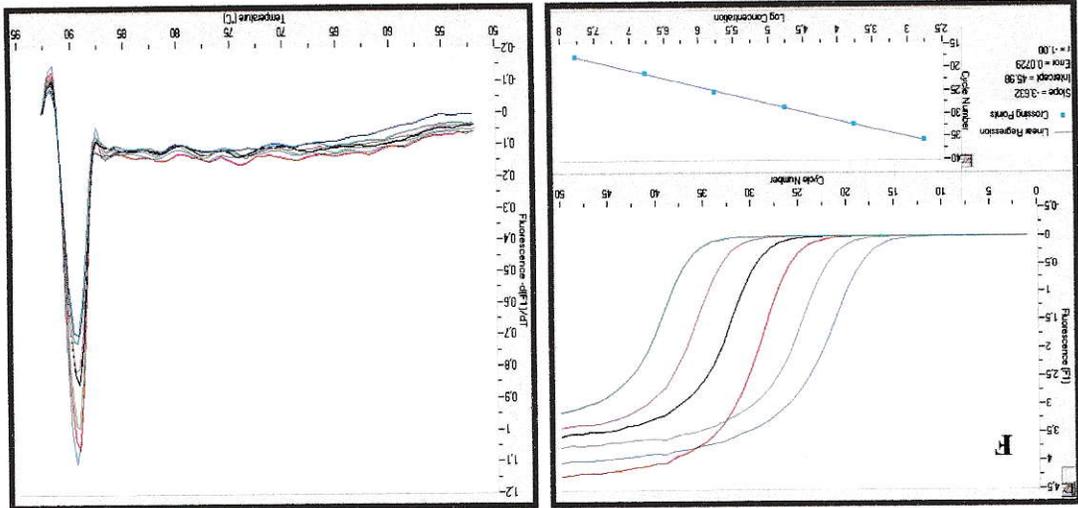
La cuantificación de los niveles de transcritos correspondientes a los genes estudiados en esta tesis se utilizó con el método de determinación de la abundancia relativa de cada transcrito con respecto al rRNA 16S. Luego de optimizar las reacciones de PCR en tiempo real se construyeron las curvas de calibración de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Al graficar el valor de Ct (ciclo en el cual la amplificación del DNA comienza a ser exponencial) versus el valor del logaritmo del número de copias del DNA genómico presente en cada tubo, se obtiene una recta con pendiente negativa para cada gen. Como se muestra en la figura 24, se construyeron las curvas de calibración para los genes *pstS1*, *pstS2*, *ppk*, *ppx*, *pho84L*, *phnG*, *phnJ*, y *rRNA16S*.

Para cada muestra de RNA a medir, se sintetizó el cDNA correspondiente para cada gen como templado. Para ello se utilizó el mismo partidador reverso que se utiliza en la reacción de PCR en tiempo real. Paralelamente se sintetizó el cDNA del gen de rRNA 16S con la misma muestra de RNA.

Luego de realizar las reacciones de PCR en tiempo real con cada templado de cDNA y las mismas condiciones de temperatura de hibridación, concentración de sales y de partidores obtenemos un valor de Ct para cada muestra, mediante el cual podemos inferir el número de copias de mRNA para cada gen estudiado y para el rRNA 16S en

esas condiciones. Al dividir estos valores se obtiene el número de copias relativo a cada condición y se puede obtener la variación en los niveles de transcrito para cada gen.





