

UCH-FC  
DOC - Microob  
V712  
C. A



**Caracterización de un posible sistema de secreción tipo  
IV en *Acidithiobacillus ferrooxidans***

Tesis entregada a la  
Universidad de Chile  
en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al grado de

**Doctor en Ciencias con Mención en Microbiología**

Facultad de Ciencias

Por

**Andrés Felipe Villa Restrepo**

Noviembre, 2014

Director de Tesis

**Dr. Carlos A. Jeréz**

**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:

**ANDRÉS FELIPE VILLA RESTREPO**

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 Privada de Tesis rendido el día 18 de noviembre de 2014.

**Director de Tesis:**

**Dr. Carlos A. Jerez**



A handwritten signature in black ink is written over a horizontal line. To the right of the signature is a circular stamp with the text "FACULTAD DE CIENCIAS" at the top, "BIBLIOTECA CENTRAL" in the center, and "U. DE CHILE" at the bottom, flanked by two stars.

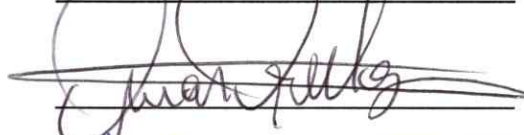
**Comisión de Evaluación de la Tesis**

**Dra. Rosa Alba Lagos**



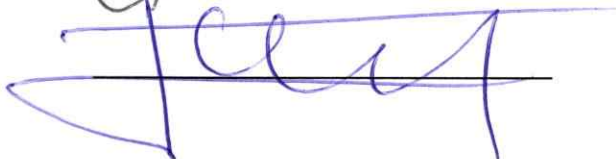
A handwritten signature in blue ink is written over a horizontal line.

**Dr. Omar Orellana**



A handwritten signature in black ink is written over a horizontal line.

**Dr. Claudio Martínez**



A handwritten signature in blue ink is written over a horizontal line.

**A Diego y mi familia.  
Su amor es el motor que me da las esperanzas y las fuerzas para luchar por mis  
sueños y cumplir el de ustedes.**

**A mi padre, Q.E.P.D.  
Por su gran ejemplo de amor y fortaleza.**

## RESUMEN BIOGRÁFICO



El 25 de junio de 1978 en Medellín, Colombia, recibí el primer beso y abrazo de mis padres, Luz Elena y Guillermo, mientras que en casa me esperaban impacientemente mis hermanos Juan Carlos y Guillermo Alonso. Gracias al amor y protección de esta familia, crecí y pude dedicarme aplicadamente a mis estudios e ingresar a la Universidad de Antioquia hasta egresar de allí como Bacteriólogo y laboratorista clínico en el año 2001. Aunque mi formación se fundamentó en la microbiología clínica, mis aptitudes han sobresalido siempre en la docencia y la investigación, las cuales pude desarrollar después de mi egreso, participando en el grupo Malaria de la Universidad de Antioquia, donde obtuve el título de Magister en Ciencias Básicas Biomédicas en Microbiología y Parasitología. Mi experiencia y desempeño, que en ese entonces ya contaban con un nuevo testigo y cómplice, Diego, permitieron que en el año 2004, me vinculara como académico de mi Alma Mater colombiana y, en el 2005, ingresar a la Universidad de Chile con una beca DAAD. Aunque no ha sido corto el tiempo, hoy me gradúo como Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, exactamente 6 meses después de haber recibido el último beso de mi padre en vida, aun así, estoy feliz de regresar a mi Alma Mater colombiana y completamente agradecido con mi Alma Mater chilena.

## AGRADECIMIENTOS

A mi profe, el Dr. Carlos Jerez, no solo por recibirme en su laboratorio y darme esa valiosa colaboración en la dirección de esta tesis, sino por su constante apoyo y paciencia.

A los profesores miembros de la comisión evaluadora, Dra. Rosa Alba Lagos, Dr. Omar Orellana y Dr. Claudio Martínez, por sus valiosas observaciones y aportes durante la realización de este trabajo, así como su colaboración y apoyo para concluir exitosamente este proceso.

Al Grupo de Genética del Departamento de Microbiología Ambiental de la Universidad Técnica de Berlín, Alemania especialmente a la Dra. Elisabeth Grohmann, el Dr. Karsten Arends, la Dra. Katarzyna Schiwon y la Bióloga Christine Bohn por recibirme en su laboratorio y permitirme estudiar la actividad relaxasa de la proteína VirD2.

Al Grupo de Biología Estructural de la Universidad de Graz, Austria, especialmente al Dr. Walter Keller y Dr. Kaan Celik por recibirme en su laboratorio y permitirme caracterizar estructuralmente la proteína VirD2.

A la Dra. Inmaculada Vaca por haberme compartido los protocolos de evaluación de formación de tumores en vegetales y al Grupo de Fisiología Vegetal Molecular por facilitarme sus espacios para el cultivo de *A. tumefaciens*.

A la Universidad de Chile, la Universidad de Antioquia y al Servicio de Intercambio Académico Alemán, DAAD, por todo su apoyo logístico y financiero dispuesto para el desarrollo de esta tesis y mi manutención.

A mis compañeros de trabajo en el Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología: Mario Vera, Francisco Chávez, Francisco Remonsellez, Lissette Valenzuela, Mauricio Acosta, Felipe Gordillo, Simón Beard, Álvaro Orell, Fernando Pagliai, Cristian Varela, Rafaela Arancibia, Claudio Navarro, Juan Araos, Cecilia Mauriaca, Rodrigo Almárcegui, Josefina Cornejo, Luis Orellana, Camilo, Daniela Soto,

Sebastián Aguilar, Cristóbal Córdova, Pablo Weber, Matías Rivero, así como también a los nuevos integrantes del laboratorio, sumados al otro grupo de compañeros del Laboratorio de Comunicación Bacteriana: Nicolás Guiliani, Lina Ruiz, Susana Valenzuela, Pilar Cortés, Álvaro Banderas, María José Gallardo, Valentina Abarca, Matías Castro, Macarena Vargas, Javiera, Mauricio y Óscar. A todos ustedes los recordaré con bastante cariño, aprecio y admiración.

A las secretarías de la Escuela de Postgrado, Marisol Maira, Inés Saavedra y Janet Guzmán, por su ayuda logística y paciencia en este proceso.

A mis amigos de la Confe: Mareo, Pili, Hugo, Ceci, Sergio, Carla, Álvaro, Cata, Yare, Ana, Celes, Vicky y especialmente, a los pequeños que me robaron un pedazo grande de corazón: Tefa, Ale, Vale y María Lucía. Adicionalmente, a otro grupo de amigos incondicionales: Julieta, Lina, Erika, Beatriz, Jorge, Cony, Dorothee, Nils, Kerstin, Alejo, María Isabel y Valentina...amigos, mientras los tenga, estaré muy agradecido con la vida.

A mi madre, mi padre Q.E.P.D., mis hermanos Guillermo y Juan Carlos, mi cuñis Carolina, mis superespectaculares sobrinos Samuel, Mateo y Sol y a ti, Diego, por su grandísimo e incondicional apoyo y amor.

Por último, un agradecimiento muy especial a mi madre y hermano Guillermo, por cuidar a mi padre durante mi larga ausencia.

## ÍNDICE DE MATERIAS

INTRODUCCIÓN	1
Organización genética del SSIV	2
Estructura proteica de los SSIV	5
Componente acoplador	5
Componente energético	6
Componente del canal	7
Componente extracelular	7
Evolución del SSIV	9
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> y SSIV	9
Estrategias experimentales para la caracterización del SSIV	13
HIPÓTESIS	16
OBJETIVO GENERAL	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
MATERIALES Y MÉTODOS	17
Bacterias, plásmidos y antibióticos	17
Análisis <i>in silico</i> de las regiones genómicas que conforman el SSIV en <i>A. ferrooxidans</i> 23270 y 53993	19
Extracción de ADN genómico	20
Partidores y reacciones de PCR	21
Electroforesis del ADN en geles de agarosa	22
Extracción del ARN total	22
Macroarreglos de ADN	23
Ensayos de complementación genética heteróloga: ensayos de conjugación	26

Formación del tumor en discos de papa y zanahoria	27
Evaluación de la actividad relaxasa de la proteína VirD2 de <i>A. ferrooxidans</i> . Clonación y expresión del gen <i>virD2af</i>	28
Purificación de la proteína VirD2af	28
Búsqueda y caracterización de los sitios <i>oriT</i> en el genoma de <i>A. ferrooxidans</i>	29
Ensayo de relajación del plásmido	30
Marcación de los oligonucleótidos de ADN	30
Ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)	31
RESULTADOS	32
Análisis bioinformático de los genes <i>trb</i> de <i>A. ferrooxidans</i> similares al SSIV de <i>A. tumefaciens</i> .	32
Análisis de la expresión diferencial de los genes del posible SSIV de <i>A. ferrooxidans</i> .	35
Importancia de la proteína VirB1 de <i>A. ferrooxidans</i> en el funcionamiento del SSIV de <i>A. tumefaciens</i> mediante ensayos de complementación genética heteróloga	36
Caracterización de la actividad relaxasa VirD2 de <i>A. ferrooxidans</i> .	40
Identificación de los sitios <i>oriT</i> en <i>A. ferrooxidans</i>	41
Caracterización de la proteína VirD2 de <i>A. ferrooxidans</i>	43
Evaluación de la interacción VirD2-ADN por medio de ensayos EMSA	44
Evaluación de la actividad relaxasa de la proteína VirD2 de <i>A. ferrooxidans</i>	46
Análisis evolutivo del SSIV de <i>A. ferrooxidans</i>	48
DISCUSIÓN	50
BIBLIOGRAFIA	62
ANEXO 1. Análisis bioinformático de los genes y proteínas del SSIV de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.	72
ANEXO 2. Secuencias <i>oriT</i> localizadas en el genoma de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.	73



## INDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Cepas usadas en esta tesis	18
<b>Tabla 2.</b> Plásmidos usados en esta tesis	18
<b>Tabla 3.</b> Genes de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 amplificados. Partidores y especificaciones de PCR usados en esta tesis.	20
<b>Tabla 4.</b> Niveles de ARN de los genes del SSIV de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	36

## INDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Organización genética de algunos SSIV	4
<b>Figura 2.</b> Estructura del sistema VirB/D4 de <i>A. tumefaciens</i>	6
<b>Figura 3.</b> Organización de los genes <i>trb</i> en el genoma de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	32
<b>Figura 4.</b> Comparación de la organización genética de los operones	34
<b>Figura 5.</b> Expresión de algunos genes del SSIV de <i>A. ferrooxidans</i>	35
<b>Figura 6.</b> Complementación genética de <i>A. tumefaciens</i> PC1001 ( $\Delta virB1$ )	38
<b>Figura 7.</b> Actividad de formación del tumor en mutantes de <i>A. tumefaciens</i> PC1001 ( $\Delta virB1$ )	39
<b>Figura 8.</b> Complementación de la actividad donadora del plásmido pLS1 en PC1001	40
<b>Figura 9.</b> Alineamiento de las secuencias nucleótídicas de los sitios <i>oriT</i> encontrados en el genoma de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	42
<b>Figura 10.</b> Alineamiento del dominio COG3843 de las relaxasas de la familia IncQ	44
<b>Figura 11.</b> Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA).	45
<b>Figura 12.</b> Actividad relaxasa de la proteína VirD2 de <i>A. ferrooxidans</i> .	47
<b>Figura 13.</b> Árbol filogenético del gen <i>trbE</i> de <i>A. ferrooxidans</i>	49
<b>Figura 14.</b> Sistema de secreción tipo IV en <i>A. tumefaciens</i> y <i>A. ferrooxidans</i> .	61

## LISTA DE ABREVIATURAS

Å	Armstrong (unidades).
ADN/ARN	Ácido desoxirribonucleico / ácido ribonucleico.
ADNss/ds	Ácido desoxirribonucleico <i>single strand/double strand</i> / cadena sencilla/doble hebra.
Amp	Ampicilina.
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i> / Colección americana de cultivos tipo
Car	Carbenicilina.
Dtr	<i>DNA transfer and replication proteins</i> / Proteínas para la replicación y transferencia del ADN.
EMSA	<i>Electrophoretic mobility shift assay</i> / Ensayo de cambio en la movilidad electroforética.
FT-ICR/MS	<i>Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance Mass Spectrometry</i> / Espectroscopía de masas de resonancia ciclotrónica por transformada de Fourier.
g	Gravedades.
ICE	<i>Integrative and conjugative element</i> / Elemento conjugativo integrativo.
IPTG	Isopropilo de tiogalactopiranosas.
Kan	Kanamicina.
Mg <sup>2+</sup>	Magnesio divalente.
µg	Microgramos.
mM	Milimolar.
ml	Mililitro.
Mpf	<i>Mating pair formation</i> / Formación del aparato de apareamiento.
<i>OriT</i>	Origen de transferencia.
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> / Reacción en cadena de la polimerasa

RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i> / Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a transcripción reversa
Spc	Espectinomicina.
SSIV	Sistema de secreción tipo IV.
Str	Estreptomina.
THG	Transferencia horizontal de genes.
TK	Transconjugantes.
Tra/Trb	Sistema de transferencia a / Sistema de transferencia b.
VirB/D	Sistema de virulencia B/D.

## RESUMEN

*Acidithiobacillus ferrooxidans* es una bacteria quimiolitotrófica que obtiene su energía a partir de la oxidación del ión ferroso, azufre elemental y sulfuros metálicos, por lo que es ampliamente usada en biominería. Han sido varios los intentos por mejorar su capacidad biolixivante pero no existe un sistema genético eficiente que permita la introducción de ADN en esta bacteria. Los microorganismos utilizan, entre otros sistemas, el sistema de secreción tipo IV (SSIV), para el transporte de proteínas y de ácidos nucleicos a través de la membrana celular bacteriana. Mediante espectrometría de masas de los extractos proteicos totales de células de *A. ferrooxidans* crecidas en azufre, se identificaron en nuestro laboratorio cuatro proteínas que presentaron alta similitud con las proteínas del SSIV de *Agrobacterium tumefaciens*. Estos resultados nos permiten sugerir la posible existencia de un SSIV en *A. ferrooxidans*, el cual sería un hallazgo importante debido a que este sistema participa en diferentes eventos celulares: conjugación, competencia y transporte de proteínas efectoras. En esta tesis, se estudió el contexto genético y la expresión de los genes del posible SSIV en *A. ferrooxidans* y se evaluó la funcionalidad del SSIV en un sistema heterólogo. Para esto, se analizaron *in silico* los genes que conforman el posible SSIV de dos cepas de *A. ferrooxidans*, ATCC 23270 y ATCC 53993, y se evaluó la expresión diferencial de éstos en diferentes medios de cultivo por medio de macroarreglos de ADN en la cepa *A. ferrooxidans* ATCC

23270. Finalmente, se analizó la posible funcionalidad de este sistema evaluando la capacidad de la proteína VirB1 de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 de complementar funcionalmente un SSIV heterólogo en una cepa mutante de *A. tumefaciens* carente de la liticasa VirB1 y la actividad relaxasa de la proteína VirD2 mediante ensayos de relajación del plásmido *in vitro* y EMSA. Los resultados demuestran que las cepas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993 poseen genes homólogos a los SSIV VirB y Trb de *A. tumefaciens*, que podrían codificar proteínas esenciales para la formación de una maquinaria de secreción tipo IV y, de acuerdo a los análisis filogenéticos, éstos pertenecen al grupo de SSIV que participan en eventos de conjugación. También, se encontró que la expresión de los genes del SSIV de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 es mayor cuando la bacteria crece en azufre elemental que cuando crece en ión ferroso. Los análisis de funcionalidad demostraron que la proteína VirB1 de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 reestablece en 57 % la capacidad de formación del tumor e incrementa hasta en 87 % la capacidad de transferir plásmidos de la familia IncQ en una cepa mutante de *A. tumefaciens* PC1001. Finalmente, el gen *virD2* de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 codificó una proteína con un dominio relaxasa, que tuvo la capacidad de formar complejos con diferentes secuencias *oriT* de *A. ferrooxidans* (ADNss y ADNds) y de relajar plásmidos que contienen dichas secuencias *oriT* en presencia de 15 mM Mg<sup>+2</sup>. La identificación y caracterización de un SSIV funcional en *A. ferrooxidans* ayudará a comprender no sólo algunos procesos fisiológicos de la bacteria sino que permitiría, más adelante, conocer mejor la transferencia conjugativa de ADN en este microorganismo.

## ABSTRACT

*Acidithiobacillus ferrooxidans* is a chemolithoautotrophic bacterium that obtains its energy from the oxidation of ferrous iron, elemental sulfur and metal sulfides; therefore, it is widely used in biomining. There have been several attempts to improve their bioleaching ability, but no efficient genetic system has allowed the introduction of DNA into these bacteria yet. Type IV secretion system (TIVSS) is used by some bacteria for the transport of proteins and nucleic acids through the bacterial cell membrane. By means of mass spectrometry analysis of total protein extracts from *A. ferrooxidans* cells grown in sulfur, we identified four proteins that showed high similarity to proteins of *Agrobacterium tumefaciens* TIVSS. Therefore, we suggest the presence of a TIVSS in *A. ferrooxidans*, which would be an important finding since this system is involved in various cellular events: conjugation system, DNA uptake or release and effector protein translocation. In this thesis, we studied the genetic background and expression of the putative TIVSS genes in *A. ferrooxidans* and evaluated the TIVSS functionality in a heterologous system. Genes were analyzed *in silico* in *A. ferrooxidans* ATCC 23270 and ATCC 53993 strains, and the differential expression of these genes were assessed in *A. ferrooxidans* ATCC 23270 strain grown in different culture media by using DNA macroarrays. Finally, the possible functionality of this system was examined by assessing the ability of VirB1 protein from *A. ferrooxidans* ATCC 23270 to complement one heterologous TIVSS mutant strain of *A. tumefaciens* lacking VirB1 lyticase and by

assessing VirD2 relaxase protein activities by using *in vitro* cleavage assays and EMSA. Results showed that both *A. ferrooxidans* ATCC 23270 and ATCC 53993 strains possess genes that showed homology to the *A. tumefaciens* *virB*- and *trb*-system genes which could encode essential proteins for the formation of a type IV secretion machinery that according to phylogenetic analysis, belong to the TIVSS involved in conjugation. Putative TIVSS genes from *A. ferrooxidans* ATCC 23270 showed a higher expression when bacteria grow in elemental sulfur than in ferrous ion. Functional analysis showed that VirB1 protein from *A. ferrooxidans* ATCC 23270 restores the ability of tumor formation by 57 % and increased up to 87 % the ability to transfer a plasmid of IncQ family in a mutant strain of *A. tumefaciens* PC1001. Finally, *A. ferrooxidans* ATCC 23270-*virD2* gene coded a protein having a relaxase domain, which has the ability to form complexes with different *oriT* sequences of *A. ferrooxidans* and to cleave plasmid containing these *oriT* sequences in the presence of 15 mM Mg<sup>+2</sup>. Identification and characterization of a functional TIVSS in *A. ferrooxidans*, will not only help to understand some physiological processes in this microorganism but would also allow to better understand, in the future, the conjugal transfer of DNA in these bacteria.



## INTRODUCCIÓN

El transporte de macromoléculas a través de las membranas es un mecanismo fundamental en algunos procesos fisiológicos bacterianos. Este evento se puede llevar a cabo por una variedad de sistemas que están conformados por uno o varios componentes que, de acuerdo a su funcionalidad y estructura, se denominan sistemas de secreción tipo I al VI (Thanassi y Hultgren, 2000; Juhas *y col.*, 2007). De éstos, los sistemas de secreción tipo IV (SSIV) están relacionados ancestralmente con el sistema de conjugación bacteriano y se caracterizan por facilitar el transporte de proteínas y de ácidos nucleicos a través de la membrana celular (Christie y Vogel, 2000).

