

UCH-FC
DOC-Microbiología
Q 24
C. 1

**Caracterización Estructural y Funcional
del Regulador Transcripcional Fur:
su Papel en el Control de la Homeostasis de Hierro
en *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC23270.**

Tesis presentada a la
UNIVERSIDAD DE CHILE
en cumplimiento de los requisitos para optar al grado de
Doctor en Ciencias - Mención Microbiología
FACULTAD DE CIENCIAS

Por Raquel Quatrini

Diciembre, 2003



Directores de Tesis

Dr. David S. Holmes

Dra. Eugenia Jedlicki

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:

Raquel Quatrini

Ha sido aprobada por la Comisión e Evaluación de Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con Mención Microbiología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 19 de Diciembre de 2003.

Directores de Tesis

Dr. David S. Holmes

.....
David S. Holmes

Dra. Eugenia Jedlicki C.

.....
Eugenia Jedlicki

Comisión de Evaluación de Tesis

Dr. Romilio Espejo

.....
Romilio Espejo

Dr. Carlos Jeréz

.....
Carlos Jeréz

Dr. Michael Seeger

.....
Michael Seeger



Para vos,

...donde sea que estés.



AGRADECIMIENTOS

A la Universidad de Chile, a los Profesores del Programa de Microbiología y al Servicio Alemán de Intercambio Académico por brindarme la oportunidad de completar estudios de Doctorado

Al Dr. David S. Holmes por hacer de la Investigación una aventura.....

A la Dra. Eugenia Jedlicki por su amistad, su entusiasmo para con mi trabajo y su permanente estímulo.....

A los Drs. Omar Orellana, Héctor Toledo y Víctor Cifuentes por su calidez, y por su interés y sus contribuciones a mi formación y/o el desarrollo de este trabajo.

A los Dr. Danilo Gonzáles, Emilio García, Michael Vasil, Kalus Hantke y Daniele Touati por sus aportes, de variada índole, a esta investigación.

A Felipe, Gonzalo, Salvador y Claudia por su incondicional ayuda pero muy especialmente por su amistad.....

A Patricia, Rodrigo, Pilar, Juan Carlos, Nayibe, Mario y Suany simplemente por coincidir en "tiempo y espacio".....

A mis amigos de siempre por darme fuerzas desde la distancia....

A mis viejos por incentivar me a buscar mi camino sin importar cuan lejos me lleve y por tanto más.....que difícilmente pueda expresarse en estas líneas.



INDICE DE MATERIAS

Agradecimientos	iii
Indice de Materias	iv
Indice de Tablas	viii
Indice de Figuras	ix
Lista de Abreviaturas	x
Resumen	xi
Abstract	xii
1. INTRODUCCION	
1.1. Antecedentes Generales de <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>	1
1.2. El Desafío de Controlar los Niveles Intracelulares de Hierro	2
1.3. El Problema de la Biodisponibilidad Ambiental de Hierro	3
1.4. El Control de la Homeostasis de Hierro por el Regulador Fur	3
1.5. El Mecanismo de Represión por Fur	5
1.6. Fur Activa Otros Genes	8
1.7. Ortólogos y Parálogos	8
1.8. Hipótesis	10
2. MATERIALES Y METODOS	
2.1. Métodos Bioinformáticos	11
2.1.1. Búsqueda de Genes de Homeostasis de Hierro	11
2.1.2. Modelamiento Estructural Comparativo de Fur _{Fe}	11
2.1.3. Búsqueda de Sitios de Regulación	13



2.2. Métodos Experimentales	14
2.2.1. Cepas	14
2.2.2. Plásmidos y Clones	17
2.2.3. Condiciones de Cultivo	18
2.2.4. Técnicas de Biología Molecular	18
2.2.4.1. Colección de las Células	18
2.2.4.2. Preparación de Ácidos Nucleicos	19
2.2.4.3. Transcripción Reversa	19
2.2.4.4. Estrategia General de Clonamiento	20
2.2.4.5. Mutación Sitio Dirigida	21
2.2.4.6. Construcción de las Quimeras C-terminales	22
2.2.4.7. Preparación de Proteínas Totales	23
2.2.4.8. Inmunodetección de Proteínas	24
2.2.4.9. Inmunoprecipitación	24
2.2.4.10. Ensayos de Retardo	25
2.2.5. Ensayo de Actividad β -Galactosidasa	26
2.2.6. Ensayo de Resistencia a H_2O_2	27
2.2.7. Ensayo de Titulación de Fur (FURTA)	27
3. RESULTADOS	
3.1. Reconstrucción de la Respuesta de Homeostasis de Hierro en <i>A. ferrooxidans</i>	28
3.1.1. Identificación <i>In Silico</i> de Genes de Homeostasis de Hierro	28
3.1.1.1. Transportadores de FeII	28
3.1.1.2. Transportadores de FeIII	33
3.1.1.3. Almacenamiento de Hierro	45
3.1.2. Identificación de Reguladores Dependientes de Hierro	47
3.1.2.1. Reguladores Dependientes de FeIII	47
3.1.2.2. Reguladores Dependientes de FeII	48

3.2. Análisis de la Expresión del Regulador Fur _{Fe} en <i>A. ferrooxidans</i>	56
3.2.1. Análisis de la Expresión de Fur _{Fe} a Nivel de Proteína	56
3.2.2. Análisis de Expresión de Fur _{Fe} , Fur _{H₂O₂} y Fur _{Hemo} a Nivel de mRNA	57
3.3. Caracterización Funcional del Regulador Fur _{Fe} en un Sistema Heterólogo	58
3.3.1. Clonamiento de Fur _{Fe}	58
3.3.2. Análisis Fenotípico en Medio Indicador	59
3.3.3. Ensayos de Actividad β-Galactosidasa	61
3.3.4. Ensayo de Resistencia a Estrés Oxidativo por H ₂ O ₂	63
3.3.5. Análisis de Expresión de Fur _{Fe} en <i>E. coli</i>	65
3.3.5.1. Análisis de Expresión de <i>fur</i> _{Fe} a Nivel de mRNA	65
3.3.5.2. Análisis de Expresión de Fur _{Fe} a Nivel de Proteína	66
3.3.5.3. Inmunoprecipitación de Fur _{Fe} del Clon Fur1	67
3.3.6. Causas del Fenotipo Activador de Fur _{Fe} en <i>E.coli</i>	67
3.3.6.1. Complementación de <i>E. coli</i> H1780 por la Mutante G40E	69
3.3.6.2. Complementación de <i>E. coli</i> H1780 por las Quimeras	71
3.3.6.3. Característica Diferencial entre las Quimeras Ec-Af y Af-Ec	74
3.3.6.4. Actividad de Fur _{Fe} Expresado desde su Promotor de Origen	77
3.4. Ensayos de Unión <i>In Vitro</i> de Fur _{Fe} a Cajas Fur de <i>E. coli</i>	80
3.5. Búsqueda de Cajas Fur	80
3.5.1. Ensayos de Titulación de Fur en <i>E. coli</i> H1717(FURTA)	81
3.5.1.1. Determinación de Cajas Fur Río Arriba de <i>fur</i> _{Fe}	81
3.5.1.2. Determinación de Cajas Fur en el Genoma	82
3.5.2. Predicción de Cajas Fur por la Teoría de la Información	87
3.5.2.1. Construcción de la Matriz de Información, Validación y Filtros	87
3.5.2.2. Búsqueda de Cajas Fur en el genoma de <i>A. ferrooxidans</i>	89
3.5.3. Operadores Complejos en el Genoma de <i>A. ferrooxidans</i>	94
3.5.4. La Caja Fur Consenso de <i>A. ferrooxidans</i>	96

4. DISCUSION	
4.1. Un Modelo de la Respuesta de Homeostasis de Hierro en <i>A. ferrooxidans</i>	98
4.2. <i>A. ferrooxidans</i> Codifica para un Ortólogo del Regulador Fur	103
4.3. El Regulador Fur _{Fe} de <i>A. ferrooxidans</i> es Funcional en <i>E. coli</i>	106
4.4. El Motivo CX ₈ C de Fur _{Fe} Afecta la Polimerización	107
4.5. Fur _{Fe} de <i>A. ferrooxidans</i> Activa la Expresión Génica en <i>E. coli</i> Cuando se Expresa a Bajas Concentraciones	110
4.6. El Efecto Activador Podría Involucrar a la Caja Fur	111
4.7. Represión o Activación de la Expresión Génica Según los Títulos de Fur _{Fe} y la Organización de los Promotores Blanco	114
4.8. <i>A. ferrooxidans</i> Expresa el Regulador Fur en Azufre y sus Niveles en Hierro Disminuyen con un Aumento en la Concentración del Metal	118
4.9. Existen en el Genoma de <i>A. ferrooxidans</i> Cajas Fur de Baja Identidad y Diferente Organización Respecto de Otras Bacterias	120
5. CONCLUSIONES	124
6. BIBLIOGRAFIA	127
7. ANEXO	138

INDICE DE TABLAS

Tabla 1 . Recursos de búsqueda y análisis de secuencia disponibles en la red	12
Tabla 2 . Cepas de <i>A. ferrooxidans</i> y <i>E. coli</i>	15
Tabla 3 . Plásmidos y Clones	17
Tabla 4 . Oligonucleótidos	20
Tabla 5 . Fenotipo <i>lacZ</i> en los clones derivados de la cepa H1780	60
Tabla 6 . Niveles de expresión de <i>fiu::lacZ</i> en los clones derivados de H1780	62
Tabla 7 . Respuesta a estrés oxidativo por H₂O₂ en clones derivados de H1780	64
Tabla 8 . Funciones codificadas en la secuencia de los clones FURTA +	84
Tabla 9 . Cajas Fur predichas en el genoma de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270	90