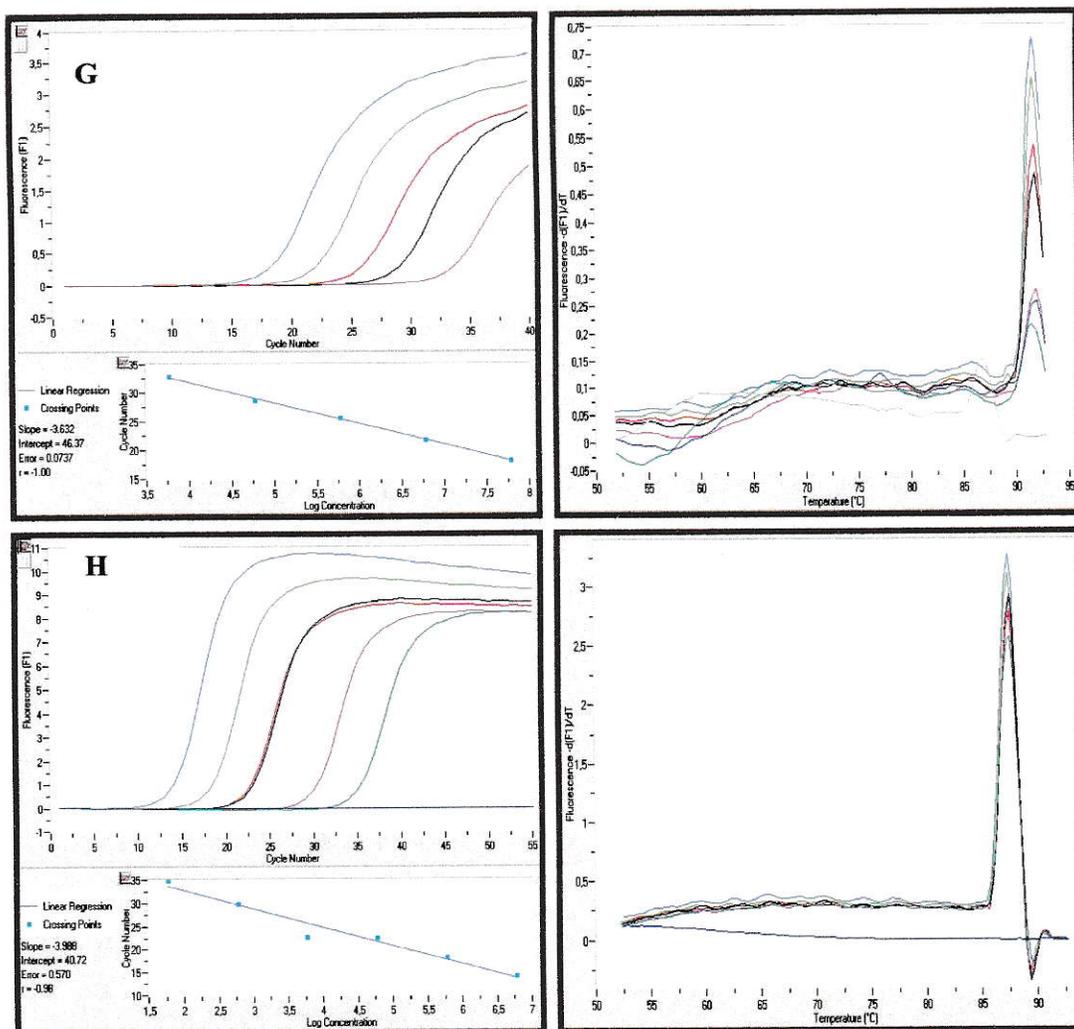


Figura 24. Curvas de calibración (izquierda) y de fusión (derecha) para los genes *pstS1* (A), *pstS2* (B), *ppk* (C), *ppx* (D), *pho84L* (E), *phnG* (F), *phnJ* (G), y *rRNA16S* (H).

En la tabla 12 se muestra la ecuación obtenida para cada curva de calibración y la eficiencia de cada una de las reacciones. También se muestra un ejemplo del cálculo de los niveles de inducción del gen *pstS2* mostrado en la figura 13.

Tabla 12. Curvas de calibración obtenidas para cada gen mediante PCR en tiempo real.

	Gen	Ecuación obtenida	Eficiencia*
A	<i>pstS1</i>	$X = (y - 44,18) / -3,73$	1.85
B	<i>pstS2</i>	$X = (y - 46,87) / -3,85$	1.82
C	<i>ppk</i>	$X = (y - 45,98) / -3,63$	1.88
D	<i>ppx</i>	$X = (y - 46,37) / -3,63$	1.88
E	<i>pho84L</i>	$X = (y - 50,82) / -3,98$	1.78
F	<i>phnG</i>	$X = (y - 45,83) / -3,55$	1.9
G	<i>phnJ</i>	$X = (y - 45,03) / -3,49$	1.93
H	16S	$X = (y - 40,72) / -3,98$	1.78

*Para el cálculo de la eficiencia (E) se utilizó la función $E = 10^{1/s}$, donde s es la pendiente de la recta obtenida al graficar Ct v/s log N° copias.