Actualmente, el SSIV se define como un grupo de sistemas dentro del cual se pueden distinguir tres subgrupos de acuerdo a su función (Alvarez-Martinez y Christie, 2009; Bhatti *y col.*, 2013; Trokter *y col.*, 2014): el primero se denomina “sistemas de conjugación” que facilitan la transferencia del ADN entre las bacterias de la misma especie y, en algunos casos, a hongos, plantas y células humanas (Lawley *y col.*, 2003). Este subgrupo se encuentra tanto en las bacterias Gram-negativas como en las Gram-positivas y los más conocidos son los sistemas Tra del plásmido F de *Escherichia coli* y Trb de *Agrobacterium tumefaciens*. El segundo subgrupo, “sistemas de captación y liberación de ADN”, funcionan de forma independiente al contacto célula-célula y están involucrados en el mecanismo de competencia en *Campylobacter jejuni* y *Helicobacter*

*pylori* (Bacon y col., 2000; Hofreuter y col., 2001). El tercer subgrupo se denomina “sistemas transportadores de proteínas efectoras”, los cuales facilitan la transferencia de proteínas y/o complejos de ADN-proteína a través de un contacto directo con la célula blanco, como es el caso del sistema VirB/D4 de *A. tumefaciens* (Zhu y col., 2000). Esta variedad de funciones hace interesante estudiar los SSIV, ya que se pueden apreciar sus participaciones en diferentes procesos fisiológicos importantes para las bacterias como son:

a) la competencia y el intercambio de material genético, que contribuyen con la plasticidad genética;

b) la conjugación, importante para el esparcimiento de plásmidos conjugativos que confieren resistencia a antibióticos o a metales;

c) la formación de las biopelículas, que facilitan la colonización de los tejidos y la interacción con los minerales en los procesos de biolixiviación y;

d) en el transporte de proteínas efectoras, importante en los mecanismos de virulencia.

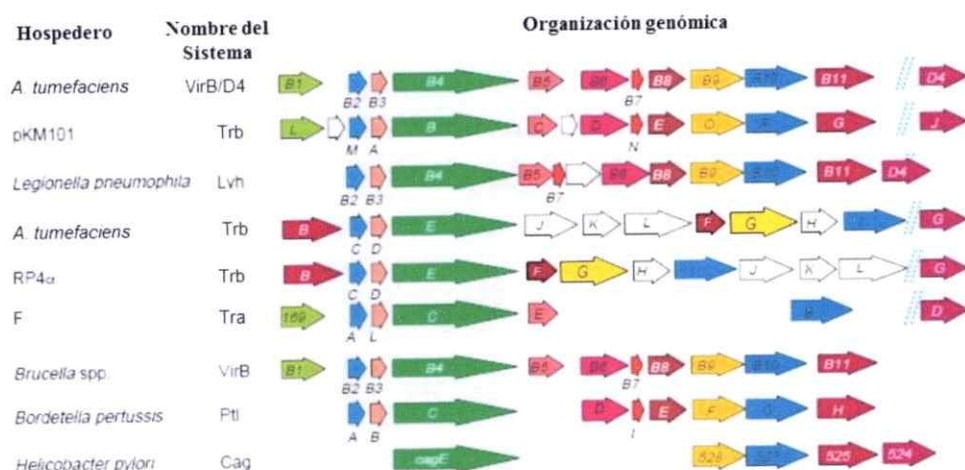
### **Organización genética del SSIV**

Aunque existe un gran número de SSIV que median la transferencia de ADN y/o proteínas, ellos comparten los mismos componentes centrales y están evolutivamente relacionados, al punto que se ensamblan y funcionan de una manera muy similar (Waksman y Fronzes, 2010). Los análisis de las secuencias de los genes de los diferentes SSIV descritos hasta el momento, indican que muchos de ellos son similares al SSIV VirB/D4 descrito en *A. tumefaciens*, el cual ha sido uno de los SSIV más estudiados y

caracterizados. *A. tumefaciens* es una bacteria fitopatógena que causa tumores en una amplia variedad de plantas. Esta bacteria posee dos SSIV codificados por los operones *virB* y *trb* ambos ubicados en el plásmido Ti y con funciones independientes. El primero se denomina VirB/D4 y es el responsable de la transferencia del complejo ADN tumorigénico (T-ADN)-proteína a las células vegetales. El T-ADN es un segmento de 200 kb de ADN de cadena sencilla que hace parte del plásmido Ti de *A. tumefaciens*, el cual, después de su transferencia, se integra en el genoma de la planta y expresa fitohormonas que estimulan la proliferación celular que conllevan a la formación de tumores en la planta (Ulker y col., 2008). El segundo sistema se denomina Trb y está organizado en dos regiones genómicas, *tra* y *trb*, las cuales contienen todos los genes que codifican las proteínas esenciales para los mecanismos de transferencia del plásmido Ti. Los productos de los genes *tra* participan en la transferencia y la replicación del plásmido desde el sitio *oriT*, por medio de la formación de un complejo proteico llamado relaxosoma, en el que la enzima relaxasa juega un papel importante para la transferencia del ADN. Las proteínas involucradas en el procesamiento del ADN blanco de transferencia son conocidas como proteínas de transferencia y replicación del ADN o “DNA transfer and replication proteins” (Dtr). Por otro lado, los productos de los genes *trb* están involucrados en la codificación del aparato necesario para el apareamiento o “mating pair formation” (Mpf) requerido para la transferencia del plásmido Ti a otras bacterias de la misma especie (Li y col., 1998; Li y col., 1999).

El sistema VirB/D4 de *A. tumefaciens* está conformado por 12 genes, los cuales están estrechamente relacionados en secuencia y organización genómica con los genes de otros SSIV ampliamente estudiados como: Trb de los plásmidos RP4, RSF1010 y Ti,

Ptl de *Bordetella pertussis*, Tra del plásmido F, Cag de *H. pylori*, Lvh de *Legionella pneumophila*, entre otros (Fig. 1) (Li y col., 1999; Alvarez-Martinez y Christie, 2009), lo que sugiere que los SSIV constituyen mecanismos de secreción que poseen un ancestro común y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Sin embargo, la figura 1 muestra que, aunque los diferentes SSIV que se han descrito hasta el momento comparten homologías entre sí, no todos los sistemas están conformados por los mismos genes. Recientes análisis filogenéticos de diversos SSIV han demostrado que los genes de estos sistemas se pueden ordenar en al menos 6 patrones diferentes, siendo el menos común, el patrón observado en *A. tumefaciens*, lo que parece indicar que el reordenamiento observado en estos genes podría estar estrechamente relacionado con procesos evolutivos del SSIV, acorde con las necesidades fisiológicas de cada microorganismo (Guglielmini y col., 2012). Aun así, el sistema VirB/D4 de *A. tumefaciens* es el punto de referencia para analizar los diferentes SSIV que se han descrito en la naturaleza.



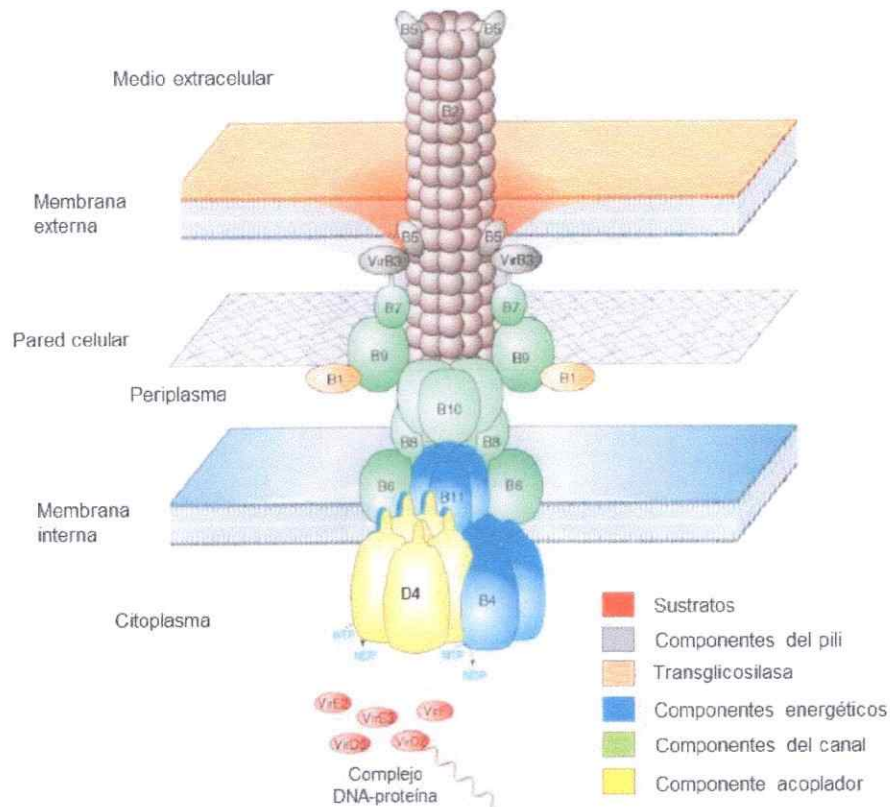
**Figura 1. Organización genética de algunos SSIV.** Los genes que codifican proteínas homólogas se muestran con el mismo color en cada sistema (Modificado de Christie y Vogel, 2000).

## Estructura proteica de los SSIV

Recientemente, se realizó una caracterización estructural de un complejo proteico formado por las proteínas VirB3 a VirB10 del plásmido R388 (Low *y col.*, 2014). Los resultados revelaron una estructura de 3 MDa, 340 Å de alto y 255 Å de ancho. Esta estructura, sumada a otras obtenidas en estudios cristalográficos de esta maquinaria de secreción (Fronzes *y col.*, 2009b; Chandran *y col.*, 2009; Rivera-Calzada *y col.*, 2013), han demostrado que los SSIV están ensamblados por tres distintas subestructuras: la proteína acopladora, el complejo proteico transmembranal y el pili conjugativo. Sin embargo, de acuerdo a su función se distinguen cuatro componentes importantes: el componente acoplador, el energético, el canal y el extracelular (Fig. 2). Para mayor claridad, los homólogos en los sistemas Trb y VirB/D4 de *A. tumefaciens* se referenciarán como Trb/VirB.

*El componente acoplador* es la proteína TraG/VirD4 de *A. tumefaciens* (Trockter *y col.*, 2014) (Fig. 2). Las proteínas relacionadas con ésta, están presentes en los SSIV de Gram-negativas y Gram-positivas y están implicadas en el reclutamiento del sustrato (ADN, proteína o ADN-proteína) hacia la maquinaria de secreción a través de interacciones específicas con el sustrato que posee secuencias señales (Fronzes *y col.*, 2009a). En el caso de los sistemas relacionados con la conjugación, la secuencia señal está presente en la proteína relaxasa, que se une covalentemente al ADNss que va a ser transferido a una célula receptora (Zechner *y col.*, 2012; Redzej *y col.*, 2013). Sin embargo, se han descrito SSIV carentes de este componente proteico, como es el caso de *B. pertussis*, donde el mecanismo de secreción del sustrato es llevado a cabo en dos pasos; en el primero, el sustrato es secretado al periplasma por medio de la vía secretora

general, SecYEG, y luego, pasa a la maquinaria de secreción tipo IV para su translocación al exterior de la célula (Seubert y *col.*, 2003).



**Figura 2. Estructura del sistema VirB/D4 de *A. tumefaciens*.** Las funciones de cada proteína se describen en el texto. Para simplificar el esquema, la mayor parte de las proteínas VirB se denominan como B1, B2 y así sucesivamente (Modificado de Backert y Meyer, 2006).

*El componente energético* está conformado por tres familias de ATPasas asociadas al sistema: TraG/VirD4, TrbE/VirB4, TrbB/VirB11 (Trockter y *col.*, 2014) (**Fig. 2**). Las tres son esenciales para la translocación del sustrato, pero solo dos, TrbE/VirB4 y TrbB/VirB11, son necesarias para la formación del pili (Fronzes y *col.*, 2009a). Incluso, los estudios sugieren que VirB11 regula la secreción del sustrato y la

biogénesis del pili, por medio de la modulación de la actividad de las proteínas VirD4 y VirB4, respectivamente (Ripoll-Rozada *y col.*, 2013). Esta regulación parece estar determinada por cambios conformacionales en la proteína inducidos por la hidrólisis del ATP (Yeo *y col.*, 2000; Savvides *y col.*, 2003). Por otro lado, la ATPasa TrbE/VirB4 es altamente conservada en secuencia y la única con proteínas homólogas en todos los SSIV conocidos a la fecha, por lo tanto, es considerada un marcador de la presencia de estos sistemas de secreción, con el cual se realizan estudios de clasificación filogenética de los SSIV (Juhas *y col.*, 2007; Frank *y col.*, 2005; Alvarez-Martinez y Christie, 2009; Guglielmini *y col.*, 2013).

*El componente del canal* está conformado por las proteínas TrbD/VirB3, VirB6 y TrbF/VirB8 que se ubican en la membrana interna, las proteínas VirB7 y TrbG/VirB9 en la externa y la proteína bitópica TrbI/VirB10, que se extiende desde la membrana interna hasta la externa (Trockter *y col.*, 2014) (Fig. 2). Una vez que el sustrato se acopla al sistema, las ATPasas TrbE/VirB4 y TrbB/VirB11 proveen la energía necesaria para la translocación del sustrato a través del canal (Cascales y Christie, 2003; Ripoll-Rozada *y col.*, 2013). La proteína VirB1 también forma parte de este componente (Fig. 2) y su función es actuar como una transglicosilasa que degrada parcialmente la pared celular y, por ende, favorece la formación del espacio necesario para el ensamblaje de las proteínas formadoras del canal (Zahrl *y col.*, 2005).

*El componente extracelular* o pili es considerado una estructura importante para la transferencia del sustrato al permitir la unión entre las células donadora y receptora. En *A. tumefaciens* está compuesto por la proteína TrbC/VirB2 y VirB5, pero requiere de TrbE/VirB4 y TrbE/B8 para su estabilidad (Fig. 2) (Yuan *y col.*, 2005; Backert y Meyer,

2006). Sin embargo, en aislados de *A. tumefaciens* carentes de pili, no se ve afectada la transferencia del sustrato ni la capacidad de producir tumor en la célula vegetal (Christie, 2004; Jakubowski y col., 2009; Banta y col., 2011), lo que indica que esta estructura no es esencial en este SSIV.

En general, varios estudios estructurales y evolutivos han encontrado que los SSIV especializados en la secreción de proteínas efectoras, están conformados por las proteínas Mpf y carecen de proteínas involucradas en el procesamiento de material genético, Dtr. A diferencia de éstos, los SSIV especializados en conjugación presentan ambas proteínas, Mpf y Dtr (Alvarez-Martinez y Christie, 2009; Smillie y col., 2010; Guglielmini y col., 2014). En estos últimos, las proteínas homólogas a VirD2 de *A. tumefaciens* poseen una actividad relaxasa importante para la transferencia del ADN a través de la maquinaria de secreción tipo IV, ya que se unen a secuencias específicas denominadas origen de transferencia (*oriT*) y cortan la cadena de ADN en una secuencia denominada sitio *nic*, ubicada dentro de las secuencias *oriT*. Luego, la relaxasa se une covalentemente al extremo 5' del ADN monohebra (ADNss) destinado para la transferencia, llamado cadena-T (del inglés *T-strand*), formando un complejo nucleoprotéico VirD2–cadena-T. Una vez formado este complejo, conocido como relaxosoma, la relaxasa VirD2 interactúa con la proteína acopladora para facilitar el paso del ADN a través de la maquinaria de transferencia (Cascales y Christie 2004).



## **Evolución del SSIV**

Los análisis filogenéticos realizados por Frank *y col.* (2005) y Guglielmini *y col.* (2013) han evidenciado la presencia de un ancestro común en los SSIV dada la alta similitud en las secuencias de los genes y su organización dentro de los genomas de los microorganismos que lo poseen. Así mismo, con estos análisis se ha identificado que la evolución de los SSIV va acompañada de una divergencia en 3 clados que separan las 3 familias de SSIV, según su función: sistemas de conjugación, sistemas de competencia y sistemas translocadores de proteínas efectoras. Las relaciones filogenéticas entre los SSIV se han basado principalmente en la comparación de las secuencias de 3 genes: *trbI/virB10*, *TrbE/virB4* y *traG/virD4*. Sin embargo, debido a la alta variabilidad que posee el gen *traG/virD4* y a que el gen *trbI/virB10* no está presente en los SSIV de las bacterias Gram-positivas, estos dos genes no son buenos candidatos para los análisis filogenéticos de los SSIV, mientras que el gen *trbE/virB4* está presente en todos los sistemas descritos hasta el momento y su proteína ha sido ideal para realizar los análisis de alineamientos y suficiente para clasificar los SSIV (Frank *y col.*, 2005; Juhas *y col.*, 2007; Alvarez-Martinez y Christie, 2009; Guglielmini *y col.*, 2013).

## ***Acidithiobacillus ferrooxidans* y SSIV**

*A. ferrooxidans* es una bacteria acidófila quimiolitotrófica que obtiene su energía a partir de la oxidación del hierro, azufre elemental o elementos azufrados parcialmente oxidados y es una de las principales bacterias ampliamente usadas en los procesos de biolixiviación (Rawlings, 2002). Actualmente, la secuencia completa del genoma de la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 se encuentra disponible en la base

de datos TIGR ([www.tigr.org](http://www.tigr.org)), la cual, junto con la reciente secuenciación del genoma de la cepa ATCC 53993 (<http://www.jgi.doe.gov/>), ha permitido realizar análisis genómicos comparativos, con los cuales se han identificado genes relevantes para la fisiología y metabolismo en cada una de estas cepas y compararlas entre sí. Uno de los resultados más interesantes obtenidos por estos estudios, ha sido la identificación de islas genómicas presentes en cada una de estas cepas secuenciadas que, por sus características, parecen ser elementos genéticos adquiridos a través de mecanismos de transferencia horizontal de genes (THG) (Levicán y col., 2009; Valdés y col., 2010; Orellana y Jerez, 2011; Bustamante y col., 2012). Uno de estos elementos ha sido caracterizado recientemente por Bustamante y col. (2012), quienes también reportaron la posible existencia de un grupo de genes que codificarían proteínas involucradas en la transferencia conjugativa de este interesante ICE. Sin embargo, estos investigadores no realizaron análisis experimentales que pudieran confirmar dicha asociación, lo que hace necesario la realización de este tipo de trabajos para el entendimiento de estos mecanismos de transferencia en este microorganismo.

Otro análisis bioinformático del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 reportó la presencia de dos regiones genómicas que contenían diez genes homólogos y con una organización genética similar a los genes del sistema Trb de *A. tumefaciens*: *trbB*, *trbD*, *trbE*, *trbJ*, *trbL* y un gen hipotético, *hyp*, en una de las regiones, y *trbF*, *trbG*, *trbG* y *trbI* en la otra región; donde el gen *hyp* presentó baja similitud al gen *traI* de *A. tumefaciens*, el gen *trbG* se encontró duplicado y se observó la ausencia de los genes *trbK* y *trbH* involucrados en la formación del pili (Barreto y col., 2003). Aun así, este trabajo no predijo la función putativa de los productos de los genes encontrados; por lo que sería

necesario profundizar en la caracterización genética de estas regiones para obtener información relevante que permita un análisis funcional de este posible SSIV en *A. ferrooxidans*.

En un estudio realizado por nuestro grupo, en el que se hizo un análisis proteómico mediante espectrometría de masas (FT-ICR/MS) de los extractos proteicos totales de *A. ferrooxidans* crecido en azufre, se identificó cuatro proteínas que presentaron homología con las proteínas TrbB, TrbE, TrbF y TrbJ de *A. tumefaciens* (Valenzuela y col., 2006). De acuerdo con los resultados de Barreto y col. (2003), los genes de tres de estas proteínas, *trbB*, *trbE* y *trbJ*, se ubicaron en una misma región del genoma de *A. ferrooxidans*, mientras que el otro gen, *trbF*, se ubicó en la otra región descrita; por lo que nuestro grupo se interesó en conocer si los tres genes que estaban juntos formaban parte de una misma unidad transcripcional. Para esto, se realizó un experimento de RT-PCR y los resultados demostraron que los genes se expresan, pero no se cotranscriben (Valenzuela y col., datos no publicados). Sin embargo, con esta metodología sólo se evaluó algunos de los genes ubicados en la primera región de este sistema, por lo que será necesario completar el análisis de la cotranscripción de todos los genes en ambas regiones genómicas descritas.

Mediante análisis por PCR en tiempo real y por macroarreglos de ADN realizados por nuestro grupo, se mostró que los niveles de expresión de los genes *trbB*, *trbE*, *trbF* y *trbJ* aumentaron cuando *A. ferrooxidans* creció en un sustrato sólido como el azufre elemental, lo que sugiere que estas proteínas podrían estar relacionadas con la interacción de la bacteria con su sustrato sólido (Valenzuela y col., 2006). Sin embargo, teniendo en cuenta que *A. ferrooxidans* también posee la capacidad de oxidar el hierro y

otros elementos azufrados y, dado que existe una expresión diferencial de proteínas en *A. ferrooxidans* que depende de la clase del sustrato oxidable disponible en el medio (Ramirez y col., 2004), sería interesante conocer si los genes descritos en este sistema se expresan en otras condiciones de crecimiento, como en medios suplementados con hierro o pirita.