INDICE DE FIGURAS

Figura	1. Esquema de las construcciones reporteras de las cepas H1780 y H1681	15
Figura	2. Estrategia de construcción de las quimeras C-terminales de Fur	22
Figura	3. Sistema de transporte de Fell, FeoAB	30
Figura	4. Sistema de transporte de Fell, MntH.	32
Figura	5. Sistemas de transporte de FellIII dependientes de sideróforos	34
Figura	6. Motivos conservados en los receptores de sideróforos	35
Figura	7. Especificidad por sideróforos probable de los receptores en <i>A. ferrooxidans</i> .	36
Figura	8. Proteínas superficiales de la capa S de <i>A. ferrooxidans</i>	44
Figura	9. Sistema de almacenamiento de FellIII de <i>A. ferrooxidans</i>	46
Figura	10. Fur _{Fe} de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270	50
Figura	11. Fur _{H₂O₂} de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270	53
Figura	12. Fur _{Hemo} de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270	55
Figura	13. Expresión de Fur en <i>A. ferrooxidans</i> crecido en S ^o ó Fe	57
Figura	14. Estrategia de clonamiento del gen <i>fur</i> _{Fe} de <i>A. ferrooxidans</i>	59
Figura	15. Actividad β-Galactosidasa en los clones recombinantes de <i>E. coli</i> H1780	61
Figura	16. Expresión de los clones recombinantes de <i>E. coli</i> H1780	65
Figura	17. Cromatogramas de secuencia de los clones derivados de H1780	68
Figura	18. Mutante G40E del gen <i>fur</i> de <i>A. ferrooxidans</i>	70
Figura	19. Quimeras C-terminales de Fur de <i>A. ferrooxidans</i> y <i>E. coli</i>	72
Figura	20. Estructura 2 ^o de la región TIR- mRNA de los clones derivados de H1780	75
Figura	21. Modificación del espaciador SD-ATG del gen <i>fur</i> de <i>A. ferrooxidans</i>	76
Figura	22. Actividad y expresión de Fur de <i>A. ferrooxidans</i> desde P <i>fur</i> _{Fe}	78
Figura	23. Unión específica de Fur de <i>A. ferrooxidans</i> a una caja Fur de <i>E. coli</i>	80
Figura	24. Fenotipo de los Clones FURTA	83
Figura	25. Organización superpuesta de cajas Fur de bajo puntaje	95
Figura	26. Consenso de caja Fur de <i>A. ferrooxidans</i>	97
Figura	27. Modelo de la respuesta de homeostasis de hierro en <i>A. ferrooxidans</i>	99
Figura	28. Modelo Estructural de Fur _{Fe} en base a la estructura cristalográfica de Fur _{PA}	104
Figura	29. Modelo de la interacción de Fur _{Fe} de <i>A. ferrooxidans</i> con el DNA	109
Figura	30. Modelo del mecanismo de regulación por Fur _{Fe} de <i>A. ferrooxidans</i>	115
Figura	31. Arquitectura de los promotores dependientes de Fur	116

LISTA DE ABREVIATURAS

Amp,	Ampicilina
β -gal,	β -galactosidasa
BSA,	Seroalbúmina bovina
Cm,	Cloramfenicol
COG,	Cluster de genes ortólogos
dATG,	Distancia al codón de inicio de la traducción (ATG)
EDTA,	Acido etilén diaminotetraacético
EMSA,	"Electrophoretic Mobility Shift Assay"
FB,	Caja Fur
Fur _{Fe} ,	Regulador Fur de respuesta a hierro
Fur _{H₂O₂} ,	Regulador Fur de respuesta a peróxido de hidrógeno
Fur _{Hemo} ,	Regulador Fur de respuesta a hemo
FURTA,	Ensayo de Titulación de Fur
Km,	Kanamicina
LB,	Luria Bertani
MCB,	Matriz de cajas Fur de un Conjunto de Bacterias
MEC,	Matriz de cajas Fur de <i>E. coli</i>
NRAMP ,	"Natural Resistance Associated Macrophage Protein"
NT,	Nucleótidos
OD,	Densidad óptica
OMR,	Receptor de membrana externa
ONPG,	o-nitrofenil- β -D-galactopiranosido
ORF,	Marco abierto de lectura
PAGE,	Electroforesis en gel de poliacrilamida
pb,	Pares de base
PBP,	Proteína periplasmática de unión a sustrato
pl,	Punto isoeléctrico
PMSF,	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
P _x ,	Promotor del gen X
RBS,	Sitio de unión a ribosoma
RIT,	Región de inicio de la traducción
RNAP,	RNA Polimerasa
RT,	Transcripción reversa
S,	Similitud
SD,	"Shine Dalgarno"
SDS,	Dodecilsulfato de sodio
Sm,	Estreptomina
TBS,	Amortiguador Tris Salino
Tris,	Tris (hidroximetil) aminometano
UFC,	Unidades formadoras de colonias

RESUMEN

En condiciones ambientales ácidas, el hierro es soluble a concentraciones que superan los requerimientos bacterianos del ion, aspecto relevante si se considera que excesos intracelulares de hierro generan estrés oxidativo. Además de *Acidithiobacillus ferrooxidans*, pocos organismos conocidos enfrentan estos extremos de acidez y en ningún caso han sido caracterizados los mecanismos de mantenimiento de la homeostasis de hierro en este tipo de microorganismos.

La presencia y conservación en el genoma de *A. ferrooxidans* de genes de transporte de FeII y FeIII-sideróforos y de genes de almacenamiento intracelular del metal, indicaría por analogía con sistemas conocidos, que esta bacteria es capaz de montar una respuesta integral para preservar la homeostasis de hierro. Adicionalmente, se ha identificado en el genoma de *A. ferrooxidans* un ortólogo del regulador Fur (ferric uptake regulator) implicado en otros sistemas en la modulación de esta respuesta.

En virtud de la similitud de secuencia y la conservación de motivos funcionales específicos, se sustenta la asignación del ortólogo Fur_{Fe} de *A. ferrooxidans* a la subfamilia de reguladores Fur de respuesta a hierro. La reactividad cruzada de esta proteína con el anticuerpo generado contra la proteína Fur de *E. coli*, la capacidad de complementar la deficiencia del regulador en un sistema heterólogo y la capacidad de unión de la proteína a cajas Fur *in vitro* respaldan tal proposición.

Mientras la expresión de Fur de *A. ferrooxidans* en *E. coli* a altos títulos de proteína, en presencia de hierro, reprime de modo clásico la expresión de dos genes Fur dependientes de *E. coli*, inesperadamente, este regulador activa la expresión los mismos genes blanco, cuando sus títulos de proteína son bajos. El efecto activador puede ser

extendido a un número mayor de genes típicamente reprimidos por Fur en *E. coli*, según lo indica la sensibilidad aumentada frente a H_2O_2 de la cepa *fur*⁻ de *E. coli* que expresa bajos títulos del represor Fur de *A. ferrooxidans*.

Se sugiere que el efecto diferencial sobre la expresión génica, observado en *E. coli* en función de los títulos celulares de Fur, podría ser significativo en la regulación génica de *A. ferrooxidans* donde Fur demostró expresarse a títulos variables según la carga de hierro del medio de crecimiento.

La búsqueda de cajas Fur en el genoma de *A. ferrooxidans* evidenció la existencia de posibles cajas Fur que conservan los residuos involucrados en el contacto DNA-proteína en *E. coli*. Sin embargo, *A. ferrooxidans* se diferencia de otros microorganismos en que sus cajas no se encuentran inmersas en operadores complejos, consistentes de múltiples cajas superpuestas entre sí y a su promotor, y que median la represión por Fur en otros sistemas. En función de este análisis se sugiere que la localización promotor-específica de las cajas Fur de *A. ferrooxidans* podría determinar la represión o activación Fur-dependiente de los genes blanco asociados.

La adaptación de un mecanismo de regulación, de por sí sensible a las concentraciones de hierro, como el de Fur para regular diferencialmente ciertos subconjuntos de genes, tiene especial sentido en un sistema como *A. ferrooxidans* que enfrenta la necesidad de balancear una inusualmente elevada demanda de hierro como fuente de electrones, con la de protegerse frente a exposiciones significativamente mayores del metal respecto de otros microorganismos.

ABSTRACT

Iron solubility in acidic environments significantly exceeds the average bacterial requirement. This is an important issue since excess of intracellular iron can impose severe oxidative stress. The γ proteobacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* and several other Bacteria and Archaea tolerate extremely acid pHs. However, in no case have the mechanisms by which they maintain iron homeostasis been investigated.

Bioinformatic analysis of the *A. ferrooxidans* genomic sequence has revealed the presence of well conserved putative proteins involved in transport and storage of iron that are typically modulated in response to iron levels to preserve homeostasis in other microorganisms. In addition, a candidate *fur_{Fe}* (Ferric Uptake Regulator) gene that functions as a global regulator of iron uptake and homeostasis in most microorganisms has also been identified in *A. ferrooxidans*. On the basis of its significant sequence similarity, including conservation of functional motifs, it is proposed that this gene is a Fur ortholog.

The candidate *fur_{Fe}* gene was cloned and expressed in *E. coli*. *A. ferrooxidans Fur_{Fe}* was cross reactive to antiserum raised against *E. coli* Fur experimentally supporting its bioinformatics identification as a Fur ortholog. In addition, *A. ferrooxidans fur_{Fe}* was able to complement *fur* deficiency in an iron-responsive manner in an *E. coli* mutant. The protein was also able to specifically bind to Fur boxes *in vitro*.

Whereas Fur represses gene expression from two classical *E. coli* Fur-responsive promoters at high cellular concentrations, unexpectedly it increases gene expression from these promoters at low concentrations. Increased sensitivity of this clone to H₂O₂ suggests that activation can be extended to other Fur-dependent promoters that presumably aggravate the iron induced oxidative stress when being actively expressed.