Ejemplo: Cálculo de los niveles de mRNA relativos del gen *pstS2* de la figura 13.

Luego de la reacción de PCR en tiempo real se obtuvieron siguientes valores de Ct:

$$Ct (-Pi) = 16,5$$

$$Ct (+Pi) = 24,7$$

Utilizando la curva de calibración para *pstS2* y reemplazando los valores de Ct en y, obtenemos

los valores de X

$$X = (y - 46,87) / -3,85,$$

$$X(-Pi) = 7,89$$

$$X(+Pi) = 5,75$$

Aplicando la función antiLog obtenemos el número de copias de cDNA para cada condición.

$$N^{\circ} \text{ Copias } (-Pi) = 7,87 \times 10^7$$

$$N^{\circ} \text{ Copias } (+Pi) = 5,69 \times 10^5$$

De la misma manera para el cDNA de 16S se obtuvieron los siguientes valores de Ct con una dilución 1/2500 del templado.

$$\text{Ct (-Pi)} = 16,96$$

$$\text{Ct (+Pi)} = 16,93$$

En este caso, la variación de Ct no es significativa y se asumió que los niveles de rRNA 16S son los mismos. En los casos donde existe variación en el número de copias de cada rRNA 16S se dividió el valor de Número de copias del cDNA correspondiente al gen de interés gen por el valor de copias del 16S.

Dividiendo el numero de copias del transcrito correspondiente al gen *pstS2* calculado en la condición de carencia de Pi versus el obtenido en presencia de Pi obtenemos el valor de inducción de la expresión de este gen en carencia de Pi.

$$7,87 \times 10^7 / 5,69 \times 10^5 = 138 \text{ veces.}$$

Anexo 3

Tabla 13. Cuantificación de los cambios de expresión de los genes del regulón Pho de *A. ferrooxidans* mediante macroarreglos de DNA. Resultado del experimento de traspaso a medio sin Pi durante 24 h. Se muestra el nivel de aumento o disminución de niveles de transcritos para los genes en la situación de ausencia de Pi comparado con las células crecidas con 22 mM Pi.

Gen	Imágenes		Intensidad Relativa Normalizada				Variación de Intensidades
	22mM Pi	0 Pi	22 mM Pi	CV	0 Pi	CV	0 Pi/ 22 mM Pi
<i>phoB</i>			0,002	2,0	0,002	0,4	1,0
<i>phoR</i>			0,007	0,7	0,004	2,0	0,5
<i>pstS1</i>			0,016	0,2	0,048	0,2	3,0
<i>pstC1</i>			0,060	0,2	0,517	0,2	8,7
<i>pstA1</i>			0,162	0,0	1,120	0,3	6,9
<i>pstB1</i>			0,008	0,2	0,009	0,9	1,0
<i>phoU</i>			0,011	0,6	0,025	0,3	2,3
<i>ppx</i>			0,005	0,5	0,009	0,4	1,7
<i>ppk</i>			0,031	0,2	0,076	0,1	2,4
<i>pstS2</i>			0,237	0,1	4,517	0,1	19,1
<i>pstC2</i>			0,010	0,4	0,066	0,1	6,7
<i>pstA2</i>			0,008	0,4	0,019	0,3	2,4
<i>pho84L</i>			0,167	0,1	0,142	0,2	0,8
<i>phnG</i>			0,037	0,2	0,053	0,2	1,4
<i>phnH</i>			0,018	0,1	0,016	0,2	0,9
<i>phnI</i>			0,011	0,9	0,006	0,5	0,5
<i>phnJ</i>			0,022	0,1	0,021	0,2	0,9
<i>phnK</i>			0,011	0,7	0,010	0,4	0,9
<i>phnL</i>			0,024	0,2	0,038	0,3	1,6
<i>phnM</i>			0,042	0,3	0,051	0,1	1,2
<i>hip</i>			0,013	0,9	0,039	0,2	2,9
<i>phnN</i>			0,048	0,3	0,065	0,1	1,4
<i>phnF</i>			0,025	0,1	0,053	0,1	2,1
<i>dnak</i>			0,908	0,1	2,079	0,2	2,3
<i>groEL</i>			0,184	0,1	0,100	0,2	0,5
<i>rus</i>			10,529	0,1	1, 70	0,3	0,2
<i>spiked</i>			0,866	0,1	1,201	0,2	-