Thorstenson y col. (1993) demostraron que las proteínas del SSIV de *A. tumefaciens* se localizaban en las membranas interna y externa de la célula, formando un complejo estructural que se expande a través de las membranas celulares. Varias de las proteínas codificadas por los genes del SSIV descritos en *A. ferrooxidans* por Barreto y col. (2003), no solo comparten homología con estas proteínas sino que algunas contienen secuencias de exportación a membranas y/o dominios hidrofóbicos, lo cual sugiere una interacción de éstas con las membranas celulares; por lo tanto, sería interesante conocer la localización celular de las proteínas que conforman el posible SSIV de *A. ferrooxidans* para predecir la ubicación de este sistema en dicha bacteria.

En conjunto, los estudios indican la posible existencia de mecanismos de transferencia horizontal de genes en *A. ferrooxidans* relacionados con los sistemas Tra del plásmido F (Bustamante y col., 2012) y Trb de *A. tumefaciens* (Barreto y col., 2003; Valenzuela y col., 2006). Este hallazgo sería importante debido a que estos SSIV participan en diferentes eventos celulares previamente descritos. Sin embargo, es necesario identificar la funcionalidad de estos posibles SSIV en *A. ferrooxidans* y determinar en cual(es) proceso(s) fisiológico(s) estaría participando en esta bacteria: en la transferencia de material genético y/o en la translocación de proteínas.



## Estrategias experimentales para la caracterización del SSIV

Con la implementación de ensayos genéticos, se ha analizado el comportamiento de cepas mutantes en cada uno de los genes que hacen parte del SSIV y se han identificado aquellos que son esenciales en la estructura y función de este sistema, no sólo en *A. tumefaciens* (Li y col., 1998) sino en otras bacterias (O'Callaghan y col., 1999). Adicionalmente, los altos porcentajes de identidad y la homología entre las proteínas que conforman estos sistemas, se han desarrollado ensayos de complementación genética que han contribuido enormemente en el estudio e identificación funcional de los SSIV (Berger y Christie, 1994; Carle y col., 2006). Sin embargo, en el caso de *A. ferrooxidans*, han sido varios los intentos de aplicar las técnicas del ADN recombinante orientadas a conocer la función y regulación de los genes y de los procesos fisiológicos en esta bacteria. Aunque se han obtenido importantes hallazgos a partir de la clonación de genes de *A. ferrooxidans* en *E. coli* (Barros y col., 1985; Guiliani y Jerez, 2000), los intentos por lograr transformar *A. ferrooxidans* han sido poco eficientes (Kusano y col., 1992; Peng y col., 1994; Liu y col., 2000). Kusano y col. (1992) lograron introducir un plásmido por electrotransformación en *A. ferrooxidans* para generar cepas resistentes al mercurio, pero de 30 cepas ensayadas, sólo una se transformó. Por otro lado, Peng y col. (1994) demostraron la transferencia de plásmidos de *E. coli* a *A. ferrooxidans* por conjugación, pero la frecuencia de transferencia obtenida fue muy baja, entre  $10^{-5}$  y  $10^{-7}$ . Más adelante, Liu y col. (2000) establecieron algunas condiciones óptimas de transferencia que incrementaban esta frecuencia en 100 veces. Aun así, estos resultados demuestran que los intentos de transformación de *A. ferrooxidans* son poco eficientes, lo cual limita el

uso de estas metodologías en la modificación genética de esta bacteria, y dificulta la implementación de análisis genéticos que faciliten la identificación de la funcionalidad del posible SSIV.

Carle *y col.* (2006) evaluaron la capacidad de las proteínas del sistema VirB de *Brucella suis* para complementar funcionalmente un SSIV heterólogo, el sistema VirB/D4 de *A. tumefaciens*. Los resultados demostraron que las proteínas VirB de *B. suis* no sólo se ensamblaron en la membrana de *A. tumefaciens* formando un complejo sino que incrementaron la habilidad de las mutantes de *A. tumefaciens* de servir como células receptoras en los experimentos de conjugación. Con estos resultados, se puede dar cuenta que la implementación de los ensayos de complementación heteróloga, puede ser una aproximación para caracterizar funcionalmente nuevos SSIV que se van describiendo en la naturaleza.

Teniendo en cuenta que la transferencia de genes entre los microorganismos representa un mecanismo de adaptación microbiana a los cambios ambientales (Schmidt-Eisenlohr *y col.*, 2001), la identificación de genes *trb*, los análisis de su expresión y consecuente identificación de algunas de estas proteínas en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (Barreto *y col.*, 2003; Valenzuela *y col.*, 2006), orientaron el objetivo de investigación de esta tesis. La identificación de un SSIV funcional en esta bacteria, sugeriría que *A. ferrooxidans* podría tener la capacidad de intercambiar material genético o interactuar con los minerales por medio de la formación de biopelículas o intercambiar macromoléculas como ADN o complejos ADN-proteína en su entorno. También es de especial importancia identificar y caracterizar este sistema ya que permitiría comprender algunos procesos fisiológicos de este microorganismo que podrían ser de suma

importancia en los mecanismos de biolixiviación y, además, facilitaría el desarrollo de la genética en este microorganismo. Es por esto que, basados en los antecedentes de la posible existencia de un SSIV en *A. ferrooxidans* y la importancia de este sistema en varios procesos fisiológicos, se planteó esta tesis con una metodología que nos permitiera responder algunos interrogantes que aún quedan: ¿Poseerá *A. ferrooxidans* un SSIV homólogo al sistema Trb de *A. tumefaciens*? ¿En qué condiciones de cultivo se expresarán estos genes? ¿Será este sistema funcional?

## Hipótesis

*Acidithiobacillus ferrooxidans* posee un sistema de secreción tipo IV funcional que permite la transferencia de ADN y/o la translocación de complejos ADN-proteína.

## Objetivo general

Estudiar la expresión de los genes del SSIV en *A. ferrooxidans* y evaluar la funcionalidad del sistema en un modelo de complementación genética heterólogo.

## Objetivos específicos

- Analizar *in silico* las regiones genómicas que conforman el SSIV en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993.
- Estudiar la expresión diferencial de los genes del SSIV de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 en diferentes medios de cultivo usando azufre y hierro como fuente de energía.
- Evaluar la capacidad de la proteína VirB1 de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 de complementar funcionalmente mutantes de *A. tumefaciens*.
- Evaluar *in vitro* la actividad relaxasa de la proteína VirD2 de *A. ferrooxidans* ATCC 23270.



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Bacterias, plásmidos y antibióticos

La cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 se cultivó a 30 °C en agitación en medio mínimo 9K suplementado independientemente con las siguientes fuentes de energía: 50 g/L de azufre elemental en perlas o con 33 g/L de ión ferroso. Otras cepas y plásmidos usados en esta tesis se muestran en la tabla 1 y 2. Las cepas de *Escherichia coli* usadas para los experimentos de clonación se cultivaron a 37 °C en medio Luria-Bertani (LB) (10 g/L peptona, 5 g/L extracto de levadura, 5 g/L NaCl). Las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* usadas para los experimentos de complementación genética se cultivaron en medio LB o en medio de inducción AB (glucosa 10 g/L, MES [ácido morfolino-etano-sulfónico] 4 g/L, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.3 g/L, KCl 0.15 g/L, CaCl<sub>2</sub> 0.01 g/L, FeSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.0025 g/L y 1 mM fosfato de potasio [pH 5.5]) a 25 °C. Los antibióticos se usaron para la propagación de los plásmidos y la selección de cepas de *E. coli* recombinantes así: espectinomicina (Spc) 50 µg/ml; estreptomycin (Str) 50 µg/ml; carbenicilina (Car) 100 µg/ml, ampicilina (Amp) 100 µg/ml, kanamicina (Kan) 50 µg/ml; y para *A. tumefaciens* así: Spc 300 µg/ml; Str 100 µg/ml; Car 150 µg/ml o gentamicina (Gen) 25 µg/mL.

**Tabla 1. Cepas usadas en esta tesis.**

Cepa	Características	Referencia
<i>E. coli</i> XL1Blue	<i>endA1 gyrA96(nal<sup>R</sup>) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F[1: Tn10:proAB<sup>+</sup> lacI<sup>+</sup> Δ(lacZ)M15] hsdR17(r<sub>K</sub><sup>+</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>)</i>	Kopec y col., 2005
<i>E. coli</i> DH5α	<i>F endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR mupG Φ80dlacZAM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(r<sub>K</sub><sup>+</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>), λ-</i>	Banco de cepas Laboratorio Microbiología Molecular y Biotecnología
<i>A. tumefaciens</i> A348	Cepa silvestre, pTiA6NC	Höppner y col., 2004
<i>A. tumefaciens</i> PC1001	pTiA6NC Δ <i>virB1</i>	Höppner y col., 2004
<i>A. tumefaciens</i> GV3101	Cepa silvestre, pTi <sup>+</sup> Gen <sup>+</sup>	Donación laboratorio Fisiología Vegetal Molecular – U. de Chile

**Tabla 2. Plásmidos usados en esta tesis**

Plásmidos	Características	Referencia
pTrc200	Vector de expresión promotor <i>trc-lacIq-ori</i> pVS1, Str <sup>r</sup> y Spc <sup>r</sup>	Höppner y col., 2004
pTrcB1suis	pTrc200 contiene el gen <i>virB1</i> de <i>Brucella suis</i> (717 pb <i>NcoI/ScaI</i> )	Höppner y col., 2004
pTrcB1af	pTrc200 contiene el gen <i>virB1af</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 (765 pb <i>NcoI/ScaI</i> )	Esta tesis
pLS1	Plásmido del grupo IncQ, Car <sup>r</sup>	Höppner y col., 2004
pET21- <i>virD2af</i>	Vector de expresión contiene el gen <i>virD2</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 (1551 pb <i>NdeI/XhoI</i> ), 7×His-Tag N-terminal, Amp <sup>r</sup>	Esta tesis
pDL277	Plásmido no conjugativo ( <i>E. coli</i> y <i>Streptococcus</i> ), <i>oriT</i> <sup>-</sup> , Spc <sup>r</sup> , 6,6 Kb	Wang y col., 1995
pDL277- <i>OriT1-11</i>	pDL277 contiene región de 300 pb del <i>oriT1-11</i> de <i>A. ferrooxidans</i> , 6,9 Kb	Esta tesis
RSF1010	Plásmido del grupo IncQ. Movilizable por los plásmidos auto-transmisibles de la familia IncP, 8,7 Kb.	Scherzinger y col., 1992

Las manipulaciones del ADN se realizaron por procedimientos estándar según Sambrook y Russell (2001). Para los ensayos de complementación, el vector pTrc200 (donado gentilmente por el Dr. Baron del Departamento de Biología, Universidad McMaster, Canadá), se cortó con las enzimas *NcoI* y *SmaI*, se trató con fosfatasa alcalina y se ligó la secuencia del gen *virBI* de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, amplificada previamente por PCR con partidores específicos que contenían los sitios de reconocimiento para las enzimas *NcoI* y *ScaI* (Tabla 3). Para los ensayos de actividad relaxasa, el plásmido pET21 se cortó con las enzimas *NdeI* y *XhoI* seguido de la ligación con el gen *virD2* de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 amplificado por PCR y digerido con las mismas enzimas de restricción.

**Análisis *in silico* de las regiones genómicas que conforman el SSIV en *A. ferrooxidans* 23270 y 53993.**

Se realizó un análisis bioinformático para obtener información relevante del contexto genético del SSIV de *A. ferrooxidans* en estas dos cepas para comparar su organización y sugerir las posibles funciones de sus proteínas. Las secuencias nucleotídicas y aminoacídicas se visualizaron con el programa computacional ARTEMISv7 (<http://www.sanger.ac.uk/Software/Artemis/>). Por medio de los programas computacionales tBLASTn y BLASTp (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) se buscó la identidad/similitud de estas proteínas con otras ya conocidas y se utilizaron las herramientas disponibles en <http://us.expasy.org/tools/blast> para la identificación de los dominios conservados en las proteínas del SSIV de *A. ferrooxidans*. El análisis de

alineamientos y la construcción del árbol filogenético, se realizó con el programa Geneious v5.4 (<http://www.geneious.com>).

**Tabla 3.** Genes de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 amplificados. Partidores y especificaciones de PCR usados en esta tesis.

Análisis	Gen	Nombre del partidor Secuencia del partidor (5' - 3')	Tamaño de amplificación (pb) / Temperatura de hibridación PCR (°C)
Macroarreglos ADN	<i>trbF</i>	trbFN CGAGCAATCCCGATTATC trbFR AGTGCGTGATGTAGATGC	642/55
	<i>trbI</i>	trbIN CACAAGCCAGTCAGCTTG trbIR CTCTTGATGCCCCGTCTGC	651/56
	<i>trbG2</i>	trbG2N CGGTCTGTATTGGTGATG trbG2R CGAGGTTGGTGGATAACG	596/56
	<i>trbG1</i>	trbGIN CCAATACAGCCTGCAGGG trbGIR GTCTGCTGACTGCAAGTC	612/58
	<i>trbE</i>	trbEN GCCAAGATGAAATCCG trbER CTTGTCCGAAGGCAATC	608/53
	<i>trbB</i>	trbBN TCATGGCTGACTACCTGC trbBR CTCATGGATCAGCGTCTG	643/56
	<i>trbJ</i>	trbJN TCAGTGAAGTGGCCGGTG trbJR GAGTCCGTCTGCAGGTTG	631/58
	<i>virB1</i>	virB1N CATGTCGATCACCTGCC virB1R TGTAGCCGGCAAGCTTGC	612/60
	<i>traG</i>	traGN GCTTGCACCCTGCAAAGG traGR TTGTCCGGCATGGCGTAG	618/58
	<i>trbD</i>	TrbDN GGCCACATTTGCCCTTTG TrbDR GGCACCTTGCCTCTGTTC	243/56
Proteínas recombinantes	<i>virB1</i>	VirB1cR GAACCATGGTTATGGGAGAACCGG VirB1cFI GCGAGTACTATGCTTTCAGGGAAG	765/63
	<i>virD2</i>	VirD2F GCGCATATGAATCCCAAAACATCAC VirD2R GAACTCGAGCTCGATCTCCGATCC	1551/55

#### Extracción de ADN genómico.

Las células de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 provenientes de 700 mL de cultivo crecido en azufre elemental o ión ferroso, se colectaron por centrifugación (6.000 x g durante 10 min) y se lavaron dos veces con agua ácida. Para la extracción del ADN

cromosómico, se utilizó el protocolo para bacterias Gram-negativas *Wizard Genomic DNA Purification kit* (Promega). Éste se basa en un paso de lisis celular seguido de una digestión enzimática del ARN, con posterior precipitación del ADN genómico con isopropanol y solubilización en agua. La cuantificación del ADN genómico se realizó al determinar su absorbancia a 260 nm de una dilución 1/500. La concentración de ADN se calculó usando la relación  $1 \text{ OD}_{260} = 50 \mu\text{g ADN/mL}$ .

### **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 sintetizaron por la empresa SIGMA-PROLIGO ([www.proligo.com](http://www.proligo.com)) (Tabla 3). Para los análisis de macroarreglos de ADN, se diseñaron partidores que amplificaban regiones internas de aproximadamente 600 pb de cada gen, excepto el gen *trbD* del cual, por su tamaño, se amplificó un fragmento de 243 pb. Para la obtención de las proteínas VirB1 y VirD2 recombinantes, se diseñaron partidores de acuerdo a la secuencia nucleotídica de cada gen con la adición de sitios de restricción específicos (Tabla 3). Cada reacción de PCR se realizó en un volumen final de 25  $\mu\text{L}$  y se utilizaron 2 ng/ $\mu\text{L}$  de ADN genómico, 5 ng/ $\mu\text{L}$  de cada partidor, 0.1 mM dNTPs, 5 % DMSO, 0.1 U/ $\mu\text{L}$  de *Taq* ADN polimerasa (Promega) en 1 X de buffer de PCR y 2.5 mM de  $\text{MgCl}_2$ . Para la amplificación, se utilizó el siguiente programa: 3 min a 95 °C, seguido de 30 a 40 ciclos de 1 min a 95 °C, 45 s a 55-62 °C de acuerdo a los partidores utilizados (Tabla 3), 1 a 2 min a 72 °C (de acuerdo al tamaño del fragmento), para finalizar con un paso de 10 min a 72 °C.

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

Se utilizaron geles de agarosa al 1 % en tampón TAE 0.5 X (20 mM Tris-acetato pH 8.0, 0.5 mM EDTA). Las muestras se mezclaron con tampón de carga 6 X (glicerol 25 %, SDS 0.5 %, azul de bromofenol 0.025 % y EDTA 12 mM). Para la tinción del ADN se utilizó una solución de bromuro de etidio a una concentración de 0.2 µg/mL preparado en tampón TAE 0.5 X. Las bandas se visualizaron bajo luz ultravioleta.

### **Extracción del ARN total**

El ARN total de *A. ferrooxidans* se extrajo durante la fase exponencial tardía de crecimiento en azufre o ión ferroso (aproximadamente  $9 \times 10^7$ -  $1 \times 10^8$  cels/mL). Para ello, se modificó el protocolo de extracción con fenol caliente (Guiliani *y col.*, 1997). Brevemente, las células se colectaron por centrifugación a 6.000 x g por 10 min a temperatura ambiente y se lavaron dos veces con agua ácida, pH 1.5. Para la obtención del ARN, se tomaron fracciones de 20 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 suspensiones, se le agregó 600 µL de fenol saturado ácido (pH 4) precalentado a 65 °C y la mezcla se incubó durante 7 min a 65 °C con agitación por inversión cada 45 s. Luego de centrifugar por 4 min a 12.700 x g, la fase acuosa se 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 para posteriormente, centrifugar durante 4 min a 12.700 x g y recuperar la fase acuosa. El ARN 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 °C

durante toda la noche o alternativamente, a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  por 2 h. Luego de la precipitación, el ARN se recuperó por centrifugación a  $13.800 \times g$  por 30 min a  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ , se lavó 2 veces con etanol al 70 % y se resuspendió en 100  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas. Para eliminar los restos de ADN presentes en la preparación, el ARN se trató por 30 min a  $30\text{ }^{\circ}\text{C}$  con DNasaI libre de RNasa en un volumen final de 200  $\mu\text{L}$  en presencia de 6 mM  $\text{MgCl}_2$ . 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 ADN, el ARN se extrajo una vez con 400  $\mu\text{L}$  de fenol/cloroformo ácido y dos veces con 400  $\mu\text{L}$  de cloroformo. Luego, se precipitó con acetato de sodio 3 M pH 5.2 como se describió anteriormente. Después de dos lavados con etanol al 70 %, el ARN se resuspendió en 40  $\mu\text{L}$  de agua libre de nucleasas. La integridad del ARN se observó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1 %. Para determinar la concentración del ARN, se midió la absorbancia a 260 nm de una dilución 1/500 y se utilizó la relación  $1 \text{ OD}_{260} = 40 \mu\text{g ARN/mL}$ . La pureza del ARN se estimó por la razón de las absorbancias a 260/280 nm.

### **Macroarreglos de ADN**

El ARN total obtenido de la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 crecida con 50 g/L de azufre elemental en perlas o con 33 g/L de ión ferroso, se utilizó para los análisis de macroarreglos de ADN, según el protocolo descrito por nuestro grupo (Acosta y col., 2005). Para esto, se diseñaron partidores para amplificar fragmentos de aproximadamente 600 pb para cada gen del SSIV de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 a analizar o el gen completo cuando su tamaño era menor a este valor (Tabla 3). Los fragmentos amplificados se purificaron a partir del gel de agarosa con *HiYield Gel/ PCR*

*Fragment extraction Kit* (Real Genomics™), según las instrucciones del fabricante. Luego, se cuantificaron por su absorbancia a 260 nm y se diluyeron a 5 ng/μL en 40 % v/v DMSO. 100 μL de cada dilución se colocaron en una placa de 96 pozos para su posterior siembra en la membrana. Igualmente, se incluyó en la placa diluciones de un fragmento del gen de la expansina-1 de *Prunus persica* (*exp-1*) como control de marcaje e hibridación.