We suggest that the differential effect on gene expression detected in *E. coli* in response to changing titres of Fur from *A. ferrooxidans* could be especially relevant to understanding gene regulation in *A. ferrooxidans* where Fur protein titres unexpectedly decrease with increasing iron concentrations in the growth medium.

A bioinformatics inspection of potential Fur binding sites in the genome of *A. ferrooxidans* reveals certain differences compared to similar sites in other microorganisms. The majority of Fur boxes in microorganisms are organized in complex, repeated and often overlapping units. This complexity provides a basis for polymerization-mediated repression of gene expression by Fur. In contrast, predicted Fur boxes in *A. ferrooxidans* appear to be solitary or at most with few repeats. We speculate that, in *A. ferrooxidans*, the position and strength of such boxes relative to the promoter dictates whether Fur serves as an activator or a repressor of the gene in question.

Such a strategy would be especially useful for bacteria like *A. ferrooxidans* facing the concomitant need to induce specific subsets of genes in order to meet electron requirements by oxidizing large amounts of iron, and at the same time repress other genes to avoid the oxidative stress threat imposed by a unique iron-rich condition.

1. INTRODUCCION

1.1. Antecedentes Generales de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

Acidithiobacillus ferrooxidans es uno de los microorganismos utilizados en la recuperación biológica de metales a partir de minerales azufrados (Holmes, 1998; Rawlings & Silver, 1995). Por ser la primera bacteria descrita capaz de solubilizar metales (Colmer & Hinkel, 1947), aún cuando no es ni la más abundante ni la más importante en el proceso de biolixiviación, se ha convertido en el microorganismo modelo en biominería y como tal en el primero cuyo genoma ha sido secuenciado (Integrated Genomics, y TIGR).

Varias particularidades fisiológicas del grupo de bacterias involucradas en la biolixiviación las convierten en objeto de estudios básicos. *A. ferrooxidans* es una γ -proteobacteria acidófila, mesófila, preferentemente aerobia y uno de los pocos microorganismos conocidos capaces de utilizar FeII como fuente de electrones y de energía para fijar CO₂ y N₂ (Rawlings y col., 1999; Holmes, 1998). Alternativamente, es capaz de utilizar compuestos de azufre reducido, formiato o hidrógeno para su crecimiento (Ohmura y col., 2002; Kelly, 1982). Aunque esta bacteria está adaptada para crecer en condiciones de acidez extrema (pH ácido 1,0 - 3,5) puede hacerlo a valores de pH fuera de su rango óptimo (Vian y col., 1986). Por otro lado, al igual que otras bacterias de biominería, *A. ferrooxidans* es tolerante a concentraciones milimolares de muchos iones metálicos considerados tóxicos para otros microorganismos (Rawlings, 2002; Leduc & Ferroni, 1994). Tal capacidad está condicionada por el medio de precrecimiento, siendo las células crecidas en hierro varios órdenes de magnitud más resistentes a ciertos iones que las crecidas en tiosulfato (Ingledeew, 1982).

El FeII provee una cantidad limitada de energía para cubrir los requerimientos del crecimiento bacteriano, siendo necesario oxidar grandes cantidades de FeII a FeIII, con un consecuente elevado consumo de O₂ y una acumulación progresiva de iones FeIII en el medio (Ingledeew, 1982). Mientras la relación FeII:FeIII es alta, el crecimiento de *A. ferrooxidans* se ve favorecido frente a otros microorganismos oxidadores (Rawlings y col., 1999; Pizarro y col., 1996). Sin embargo, frente a altas concentraciones de FeIII *A. ferrooxidans* se ve expuesto no sólo a la limitación de una adecuada fuente de energía química, sino también a la inhibición por FeIII de la capacidad de oxidar FeII (Rawlings y col., 1999) y sulfuros metálicos (Sugio y col., 1985).

1.2. El Desafío de Controlar los Niveles Intracelulares de Hierro

Además de ser una importante fuente de energía para el crecimiento en el caso particular de *A. ferrooxidans*, el hierro constituye un micronutriente esencial para el crecimiento bacteriano en general (Earhart, 1996). Como metal de transición, capaz de sufrir reacciones redox monoelectrónicas, el hierro es cofactor en numerosos procesos del metabolismo celular. Sin embargo, esta propiedad lo convierte, además, en un agente potencialmente tóxico, puesto que el hierro cataliza la formación de especies reactivas del oxígeno. La transferencia de un electrón al oxígeno molecular genera radicales superóxido, y la transferencia de un electrón al peróxido de hidrógeno da origen al radical hidroxilo, ambos dañinos para las macromoléculas biológicas (Fridovich, 1998).

Así, las bacterias enfrentan el desafío de mantener un delicado balance entre los niveles mínimos requeridos y máximos permitidos del metal (Hantke & Braun, 2000; Touati, 2000).

1.3. El Problema de la Biodisponibilidad Ambiental de Hierro

Como micronutriente, el hierro es habitualmente requerido en cantidades micromolares para el crecimiento bacteriano (requerimiento de $Fe^{II} = 10^{-7}M$). Sin embargo, y aunque el hierro es uno de los elementos más abundantes en la tierra, los microorganismos están frecuentemente sometidos a deficiencias del metal. Esto se debe a que, en presencia de oxígeno y a pHs en el rango neutro-alkalino, el ion Fe^{II} se autooxida rápidamente a Fe^{III} (solubilidad Fe^{III} a pH 7 = $10^{-18}M$) y precipita formando hidróxidos insolubles. A diferencia de lo que ocurre en este tipo de ambientes, en condiciones ácidas, el hierro es soluble a concentraciones que superan los requerimientos bacterianos del metal (solubilidad Fe^{II} a pH 3 = $10^{-8}M$) (Kupka & Kupsáková, 1999).

Así, mientras la mayoría de los microorganismos se enfrenta al desafío de adquirir un recurso escaso, *A. ferrooxidans* debe resolver la situación diametralmente opuesta de adquirir hierro para la biosíntesis desde un medio donde el metal está presente en exceso. Adicionalmente, debe ser capaz de enfrentar los significativos cambios en la disponibilidad de hierro asociados a otras de sus condiciones de crecimiento.

1.4. El Control de la Homeostasis de Hierro por el Regulador Fur

Para poder, entonces, cubrir los requerimientos de hierro sin incurrir en los riesgos biológicos asociados al exceso intracelular de este ion, las bacterias han montado una sofisticada respuesta de homeostasis de hierro (Andrews y col., 2003).

A efectos de superar la baja biodisponibilidad de hierro, las bacterias producen y secretan al medio extracelular sideróforos que quelan el metal con alta afinidad, los cuales luego internalizan a través de complejos sistemas de transporte. El metal entrante es utilizado como cofactor en la biosíntesis de metaloproteínas y los excesos son acumulados en forma de depósitos intracelulares asociados a proteínas de almacenamiento, para ser

utilizados en condiciones de limitación de hierro de fuente externa. No se han descrito, a la fecha, sistemas de excreción para este metal en bacterias. Ambas estrategias, la asimilación y el almacenamiento de hierro, son moduladas en respuesta a los cambios en la disponibilidad ambiental del metal de forma coordinada por el regulador transcripcional Fur.

Fur (Ferric Uptake Regulator) opera simultáneamente como sensor citoplasmático de hierro y como efector de respuesta, reprimiendo la expresión de un vasto número de genes blanco, entre los que se cuentan aquellos involucrados en la adquisición de hierro. Para cumplir con este rol, *fur* se expresa a niveles basales elevados. En condiciones de limitación de hierro la proteína se encuentra como aporepresor, disociada del DNA. Frente a la entrada de hierro, y por sobre cierta concentración umbral del metal ($10\mu\text{M}$), Fur une su correpresor adquiriendo la capacidad de unir secuencias específicas del DNA y reprimir la expresión los genes asociados (Bagg & Neilands, 1987; de Lorenzo y col., 1987).

En ausencia del metal, presencia de quelantes de hierro o mutación del gen *fur*, se desreprimen en *E. coli* más de noventa genes (McHugh y col., 2003; Hantke, 2001), y un número comparable de genes en otros sistemas bacterianos (Bjarnason y col., 2003; Baichoo y col., 2002a; Ochsner y col., 2002; Thompson y col., 2002). Algunas de las respuestas son efecto directo de la desrepresión de los genes controlados por Fur, pero a éstos se suman una cantidad de efectos indirectos, producto de la existencia de cascadas de regulación (Ochsner y col., 2002; Barton y col., 1996). En función de la gran cantidad de genes sometidos al control por Fur, a la fecha se lo reconoce como un regulador global encargado de ajustar la fisiología celular a la disponibilidad de hierro.

El represor Fur también controla genes involucrados en procesos celulares no relacionados directamente con el metabolismo del hierro y que incluyen funciones y repuestas tan variadas como la resistencia a estrés oxidativo (Tardat & Touati, 1993; Niederhoffer y col., 1990), la resistencia a ácido (Hall & Foster, 1996; Foster, 1991), la

patogenicidad (Litwin & Calderwood, 1993), el "swarming" (McCarter & Silverman, 1989) o la bioluminiscencia (Makemson & Hastings, 1982). Recientemente, se ha indicado que un gran número de genes del metabolismo energético son inducidos por Fur, muchos de los cuales son proteínas que contienen hierro (McHugh y col., 2003).

1.5. El Mecanismo de Represión por Fur

Como regulador global de la expresión génica, su estrategia de regulación se diferencia de los sistemas de regulación bacterianos típicos, fundamentalmente en aspectos estructurales y aspectos mecanísticos.

Fur es una proteína pequeña (17 kDa), con un dominio N-terminal de unión a DNA del tipo hélice vuelta hélice "alado" (Holm y col., 1994; Stojiljkovic & Hantke, 1985) y un dominio C-terminal de unión a metales, involucrado también en la dimerización (Michaud-Soret y col., 1997; Coy & Neilands, 1991). Cada monómero de Fur une dos iones metálicos, un átomo de ZnII estructural y un átomo de FeII que actúa como correpresor.