El ADN se sembró manualmente desde la placa de 96 pozos en membranas de nylon Immobilon-Ny<sup>+</sup> utilizando el *Multi Blot Replicator*. Cada dilución se sembró 3 veces (aprox. 1.5 ng de ADN por mancha) y por cuadruplicado. Las membranas se secaron al aire y luego se trataron con solución de desnaturalización (NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M) por 7 min sin agitación. Luego, se incubaron 2 veces por 3 min en solución de neutralización (0.5 M Tris-HCl pH 8.0, 1.5 M NaCl, 1 mM EDTA) con agitación y se secaron al aire nuevamente. El ADN se entrecruzó a la membrana por irradiación con luz UV (254 nm) a 0.12 J/cm<sup>2</sup> en un Hibrilinker HL-200 (UVP Laboratory Products). La sonda marcada se obtuvo por la incorporación de [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP en el cADN sintetizado por 2 h a 42 °C en un volumen de reacción final de 50 μL que contenía: 10 μg de ARN total (*A. ferrooxidans* crecido en hierro o en azufre), 1.5 ng ARN *exp-1*, 10 pmol de cada partidor específico, 800 μM dNTPs sin dCTP, 3.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 μCi [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP, 40 U ARNsin, 2 μL de transcriptasa reversa ImPromII (Promega). La mezcla de ARN total y de *exp-1* se hibridó con la mezcla de partidores previo a la transcripción reversa a 70 °C por 5 min. Luego de la reacción, la enzima se inactivó a 65 °C por 15 min y el ARN se degradó por tratamiento con NaOH 0.2 M a 37 °C por 15 min y se neutralizó con



HEPES 0.25 M. Las sondas de cADN marcado, se purificaron utilizando las columnas S-200 HR (Amersham), según las instrucciones del fabricante. La radiactividad incorporada en 1  $\mu$ l se cuantificó en un contador de centelleo.

Por cada sonda obtenida, se hibridaron dos membranas que fueron humedecidas previamente en 2 X SSPE (10 X SSPE: 1.8 M NaCl, 100 mM fosfato de sodio pH 7.7, 10 mM EDTA) por 5 min a temperatura ambiente. Luego, se pre-hibridaron en 7.5 mL de solución de hibridación (5 X SSPE, 2 % p/v SDS, 1 X solución de Dendharts, 100  $\mu$ g/mL ADN de esperma de salmón) a 65 °C por 2-4 h. Las membranas se hibridaron en 5 mL de solución de hibridación fresca a 65 °C con la sonda de cADN obtenida ( $>1.5 \times 10^6$  cpm/mL de solución de hibridación), desnaturalizada en agua hirviendo por 5 min, durante toda la noche. Las membranas se lavaron con 25 mL de solución de lavado (0.5 X SSPE, 0.2 % p/v SDS) 2 veces a temperatura ambiente por 5 min seguidos por 2 lavados a 65 °C por 15 min. Las membranas se envolvieron en una película plástica, se expusieron en una pantalla K-Screen (Kodak) por 1-2 días y se escanearon en un PhosphorImager (Molecular Imager FX system, Bio-Rad) utilizando el programa Quantity One 1,0 (Bio-Rad).

La cuantificación y análisis de las manchas obtenidas, se realizó con el programa VersArray (Bio-Rad) y Excel (Microsoft Office). 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, obteniendo la intensidad neta relativa (INR). La relación señal ruido (Qsr) se determinó

a partir de la IC y la IFX según la relación  $Qsr = [IC / (IC + IFX)]$  (Wang *y col.*, 2001). Las INR con una  $Qsr > 0.51$  de las diferentes réplicas para cada mancha en cada condición se promediaron obteniendo la intensidad neta relativa promedio (INRX). Para cada condición las INRX se calcularon con al menos 3 datos de intensidad para cada mancha.

### **Ensayos de complementación genética heteróloga: ensayos de conjugación**

Se evaluó la capacidad de la cepa de *A. tumefaciens* PC1001 complementada genéticamente con el gen *virB1* de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (*virB1Af*), de donar el plásmido de la familia IncQ, pLS1, según el protocolo descrito previamente por Höppner *y col.* (2004). *A. tumefaciens* se cultivó en medio LB en ausencia de antibióticos (cepa silvestre) o con Spc (300 µg/ml)/Str (100 µg/ml) para la propagación del plásmido pTrc200 y sus derivados. Para la propagación del plásmido pLS1, se creció en presencia de Car (150 µg/ml). Luego, las células se inocularon en medio AB líquido a una  $OD_{600}$  entre 0.1 y 0.25 y se incubaron por 6 h a 25 °C. *A. tumefaciens* A348 y PC1001 transformada con pTrc200 con o sin los genes *virB1suis* y *virB1af* y con el plásmido pLS1, se cocultivaron con *A. tumefaciens* GV3101 en una relación de 1:5 por 3 días a 25 °C en placas de 24 pozos que contenían 1.5 mL medio AB agar con y sin 500 µM de AS y 500 µM de IPTG. Luego, las células se recuperaron lavando dos veces con 0.5 mL de LB y se realizaron diluciones seriadas  $1 \times 10^{-3}$ ,  $1 \times 10^{-4}$  y  $1 \times 10^{-5}$  que se sembraron en medio LB con Car/Str/Spc (selección de donadoras), Gen (selección de receptoras) y Car/Gen (selección de transconjugantes). Después de 3 días, se contaron

las colonias y los resultados se expresaron en términos de porcentaje de transconjugantes/silvestres (TK/silvestres), según protocolo descrito por Bohne *y col.* (1998). Se realizaron análisis estadísticos usando una ANOVA de dos vías y la prueba *post-hoc* Dunnet usando el programa estadístico Prisma v5.0.

### **Formación del tumor en discos de papa y zanahoria**

Se evaluó la capacidad de la cepa de *A. tumefaciens* PC1001 complementada genéticamente con el gen *virB1Af*, de producir la formación de tumores en discos de papa (*Solanum tuberosum*) y zanahoria (*Daucus carota*), según protocolo descrito previamente por McLaughlin *y col.* (1998) y Coker *y col.* (2003). Las papas y las zanahorias se lavaron con agua y jabón, se removió la cáscara y luego, se sumergieron en hipoclorito de sodio al 10 % por 20 min. Se cortaron rebanadas de aproximadamente 3 mm, de las cuales se obtuvieron discos de 3 cm de diámetro por medio de un sacabocados. Cinco discos de papa y cinco discos de zanahoria se depositaron por separado en cajas de Petri que contenían agar agua-peptonada. *A. tumefaciens* A348 y PC1001 transformada con pTrc200 con y sin los genes *virB1suis* y *virB1Af* se cultivaron en medio LB en presencia de 0.5 mM IPTG (inductor del plásmido pTrc200) y 300  $\mu$ M de acetosiringona (AS, inductor de los genes *vir* de los plásmidos pTi y pTiA6NC) por 2 días a 25 °C en oscuridad. Luego, se infectaron los discos de papa y zanahoria con 50  $\mu$ L de una suspensión de  $1 \times 10^8$  células/mL y se incubaron a 25 °C en oscuridad. Como control negativo, se incluyeron discos inoculados con medio LB. Se evaluó la formación de tumores durante 5 días en diez discos (cinco de papa y cinco de zanahoria) por cepa

analizada y en 3 repeticiones. Para facilitar el recuento de tumores en los discos de papa, se adicionaron 30  $\mu$ L de lugol (I<sub>2</sub>KI: I<sub>2</sub> 5 % y KI 10 %). Los resultados se analizaron con una ANOVA y como prueba *post-hoc* se aplicó la prueba Scheffé para comparaciones múltiples entre los tratamientos usando el programa estadístico Prisma v5.0.

### **Evaluación de la actividad relaxasa de la proteína VirD2 de *A. ferrooxidans*. Clonación y expresión del gen *virD2af***

El gen *virD2* de *A. ferrooxidans* 23270, *virD2af*, se amplificó por PCR con partidores específicos (Tabla 3). El producto de PCR se cortó con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI* y se ligó en el vector de expresión pET21, el cual incorpora una cola 7xHis en el dominio N-terminal de la proteína. La secuencia nucleotídica del gen *virD2af* se verificó por medio de un secuenciador automático (ABI prism 310; Perkin Elmer) a través de un servicio en biología molecular (Berlín, Alemania). pET21-*virD2af* sirvió para transformar células de *E. coli* XL1Blue y los clones recombinantes se seleccionaron en agar LB que contenía 100 mg/L de ampicilina. La inducción de la proteína se realizó adicionando 1 mM IPTG cuando el cultivo alcanzó una OD<sub>600</sub> entre 0.6 – 0.8 e incubando por 4 h a 20 °C. La expresión de la proteína recombinante 7xHis-VirD2af (aprox. 62.9 KDa) se analizó por medio de SDS-PAGE.

### **Purificación de la proteína VirD2af**

La proteína VirD2af se purificó en condiciones desnaturalizantes en presencia de urea. El extracto proteico total se resuspendió en tampón Tris/HCl 50 mM pH 7.5 y se pasó por columnas de Ni<sup>2+</sup> *HiTrap Chelating Column* (Amersham Biosciences). VirD2af

se eluyó con un gradiente de imidazol y la fracción que contenía la proteína, se dializó para remover el imidazol y la urea y permitir su renaturalización. La correcta estructura de la proteína purificada, se confirmó por dicroísmo circular por medio del espectropolarímetro Jasco J-715 en el Instituto de Química de la Universidad de Graz-Karl Franzens, Austria (dato no mostrado). Una vez concentrada y purificada la proteína VirD2af, se utilizó para siguientes experimentos.

### **Búsqueda y caracterización de los sitios *oriT* en el genoma de *A. ferrooxidans***

Con base en la secuencia consenso de los sitios *oriT* reportada por Kurenbach y *col.* (2002), NCGTNTAAGTGCGCCCTTA, se realizó una búsqueda de ésta en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Se caracterizó la ubicación de los *oriT* de *A. ferrooxidans* (*oriT<sub>Af</sub>*), analizando 300 pb bases río-arriba y río-abajo de las secuencias identificadas. Los análisis bioinformáticos se realizaron con el programa computacional ARTEMISv7. Para los ensayos de relajación del plásmido *in vitro*, se diseñaron partidores para amplificar un fragmento de 300 pb que abarcara 150 pb río-arriba y 150 pb río-abajo de cada uno de los *oriT* identificados en *A. ferrooxidans*. Los fragmentos amplificados se ligaron al plásmido pDL277 en el sitio *Bam*HI/*Hinc*II (Tabla 2) y se clonaron en cepas de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Para los ensayos de cambio en la movilidad electroforética, se diseñaron oligonucleótidos de aproximadamente 50 pb que contenían cada uno de los sitios *oriT<sub>Af</sub>* y se analizaron *in silico* en busca de secuencias repetidas invertidas por medio del programa disponible en la red OligoAnalyzer 3,1 (<http://www.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>).

### Ensayo de relajación del plásmido

Los plásmidos pDL277, pDL277-*oriT<sub>Af</sub>* y RSF1010 se purificaron por medio de columnas *Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) y las formas superenrolladas (ccc) y relajadas (oc) de cada uno de los plásmidos, se obtuvieron usando gradiente de densidad con CsCl. Las formas ccc se usaron como sustratos en los ensayos de relajación del plásmido *in vitro* con la proteína VirD2af previamente purificada. La forma ccc de los plásmidos pDL277-*oriT<sub>Af</sub>* contenían una región de 300 pb de cada uno de los *oriT<sub>Af</sub>* identificados. Como control negativo se usó el plásmido RSF1010 (Tabla 2). Para evaluar la actividad de relajación del plásmido de la proteína VirD2af y establecer las condiciones óptimas de actividad, se realizaron ensayos en una mezcla de reacción que contenía 5, 10 y 15 mM de Mg<sup>+2</sup> como cofactor, 150 ng de cada plásmido, entre 20 a 40 veces de exceso molar de VirD2af en una solución tampón que contenía: 20 mM Tris/HCl pH 7.8, 100 mM NaCl, 0.1 mM EDTA y 200 ng BSA. La reacción se evaluó a 30, 37, 42 y 45 °C por 30 y 60 min y se detuvo ajustando la mezcla a 10 mM EDTA, 0.5 % SDS y 0.5 mg/ml de proteinasa K continuando la incubación a 37 °C por 30 min. Los productos se analizaron en geles de agarosa al 0.7 % (w/v) aplicando 7 V/cm por 4 h en tampón TAE. Los geles se colorearon con bromuro de etidio y la cantidad de las formas ccc y oc de los plásmidos, se determinó con AlphaEaseFC™ software (Biozym Scientific).

### Marcación de los oligonucleótidos de ADN

Se diseñaron oligonucleótidos de cadena sencilla y doble de los *oriT<sub>Af</sub>* de aproximadamente 50 pb y se adquirieron en SIGMA. Los oligonucleótidos se marcaron con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP por medio de la actividad T4 polinucleótido kinasa. El [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP no

unido se removió usando columnas de Sephadex G-50. Los oligonucleótidos marcados se usaron en los ensayos de cambio en la movilidad electroforética o se almacenaron a 4 °C.

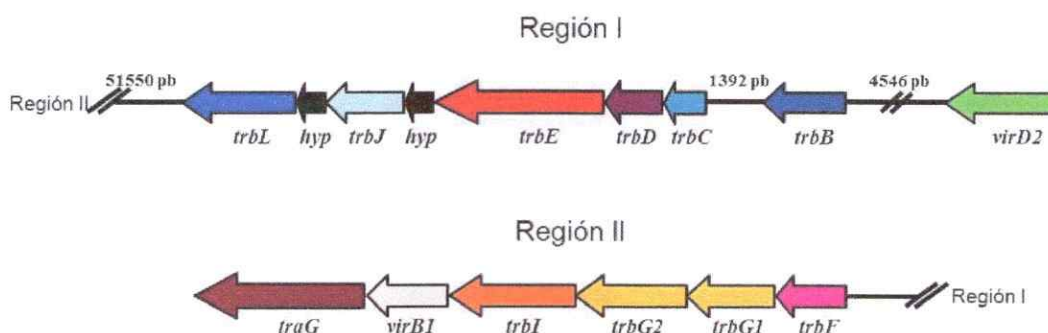
### **Ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA)**

Para establecer las condiciones óptimas del ensayo y evaluar la capacidad de VirD2af de unirse al *oriT<sub>Af</sub>*, se realizaron ensayos en un volumen final de reacción de 20  $\mu$ l de una mezcla que contenía: 10 fmol de oligonucleótidos radiomarcados, concentraciones crecientes de la proteína VirD2af (0, 2.5, 5.0, 7.0 y 10  $\mu$ M) en una solución tampón (1 mg/ml BSA, 200 mM NaCl, 0.1 mM EDTA, 20 mM Tris/HCL). Los experimentos de EMSA se realizaron a pH entre 7.3 y 8.3, a 30, 37, 42 y 45 °C, por 30, 60 y 120 min, en presencia y ausencia del cofactor Mg<sup>+2</sup> para confirmar la importancia de este elemento en la actividad enzimática. Después del tiempo de incubación, las muestras se cargaron en un gel PAGE en condiciones nativas al 10 % (w/v) y se realizó la electroforesis por 90 min a un voltaje constante de 90 V. Como control negativo, se diseñó un oligonucleótido sin secuencias homólogas a los *oriT* de *A. ferrooxidans*. Los ensayos se realizaron usando ADNss y ADNds. Los geles de poliacrilamida se secaron y se expusieron a una película *HyperfilmTM- $\beta$ max* (Amersham Biosciences) toda la noche y luego, se revelaron con procedimientos estándar para las películas de rayos-X.

## RESULTADOS

### Análisis bioinformático de los genes *trb* de *A. ferrooxidans* similares al SSIV de *A. tumefaciens*.

Se identificaron 13 genes en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 organizados en dos regiones dentro del cromosoma separados por una secuencia de nucleótidos de 51550 pb. En la primera región, se ubicaron los genes *trbB*, *trbC*, *trbD*, *trbE*, *trbJ* y *trbL* y, en la segunda región: *trbL*, *trbG1*, *trbG2*, *trbI*, *virB1*, *traG* y a 4546 pb río abajo del gen *trbB*, se encuentra el gen *virD2* (**Fig. 3**). El nombre de los genes se asignó según el porcentaje de identidad encontrado con los genes de los SSIV presentes en *A. tumefaciens*, VirB/D4 y Trb (**Anexo 1**).



**Figura 3. Organización de los genes *trb* en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270.** Se muestran las dos regiones genómicas contiguas que contienen los genes homólogos a *virD2*, *trbB*, *-C*, *D*, *-E*, *-J*, *-L*, *-F*, *-G1*, *-G2*, *-I*, *virB1*, *traG* en *A. ferrooxidans* ATCC 23270. *hyp*: genes hipotéticos. El tamaño de los genes se graficó a escala.

Nueve de estos genes han sido descritos previamente por Barreto *y col.* (2003), pero a diferencia de lo reportado por estos investigadores, se identificaron tres genes

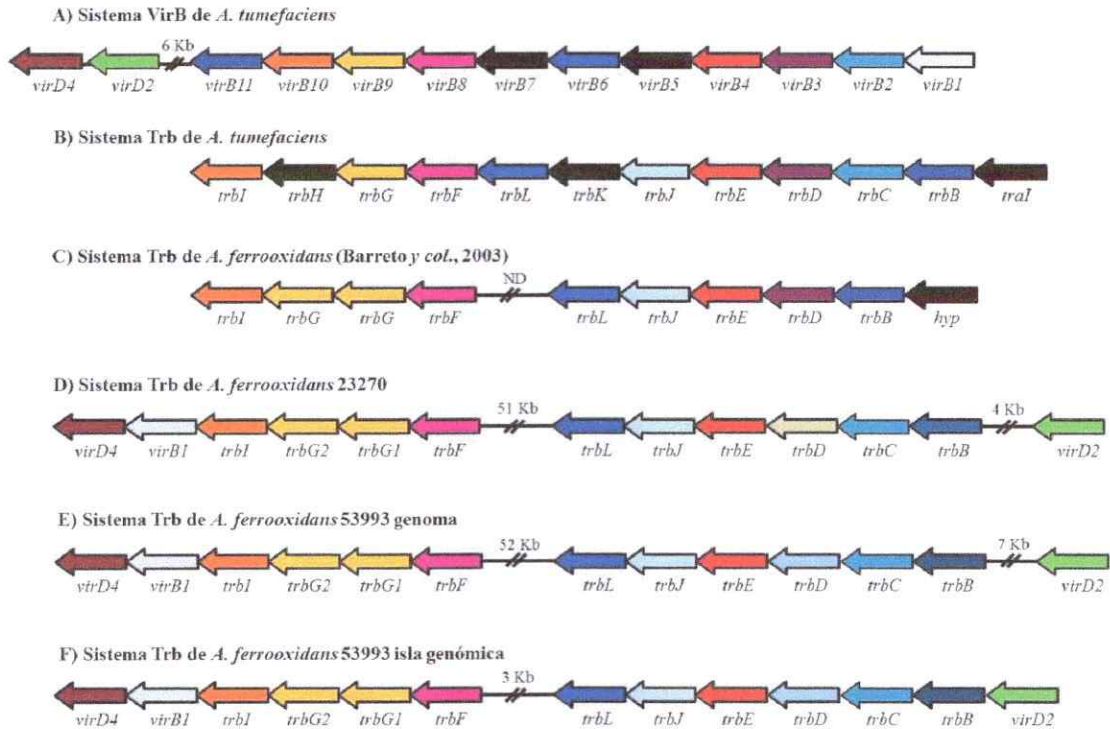


denominados *traG*, *virB1* y *virD2* por su identidad con estos mismos genes del SSIV de *A. tumefaciens* y un gen *trbC* que presentó 92 % de identidad con el gen *trbC* de la cepa ATCC 53993 de *A. ferrooxidans* recientemente secuenciada (Anexo 1). Adicionalmente, se identificaron dos genes hipotéticos (*hyp*) ubicados en la primera región pero ninguno de ellos presentó similitud a *traI* como lo sugirió Barreto y col. (2003) en su reporte.

Al comparar el contexto génico de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 con los de *A. tumefaciens* (Fig. 4A, 4B, 4D), se observó que en *A. ferrooxidans* existe una duplicación del gen *trbG*, el gen *virD2* se ubicó río arriba del gen *trbB* y carece de 2 genes implicados en la codificación de dos proteínas que hacen parte del filamento extracelular o pili, *trbK/virB5* y *trbH/virB7*, en *A. tumefaciens*. Aunque esta estructura favorece la unión con la célula receptora, existen estudios con cepas mutantes deficientes en la formación del pili, donde la transferencia del plásmido Ti no se ve afectada (Christie, 2004), lo que indica que estas proteínas, no son un elemento esencial en la maquinaria de conjugación.

Por otro lado, nuestro hallazgo de un gen que codificaría una proteína homóloga a VirD2 es de especial interés debido a que, durante los mecanismos de conjugación, el ADN que es objeto de transferencia, es específicamente procesado por un complejo proteico denominado relaxosoma. La proteína VirD2 de *A. tumefaciens* es una enzima con actividad relaxasa responsable de cortar el ADN en el sitio *oriT* y se une al ADN de cadena sencilla que va a ser transferido por el SSIV. Luego, la proteína VirD2 interactúa con la proteína acopladora (TraG) para comenzar con el mecanismo de transferencia del ADN a través del Mpf (Kopeck y col., 2005). Éste ha sido el motivo por el cual se planteó

evaluar la actividad relaxasa de esta enzima, con el objetivo de acercarnos en el identificación de una posible función de este sistema en *A. ferrooxidans*.



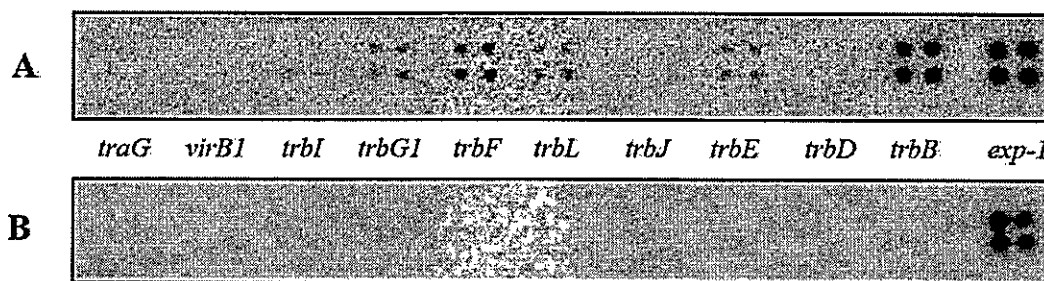
**Figura 4. Comparación de la organización genética de los operones A) *virB/D4* de *A. tumefaciens*; B) *trb* de *A. tumefaciens*; C) *trb* putativo de *A. ferrooxidans* descrito por Barreto y col. (2003). *hyp*: gen con baja similitud a *traI*. ND: ambas regiones están separadas por una secuencia no determinada; D) *trb* putativo de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 descrito en este trabajo; E) *trb* putativo de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 identificado en el genoma (por fuera de la isla) y en F) la isla genómica. Los genes que codifican proteínas homólogas se muestran del mismo color. Los genes en negro no poseen homólogos dentro del sistema putativo de *A. ferrooxidans*.**

Durante la realización de esta tesis, se publicó la secuencia del genoma de la cepa *A. ferrooxidans* ATCC 53993 (<http://www.jgi.doe.gov/>), lo que motivó a realizar una búsqueda de estos genes en esta cepa. Los análisis bioinformáticos permitieron identificar que los genes *trb* están presentes en las dos cepas de *A. ferrooxidans*, ATCC 23270 y ATCC 53993 con una alta similitud en sus secuencias (> 96 %) (Datos no

mostrados). En la figura 4 se puede observar que el número de genes y la organización de los mismos es altamente conservada, observándose variaciones de tamaño solo en las regiones intergénicas de estos genes (Fig. 4D, 4E, 4F). Adicionalmente, se encontró dos grupos de genes *trb* en la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 53993, uno de ellos localizado dentro de la isla genómica de aprox. 160 Kb que solo ésta posee (Fig. 4E, 4F).

#### Análisis de la expresión diferencial de los genes del posible SSIV de *A. ferrooxidans*.

Por medio de macroarreglos de ADN, se encontró que los genes del SSIV de *A. ferrooxidans* tienen niveles de ARN más altos cuando se crecía la bacteria en azufre elemental que cuando se crecía en ión ferroso (Fig. 5, Tabla 4), lo que confirma los resultados obtenidos previamente por nuestro grupo (Valenzuela y col., 2006). Hasta el momento, estos resultados sugieren la presencia de un posible SSIV en *A. ferrooxidans*, que se expresa cuando el microorganismo crece en un sustrato sólido, donde se sabe que forma biopelículas (Valenzuela y col., 2006).



**Figura 5. Expresión de algunos genes del SSIV de *A. ferrooxidans*.** Macroarreglos de ADN a partir del ARN extraído de células de *A. ferrooxidans* crecidas en medio suplementado con azufre (A) o ión ferroso (B). Se incluyó en las membranas un fragmento del gen de la expansina-1 de *Prunus persica* (*exp-1*) como control de marcación e hibridación.

**Tabla 4.** Niveles de ARN de los genes del SSIV de *A. ferrooxidans* ATCC 23270.

Gen	INRX x10 <sup>-2</sup> (CV)		Razón de cambio
	Azufre (S <sup>0</sup> )	Hierro (Fe <sup>2+</sup> )	S <sup>0</sup> / Fe <sup>2+</sup>
<i>trbB</i>	86,9 (0,42)	0,6 (0,24)	146,0
<i>trbD</i>	1,4 (0,52)	ND	↑∞
<i>trbE</i>	5,3 (0,25)	0,16 (0,27)	33,6
<i>trbJ</i>	0,7 (0,40)	0,04 (0,35)	16,9
<i>trbL</i>	5,5 (0,28)	0,11 (0,84)	49,4
<i>trbF</i>	12,6 (0,15)	0,21 (0,25)	60,4
<i>trbG1</i>	6,2 (0,26)	0,09 (0,65)	70,0
<i>trbG2</i>	NA	NA	NA
<i>trbI</i>	1,9 (0,49)	0,09 (0,35)	21,3
<i>virB1</i>	0,6 (0,49)	0,08 (0,60)	7,8
<i>traG</i>	1,2 (0,17)	0,25 (0,32)	4,9
<i>exp-1</i>	1,2 (0,40)	1,2 (0,22)	1,0

INRX: intensidad neta relativa promedio correspondiente a 6-8 manchas de cada gen.

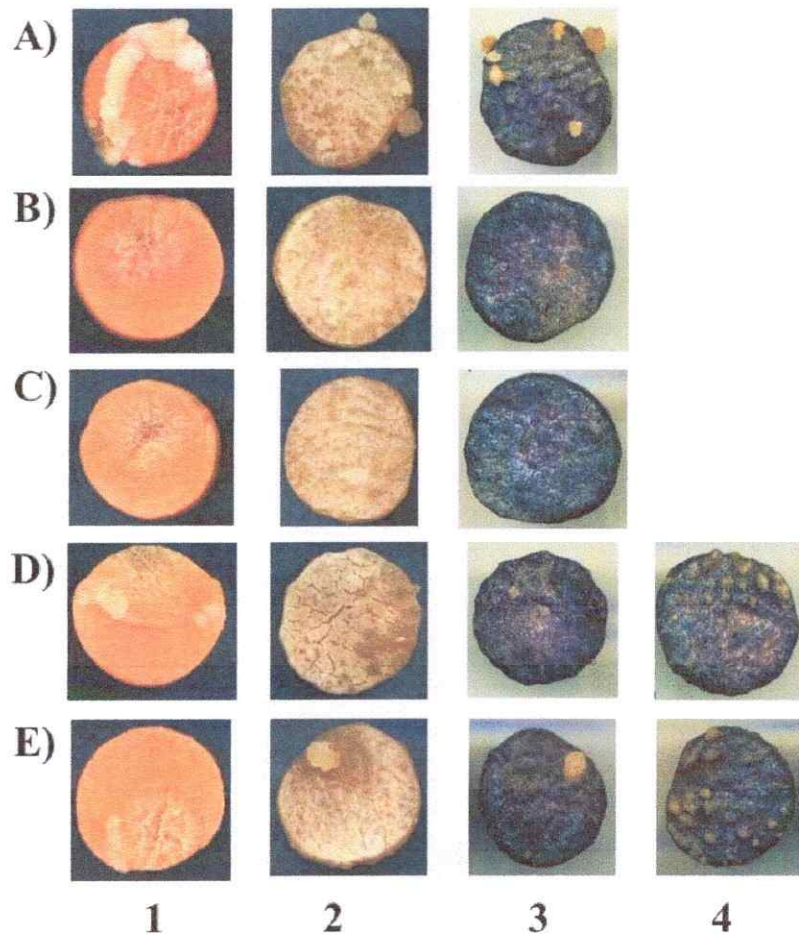
CV: coeficiente de variación. NA: no analizado. ND: no detectado

#### Importancia de la proteína VirB1 de *A. ferrooxidans* en el funcionamiento del SSIV de *A. tumefaciens* mediante ensayos de complementación genética heteróloga.

Debido a la dificultad que presenta la aplicación de técnicas genéticas en *A. ferrooxidans* y a que las proteínas del SSIV de *A. ferrooxidans* poseen alta similitud con las proteínas del SSIV de *A. tumefaciens*, se evaluó la capacidad que tiene el gen que codifica la proteína VirB1 de *A. ferrooxidans*, *virB1*, de complementar funcionalmente una mutante de *A. tumefaciens*, la cepa PC1001 ( $\Delta virB1$ ), mediante ensayos de transferencia del plásmido, para evaluar la capacidad de reestablecer la función conjugativa de este sistema; y la formación del tumor en bioensayos con papa y zanahoria, para evaluar la capacidad de reestablecer la función de translocación de

proteínas. Ambos ensayos permitirán conocer la importancia de la proteína VirB1af, con un dominio transglicosilasa (Anexo 1), en el ensamblaje de un SSIV heterólogo.

En los ensayos de la formación del tumor, la cepa mutante de *A. tumefaciens* PC1001 careció de la capacidad de formar tumores en los discos de zanahoria y papa (Fig. 6B), a diferencia de la cepa silvestre de *A. tumefaciens* A348 (Fig. 6A). Cuando se transformó la cepa mutante con el plásmido sin el inserto (*pTrc200*), no se observó ningún efecto en la formación del tumor (Fig. 6C), sin embargo, esta capacidad se restableció cuando se transformó la cepa mutante con *pTrc-B1suis* y *pTrc-B1af* y se indujo la expresión de ambas proteínas en la mutante de *A. tumefaciens* (Fig. 6D, 6E). En la figura 7, se puede observar que el gen *virB1* de *A. ferrooxidans* tiene la capacidad de reestablecer la formación de tumores por una mutante de *A. tumefaciens* PC1001 en un 57 %, mientras que *virB1* de *B. suis* en un 36 %. Los análisis estadísticos indican que existe una diferencia estadísticamente significativa entre la cepa silvestre y complementadas versus la cepa mutante sin complementar ( $p < 0,0001$ ) (Fig. 7), lo que indica que la cepa silvestre y la complementada, tuvieron una capacidad similar de producir tumores. Al mismo tiempo, se evaluó un segundo fragmento del gen *virB1* de *A. ferrooxidans* de 670 pb (*virB1af2*) que codificaría una proteína VirB1af con una delección de 32 aminoácidos en su dominio N-terminal. Aunque la capacidad de reestablecer la formación del tumor por parte de esta proteína VirB1af mutada (27 %) fue menor que la no mutada (57 %), se observó que no hubo diferencia estadísticamente significativa entre la actividad observada con la proteína mutada y la no mutada (Fig. 7).



**Figura 6. Complementación genética de *A. tumefaciens* PC1001 ( $\Delta virB1$ ).** Se clonó el gen *virB1* de *A. ferrooxidans* en el vector *pTrc200*. *pTrc-B1af* se usó para transformar *A. tumefaciens* PC1001 ( $\Delta virB1$ ). La expresión del gen *virB1* se indujo con 1 mM de IPTG y los genes del SSIV de *A. tumefaciens* con acetosiringona 300  $\mu$ M por 4 h. Se evaluó la formación del tumor en discos de zanahoria y papa de 2 cm de diámetro que se inocularon con 50  $\mu$ l de **A)** *A. tumefaciens* A348 (silvestre); **B)** medio de cultivo LB (control negativo); **C)** *A. tumefaciens* PC1001 transformada con *pTrc200*; **D)** *A. tumefaciens* PC1001 transformada con el gen *virB1* de *B. suis* (*pTrc-B1suis*); **E)** *A. tumefaciens* PC1001 transformada con el gen *virB1* de *A. ferrooxidans* (*pTrc-B1af*). En la columna 1: zanahoria; en la columna 2: papa; en las columnas 3 y 4: coloración de la papa con lugol.

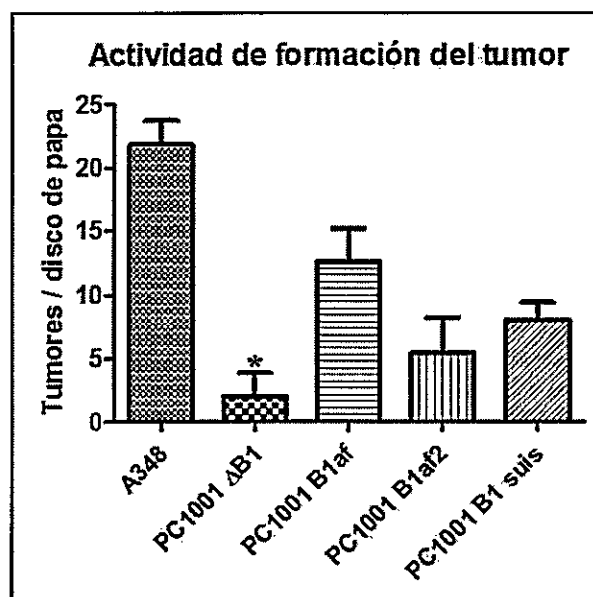
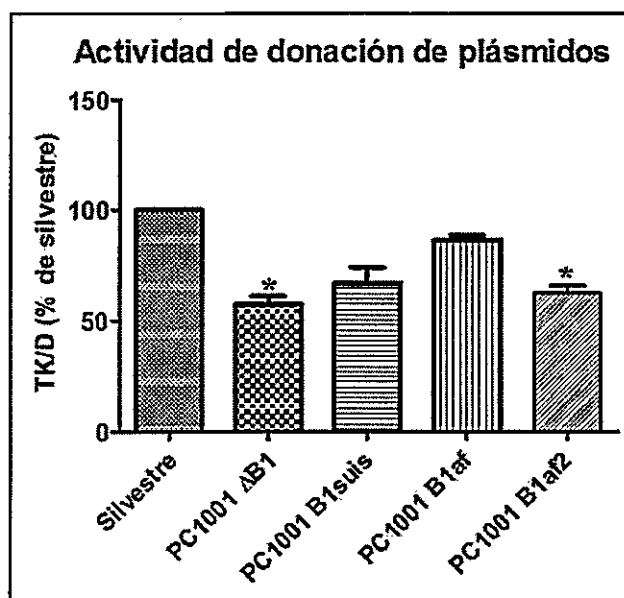


Figura 7. Actividad de formación del tumor en mutantes de *A. tumefaciens* PC1001 ( $\Delta$ *virB1*). Número de tumores por disco de papa producidos por *A. tumefaciens* A348 (silvestre); *A. tumefaciens* PC1001 ( $\Delta$ *virB1*) transformada con *pTrc200* (PC1001 $\Delta$ B1); *A. tumefaciens* PC1001 transformada con el gen *virB1* (PC1001B1af) y *virB1* mutado de *A. ferrooxidans* (PC1001B1af2); *A. tumefaciens* PC1001 transformada con el gen *virB1* de *B. suis* (PC1001B1suis). Las barras de error indican las desviaciones estándar de los resultados de 3 experimentos independientes. Se realizaron análisis estadísticos usando una ANOVA de dos vías y la prueba *post-hoc* Dunnet usando el programa estadístico Prisma v5.0.  $p < 0,0001$

Por otro lado, en los ensayos de transferencia del plásmido (Fig. 8), se observó que la mutante de *A. tumefaciens* PC1001 poseía un 59 % de capacidad de transferir el plásmido pLS1, lo cual es estadísticamente significativo con respecto a la actividad observada con la cepa silvestre ( $p < 0.05$ ). A diferencia de ésta, las mutantes PC1001 complementadas con *virB1suis* y *virB1af* presentaron una capacidad de transferencia del plásmido de 70 y 87 %, respectivamente. Adicionalmente, la complementación con el segundo fragmento del gen *virB1* de *A. ferrooxidans* de 670 pb (*virB1af2*) no tuvo ningún efecto significativo en la transferencia del plásmido pLS1, ya que se comportó de la misma forma que la mutante PC1001.





**Figura 8. Complementación de la actividad donadora del plásmido pLS1 en PC1001.** La cepa donadora A348 (pLS1) y PC1001 ( $\Delta virB1$ ) (pLS1) con el pTrc200 con y sin el gen *virB1* se cocultivaron con la cepa recipiente de *A. tumefaciens* GV3101 (pTiA6) por 3 días en presencia de IPTG y acetosiringona (AS) seguido por la cuantificación de las células transconjugantes (TK/D = transconjugantes por donador). Las cepas usadas fueron: *A. tumefaciens* A348 (pLS1) (silvestre); *A. tumefaciens* PC1001 (pLS1) transformada con *pTrc200* (PC1001 $\Delta B1$ ); *A. tumefaciens* PC1001 (pLS1) transformada con el gen *virB1* de *B. suis* (PC1001B1suis); *A. tumefaciens* PC1001 (pLS1) transformada con el gen *virB1* (PC1001B1af) y *virB1* mutado de *A. ferrooxidans* (PC1001B1af2). Las barras de error indican las desviaciones estándar de los resultados de 3 experimentos independientes.  $p < 0.05$ .

Los resultados obtenidos en los experimentos de complementación genética heteróloga con el gen *virB1af* sugieren que la proteína VirB1 codificada por este gen, podría ser importante en el ensamblaje y funcionamiento del posible SSIV presente en *A. ferrooxidans*.

#### Caracterización de la actividad relaxasa VirD2 de *A. ferrooxidans*.

El gen *virD2* identificado en el SSIV de *A. ferrooxidans* (Fig. 3) codifica una proteína que posee un dominio relaxasa en su estructura (Anexo 1). Es conocido que



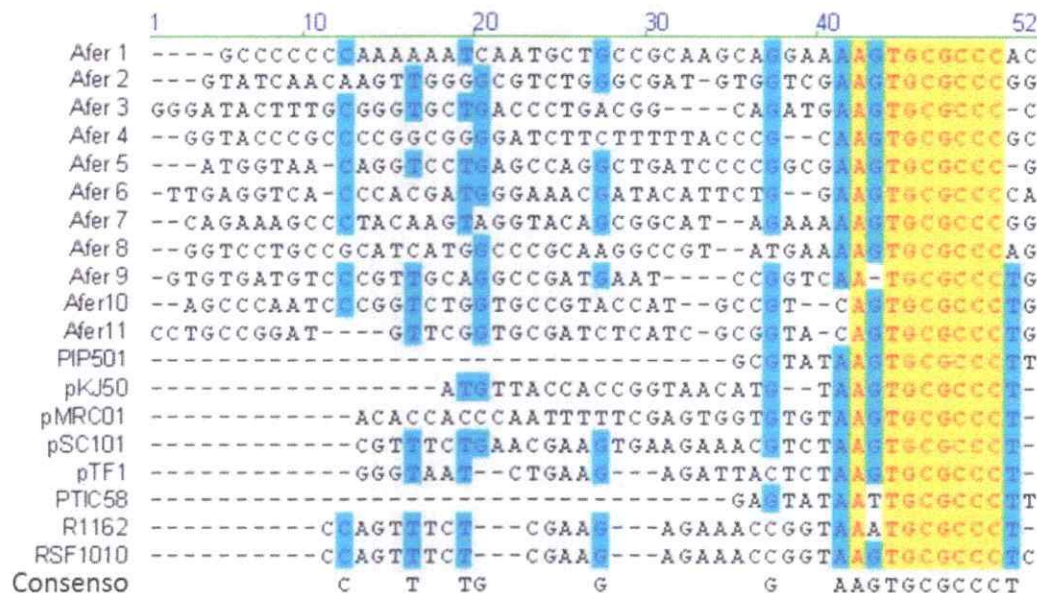
proteínas de este tipo están involucradas en la transferencia del ADN a través del SSIV. La relaxasa VirD2 de *A. tumefaciens* se une al origen de transferencia (*oriT*) y corta la cadena de ADN destinada para la transferencia y permanece unida covalentemente al extremo 5', formando un complejo nucleoprotéico VirD2-ADN. Por lo tanto, la relaxasa es una proteína importante dentro del complejo llamado relaxosoma, que permite la interacción entre el ADN blanco de transferencia y las proteínas del Mpf, especialmente, con la proteína acopladora TraG/VirD4 del SSIV (Cascales y Christie 2004).

Para caracterizar la actividad relaxasa de la proteína VirD2 de *A. ferrooxidans*, se analizó el genoma del microorganismo en busca de posibles sitios de reconocimiento y corte por parte de la relaxasa (sitios *oriT*), se expresó y purificó la proteína VirD2, se realizaron ensayos de relajación del plásmido *in vitro* y se determinó la interacción proteína-ADN por medio del ensayo cambio en la movilidad electroforética (EMSA) descrita por Kopec *y col.* (2005).