Recientemente se ha resuelto la estructura tridimensional de la proteína Fur de *P. aeruginosa* (Pohl y col., 2003). Los datos cristalográficos y espectroscópicos generados han permitido conciliar las discrepancias relativas a la identidad del motivo de unión de hierro derivadas de estudios bioquímicos (Adrait y col., 1999; Jacquamet y col., 1998; Coy & Neilands, 1991; Saito y col., 1991) y genéticos anteriores (Lewin y col., 2002; Bsat & Helmann, 1999; Barton y col., 1996; Hall & Foster, 1996; Coy y col., 1994). El motivo de coordinación del átomo de hierro estaría formado por los residuos H₈₈, D₈₉, E₁₀₀ y H₁₂₄ del ortólogo de *P. aeruginosa* y estaría localizado enteramente en el dominio de dimerización de la proteína (Pohl y col., 2003).

La identidad del motivo de unión del metal estructural (ZnII) también ha sido controversial. Los datos obtenidos para el grupo de ortólogos similares a Fur de *E. coli* indican que el ZnII se encuentra coordinado por dos ligandos S, aportados por dos residuos

cisteína y dos ligandos N u O, aportados por residuos de identidad menos obvia (Gonzales de Perédo y col., 1999). Sin embargo, la evidencia generada para los ortólogos de Fur similares a *P. aeruginosa*, que son trancos en su extremo C-terminal y carecen de cisteínas, involucra a los residuos H₃₂, E₈₀, H₈ y E₁₀₀ en este papel (Pohl y col., 2003). La conservación absoluta de estos últimos cuatro residuos en toda la familia de reguladores Fur y la localización de repartida de estos en los dos dominios de la proteína, es consecuente con el papel estructural atribuido al átomo ZnII y favorece su participación en la coordinación del mismo.

Adicionalmente, Fur es capaz de establecer interacciones de orden superior a través de contactos no caracterizados entre dímeros adyacentes, polimerizando en torno de sus sitios de unión en el DNA.

Mientras los represores clásicos se encuentran en la célula a bajos títulos de proteína, en cultivos en fase exponencial de crecimiento de *E. coli* existen alrededor de 5000 moléculas/célula del regulador, que en condiciones inducidas pueden llegar hasta 10.000 (Zheng y col., 1999; Watnick y col., 1997; Barton y col., 1996). Los altos niveles intracelulares de Fur se relacionan con tres aspectos de su función: su capacidad de quelar hierro, el gran número de blancos controlados por Fur y adicionalmente con la inusual capacidad de polimerizar sobre el DNA para ejercer su efecto represor (de Lorenzo y col., 1988; Escolar y col., 1998b).

La forma activa del represor Fur reconoce y une específicamente una secuencia asociada a los elementos -10 o -35 de los promotores de sus genes blanco, conocida como caja Fur. En función de tal localización, y de resultados de estudios *in vitro* que demuestran que la RNAP no puede desplazar a Fur, cuando el regulador se encuentra preunido a un promotor Fur dependiente de *E. coli*, se ha propuesto que el mecanismo de represión por Fur se ejerce a nivel de la iniciación de la transcripción por bloqueo del acceso de la RNAP al promotor (Escolar y col., 1998a, 1997). Evidencia que respalda éste mecanismo ha sido

generada para un promotor de *B. subtilis* (Bsat & Helmann, 1999) y otro de *B. japonicum* (Friedman & O'Brian, 2003).

La caja Fur derivada del análisis de secuencia de varios promotores regulados por hierro es, en su interpretación más simple, una secuencia palindrómica de 19 nucleótidos rica en A+T que se ajusta a un consenso común en *E. coli* (de Lorenzo y col., 1987) y otras bacterias (Baichoo y col., 2002b; Thompson y col., 2002; Ochsner & Vasil, 1996). Sin embargo, el estudio de la interacción de Fur con sus sitios de regulación, a través de ensayos de retardo en gel y de "footprinting" frente a DNAsa I, ha revelado que Fur forma complejos multiméricos y protege regiones del DNA mayores a 19 nt (Griggs & Konisky, 1999; Frechon y col., 1994; Hunt y col., 1994; Stojiljkovic y col., 1994; Tardat & Touati 1993; Brickman y col., 1990). La inspección minuciosa de muchos de estos promotores ha permitido identificar múltiples cajas adyacentes o superpuestas. Estas observaciones son compatibles con estudios de microscopía electrónica que evidencian la polimerización de Fur entorno de estas secuencias de DNA (Frechon & Le Cam, 1994; Le Cam y col., 1994). En virtud de tales antecedentes la caja Fur ha sido reinterpretada como un arreglo de extensión variable constituido por repeticiones de hexámeros 5'-NAT(A/T)AT-3', cada uno de los cuales constituye la mínima unidad de reconocimiento por el represor Fur. Esto hace posible la existencia de un amplio repertorio de sitios de unión para el represor, de extensión y afinidad variable, que permite a Fur actuar como un regulador específico y al mismo tiempo ejercer un efecto global y jerárquico sobre una gran cantidad de genes en respuesta a cambios sutiles en la concentración de hierro (Escolar y col., 1999).

1.6. Fur Activa Otros Genes

Además de su papel central en la represión génica en respuesta a la biodisponibilidad de hierro, Fur regula positivamente la expresión de algunos genes. En *E. coli* se ha descrito la inducción hierro y Fur dependiente de al menos cuatro genes codificantes para proteínas que unen el metal (FumA, FumB, AcnA, SodB) y dos proteínas de almacenamiento (Dubrac y col., 2000; Hall & Foster, 1996; Gruer & Guest, 1994; Litwin & Calderwood, 1993; Foster & Hall, 1992; Niederhoffer y col., 1990). Sin embargo, el mecanismo de activación por Fur es indirecto, independiente de cajas Fur, e involucra la síntesis de un sRNA antisentido (*ryhB*) que es a su vez parte del regulón Fur clásico (Massé & Gottesman, 2002).

En *H. pylori* y *S. typhimurim* Fur participa en la regulación de la resistencia a disminuciones súbitas de pH. En ambos microorganismos se ha demostrado que Fur participa en la inducción de genes de tolerancia a shock ácido, siendo los mutantes *fur*⁻ sensibles a ácido (Bijlsma y col., 2002; Foster & Hall, 1992). El rol del regulador Fur en esta respuesta, es independiente de la concentración intracelular de hierro y mutaciones puntuales puede inactivar selectivamente la capacidad de Fur de actuar en la represión hierro dependiente o en la inducción dependiente de pH (Delany y col., 2002; Hall & Foster, 1996). El modo en que Fur activa los genes involucrados en la respuesta de tolerancia a ácido no ha sido aún caracterizada.

1.7 Ortólogos y Parálogos

Se han descrito homólogos de *fur* en bacterias y cianobacterias; y la inspección de los genomas disponibles en base de datos indica la presencia del gen, incluso en arqueas. Los microorganismos que codifican para homólogos de *fur*, presentan también secuencias tipo caja Fur en un número variable de promotores. En la mayoría de casos analizados los

homólogos de *fur* son capaces de complementar la deficiencia del represor en *E. coli* o en bacterias filogenéticamente cercanas, sugiriendo que el mecanismo de regulación por Fur es conservado (Hassett y col., 1997; Desai y col., 1996; Ochsner y col., 1996; Hickey & Cianciotto, 1994; Thomas & Sparling, 1994).

El regulador Fur de *E. coli* es el prototipo de una familia de proteínas metalorregulatorias que crece en complejidad a medida que progresa la secuenciación de nuevos genomas. Muchas proteínas de la familia Fur presentan una considerable divergencia de secuencia y se han diferenciado funcionalmente para controlar la expresión de conjuntos particulares de genes a través del reconocimiento de sitios de unión a DNA específicos. Se reconocen hoy en día al menos cuatro subfamilias. Además de la subfamilia Fur, *per se*, que responde a la disponibilidad ambiental de hierro y controla la expresión de un regulón complejo de genes, la subfamilia Per regula una variedad de funciones antioxidantes en algunos microorganismos en respuesta a las condiciones redox del citoplasma (Zahrt y col., 2001; Xiong y col., 2000; Bsat y col., 1998). Los parálogos de Fur de una tercera subfamilia, designados Zur, responden a la disponibilidad de ZnII y regulan un sistema de adquisición del metal (Gaballa & Helmann, 1998; Patzer & Hantke, 1998). Finalmente, un grupo pequeño de reguladores, significativamente divergentes respecto del resto de los miembros de la familia Fur, designados Irr, participan en la regulación de la biosíntesis del grupo hemo en función de la disponibilidad de hierro (Wexler y col., 2003; Qi y col., 2002, 1999,; Hamza y col., 1998).

En función de las inusuales condiciones de su fisiología y su hábitat, *A. ferrooxidans* representa un sistema excepcional para abordar el problema de la adquisición de hierro y de la homeostasis del metal. A diferencia de microorganismos que habitan nichos ecológicos restringidos, esta bacteria se enfrenta a variaciones de consideración en parámetros que afectan de modo directo la disponibilidad de hierro en el medio de

crecimiento, como son el pH y la tensión de oxígeno. Por otra parte, *A. ferrooxidans* es uno de los pocos microorganismos capaces de utilizar hierro como fuente de energía. Además, aunque se ha descrito con anterioridad que existiría regulación por sustrato de varias respuestas fisiológicas de *A. ferrooxidans* (Jeréz y col., 1995, Sand y col., 1995), se desconocen a la fecha los mecanismos subyacentes.