#### **Identificación de los sitios *oriT* en *A. ferrooxidans*.**

Inicialmente, se hizo una búsqueda de los posibles sitios *oriT* presentes en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 usando la secuencia consenso de los *oriT* descrita por Kurenbach *y col.* (2002). La búsqueda arrojó más de 1000 sitios *oriT* en el genoma de *A. ferrooxidans* por lo que se limitó con las secuencias consenso AAGTGCGCCC y ACAATGCGCACT, que correspondían solamente al sitio *nic* de los *oriT* descritos por Kurenbach *y col.* (2002). Con éstas, se encontraron 11 posibles sitios de corte distribuidos en diferentes lugares del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (Fig. 9). Para definir estas secuencias como verdaderos sitios *oriT* y poder usarlas en los

ensayos *in vitro*, se analizaron las primeras 50 pb río arriba del sitio *nic*, en busca de repetidos invertidos, que se conocen por su importancia en la formación de estructuras secundarias necesarias para el reclutamiento de las proteínas del relaxosoma en los sitios *oriT* (Garcillán-Barcia *y col.*, 2009). De los once, 10 *oriT* identificados poseían dichas secuencias palindrómicas, por lo que podrían ser utilizados en los análisis *in vitro* aquí contemplados y, por su localización aledaña a genes de interés en el genoma de *A. ferrooxidans* (**Anexo 2**), se seleccionaron los *oriT*4, 6 y 9 para ser analizados en los ensayos de EMSA y de relajación del plásmido *in vitro*.



**Figura 9.** Alineamiento de las secuencias nucleóticas de los sitios *oriT* encontrados en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Sitios *oriT* encontrados en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (*Afer1-11*) alineados con las secuencias de los sitios *oriT* de los plásmidos: IP501, KJ50, MRC01, SC101, TF1, TIC58, R1162 y RSF1010. En amarillo, la región del sitio de corte por parte de la relaxasa, sitio *nic*.

### Caracterización de la proteína VirD2 de *A. ferrooxidans*

En la estructura general de las relaxasas, el extremo N-terminal posee un dominio con actividad endonucleasa y un dominio de unión al DNA; mientras que el extremo C-terminal contiene un dominio con actividad helicasa y/o funciones relacionadas con su asociación a la membrana y con la interacción proteína-proteína (Lorenzo-Díaz *y col.*, 2011). Nuestros análisis bioinformáticos mostraron que las proteínas VirD2 de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y 53993 poseen en su extremo N-terminal un dominio relaxasa clasificado en la base de datos de dominios conservados como COG3843 (*E-value*: 1.31e-12). Dentro de éste, se encontraron dos motivos importantes para su clasificación y actividad relaxasa (Fig. 10). El motivo I participa en el ataque nucleofílico en el sitio de corte y el motivo III se encarga de activar la tirosina del motivo I uniéndose a metales catiónicos como  $Mg^{+2}$  o  $Mn^{+2}$ . La presencia de estos dos motivos y la ausencia del motivo II indican que la relaxasa VirD2 de *A. ferrooxidans* pertenece a las relaxasas de la familia IncQ, en las cuales se conoce que el motivo II, presente en otras relaxasas, no es necesario para cortar ni movilizar el ADN por parte de este tipo de relaxasas (Monzingo *y col.*, 2007). Esto concuerda con la secuencia consenso de los *oriT* encontrados (AAGTGCGCCC) en el genoma de *A. ferrooxidans* (Fig. 9) que es reconocida y cortada específicamente por esta familia de relaxasas.



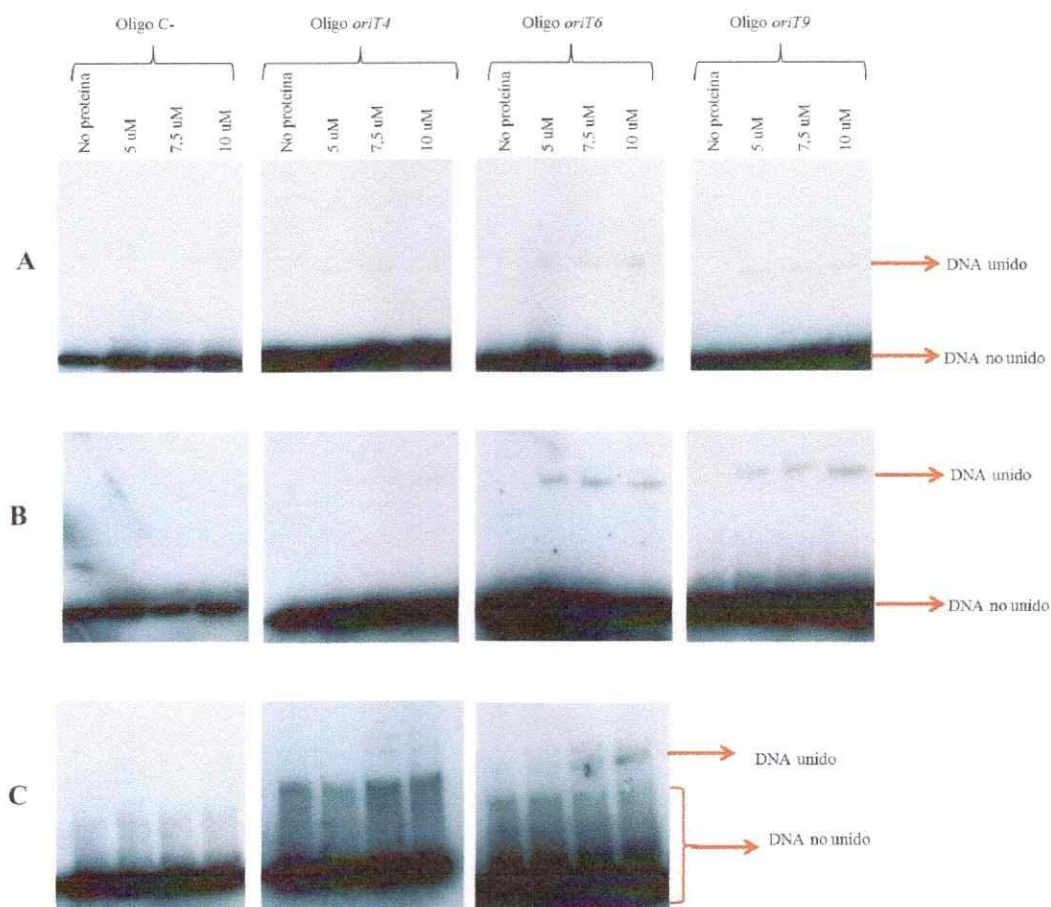
**Figura 10. Alineamiento del dominio COG3843 de las relaxasas de la familia IncQ.** Secuencias del dominio relaxasa de las principales relaxasas de la familia IncQ presentes en los SSIV de los plásmidos: IP501, RE25, MRC01, G01, TF1, RSF1010 alineadas con el dominio relaxasa de las proteínas VirD2 presentes en el SSIV de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y 53993. Se resaltan los motivos I y III característicos en esta familia de relaxasas. En amarillo, los residuos catalíticos de cada motivo.

### Evaluación de la interacción VirD2-ADN por medio de ensayos EMSA.

Es conocido que la interacción entre la relaxasa y el *oriT* es específica de secuencia y estructura, debido a que esta secuencia contiene repetidos invertidos y secuencias ricas en AT necesarias para esta interacción. Adicionalmente, las relaxasas requieren de cofactores divalentes ( $Mg^{2+}$  o  $Mn^{2+}$ ) para el reconocimiento y unión a las



secuencias *oriT*, pero son más importantes para la actividad de corte en el sitio *nic* (Garcillán-Barcia *y col.*, 2009; Lorenzo-Díaz *y col.*, 2011). Una vez estandarizados los ensayos (ver materiales y métodos), se seleccionaron las mejores condiciones de reacción (**Fig. 11**).



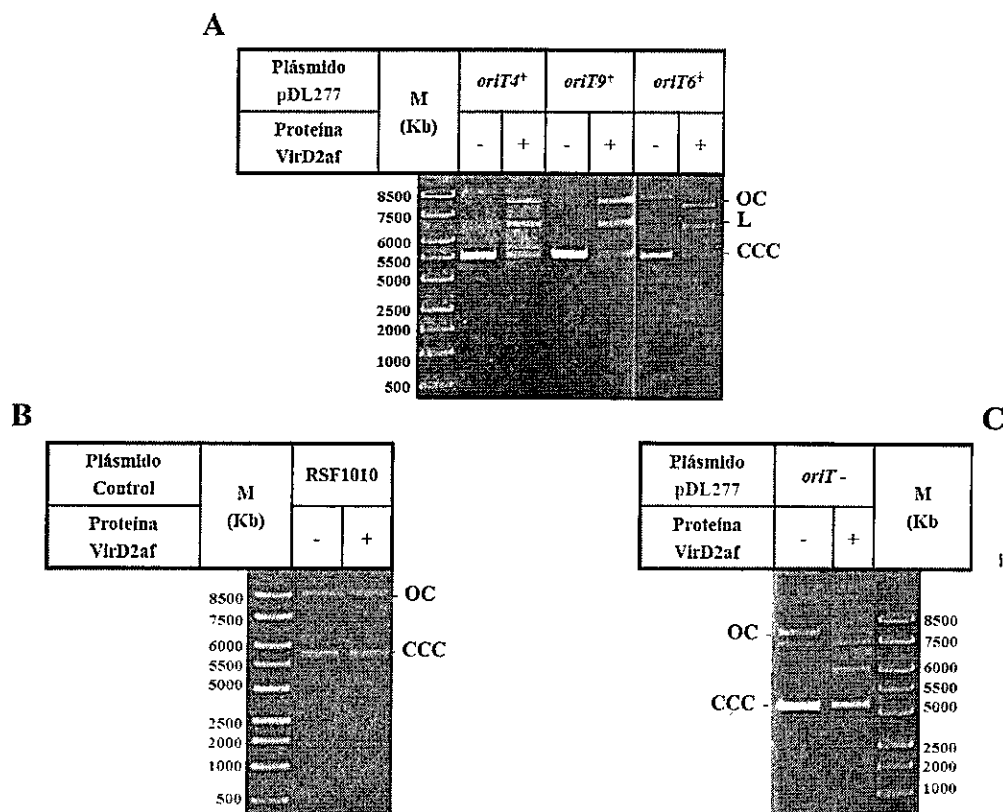
**Figura 11. Ensayo de cambio en la movilidad electroforética (EMSA).** Se diseñaron oligonucleótidos de 50 pb de los 11 *oriT* identificados en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y se marcaron con [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P] ATP. Se mezclaron 10 fmol de oligonucleótidos radiomarcados con concentraciones crecientes de la proteína VirD2 (0, 5, 7.5 y 10  $\mu$ M) por 30 min de incubación a 45 °C. Las muestras se cargaron en un gel de poliacrilamida nativo al 10 % (w/v) y se realizó la electroforesis por 90 min a un voltaje constante de 90 V. Como control negativo se diseñó un oligonucleótido sin secuencias homólogas a los *oriT* de *A. ferrooxidans* (oligo C-). Los ensayos se realizaron con oligonucleótidos de ADNss conteniendo los *oriT4*, 6 y 9 en ausencia de Mg<sup>2+</sup> (**A**) y en presencia de 10 mM de Mg<sup>2+</sup> (**B**). Ensayos con oligonucleótidos de ADNds conteniendo los *oriT4* y 6 en presencia de Mg<sup>2+</sup> se muestran en **C**.

Los análisis de EMSA realizados mostraron que la proteína VirD2 reconoce y se une a oligonucleótidos de ADNss que contienen los *oriT4*, *6*, y *9* presentes en el genoma de *A. ferrooxidans*, en ausencia y presencia de 10 mM de  $Mg^{2+}$  (Fig. 11A, 11B). Adicionalmente, esta interacción también se observó cuando el ADN está en doblehebra conteniendo los *oriT4* y *6* en presencia de 10 mM de  $Mg^{2+}$  (Fig. 11C). Es importante resaltar que no se observó la formación de complejos ADN-proteína cuando se utilizó el oligonucleótido control (Oligo C-) que contenía una secuencia aleatoria no similar a los *oriT* evaluados en este ensayo (Fig. 11A, 11B, 11C).

#### **Evaluación de la actividad relaxasa de la proteína VirD2 de *A. ferrooxidans***

Con base en los resultados obtenidos en EMSA, se diseñaron experimentos de relajación del plásmido *in vitro* para determinar la capacidad de la proteína VirD2 de *A. ferrooxidans* de relajar un plásmido que contuviera las secuencias *oriT4*, *6* y *9*, según protocolo descrito por Kurenbach y col. (2002). En presencia de la proteína VirD2af, se observó una disminución en la intensidad del plásmido superenrollado (ccc) que contenía las secuencias *oriT4*, *6* y *9* (pDL277*oriT<sup>+</sup>*) y un aumento en la intensidad de una banda correspondiente a la forma relajada del plásmido (oc) (Fig. 12A). Al comparar la intensidad de las bandas ccc de los plásmidos que contenían los *oriT4*, *6* y *9*, se encontró que esta intensidad disminuyó en aproximadamente un 71, 90 y 87 %, respectivamente, en presencia de la proteína VirD2af; mientras que la intensidad de la banda oc aumentó un promedio de 97,8 %, en los plásmidos que contenían los *oriT4*, *6* y *9* en presencia de la enzima. En los plásmidos usados como controles negativos, RSF1010 y pDL277, no se observó ninguna diferencia significativa en la intensidad de

las bandas ccc y oc, cuando se compararon en presencia y ausencia de la enzima (Fig. 12B, 12C).



**Figura 12. Actividad relaxasa de la proteína VirD2 de *A. ferrooxidans*.** A) El plásmido pDL277 conteniendo una región de 300 pb con los *oriT4*, 6 y 9 (6.9 kb) se usó como sustrato para la reacción en ausencia (-) y presencia de la proteína VirD2af (+). Como control negativo se usó B) el plásmido RSF1010 (familia IncQ) (8.7 kb) y C) el plásmido pDL277 sin secuencias *oriT* (6.6 kb). La mezcla de reacción contenía 150 ng de cada plásmido y 40 veces de exceso molar de VirD2af. CCC (*covalently closed circular*): forma superenrollada; OC (*open circular*): forma relajada; L (lineal): plásmido lineal. M: marcador de peso molecular en kilobases.

Adicionalmente, en presencia de la proteína VirD2, se observó la aparición de una banda intermedia (L) con un tamaño de aproximadamente 6,9 kb, correspondiente al tamaño lineal del plásmido pDL277 cuando contenía los *oriT*s de *A. ferrooxidans* (Fig. 12A). Esta banda también se observó presente en el plásmido control pDL277 que no contenía los sitios *oriT* de *A. ferrooxidans* (Fig. 12C) pero no, en el otro plásmido usado

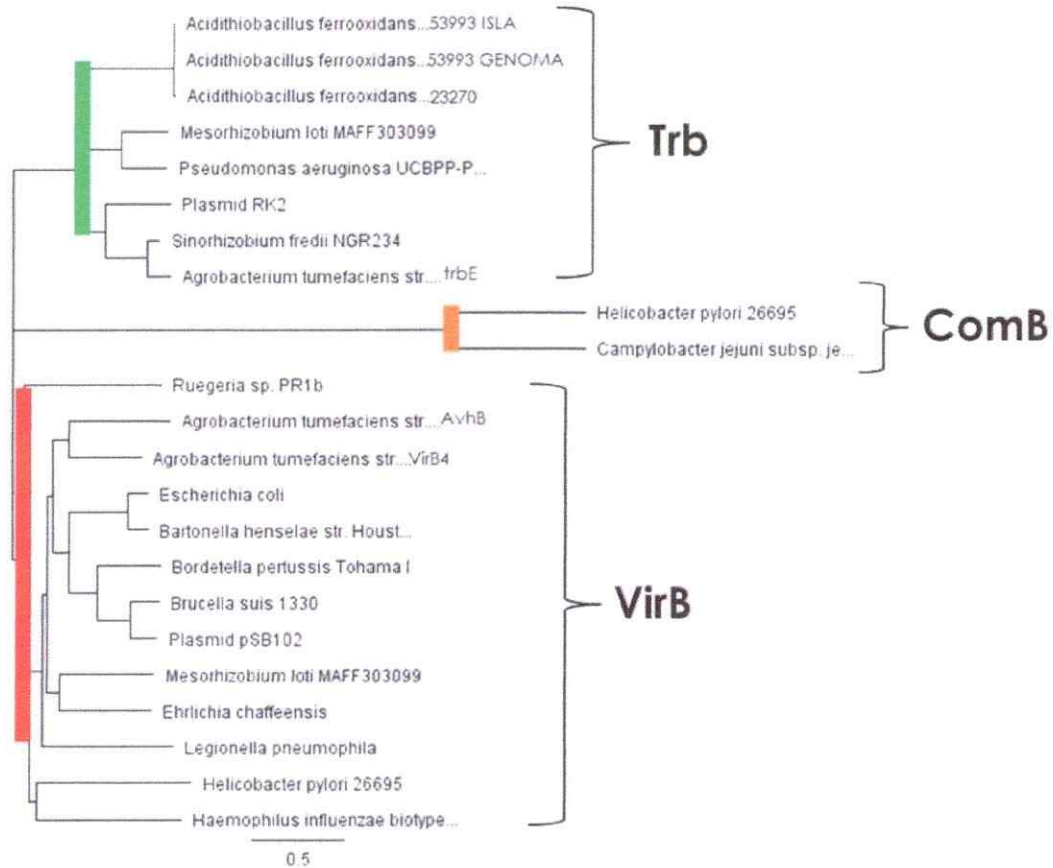
como control negativo, RSF1010 (Fig. 12B), lo que podría estar en consonancia con lo reportado por otros autores, que reportaron la capacidad que tienen algunas relaxasas de hacer un corte en la doble hebra del ADN de forma inespecífica cuando se evalúa en ensayos *in vitro* (Vedantam *y col.*, 2006; Rocco y Churchward, 2006; Grove *y col.*, 2013).

#### **Análisis evolutivo del SSIV de *A. ferrooxidans***

Los resultados de Frank *y col.* (2005) y Juhas *y col.* (2007) demuestran que los SSIV se agrupan filogenéticamente según su función de secreción de proteínas, conjugación o sistemas de competencia basados en los árboles filogenéticos construidos con la secuencia del gen *trbE/virB4* por ser un gen que es constante en todos los SSIV descritos hasta el momento. Dado que los genes del SSIV están presentes en las dos cepas de *A. ferrooxidans*, ATCC 23270 y 53993 y a que los genes de los 3 posibles sistemas poseen alta similitud en sus secuencias (> 96 %), un análisis filogenético permitiría aproximar sus posibles funciones. Se construyó un árbol filogenético con las secuencias de genes homólogos a *trbE/virB4* descritas en otros sistemas y microorganismos. Los análisis filogenéticos mostraron como estos genes se agruparon en 3 diferentes clados monofiléticos (Fig. 13). El clado representado por la línea roja, denominado VirB, agrupó genes de SSIV relacionados con la transferencia de proteínas efectoras (*bootstrap* 100 %). Otro clado representado por la línea naranja, ComB, agrupó genes de SSIV relacionados con mecanismos de toma y liberación de material genético (*bootstrap* 100 %) y un tercer clado representado en verde, Trb, agrupó los genes *trbE* relacionados con SSIV especializados en procesos conjugativos (*bootstrap* 97 %). Al



analizar la localización de los genes *trbE* presentes en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y 53993 en este árbol filogenético, se observó que éstos se agruparon en el clado Trb que alberga genes homólogos de otros SSIV relacionados principalmente, con eventos de conjugación.



**Figura 13.** Árbol filogenético del gen *trbE* de *A. ferrooxidans*. La topología y el largo de las ramas están acordes a las reconstrucciones hechas con el máximo de verosimilitud (*maximum likelihood*) hechas con el programa Geneious v5.4. Los grupos monofiléticos son representados por colores que indican porcentajes de agrupamiento: verde 97 %, naranja 100 % y rojo 100%, según los valores de *bootstrap* obtenidos a partir de 500 réplicas. Los genes *trbE* de *A. ferrooxidans* se agruparon con otros genes *trbE* asociados a SSIV que participan en procesos conjugativos. Los números de acceso de los genes analizados en esta gráfica se encuentran disponibles en Frank y col. (2005).

## DISCUSIÓN

Esta es la primera descripción y análisis de la expresión y funcionalidad de un SSIV en una bacteria de importancia industrial que participa en procesos de biolixiviación. La identificación de genes homólogos a los SSIV VirB y Trb de *A. tumefaciens* en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 53993 es un hallazgo importante que sugiere la presencia de un sistema genético que codificaría las proteínas necesarias para una maquinaria de secreción tipo IV en esta bacteria, la cual estaría compuesta por cuatro elementos o subestructuras importantes que caracterizan los SSIV funcionales descritos hasta el momento (Fig. 14B): 1) la proteína acopladora, TraG; 2) el componente energético, que estaría compuesto por las ATPasas TraG, TrbB y TrbE; 3) un complejo proteico que formaría el canal de secreción, TrbD, TrbL, TrbF, TrbG1, TrbG2 y TrbI y; 4) un pili que, a diferencia de lo reportado en el SSIV de *A. tumefaciens* (Fig. 14A), en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y 53993 estaría conformado solo por la proteína TrbC al no encontrarse en este sistema, un gen homólogo a *virB5*. Sin embargo, Kalkum y col. (2002) y Yuan y col. (2005) han descrito que la proteína TrbC es el principal componente de esta estructura extracelular; mientras que la proteína VirB5, es un componente ausente en varios SSIV descritos a la fecha (Christie, 2004; Jakubowski y col., 2009; Banta y col., 2011). Adicionalmente, el hallazgo de un gen homólogo al gen *trbJ* de *A. tumefaciens*, sugiere la presencia de un sistema en *A. ferrooxidans* similar al

observado en *E. coli* denominado, *exclusión de entrada*, un mecanismo que evita que las células de tipo  $F^+$  puedan actuar como receptoras frente a otras  $F^+$ ; ya que la proteína codificada por este gen, TrbJ, confiere dicha exclusión de superficie en la transferencia del plásmido RP1 en *Pseudomonas aeruginosa* (Lyras y col., 1994). Similar a lo descrito por Barreto y col. (2003), el gen *trbG*, que codifica una proteína de membrana externa formadora del canal, la secretina, se encontró duplicado en los sistemas Trb descritos en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y 53993 (Fig. 3D). Aunque se desconoce cuál pueda ser la implicación que esto tenga en la funcionalidad del sistema, se han descrito SSIV que poseen un pili de mayor grosor asociado a un componente de membrana externa, más ancho para facilitar su ensamblaje (Alvarez-Martinez y Christie, 2009; Chandran y col., 2009; Torker y col., 2014).

Con relación a los genes no identificados en el sistema Trb de *A. ferrooxidans*, *virb5* y *virB7*, existen reportes que indican que estos mismos genes se encuentran ausentes en el 25 % de los SSIV caracterizados y han demostrado no ser esenciales para el funcionamiento de los mismos (Gluglielmini y col., 2013). Es interesante mencionar que la organización genética que presentan los genes del SSIV aquí descritos, es la más frecuente en la naturaleza y que la organización observada en *A. tumefaciens* es la menos común reportada (Gluglielmini y col., 2013). Todas las variaciones en la estructura y organización de los genes de los SSIV observados en la naturaleza pueden ser una característica especial de cada sistema, que indicaría la necesidad del microorganismo de adaptar una maquinaria de secreción tipo IV, acorde con sus características fisiológicas.

Es conocido que los SSIV poseen diversidad funcional y que están ampliamente distribuidos en los genomas de bacterias y plásmidos, al punto de observarse la

presencia de dos o varios SSIV en el genoma de una misma bacteria (Cascales y Christie, 2003; 2004). Con la publicación de la secuencia del genoma de la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 53993, se encontró que los genes del SSIV están presentes en dos cepas de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y 53993, y que la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 53993 posee dos SSIV, uno de ellos localizado en la isla genómica propia de esta cepa y el otro, en otra región del cromosoma fuera de la isla. Lo conservado de sus secuencias y organización genética podrían ser el producto de eventos de transferencia genética entre estas dos cepas.

El hallazgo de estos sistemas Trb en ambas cepas de *A. ferrooxidans*, es de especial interés a la luz de reportes recientes sobre el genoma de estos microorganismos. Un resultado interesante ha sido la identificación de islas genómicas presentes en cada una de estas cepas secuenciadas que, por sus características, parecen ser elementos genéticos adquiridos a través de mecanismos de transferencia horizontal de genes (THG) (Levicán y col., 2009; Valdés y col., 2010; Orellana y Jerez, 2011; Bustamante y col., 2012). De éstos, los resultados obtenidos por Bustamante y col. (2012) demostraron la existencia de una región de 291 kpb en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 con características de un elemento conjugativo integrativo (ICE) que posee la capacidad de escindir-se del genoma en condiciones de estrés. Más interesante ha sido la identificación de genes homólogos al sistema conjugativo Tra del plásmido F en 3 regiones de esta secuencia, los cuales, según los autores, podrían estar involucrados en la transferencia conjugativa de este interesante ICE. La descripción de genes *tra* y *trb* en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 es, sin duda, un hallazgo importante que permitirá

explorar, con otros estudios experimentales, la capacidad de este microorganismo de realizar procesos de THG entre los microorganismos presentes en su entorno.

En este sentido, la presencia de un SSIV es importante para que los microorganismos lleven a cabo diversos procesos fisiológicos que le permitan interactuar con el medio y/o con otros microorganismos que hacen parte de su ambiente. Los análisis filogenéticos indican que los posibles SSIV de *A. ferrooxidans* se relacionan con otros SSIV que participan en eventos de conjugación, lo que sugiere que el SSIV de *A. ferrooxidans* le permitiría a la bacteria tener la capacidad de intercambiar macromoléculas como ADN o complejos ADN-proteína con las bacterias de su misma especie y con otras de su entorno. Esta transferencia de genes entre los microorganismos es un mecanismo importante de adaptación microbiana a los cambios ambientales (Schmidt-Eisenlohr *y col.*, 2001), lo cual es especialmente importante, ya que *A. ferrooxidans* hace parte de un consorcio de microorganismos biomineros en su ambiente natural y la identificación de este tipo de sistemas en esta bacteria biolixivante, ayudará a los investigadores que buscan mejorar las actividades de estos consorcios para su aplicación en faenas mineras (Brune y Bayer, 2012).

*A. ferrooxidans* es una bacteria quimiolitotrófica capaz de vivir en diferentes condiciones ambientales, ya que obtiene su energía a partir de la oxidación del ión ferroso, azufre elemental y sulfuros metálicos. Con los resultados obtenidos en esta tesis, se observó que los genes del SSIV de *A. ferrooxidans* se expresan, preferiblemente, cuando la bacteria crece usando azufre (sustrato sólido) como fuente de energía, lo que sugiere una participación de este sistema en los procesos fisiológicos que la bacteria realice al crecer en estas condiciones, ya sea en procesos de adherencia al sustrato o



procesos conjugativos. Teniendo en cuenta las características de este sustrato, las funciones del SSIV y los resultados obtenidos en esta tesis, cuando la bacteria crece formando biopelículas alrededor de este sustrato sólido, se le facilitaría tener un contacto estrecho entre las bacterias que allí se encuentran, favoreciendo una THG mediante procesos de conjugación; al igual que lo observado en las biopelículas formadas por *Vibrio* sp. (Angles y col., 1993), *E. coli* (Król y col., 2011) y *Staphylococcus aureus* (Savage y col., 2013), donde se reportó un incremento en la transferencia de plásmidos asociados con la multiresistencia a medicamentos entre las células presentes en la biopelícula, comparado con las células planctónicas. Estos hallazgos, junto a otros reportados (Rawlings, 2005, Andersson y Banfield, 2008; Orellana y Jerez, 2011, Bustamante), sugieren que las condiciones de cultivo de *A. ferrooxidans*, no son un impedimento para llevar a cabo eventos de THG, y que por el contrario, existe un intercambio de material genético constante entre estos microorganismos.

Es importante para la funcionalidad del SSIV, un correcto ensamblaje del complejo proteico en las membranas celulares. Para esto, el producto del gen *virB1*, con su actividad transglicosilasa, degrada parcialmente la pared celular y permite un ensamblaje correcto de la maquinaria de secreción tipo IV en las bacterias Gram-negativas. El SSIV de *A. ferrooxidans* posee un gen que codifica una proteína con dominios importantes para una actividad transglicosilasa lítica, y para evaluar su participación en el ensamblaje de un SSIV, se realizaron ensayos de complementación genética en un sistema heterólogo como *A. tumefaciens* debido a la dificultad que presenta la aplicación de técnicas genéticas en *A. ferrooxidans*. Los resultados demuestran la capacidad que tiene el gen *virB1* de *A. ferrooxidans* para complementar,

funcionalmente, mutantes de *A. tumefaciens* en el sistema VirB/D4, permitiéndole a esta mutante reestablecer parcialmente su capacidad tumorigénica (57 %) y su capacidad de transferir un plásmido de la familia IncQ, pLS1 (87 %). Estos resultados sugieren que la transglicosilasa lítica VirB1 de *A. ferrooxidans* permite un ensamblaje del SSIV de *A. tumefaciens* adecuado para facilitar la transferencia de complejos ADN-proteína importantes para la formación de tumores en las plantas y, adicionalmente, facilitando la transferencia de material genético mediante procesos conjugativos con bacterias de su misma especie o con aquellas que se encuentren en su entorno.

Es de especial interés, resaltar la capacidad de este sistema en reconocer y transferir plásmidos de la familia IncQ, ya que los plásmidos descritos en algunas cepas de *A. ferrooxidans*, pTF1 y pTF-FC2, se han caracterizado y clasificado dentro de esta familia de plásmidos (Drolet *y col.*, 1990, Drolet y Lau, 1992 y Rawlings, 2005). Además, se caracterizan por ser plásmidos movilizables, los cuales, al poseer solo en su estructura genética la cantidad de genes mínimos para facilitar su transferencia a través de procesos conjugativos, no poseen los genes que codificarían las proteínas de la maquinaria Mpf. Por lo tanto, nuestros hallazgos podrían estar en consonancia con lo reportado por Garcillán-Barcia *y col.* (2009) que indican que la presencia de un SSIV podría facilitar la transferencia conjugativa de elementos genéticos movilizables, que en el caso de *A. ferrooxidans*, podrían ser los plásmidos que esta posee.

También es importante mencionar que, aunque estos plásmidos se han definido como plásmidos crípticos, se han identificado en su secuencia, transposones de la familia *Tn21* implicados en el esparcimiento de genes que confieren resistencia a antibióticos como los aminoglicósidos,  $\beta$ -lactamasas, sulfonamidas, cloranfenicol y

tetraciclinas (Grinsted *y col.*, 1990). Dado el ambiente inorgánico y ácido en el que crece *A. ferrooxidans*, ésta no estaría expuesta a este tipo de moléculas pero sí, a genes que confieren resistencia a metales (mercurio y arsénico) u otro tipo de metabolismo que puedan ser adquiridos por THG, como lo sugieren los resultados de Clennel *y col.* (1995) y Kaliaeva *y col.* (2001), quienes reportaron el hallazgo de genes similares al gen *merR* y al gen glutaredoxina, incluso, la presencia de un operón *mer* conformado por los genes *merR*, *T*, *P* y *A* dentro de la región variable de esta familia de transposones presentes en los plásmidos pTF-FC2 de *A. ferrooxidans*.

En la transferencia del ADN desde la célula donadora a la receptora por medio del SSIV, está involucrado un reconocimiento del sitio *oriT* en el ADN a transferir seguido por un corte en la molécula del ADN para permitir su liberación. Este reconocimiento y corte es llevado a cabo por la relaxasa VirD2 en *A. tumefaciens* (Kopeck *y col.*, 2005). Los análisis en la secuencia del ADN de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 evidenciaron la presencia de al menos 11 secuencias tipo *oriT* que se encontraron ampliamente distribuidas en el genoma, indicando posiblemente, la presencia de una diversidad de genes en el genoma de *A. ferrooxidans* susceptibles de ser transmitidos por mecanismos que involucren el reconocimiento y corte de estas secuencias *oriT* por parte de proteínas con actividad relaxasa, y de esta forma, contribuir al esparcimiento de estos genes que traerían ventajas evolutivas y/o fisiológicas en esta bacteria de interés industrial.

En este sentido, el producto de los genes *virD2* de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 y 53993 es una proteína con un dominio relaxasa. La evaluación *in vitro* de la actividad relaxasa de la proteína VirD2 de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 mostró que esta proteína



poseía afinidad por los 3 sitios *oriT* evaluados en ausencia de proteínas accesorias del relaxosoma. Esta unión se evidenció en los ensayos EMSA cuando la proteína VirD2 de *A. ferrooxidans* formó complejos con oligonucleótidos de ADNss y ADNds que contenían secuencias *oriT* de *A. ferrooxidans* en presencia y ausencia de un cofactor divalente como el  $Mg^{+2}$ . Adicionalmente, en los ensayos de relajación del plásmido *in vitro*, se observó que dicha proteína tiene la capacidad de relajar un plásmido superenrollado que contiene estas secuencias de transferencia y en presencia de  $Mg^{+2}$ . Estos resultados concuerdan con los observados en otros estudios (Matson y Morton, 1991; Llosa y col., 2003; Vedantam y col., 2006; Rocco y Churchward, 2006; Grove y col., 2013), donde las relaxasas TraI del plásmido F, TrwC del plásmido R388, Orf20 del transposón Tn2916, Mob del transposón Tn5520 y VirD2 de *H. pylori*, se unen y cortan el *oriT in vitro* en ausencia de proteínas auxiliares del relaxosoma, requiriendo solo la presencia de  $Mg^{+2}$  y ADN superenrollado para su actividad de corte. Lo anterior, no solo concuerda con el hallazgo de los motivos I y III dentro del dominio relaxasa de esta proteína, importantes para el reconocimiento y corte de los sitios *oriT* blancos de su actividad, sino con las características de acción enzimática ampliamente descritas para este tipo de enzimas relaxasa (Garcillán-Barcia y col. 2009; Smillie y col., 2010).

Es importante también resaltar, que las interacciones observadas en este estudio entre VirD2 y las secuencias *oriT*, indicarían la capacidad que tiene esta enzima de reconocer y cortar estos sitios que se encontraron ampliamente distribuidos en el genoma de *A. ferrooxidans*. Esta interacción permitiría que los genes aledaños a estas secuencias, se conviertan en blanco de transferencia por este sistema. Si bien los *oriT* analizados, *oriT4*, 6 y 9, se seleccionaron por estar cerca de genes involucrados en el

metabolismo del mercurio, genes de transferencia conjugativa (genes *tra*) y los genes del SSIV de *A. ferrooxidans* descritos en esta tesis, respectivamente; los otros *oriT* identificados, se encuentran aledaños a genes que podrían codificar proteínas para el metabolismo y transporte de polisacáridos capsulares, el metabolismo del ADN (reparación, replicación, helicasas, proteínas de unión), endonucleasas de restricción tipo I, ATPasas transportadoras de potasio y para proteínas involucradas en la formación de un pili tipo IV importante en procesos de adherencia. A esta interesante lista, se podrían anexar como blancos de transferencia, aquellos genes contenidos en los elementos movilizables pTF1 y pTF-FC2 (Grinsted y col., 1990; Clennel y col., 1995; Kaliaeva y col., 2001) y conjugativos como el recientemente descrito ICEafe1 (Levican y col., 2009; Bustamante y col., 2012 y 2014) presentes en el genoma de *A. ferrooxidans*. Incluso, se podría especular que la presencia de un *oriT*, el *oriT9*, aledaño a los genes *trb* aquí descritos, podría ser el responsable de transferir este grupo de genes entre cepas de *A. ferrooxidans*; ésto por la alta similitud, organización genética y agrupación filogenética de los 3 sistemas *Trb* identificados en esta tesis, dos en la cepa ATCC 23270 y uno en la 53993. Sin embargo, se requiere de estudios experimentales que permitan confirmar estos resultados y supuestos.

Particularmente, la proteína VirD2af se unió a un plásmido superenrollado que contenía los *oriT4*, 6 y 9 de *A. ferrooxidans* generando dos formas relajadas del mismo, la forma relajada (oc) y una banda intermedia (L). Esta última presentó una movilidad electroforética aproximada de 6,9 kb, que corresponde al tamaño lineal del plásmido que contenía los *oriT*s de *A. ferrooxidans* (pDL277*oriT*<sup>+</sup>), lo que indicaría una actividad de doble corte de la cadena de ADN por parte de la enzima relaxasa de *A. ferrooxidans*.

Estos resultados concuerdan con los reportados por otros autores, quienes confirmaron la capacidad que tienen algunas relaxasas de hacer un corte en la doble hebra del ADN de forma inespecífica cuando se evalúan en ensayos *in vitro*, debido a la carencia de proteínas auxiliares que regulan el reconocimiento y corte del ADN blanco por parte de la relaxasa (Vedantam *y col.*, 2006; Rocco y Churchward, 2006; Grove *y col.*, 2013). Este sitio de corte inespecífico pudo haberse localizado en la secuencia del vector usado en nuestros experimentos, ya que esta banda también se observó cuando el plásmido control, pDL277 sin *oriT* de *A. ferrooxidans*, estuvo en presencia de la enzima. Con estos resultados, surge la necesidad de realizar estudios que permitan identificar las proteínas auxiliares que puedan ser requeridas para la actividad relaxasa de la proteína VirD2 de *A. ferrooxidans*.

En general, a partir de nuestros experimentos podríamos concluir que *A. ferrooxidans* posee un grupo de genes *trb* relacionados con los sistemas de secreción tipo IV conjugativos, que se expresan preferiblemente, cuando el microorganismo crece utilizando azufre como fuente energía. Algunos de estos genes, en especial *virB1* y *virD2*, codificarían proteínas importantes para una funcionalidad potencial de este sistema. La relaxasa VirD2af podría participar en los procesos de transferencia de genes al reconocer y unirse a secuencias *oriT* presentes en el ADNds, y cortarlo en el sitio *nic* en presencia de  $Mg^{2+}$ . Esta enzima sería el punto de enlace entre el ADN que se va a transferir y la maquinaria de secreción tipo IV que se encontraría correctamente ensamblada en las membranas de la célula, muy posiblemente, con ayuda de la proteína VirB1.

El hallazgo en el genoma de *A. ferrooxidans* de genes *tra* reportada por Bustamante y col. (2012) y de genes *trb* aquí descritos es sin duda, un hallazgo importante que se debe estudiar a fondo para comprender la funcionalidad de estos sistemas en *A. ferrooxidans* y así., identificar algunos procesos fisiológicos de este microorganismo importantes para los mecanismos de biolixiviación, como por ejemplo, entender su comportamiento durante la formación de las biopelículas y su interacción con las bacterias del consorcio a través de mecanismos de conjugación. Igualmente, facilitaría el desarrollo de metodologías que permitan la modificación genética de este microorganismo y así, potenciar su utilidad en los consorcios y faenas mineras.



## BIBLIOGRAFIA

Acosta M, Beard S, Ponce J, Vera M, Mobarec JC, Jerez CA. 2005. Identification of putative sulfurtransferase genes in the extremophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 genome: structural and functional characterization of the proteins. *OMICS*. 9:13-29.

Angles, ML, Marshall KC, Goodman AE. 1993. Plasmid transfer between marine bacteria in the aqueous phase and biofilms in reactor microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:843-50.

Backert S, Meyer TF. 2006. Type IV secretion systems and their effectors in bacterial pathogenesis. *Curr. Opin. Microbiol.* 9:207-17.

Alvarez-Martinez CE, Christie PJ: 2009. Biological diversity of prokaryotic type IV secretion systems. *Microbiol. Mol. Biol.* 73:775-808.

Bacon DJ, Alm RA, Burr DH, Hu L, Kopecko DJ, Ewing CP, Trust TJ, Guerry P. 2000. Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infect. Immun.* 68:4384-90.

Banta LM, Kerr JE, Cascales E, Giuliano ME, Bailey ME, McKay C, Chandran V, Waksman G, Christie PJ. 2011. An *Agrobacterium* VirB10 mutation conferring a type IV secretion system gating defect. *J. Bacteriol.* 193:2566-74.

Barreto M, Quatrini R, Bueno S, Arriagada C, Valdes J, Silver S, Jedlicki E, Holmes DS. 2003. Aspects of the predicted physiology of *Acidithiobacillus ferrooxidans* deduced from an analysis of its partial genome sequence. *Hydrometallurgy.* 71:97-105.

Barros ME, Rawlings DE, Woods DR. 1985. Cloning and expression of the *Thiobacillus ferrooxidans* glutamine synthetase gene in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 164:1386-9.

Berger BR, Christie PJ. 1994. Genetic complementation analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* *virB* operon: *virB2* through *virB11* are essential virulence genes. *J. Bacteriol.* 176:3646-60.

Bhatty M, Laverde Gomez JA, Christie PJ. 2013. The expanding bacterial type IV secretion lexicon. *Res. Microbiol.* 164:620-39.

Bohne, J, Yim A, Binns, AN. 1998. The Ti plasmid increases the efficiency of *Agrobacterium tumefaciens* as a recipient in *virB*-mediated conjugal transfer of an IncQ plasmid. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95:7057-62.