En virtud de la importancia del regulador transcripcional Fur en el control global de la expresión génica en respuesta a hierro en los sistemas donde se ha analizado su función, se consideró de interés evaluar el eventual papel de este tipo de reguladores en la regulación génica y en la coordinación de la respuesta de homeostasis de hierro en *A. ferrooxidans*. El análisis bioinformático de la secuencia del genoma de *A. ferrooxidans* muestra que éste codifica para un regulador de la familia Fur, cuya conservación de motivos lo relaciona con la subfamilia de reguladores Fur de respuesta a hierro, por lo cual se planteó la siguiente hipótesis de trabajo:

Un ortólogo de Fur codificado en el genoma de A.ferrooxidans coordina la respuesta de homeostasis de hierro en esta bacteria.

Para abordar esta pregunta se ha efectuado la reconstrucción bioinformática de la respuesta de homeostasis de hierro en *A. ferrooxidans* sobre la base de los modelos propuestos en otros microorganismos, identificando por un lado genes involucrados en el transporte y almacenamiento de hierro y la regulación de estos, y por otro sitios de reconocimiento para el regulador central de la respuesta de homeostasis de hierro en otros microorganismos, el regulador Fur. En virtud de la importancia del Fur en esta respuesta, se ha analizado la expresión en *A. ferrooxidans* del gen candidato a ser el regulador Fur - hierro dependiente - en esta bacteria y se han evaluado sus capacidades funcionales en el sistema heterólogo mejor caracterizado, *E. coli*.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. Métodos Bioinformáticos:

2.1.1. Búsqueda de Genes de Homeostasis de Hierro

Se utilizó en el análisis bioinformático, la secuencia parcial del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC23270 disponible en las bases de datos de Intergrated Genomics (ERGO, Tabla 1) y The Institute for Genomic Research (TIGR, Tabla 1) en su versión no anotada. Se trabajó adicionalmente sobre la anotación del genoma efectuada en nuestro laboratorio utilizando, en el manejo de los datos, la aplicación Artemis.

Empleando los programas de BlastP y tblastx y sobre la base de la información generada para otros microorganismos, se efectuó una búsqueda por similitud de genes involucrados en la respuesta de homeostasis de hierro y de genes regulados por Fur ya conocidos. Los posibles genes identificados se utilizaron en una búsqueda de similitud por BlastP contra la base de datos de NCBI para confirmar la asignación de función. Las proteínas predichas se caracterizaron utilizando los recursos disponibles en la red y listados en la Tabla 1.

2.1.2. Modelamiento Estructural Comparativo de Fur_{Fe}

Se generó un modelo estructural para Fur_{Fe} de *A. ferrooxidans* utilizando como templado la estructura de la proteína Fur de *P. aeruginosa* (Pohl y col., 2003, PDB:1MZBA), sobre la base de una identidad de secuencia aminoacídica del 57 %. El modelo tridimensional de la proteína Fur_{Fe} se generó empleando el programa MODELLER (Versión 6.1), a partir del alineamiento de pares entre Fur_{Fe} y la estructura de referencia.

Tabla 1. Recursos de búsqueda y análisis de secuencia disponibles en la red

Aplicación	Dirección http
Bases de datos	
NCBI	www.ncbi.nlm.nih.gov
TIGR	www.tigr.org
ERGO	www.integratedgenomics.org
COG	www.ncbi.nlm.nih.gov/COG/index.html
KEGG	www.genome.ad.jp/kegg/kegg2.htm
ECOCYC	ecocyc.org/
Predicción de ORFs	
ORF finder	www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf
Análisis de similitud	
BLASTP	www.ncbi.nlm.nih.gov/blastp
PHYLOBLAST	www.pathogenomics.bc.ca/cgi-bin/phyloblast.pl
Alineamiento de secuencia	
CLUSTALW	www.ebi.ac.uk/ClustalW/
Análisis de estructura 2ª	
PROTPARAM	www.expasy.ch/tools/protparam.html www.infobiogen.fr/services/analyseq/cgi-bin/saps_in.pl
Predicción de estructura 2ª	
MULTALIN	npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/align_multalin.pl
PSIPRED	insulin.brunel.ac.uk/psipred/
PREDICTPROTEIN	maple.bioc.columbia.edu/predictprotein).
Búsqueda de dominios y motivos	
Helix Turn Helix	npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/primanal_hth.pl
Transmembrana	www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html
SignalP	www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
Localización	www.psort.nibb.ac.jp/
BLOCKS	www.blocks.fhcrc.org/
PRODOM	www.toulouse.inra.fr/prodom.html
PROSITE	www.expasy.ch/prosite
INTERPRO	www.ebi.ac.uk/interpro/
PFAM	www.sanger.ac.uk/cgi-bin/pfam
PRINTS	www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/dbbrowser/PRINTS/printscontents.html/
Predicción de Estructura 2ª (RNA)	
RNAFold	www.tbi.univie.ac.at/~ivo/RNA/
Edición de Secuencias	
BOXSHADE	www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html
LOGO	weblogo.berkeley.edu/logo.cgi

El modelo de menor energía, generado por MODELLER, se relajó subsiguientemente con el programa de dinámica molecular Discover, utilizando ciclos de minimizaciones y dinámicas moleculares de 3 picosegundos, hasta llegar a convergencia energética. En los cálculos de relajación se fijaron restricciones espaciales para los carbonos α , a fin de evitar la pérdida de estructura 2^{ra} durante las dinámicas.

Adicionalmente, sobre la base de la interacción teórica proteína : DNA establecidas para Fur de *E. coli*, se efectuó el acoplamiento de una serie de dímeros de Fur_{Fe} sobre una molécula de DNA-B, simulando la polimerización del represor a su secuencia operadora. El arreglo óptimo de dos dímeros adyacentes en el DNA se obtuvo a partir de rutinas de minimización de energía utilizando el programa Discover. Por su parte, la extensión C-terminal libre de Fur_{Fe} se relajó por dinámica molecular utilizando el programa CHARMM (Versión 27), considerando la coordinación de un átomo Zn por las cisteínas C₉₆, C₉₉, C₁₃₆ y C₁₄₅. Se fijaron, a tal efecto, restricciones de distancia entre el átomo de S de cada cisteína y el átomo de Zn, dejando fijos los residuos situados a más de 20 Å de distancia de la cisteína C₉₆ del par central.

La manipulación de la estructuras se realizó con el programa Insight II. Los cálculos de dinámica molecular y de minimización de energía se realizaron en una estación de trabajo Silicon Graphics Origin 200 (2 x R12000) y en un PC-cluster de 6 CPU Athlon MP 2200+ con 1 Gb de RAM.

2.1.3. Búsqueda de Sitios de Regulación

A partir del alineamiento de 26 cajas Fur definidas experimentalmente en *E. coli* o 67 cajas de un conjunto de microorganismos (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium*, *S. aureus*), se construyeron dos matrices de información (Schneider y col., 1997), designadas respectivamente, MEC (Matriz *E.coli*) y MCB (Matriz Conjunto Bacterias). Estas matrices

resumen la frecuencia de cada base en las posiciones 1 a 19 de la caja en el conjunto de secuencias y se emplearon para alimentar el siguiente algoritmo:

$$R_{iw}(b,l) = 2 + \log_2 f(b,l) - e(n) , \text{ donde:}$$

$f(b,l)$ es la frecuencia de cada nucleótido b en la posición l del alineamiento

$e(n)$ es un factor de corrección por tamaño muestral.

Este algoritmo asigna a una secuencia cualquiera de 19 nucleótidos un puntaje que corresponde a su contenido local de información respecto de la matriz de alimentación. Utilizando una rutina de automatización escrita en lenguaje Perl se barrió la secuencia del genoma de *A. ferrooxidans* con una ventana deslizante de 19 nucleótidos, identificando regiones de alto y bajo contenido de información. Se consideraron como posibles cajas Fur a aquellos 19meros con puntaje mayor a la peor caja comprobada de *E. coli* (Caja Fur_{exbB} = 5,52 bits).

2.2. Métodos Experimentales

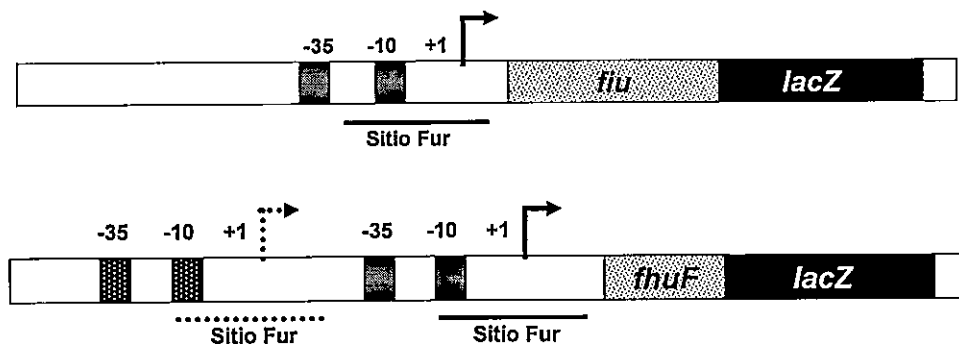
2.2.1. Cepas

En el presente estudio se utilizaron las cepas de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 y ATCC 19859. La primera de ellas corresponde a la cepa cuya secuencia genómica se encuentra depositada en las bases de datos pública TIGR y ERGO. Las cepas de *Escherichia coli* utilizadas en el clonamiento de genes de *A. ferrooxidans* y en ensayos de complementación de función se presentan en la Tabla 2 y se describen a continuación.

Tabla 2. Cepas de *A. ferrooxidans* y *E. coli*

Cepa	Genotipo	Origen
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>		
23270	silvestre	ATCC
19859	silvestre	ATCC
<i>Escherichia coli</i>		
H1780	<i>fur, fju::lacZ</i> , Sm, Km	K. Hantke
H1681	<i>fur, fhuF::lacZ</i> , Sm, Km	K. Hantke
H1717	<i>aroB, fhuF::lacZ</i> ; Sm, Km	K. Hantke
QC-771	GC4468, F- $\Delta(lacZYA-argF)U169$ <i>rpsL</i>	R.D'Ari
QC-1732	QC-771, Δfur	D. Touati

Las cepas H1780 y H1681 (Hantke, 1987) portan una inserción del fago Mudlac en un gen regulado por Fur, de modo que el gen reportero *lacZ* (comenzando a partir de su codón 9) queda sometido al control transcripcional de tal promotor.