Brune KD, Bayer TS. 2012. Engineering microbial consortia to enhance biomining and bioremediation. *Front. Microbiol.* 3:203.

Bustamante P, Covarrubias PC, Levicán G, Katz A, Tapia P, Holmes D, Quatrini R, Orellana O. 2012. ICE Afe 1, an actively excising genetic element from the biomining bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 22:399-407.

Bustamante P, Tello M, Orellana O. 2014. Toxin-Antitoxin Systems in the Mobile Genome of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *PLoS One.* 9:e112226. doi: 10.1371/journal.pone.0112226.

Carle A, Hoppner C, Ahmed Aly K, Yuan Q, den Dulk-Ras A, Vergunst A, O'Callaghan D, Baron C. 2006. The *Brucella suis* type IV secretion system assembles in the cell envelope of the heterologous host *Agrobacterium tumefaciens* and increases IncQ plasmid pLS1 recipient competence. *Infect. Immun.* 74:108-17.

Cascales E, Christie PJ. 2003. The versatile bacterial type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 1:137-49.

Cascales E, Christie PJ. 2004. Definition of a bacterial type IV secretion pathway for a DNA substrate. *Science.* 304:1170-73.

Chandran V, Fronzes R, Duquerroy S, Cronin N, Navaza J, Waksman G: 2009. Structure of the outer membrane complex of a type IV secretion system. *Nature*. 462:1011-15.

Christie PJ, Vogel JP. 2000. Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends Microbiol.* 8:354-60.

Christie PJ. 2004. Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochim. Biophys. Acta.* 1694:219-34.

Clennel AM, Johnston B, Rawlings DE. 1995. Structure and function of *Tn5467*, a *Tn21*-like transposon located on the *Thiobacillus ferrooxidans* broad-host-range plasmid pTF-FC2. *Appl. Environ. Microbiol.* 61:4223-9.

Coker PS, Radecke J, Guy C, Camper ND. 2003. Potato disc tumor induction assay: a multiple mode of drug action assay. *Phytomedicine.* 10:133-8.

Drolet M, Zanga P, Lau PC. 1990. The mobilization and origin of transfer regions of a *Thiobacillus ferrooxidans* plasmid: relatedness to plasmids RSF1010 and pSC101. *Mol. Microbiol.* 4:1381-91.

Drolet M, Lau PC. 1992. Mobilization protein-DNA binding and divergent transcription at the transfer origin of the *Thiobacillus ferrooxidans* pTF1 plasmid. *Mol. Microbiol.* 6:1061-71.

Frank AC, Alsmark CM, Tholleson M, Andersson SG. 2005. Functional divergence and horizontal transfer of type IV secretion systems. *Mol. Biol. Evol.* 22:1325-36.

Fronzes R, Christie PJ, Waksman G. 2009a. The structural biology of type IV secretion systems. *Nat. Rev. Microbiol.* 7:703-14.

Fronzes R, Schafer E, Wang L, Saibil HR, Orlova EV, Waksman G: 2009b. Structure of a type IV secretion system core complex. *Science* 323:266-68.



Garcillán-Barcia MP, Francia MV, de la Cruz F. 2009. The diversity of conjugative relaxases and its application in plasmid classification. *FEMS Microbiol. Rev.* 33:657-87.

Grinsted J, de la Cruz F, Schmidt R. 1990. The Tn21 subgroup of bacterial transposable elements. *Plasmid.* 24:163-89.

Grove JI, Alandiyjany MN, Delahay RM. 2013. Site-specific relaxase activity of a VirD2-like protein encoded within the *tfs4* genomic island of *Helicobacter pylori*. *J. Biol. Chem.* 288:26385-96.

Guglielmini J, de la Cruz F, Rocha EP. 2013. Evolution of conjugation and type IV secretion systems. *Mol. Biol. Evol.* 30:315-31.

Guiliani N, Bengrine A, Borne F, Chippaux M, 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.* 143:2179-87.

Guiliani N, Jerez CA. 2000. Molecular cloning, sequencing, and expression of *omp-40*, the gene coding for the major outer membrane protein from the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2318-24.

Hofreuter D, Odenbreit S, Haas R. 2001. Natural transformation competence in *Helicobacter pylori* is mediated by the basic components of a type IV secretion system. *Mol. Microbiol.* 41:379-91.

Höppner C, Liu Z, Domke N, Binns AN, Baron C. 2004. VirB1 orthologs from *Brucella suis* and pKM101 complement defects of the lytic transglycosylase required for efficient type IV secretion from *Agrobacterium tumefaciens*. *J. Bacteriol.* 186:1415-22.

Jakubowski SJ, Kerr JE, Garza I, Krishnamoorthy V, Bayliss R, Waksman G, Christie PJ. 2009. *Agrobacterium* VirB10 domain requirements for type IV secretion and T pilus biogenesis. *Mol. Microbiol.* 71:779-94.

- Juhas M, Crook DW, Dimopoulou ID, Lunter G, Harding RM, Ferguson DJ, Hood DW. 2007. Novel type IV secretion system involved in propagation of genomic islands. *J. Bacteriol.* 189:761-71.
- Kaliaeva ES, Kholodiĭ GIa, Bass IA, Gorlenko ZhM, Iur'eva OV, Nikiforov VG. 2001. Tn5037-a Tn21-like mercury transposon, detected in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Genetika.* 37:1160-4.
- Kalkum M, Eisenbrandt R, Lurz R, Lanka E. 2002. Tying rings for sex. *Trends Microbiol.* 10:382-7.
- Kopec J, Bergmann A, Fritz G, Grohmann E, Keller W. 2005. TraA and its N-terminal relaxase domain of the Gram-positive plasmid pIP501 show specific oriT binding and behave as dimers in solution. *Biochem. J.* 387:401-9.
- Król JE, Nguyen HD, Rogers LM, Beyenal H, Krone SM, Top EM. 2011. Increased transfer of a multidrug resistance plasmid in *Escherichia coli* biofilms at the air-liquid interface. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:5079-88.
- Kurenbach B, Grothe D, Farias ME, Szewzyk U, Grohmann E. 2002. The *tra* region of the conjugative plasmid pIP501 is organized in an operon with the first gene encoding the relaxase. *J. Bacteriol.* 184:1801-5.
- Kusano T, Sugawara K, Inoue C, Takeshima T, Numata M, Shiratori T. 1992. Electrotransformation of *Thiobacillus ferrooxidans* with plasmids containing a *mer* determinant. *J. Bacteriol.* 174:6617-23.
- Lawley TD, Klimke WA, Gubbins MJ, Frost LS. 2003. F factor conjugation is a true type IV secretion system. *FEMS Microbiol. Lett.* 224:1-15.
- Levicán G, Katz A, Valdés J, Quatrini R, Holmes DS, Orellana O. 2009. A 300 kpb genome segment, including a complete set of tRNA genes, is dispensable for *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Adv. Mat. Res.* 7173:187-190.

Li PL, Everhart DM, Farrand SK. 1998. Genetic and sequence analysis of the pTiC58 *trb* locus, encoding a mating-pair formation system related to members of the type IV secretion family. *J. Bacteriol.* 180:6164-72.

Li PL, Hwang I, Miyagi H, True H, Farrand SK. 1999. Essential components of the Ti plasmid *Trb* system, a type IV macromolecular transporter. *J. Bacteriol.* 181:5033-41.

Liu Z, Guiliani N, Appia-Ayme C, Borne F, Ratouchniak J, Bonnefoy V. 2000. Construction and characterization of a *recA* mutant of *Thiobacillus ferrooxidans* by marker exchange mutagenesis. *J. Bacteriol.* 182:2269-76.

Llosa M, Zunzunegui S, de la Cruz F. 2003. Conjugative coupling proteins interact with cognate and heterologous *VirB10*-like proteins while exhibiting specificity for cognate relaxosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:10465-70.

Lorenzo-Díaz F, Dostál L, Coll M, Schildbach JF, Menéndez M, Espinosa M. 2011. The MobM relaxase domain of plasmid pMV158: thermal stability and activity upon Mn<sup>2+</sup> and specific DNA binding. *Nucleic. Acids Res.* 39:4315-29.

Low HH, Gubellini F, Rivera-Calzada AF, Braun N, Connery S, Dujeancourt A, Lu F, Redzej A, Fronzes R, Orlova EV, Waksman G. 2014. Structure of a type IV secretion system. *Nature*. <http://dx.doi.org/10.1038/nature13081>.

Lyras D, Chan AW, McFarlane J, Stanisich VA. 1994. The surface exclusion system of RP1: investigation of the roles of *TrbJ* and *TrbK* in the surface exclusion, transfer, and slow-growth phenotypes. *Plasmid.* 32:254-61.

Matson SW, Morton BS. 1991. *Escherichia coli* DNA helicase I catalyzes a site- and strand-specific nicking reaction at the F plasmid *oriT*. *J. Biol. Chem.* 266, 16232-37.

McLaughlin JL, Rogers LL. 1998. The use of biological assays to evaluate botanicals. *Drug Inform. J.* 32: 513-24.

Monzingo AF, Ozburn A, Xia S, Meyer RJ & Robertus JD. 2007. The structure of the minimal relaxase domain of MobA at 2.1 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 366: 165–178.

O'Callaghan D, Cazevieille C, Allardet-Servent A, Boschirola ML, Bourg G, Foulongne V, Frutos P, Kulakov Y, Ramuz M. 1999. A homologue of the *Agrobacterium tumefaciens* VirB and *Bordetella pertussis* Ptl type IV secretion systems is essential for intracellular survival of *Brucella suis*. *Mol. Microbiol.* 33:1210-20.

Orellana LH, Jerez CA. 2011. A genomic island provides *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 53993 additional copper resistance: a possible competitive advantage. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2011;92:761-767.

Peng JB, Yan WM, Bao XZ. 1994. Plasmid and transposon transfer to *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 176:2892–97.

Ramirez P, Guiliani N, Valenzuela L, Beard S, Jerez CA. 2004. Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds, or metal sulfides. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:4491-8.

Rawlings DE. 2002. Heavy metal mining using microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:65-91.

Rawlings DE. 2005. The evolution of pTF-FC2 and pTC-F14, two related plasmids of the IncQ-family. *Plasmid.* 53:137-47.

Redzej A, Ilangovan A, Lang S, Gruber CJ, Topf M, Zangger K, Zechner EL, Waksman G: 2013. Structure of a translocation signal domain mediating conjugative transfer by type IV secretion systems. *Mol. Microbiol.* 89:324-33.

Ripoll-Rozada J, Zunzunegui S, de la Cruz F, Arechaga I, Cabezon E. 2013. Functional interactions of VirB11 traffic ATPases with VirB4 and VirD4 molecular motors in type IV secretion systems. *J. Bacteriol.* 195:4195-4201.

Rivera-Calzada A, Fronzes R, Savva CG, Chandran V, Lian PW, Laeremans T, Pardon E, Steyaert J, Remaut H, Waksman G y col. 2013. Structure of a bacterial type IV secretion core complex at subnanometre resolution. *EMBO J.* 32:1195-1204.

Rocco JM, Churchward G. 2006. The integrase of the conjugative transposon Tn916 directs strand- and sequence-specific cleavage of the origin of conjugal transfer, *oriT*, by the endonuclease Orf20. *J. Bacteriol.* 188:2207-13.

Sagulenko E, Sagulenko V, Chen J, Christie PJ. 2001. Role of *Agrobacterium* VirB11 ATPase in T-pilus assembly and substrate selection. *J. Bacteriol.* 183:5813-25.

Sambrook J, Russell DW. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Vol 1-3. 3rd ed. New York. Cold Spring Harbor Laboratory.

Savage VJ, Chopra I, O'Neill AJ. 2013. *Staphylococcus aureus* biofilms promote horizontal transfer of antibiotic resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* 57:1968-70.

Savvides SN, Yeo HJ, Beck MR, Blaesing F, Lurz R, Lanka E, Buhrdorf R, Fischer W, Haas R, Waksman G. 2003. VirB11 ATPases are dynamic hexameric assemblies: new insights into bacterial type IV secretion. *EMBO J.* 22:1969-1980.

Scherzinger E, Lurz R, Otto S, Dobrinski B. 1992. *In vitro* cleavage of double- and single-stranded DNA by plasmid RSF1010-encoded mobilization proteins. *Nucleic. Acids Res.* 20:41-8.

Schmidt-Eisenlohr H, Rittig M, Preithner S, Baron C. 2001. Biomonitoring of pJP4-carrying *Pseudomonas chlororaphis* with Trb protein-specific antisera. *Environ. Microbiol.* 3:720-30.

Seubert A, Hiestand R, de la Cruz F, Dehio C. 2003. A bacterial conjugation machinery recruited for pathogenesis. *Mol. Microbiol.* 49:1253-66.

Smillie C, Garcillán-Barcia MP, Francia MV, Rocha EP, de la Cruz F. 2010. Mobility of plasmids. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74:434-52.

Thanassi DG, Hultgren SJ. 2000. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Curr. Opin. Cell Biol.* 12:420-30.

Thorstenson YR, Kuldau GA, Zambryski PC. 1993. Subcellular localization of seven VirB proteins of *Agrobacterium tumefaciens*: implications for the formation of a T-DNA transport structure. *J. Bacteriol.* 175:5233-41.

Troster M, Felisberto-Rodrigues C, Christie PJ, Waksman G. 2014. Recent advances in the structural and molecular biology of type IV secretion systems. *Curr Opin Struct Biol.* 27:16-23.

Ulker B, Li Y, Rosso MG, Logemann E, Somssich IE, Weisshaar B. 2008. T-DNA-mediated transfer of *Agrobacterium tumefaciens* chromosomal DNA into plants. *Nat. Biotechnol.* 26:1015-7.

Valdés J, Cárdenas JP, Quatrini R, Esparza M, Osorio H, Duarte F, Lefimil C, Sepulveda R, Jedlicki E, Holmes DS. 2010. Comparative genomics begins to unravel the ecophysiology of bioleaching. *Hydrometallurgy* 104: 471–76.

Valenzuela L, Chi A, Beard S, Orell A, Guiliani N, Shabanowitz J, Hunt DF, Jerez CA. 2006. Genomics, metagenomics and proteomics in biomining microorganisms. *Biotechnol. Adv.* 24:197-211.

Vedantam G, Knopf S, Hecht DW. 2006. *Bacteroides fragilis* mobilizable transposon Tn5520 requires a 71 base pair origin of transfer sequence and a single mobilization protein for relaxosome formation during conjugation. *Mol. Microbiol.* 59:288-300.

Waksman G, Fronzes R. 2010. Molecular architecture of bacterial type IV secretion systems. *Trends Biochem. Sci.* 35:691-8.

Wang A, Macrina FL. 1995. Streptococcal plasmid pIP501 has a functional *oriT* site. *J. Bacteriol.* 177:4199-206.

Wang X, Ghosh S, Guo SW. 2001. Quantitative quality control in microarray image processing and data acquisition. *Nucleic Acids Res.* 29: E75-5

Yeo HJ, Savvides SN, Herr AB, Lanka E, Waksman G. 2000. Crystal structure of the hexameric traffic ATPase of the *Helicobacter pylori* type IV secretion system. *Mol. Cell.* 6:1461-72.

Yuan Q, Carle A, Gao C, Sivanesan D, Aly KA, Hoppner C, Krall L, Domke N, Baron C. 2005. Identification of the VirB4–VirB8–VirB5–VirB2 pilus assembly sequence of type IV secretion systems. *J. Biol. Chem.* 280:26349-59.

Zahl D, Wagner M, Bischof K, Bayer M, Zavec B, Beranek A, Ruckstuhl C, Zarfel GE, Koraimann G. 2005. Peptidoglycan degradation by specialized lytic transglycosylases associated with type III and type IV secretion systems. *Microbiology.* 151:3455-67.

Zechner EL, Lang S, Schildbach JF. 2012. Assembly and mechanisms of bacterial type IV secretion machines. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 367:1073-87.

Zhu J, Oger PM, Schrammeijer B, Hooykaas PJ, Farrand SK, Winans SC. 2000. The bases of crown gall tumorigenesis. *J. Bacteriol.* 182:3885-95.

ANEXO 1

Análisis bioinformático de los genes y proteínas del SSIV de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Las proteínas de *A. ferrooxidans* presentaron homología con los SSIV presentes en *A. tumefaciens*. Las funciones putativas se asignaron de acuerdo a los resultados reportados para cada uno de los dominios encontrados.

Gen del posible SSIV de <i>A. ferrooxidans</i>	Locus (JCIV)	Longitud gen / proteína	Dominios conservados en la secuencia aminoacídica	Peso Molecular (kDa)	Péptido señal / Dominio Transmembrana / Localización celular	Proteína homóloga <i>A. tumefaciens</i>	Identidad/ similitud proteica con <i>A. tumefaciens</i> (%)	Posible función
<i>trbB</i>	AFE_1451	969/522	Cd01130; VirB11/TrbB	32,6	No / / Citoplasma	TrbB	48/65	ATPasa
<i>trbC</i>	AFE_1449	387/128	No se detectaron dominios conservados	12,6	Si / 4 / Extracelular	TrbC de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 33993	92	Phi-Adhesión?
<i>trbD</i>	AFE_1448	378/125	COG5268; TrbD/VirB3	13,6	No / / Memb. Interna	TrbD	30/50	Estabiliza Mem. Interna
<i>trbE</i>	AFE_1447	2523/840	COG3431; VirB4/TrbE	93,3	No / / Citoplasma	TrbE	37/57	ATPasa
<i>trbJ</i>	AFE_1445	741/246	COG5314; TrbJ	26,2	Si / / Periplasma	TrbJ	25/47	Exclusión de entrada
<i>trbL</i>	AFE_1443	1770/589	TIGR02783; TrbL/VirB6	58,4	Si / 11 / Memb. Interna	TrbL	20/40	Formación del canal
<i>trbF</i>	AFE_1391	669/222	Pfam04335; VirB8/TrbF	24,8	No / / Periplasma	TrbF	30/50	Formación del canal
<i>trbG1</i>	AFE_1390	1146/381	Cd06911; VirB9/TrbG	40,4	Si / / Periplasma	TrbG	24/38	Formación del canal
<i>trbG2</i>	AFE_1389	1002/333	VirB9/TrbG	38,7	Periplasma	TrbG	26/39	Formación del canal
<i>trbI</i>	AFE_1388	1801/599	Pfam0743; TrbI	50,7	No / 4 / Periplasma	TrbI	43/61	Formación del canal
<i>virB1</i>	AFE_1587	672/223	PRK13864; SLT-Transglucosilasa	30,1	No / No / Periplasma	VirB1	34/52	Trans-glicosilasa
<i>traG</i>	AFE_1386	2505/834	Cd01126; TraG/VirD4	94,0	No / 5 / Citoplasma	TraG	22/40	Proteína acopladora
<i>virD2</i>	AFE_1464	1551/516	COG3843; VirD2	58,7	No / No / Citoplasma	VirD2 de <i>Ralstonia solanacearum</i>	34/51	Relaxasa



## ANEXO 2

Secuencias *oriT* localizadas en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Los sitios de corte se resaltan en negrilla y la región rica en secuencias repetidas invertidas se subraya.

Nombre	Secuencia (5'-3')
<i>Afer1</i>	ctgcccgaagcaggaaaagtggccaccacatacctcccgaatccatccagcccagaagcttctggcagaggg
<i>Afer2</i>	tatcaacaagttgggggctctggcggatgctgcgaagtggccccgggttacggccgtaattctctggtgcccgcagggcca
<i>Afer3</i>	tggggggtgctgacccctgacggccagatgaaagtggcccccaatctcggccggagatgctgctgcatgtagctggccgtatccccaaacaatag
<i>Afer4</i>	gtacccggccccggcgggatactctctttttaccggcaagtggcccccaaggccagcagctggcagataggcccccaatagccg
<i>Afer5</i>	ggtaacaagtctgagccaggtctgataccccgggaagtggccccctggccgcaataacgattggggccataaa
<i>Afer6</i>	tgaggtaaccaccgatgggaaacgatactctggaaagtggcccccaatctgctggcggccccgggatacaccggcaacgggat
<i>Afer7</i>	agaaaagccctacaaagtgtatggcagctggcagatagaaanaatggccccctgattcagcccagacggtctggccacttggcaacgg
<i>Afer8</i>	gtccctggcgcatacggccccgcaaggccgtatgaaaaagtggcccccaatctggccccctaccggggtatctgctgcaccctgct
<i>Afer9</i>	ggtgtagtccccgttgcagggccgatgaaaccggctcaatggccccctgctcattgagaaccgggtcaatgctgcaaccgait
<i>Afer10</i>	agccccaatccccggtctggtggcggtaaccatgcccctcagtgggccccctggctacgatacaccctctgggtgctgctcggcattcggg