Figura 1. Esquema de las construcciones reporteras incluidas en el genoma de las cepas *fur* de *E. coli* H1780 y H1681.

En la cepa H1780 (*fhu::λplac Mu53*) el gen *lacZ* se expresa desde el promotor del gen *fhu*. Este gen codifica para una proteína de membrana externa regulada por hierro (Crosa, 1997) en cuyo promotor se identifican 4 cajas *fur* superpuestas entre las posiciones -19 y +17 y cubriendo la región -10 del promotor. Por su parte, en la cepa H1681 (*fhuFλplac Mu53*) el gen *lacZ* está sometido al control del promotor del gen *fhuF*. FhuF es una proteína con centro Fe-S con funciones de reductasa férrica regulada por hierro (Stojiljkovic y col., 1994). Para este gen se han reportado dos sitios de inicio de la transcripción. El primero de ellos está centrado 30 pb río arriba del ATG, inmerso en un sitio de baja afinidad por Fur (Zheng y col., 2001b). El segundo sitio +1 se encontraría 123 pb río arriba del ATG (Müller y col., 1998), inmerso en un sitio de alta afinidad por Fur (Zheng y col., 2001b). En ambas regiones promotoras de *fhuF* es posible identificar 2-3 cajas *fur* solapadas en el entorno de la región -10 del promotor.

Las cepas H1780 y H1681 llevan, además, una mutación puntual que anula la expresión del gen *fur*. En presencia de un gen heterólogo funcional, capaz de complementar la deficiencia del regulador Fur, las fusiones génicas descritas son reguladas por la disponibilidad de hierro del medio. La actividad β-Galactosidasa se incrementa durante la fase exponencial de crecimiento, alcanzando un plateau en fase estacionaria (Newman & Shapiro, 2000).

En medio indicador Agar MacConkey-Lactosa suplementado con FeSO₄ (40μM) la hidrólisis de lactosa otorga a las cepas *lac*⁺ una coloración rojiza, mientras que las cepas *lac*⁻ permanecen incoloras. En consecuencia, ambas cepas *fur*⁻ crecen en medio MacConkey-Fe formando colonias rojas. Por el contrario, la introducción de un gen *fur* funcional resulta en la represión del reportero *lacZ* (fenotipo *lac*⁻) siendo las colonias resultantes blanquecinas o translucidas.

2.2.2. Plásmidos y Clones

Los plásmidos comerciales y los clones recombinantes construidos durante el desarrollo de esta Tesis se resumen en la Tabla 3.

Tabla 3. Plásmidos y Clones

	Genotipo	Origen
Plásmido		
pUC-18	vector de clonamiento, Ap	Gibco _{BRL}
GEMT-Easy	vector de clonamiento, Ap	Promega
Clon		
pMH15	gen <i>fur</i> de <i>E. coli</i> K12, Cm	K. Hantke
pEc-Fur	gen <i>fur</i> de <i>E. coli</i> K12 expresado desde P _{lacZ} de pUC18, Ap	Esta Tesis
pFur1	gen <i>fur</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270 expresado desde P _{lacZ} de pUC18, Ap	Esta Tesis
pFur2	gen <i>fur</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC19859 expresado desde P _{lacZ} de pUC18, Ap	Esta Tesis
pG40E	gen <i>fur</i> mutante G40E de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270 expresado desde P _{lacZ} de pUC18, Ap	Esta Tesis
pAf-Ec	gen <i>fur</i> quimérico: porción N-terminal del gen <i>fur</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270 fusionada a la porción C-terminal del gen <i>fur</i> de <i>E. coli</i> expresado desde P _{lacZ} de pGEMT-Easy, Ap	Esta Tesis
pEc-Af	gen <i>fur</i> quimérico: porción N-terminal del gen <i>fur</i> de <i>E. coli</i> fusionada a la porción C-terminal del gen <i>fur</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270 expresado desde P _{lacZ} de pGEMT-Easy, Ap	Esta Tesis
pFur3	gen <i>fur</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270 expresado desde el promotor y sitio SD de la construcción pEc-Fur, Ap	Esta Tesis
pFur4	gen <i>fur</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270 expresado desde su promotor de origen en pGEMT-Easy, Ap	Esta Tesis

2.2.3. Condiciones de Cultivo

Los cultivos de *A. ferrooxidans* se crecieron a 30 °C con agitación (150 rpm) en medio salino 9K (0,4 g (NH₄)₂SO₄; 0,1 g K₂HPO₄; 0,4 g MgSO₄ por L) con adición de S (0,5% azufre particulado esterilizado en etanol; ajustado a pH 3,5 con H₂SO₄) o concentraciones variables de hierro (100-400 mM FeSO₄; ajustado a pH 1,6 con H₂SO₄) según Yates & Holmes (1987). El crecimiento de *A. ferrooxidans* se evaluó por recuento directo de células en cámara Petroff-Hausser.

Los cultivos de *E. coli* se crecieron a 37 °C con agitación (200 rpm) en caldo Luria Bertani (LB) con adición de antibióticos según se indica en la Tabla 3: Ap 100 µg/ml, Sm 100 µg/ml y/o Km 30 µg/ml. Los cultivos crecidos en presencia de hierro se suplementaron con FeSO₄ 40µM. Las condiciones de deficiencia de hierro se lograron mediante la adición al medio de crecimiento LB del quelante de FeII orto-fenantrolina (200 µM).

2.2.4. Técnicas de Biología Molecular

2.2.4.1. Colección de las Células

Los cultivos de *A. ferrooxidans* a ser empleados en la purificación de ácidos nucleicos o proteínas se colectaron por centrifugación a 12.000 rpm durante 25 min, previa centrifugación a baja velocidad (600 rpm) para remover el hierro precipitado (jarosita) o las partículas de azufre. Las células se lavaron en medio basal 9K hasta obtener un pellet de células libre de partículas.

Los cultivos de *E. coli* se colectaron por centrifugación a 12.000 rpm durante 5 min y se lavaron en amortiguador Tris-HCl pH 8,0.

Los pellets celulares obtenidos se mantuvieron en hielo o se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

2.2.4.2. Preparación de Ácidos Nucleicos

La extracción del DNA genómico de *A. ferrooxidans* se efectuó según Yates & Holmes (1987) a partir de cultivos crecidos a 30 °C hasta alcanzar la fase exponencial tardía en medio 9K-Fe.

La extracción de DNA genómico de *E. coli* se efectuó utilizando el sistema de purificación de DNA Genómico Wizard (Promega) a partir de cultivos crecidos a 37 °C durante 16 h.

La extracción de DNA plasmidial de *E. coli* se efectuó utilizando el Sistema de Purificación de DNA Plasmidial Wizard (Promega) a partir de cultivos crecidos en presencia de antibióticos a 37 °C durante 16 h.

La extracción de RNA total de *A. ferrooxidans* se efectuó según Hagen & Young (1978) a partir de cultivos crecidos a 30 °C hasta alcanzar la fase exponencial tardía/estacionaria temprana en medio 9K-Fe o 9K-S.

La extracción de RNA total a partir de *E. coli* se efectuó por el método de fenol ácido según Aiba y col. (1981) a partir de cultivos crecidos a 37 °C hasta una OD₆₀₀ de 0,6 en LB con adición de antibióticos, FeSO₄ u ortofenantrolina según el caso.

2.2.4.3. Transcripción Reversa

La transcripción reversa y la amplificación acoplada del cDNA a través de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se efectuaron utilizando respectivamente, la transcriptasa reversa Superscript II (Gibco BRL) y la DNA polimerasa Taq (Invitrogen) según las recomendaciones del proveedor y los partidores adecuados al caso (Tabla 4).

Se empleó, en cada reacción, 1 µg de RNA total; en los casos en que no se detectó amplificación, la concentración de RNA total por reacción se incrementó hasta 3 µg. Se incluyeron los siguientes controles: PCR sobre DNA genómico como control positivo de amplificación, PCR sobre RNA total para detectar contaminación por DNA en la preparación y PCR sin molde como control negativo de amplificación por PCR. El gen *recA*

se empleó como control de expresión independiente de hierro. Todos los experimentos se efectuaron al menos por duplicado.

2.2.4.4. Estrategia General de Clonamiento

Los genes a clonar se amplificaron mediante PCR a partir del DNA genómico de las cepas pertinentes, utilizando la DNA polimerasa con actividad correctora Elongasa (Invitrogen). Las condiciones de reacción fueron las recomendadas por el proveedor, utilizándose un bajo número de ciclos de amplificación (28-30). Los partidores empleados en cada caso y sus temperaturas de reasociación al molde se presentan en la Tabla 4.

Tabla 4. Oligonucleótidos

Oligonucleótido	Secuencia (5'-3')	Sitios de Restricción	T° de Reasociación
<i>A. ferrooxidans</i>			
AF-FurA3sd	TTAAGGAGACTCGAGCGAATGATCGACGAACG	<i>XhoI</i>	69
AF-FurA2 ^a	ACCGTGACACCTGGTGC		69
AF-FurB1	CTAGCATGGCTCCATGGC		69
AF-FurB2 ^a	ATCAGGGAAGGCACACCG		69
AF-FurC1	AGGTGAGCACATTAAGGCC		68
AF-FurC2 ^a	TGCCAAGAAGGCAAGGGC		69
AF-G40E1 ^b	ACTGCCGAGGAAATCTACCGG		51
AF-G40E2 ^b	AAGATGCCGTGCGTTCGCT		51
AF-LYLY1	ACCACAGTCTCTATCTTTACGGTCACTGTGCCG		61
AF-LYLY2	CCGAAGAAATAGTCGCTGGTGTGCGAGATAGA		63
AF-FurA5sd	ACAGGACCTCGAGCGCATGATCGACGAACG	<i>XhoI</i>	67
AF-RIGA1	GTCAAAAAGCACCCAGAACC		56
<i>E. coli</i>			
EC-Fur1sd	ACAGGACCTCGAGCGCATGACTGATAAC	<i>XhoI</i>	69
EC-Fur2 ^a	TATTTGCCTTCGTGCGC		68
EC-LYLY1	ACCACAGCCTCTATCTCTATGGCACCTGTCTTG		69
EC-LYLY2	TACCGTAAGCGGACTGATTGGTGTGAGAGATAGA		61
FB-FhuF1 ^c	CTCTAGAGATAATGATAACCAATATCTCTAGAG	<i>XbaI</i>	53
FB-FhuF2 ^c	CTCTAGAGATATTGGTTATCATTATCTCTAGAG	<i>XbaI</i>	53
Vector			
pUC-2(2006972)	GTTTTCCAGTCACGAC		63

Partidores directos: número impar; Partidores inversos: número par; (a) Partidores para RT-PCR; (b) Partidores para PCR divergente; (c) Oligonucleótidos-sonda para el ensayo EMSA. El sitio SD y el codón ATG incluido en los oligonucleótidos se encuentra subrayado.

Los vectores de clonamiento se digirieron con enzimas de restricción (Invitrogen) y se desfosforilaron utilizando protocolos convencionales de biología molecular (Sambrook y col., 1986).

Los productos de PCR y los vectores digeridos se purificaron a partir de geles de agarosa 0,8 -1 % utilizando el sistema QiaEx (QiaEx DNA purification kit, Qiagen Inc).

Las ligaciones se efectuaron entre 4 y 16 °C por períodos de 12-20 h utilizando la Ligasa T4 (Promega) según las especificaciones del proveedor.

Las mezclas de ligación se transformaron por electroporación (Cell Porator Gibco BRL Life Technologies) en las cepas huésped, a través de un pulso de 2.4kV (25UF, 330Ω).

Los transformantes se aislaron en medio sólido LB o medio indicador Agar MacConkey-lactosa con la selección pertinente. Los clones recombinantes se evaluaron mediante PCR para definir la presencia y orientación del inserto. La identidad e integridad del fragmento clonado se verificó por secuenciación. Los clones orientados en la dirección del promotor del vector se seleccionaron para los experimentos subsiguientes.

2.2.4.5. Mutación Sitio Dirigida

La mutante G40E se generó por PCR utilizando un partidador directo (AF-G40E1) originado en la posición 112 del gen *fur* de *A. ferrooxidans* que introdujo el cambio G:A en la posición 119 y un partidador inverso (AF-G40E2) divergente originado en la posición (111) inmediata anterior (Tabla 4).

La amplificación por PCR se efectuó utilizando la DNA polimerasa con actividad correctora Elongasa (Invitrogen) y las siguientes condiciones de reacción: 30 ciclos de desnaturalización a 90 °C por 30 s, reasociación del partidador a 48 °C por 30 s y elongación a 68 °C por 4 min, seguidas de un ciclo final de elongación a 68 °C de 10 min. El producto de PCR obtenido se purificó a partir de un gel de agarosa, y se fosforiló utilizando la Polinucleótido quinasa

de T4 (Promega) y se ligó en condiciones diluidas (20 μ l finales) para permitir la recircularización del plásmido.

2.2.4.6. Construcción de las Quimeras C-terminales

Las quimeras de Fur que intercambian recíprocamente el extremo C-terminal de *E. coli* y *A. ferrooxidans* se construyeron a través de PCR y "overlap extension" acoplado según se muestra en la Figura 2 (A). Se generaron cuatro fragmentos, correspondientes a los segmentos N- y C-terminales de Fur de *A. ferrooxidans* o de *E. coli*, a través de reacciones de PCR independientes.

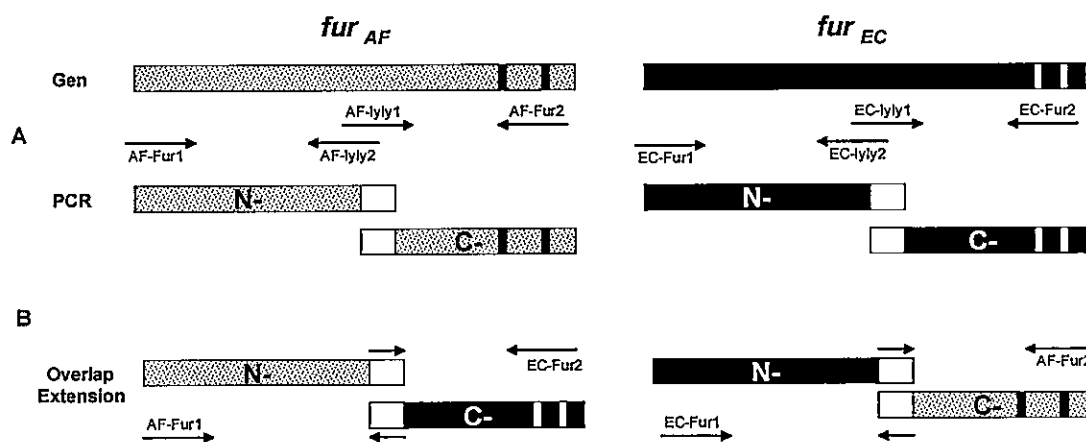


Figura 2. Estrategia utilizada en la construcción de las quimeras C-terminales de Fur de *A. ferrooxidans* y *E. coli*. (A) Primera ronda de PCR para generar los fragmentos N- y C-terminales de los genes *fur* de *A. ferrooxidans* y *E. coli*. (B) Segunda ronda de PCR sobre la mezcla recíproca de los fragmentos N- y C- terminales de los genes *fur* de *A. ferrooxidans* y *E. coli*. Los partidores empleados se indican con flechas.

Los productos obtenidos se purificaron desde un gel de agarosa y se combinaron de modo recíproco en cantidades equimolares en una segunda reacción de PCR (Figura 2 B).

Los partidores directos utilizados para amplificar los dos fragmentos C-terminales (AF-lyly1 y EC-lyly1) y los partidores inversos utilizados para amplificar los dos fragmentos N-

terminales (AF-lyly2 y EC-lyly2) de Fur de *A. ferrooxidans* y de *E. coli* respectivamente, comparten una región de 16 nt idénticos. Esta región se utilizó como segmento de asociación y de partidor reverso en una segunda reacción de PCR ("overlap extensión").

Las condiciones de la segunda vuelta de PCR fueron las siguientes: 5 ciclos de desnaturación a 95 °C por 1 min, reasociación a 50 °C por 2 min y elongación a 72 °C por 1 min en ausencia de partidores, seguido de 25 ciclos de amplificación estándar tras agregar los partidores externos correspondientes (Tabla 4).

Los productos de PCR resultantes se purificaron desde un gel de agarosa y se clonaron en el vector pGEMT-Easy (*EcoRV*) según las recomendaciones del proveedor, y se transformaron en la cepa huésped DH5 α . Las construcciones designadas pAf-Ec y pEc-Af (Tabla 3) se verificaron por secuenciación.

2.2.4.7. Preparación de Proteínas Totales

Se colectaron muestras de 1,5 ml de cultivos de *E. coli* en fase exponencial (OD_{600} 0,6) crecidas en medio LB en presencia/ausencia de hierro a 37 °C.

Se colectaron muestras de 125 ml de cultivos de *A. ferrooxidans* en fase exponencial tardía crecidos en medio 9K-S o 9K-Fe con concentraciones variables de $FeSO_4$ a 30 °C.

El contenido de proteínas por preparación se determinó a través del método de Bradford utilizando el ensayo de determinación de proteínas BioRad, según las especificaciones del proveedor. Las curvas de calibración se construyeron empleando BSA como patrón.

Los extractos de proteínas totales de *E. coli* y de *A. ferrooxidans* se prepararon según Sambrook y col. (1989) en 100 μ l de amortiguador de carga para SDS-PAGE. Alícuotas normalizadas en función de la concentración de proteínas totales se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 15% o 18% en presencia de SDS, a 150 V durante 1,5 h.

2.2.4.8. Inmunodetección de Proteínas

Las proteínas separadas mediante SDS-PAGE se transfirieron a membranas de Nitrocelulosa (Schleicher & Schuell) en una solución de 10% ácido bórico 500 mM /NaOH 190 mM, 20% etanol, 0,1% SDS, en presencia de una corriente de 300 mA durante 1,5 h. Se utilizó como referencia el marcador de peso molecular preteñido Kaleidoscope (BioRad).

Las membranas se bloquearon en una solución de leche al 5% y Tween 20 al 0,05% en amortiguador Tris Salino (TBS) durante 16 h a 4 °C con agitación. Las proteínas se detectaron por incubación secuencial con antisuero policlonal de conejo (gentilmente cedido por el Dr. M. Vasil) generado contra la proteína Fur de *E. coli* (1:500 en TBS) y anticuerpo secundario de cabra anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa (1:15.000 en TBS), durante 1 h respectivamente. Las proteínas inmunoreactivas se visualizaron utilizando el sustrato quimioluminiscente Supersignal West Pico (Pierce). El anticuerpo primario se preabsorbió previamente contra extractos crudos de *E. coli* H1780 según Sambrook y col. (1989).

2.2.4.9. Inmunoprecipitación

Los cultivos de *E. coli* se crecieron hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,8 y se colectaron por centrifugación a 12.000 rpm. En el caso particular del clon Fur1 se colectó 1 litro de cultivo. Los pellets se lavaron en amortiguador Tris-HCl 25 mM pH 8,0 y se resuspendieron en 10 volúmenes de amortiguador de lisis (glucosa 50 mM; EDTA 10 mM; Tris-HCl 25 mM pH8,0; PMSF 1mM) conteniendo lisozima (0,1 mg/ml). Tras 30 min de incubación en hielo las células se sonicaron alternando 5 pulsos de 10 s (a 50 Watts) con incubaciones de 1 min en hielo. Las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm y 4 °C por 10 min y el sobrenadante se diluyó en amortiguador RIPA 2X (Tris-HCl 100mM pH 8,0; SDS 2 mg/ml,

deoxicolato 10 mg/ml; NaCl 300 mM; Nonidet P40 2% (v/v), PMSF 2 mM) incubándose durante 5 min en hielo según Qi y col. (1999). Los extractos se trataron con antisuero policlonal de conejo contra Fur de *E. coli* (1:500) durante 2 h a 4 °C y luego se incubaron en amortiguador RIPA 1X conteniendo 300 µl de proteína A acoplada a agarosa (Invitrogen) durante 1 h a 4 °C. El inmunoprecipitado se disoció de la matriz de agarosa en Urea 8M y se resuspendió en amortiguador de carga SDS-PAGE. Las proteínas se separaron mediante SDS-PAGE 15% (20 µl/carril), para establecer la presencia de la banda esperada por Western blot.

2.2.4.10. Ensayos de Retardo

Se empleó como sonda en el ensayo de retardo (EMSA) un fragmento de DNA de 33 pb conteniendo la caja Fur del promotor del gen *fhuF* de *E. coli*. La sonda se construyó por reasociación espontánea de dos oligonucleótidos complementarios (Tabla 4, FB-fhuF1 y FB-FhuF2) tras 10 min de calentamiento a 65 °C y se marcó con [$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP en su extremo 5' utilizando la polinucleótido quinasa T4 (Invitrogen) según las recomendaciones del proveedor. La marca no incorporada se removió por cromatografía en columnas (Micro Bio-spin chromatography columns, Biorad) utilizando la matriz Bio-Gel 10 (Biorad).

Cultivos de *E. coli* QC1732 (Tabla 2) conteniendo los plásmidos pEc-Fur y pFur3 se crecieron hasta OD_{600} 0,8, se cosecharon a 12.000 rpm y se resuspendieron en 10 volúmenes de amortiguador de retardo (Tris-HCl 20 mM pH 8,0; glicerol 0. 5% (v/v), PMSF 1 mM; aprotinina 2 µg/ml) conteniendo lisozima (0,1 mg/ml). Tras 40 min de incubación en hielo, las células se sonicaron alternando 5 pulsos de 10 s (a 50 Watts) con incubaciones de 1 min en hielo. La muestras se centrifugaron a 12.000 rpm y 4 °C durante 10 min y el sobrenadante se almacenó a -20 °C hasta su utilización.

El ensayo de retardo se efectuó según de Lorenzo y col. (1988) con las siguientes modificaciones. Se equilibraron 80-100 µg de proteínas totales en 20 µl de amortiguador

EMSA (Tris-HCl 20 mM pH 8,0; KCl 40 mM; MgCl₂ 1 mM; MnSO₄ 0,1 mM; BSA 0,1 mg/ml; glicerol 5% v/v). Se agregó la sonda marcada (50-75 pM; 100.000 cpm) y el DNA competidor no específico (DNA de espermatozoos de salmón - 50 µg/µl) y se incubó la reacción por 10 min a 30 °C.

En los ensayos de competencia se empleó sonda fría en exceso (50 X) y en los ensayos de "supershift" se agregó una dilución (1:500) del antisuero policlonal de conejo contra Fur de *E. coli* incubándose durante 5 min adicionales.

Las reacciones se resolvieron mediante electroforesis en geles no desnaturantes de poliacrilamida al 4% (p/v) corridos a 200 V durante 1 h en amortiguador Tris-Acetato a 4 °C. Los geles se secaron, se expusieron a una película Kodak X-OMAT (Sigma) y se analizaron mediante PhosphorImager (Molecular Imagen FX Pro Plus, BioRad).

2.2.5. Ensayo de Actividad β-Galactosidasa

Cultivos en fase exponencial de crecimiento (OD₆₀₀ 0,4), se subdividieron en alícuotas equivalentes y se crecieron en caldo LB (Sm 100 µg/ml y Amp 100 µg/ml) en presencia de exceso de hierro por adición de FeSO₄ 40 µM o en deficiencia de hierro por adición de ortofenantrolina 200 µM, durante las 3 h subsiguientes a 37 °C con agitación (200 rpm). Transcurrido el período de tratamiento, el crecimiento de los cultivos se detuvo en hielo. Alícuotas celulares (10⁸ células), normalizadas por la OD₆₀₀ de los cultivos respectivos, se colectaron por centrifugación, se resuspendieron en amortiguador Z en presencia de agentes reductores según Sambrook y col. (1989) y se permeabilizaron con clorofomo-SDS 10% durante 5 min a 30 °C inmediatamente antes de la medición de actividad. La actividad β-galactosidasa (β-gal) se determinó mediante el método de Miller (1972), en función de la hidrólisis de o-nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONPG) y se expresa en unidades Miller relativas (OD₄₂₀/min.ml.OD₆₀₀).

2.2.6. Ensayo de Resistencia a H₂O₂

Los ensayos de resistencia a peróxido se efectuaron según Touati y col. (1995) con las siguientes modificaciones. Alícuotas de 5 ml de cultivos de *E. coli* crecidos a 37 °C con agitación (200 rpm) hasta OD₆₀₀ 0,4 – 0,5 en caldo LB (~ 30µM hierro intrínseco) se sometieron a concentraciones crecientes de peróxido de hidrógeno (0, 1, 5, 15, 30 mM) y se incubaron a 37 °C con agitación (200 rpm) durante 20 min. El tratamiento fue detenido por dilución de los cultivos en MgSO₄ 10 mM (en hielo). Diluciones seriadas de cada tratamiento se sembraron en agar LB, determinándose el porcentaje relativo de sobrevivencia respecto del control sin H₂O₂, por recuento celular (UFC/ml) tras 18 h de incubación a 37 °C. Los tratamientos se efectuaron por duplicado.

2.2.7. Ensayo de Titulación de Fur (FURTA)

El ensayo de titulación del represor Fur se efectuó según Stojiljkovick (1994) utilizando la cepa de *E. coli* H1717 (*fur*⁻, *fhuF::lacZ*, Tabla 2) y la genoteca pGTF de *A. ferrooxidans* ATCC19859 construida en pUC18, conteniendo insertos *Sau3A* de 1Kb tamaño promedio. Se ha estimado que 1.4 x 10⁴ clones representan 1 vez el genoma con una probabilidad de 99%.

La cepa de *E. coli* H1717 (~10¹⁰ células) se transformó por electroporación con la genoteca pGTF (300 ng), obteniéndose 3,1 x10⁵ clones Ap^R en medio indicador MacConkey-Fe (40 µM) con selección. Se incluyeron como controles de este ensayo, el vector pUC18 y una caja Fur conocida clonada en el mismo vector (FB-*fhuF*1+2, Tabla 4).

3. RESULTADOS

3.1. Reconstrucción de la Respuesta de Homeostasis de Hierro en *A. ferrooxidans*

En base a los antecedentes acumulados en otros sistemas microbianos y utilizando herramientas bioinformáticas (ver métodos), se estableció la presencia y conservación en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC23270 (TIGR) de una variedad de genes potencialmente implicados en la adquisición y en el almacenamiento intracelular de hierro, así como también en la regulación transcripcional hierro dependiente. A continuación se describe la caracterización estructural y funcional de estos elementos, y algunos detalles particulares de cada sistema.

3.1.1. Identificación *In Silico* de Genes de Homeostasis de Hierro

3.1.1.1. Transportadores de FeII

En bacterias el ión ferroso (FeII) puede ser transportado específicamente a través de tres tipos de transportadores: el transportador de alta afinidad FeoAB, transportadores de metales de tipo ABC y el sistema MntH. Adicionalmente, el FeII puede ser transportado de modo inespecífico cuando su concentración es alta (>1mM), a través de transportadores de otros iones divalentes pobremente definidos (Velayudhan, 2000; Hantke, 1997; Earhart, 1996). En el genoma de *A. ferrooxidans* se encuentran codificados ortólogos para algunos de estos sistemas.

FeoAB

El sistema FeoAB está ampliamente distribuido y altamente conservado en bacterias. Este transportador es el principal contribuyente en la adquisición de Fe frente a bajas tensiones de oxígeno en las enterobacterias *E. coli* y *S. typhimurium* (Tsolis y col., 1996; Kammler y col., 1993), y en *H. pylori* durante la colonización de la mucosa gástrica a pH ácido (Tomb y col., 1997).

A. ferrooxidans codifica para un ortólogo de FeoB (AF0541), 41% idéntico a FeoB de *E. coli* (P33650) y 28% idéntico a FeoB de *H. pylori* (D71909). Es posible distinguir en este ortólogo un dominio citoplasmático e hidrofílico N-terminal (1-174 aa) con similitud a proteínas que unen e hidrolizan GTP y un segundo gran dominio hidrofóbico de membrana (174-782aa). Cuatro motivos de unión para GTP (G1-G4) característicos de las proteínas G de eucariotas se encuentran conservados en la familia de transportadores bacterianos de tipo FeoB (Sprang, 1997) los cuales se detectaron también en el ortólogo de *A. ferrooxidans*. El perfil de hidropatía consenso para FeoB_{AF}, permite predecir en el dominio C-terminal, 8 hélices de transmembrana con un considerable nivel de conservación de secuencia. Por el contrario, en algunos de los segmentos expuestos al periplasma de *A. ferrooxidans*, se observa un mayor número de sustituciones aminoacídicas.

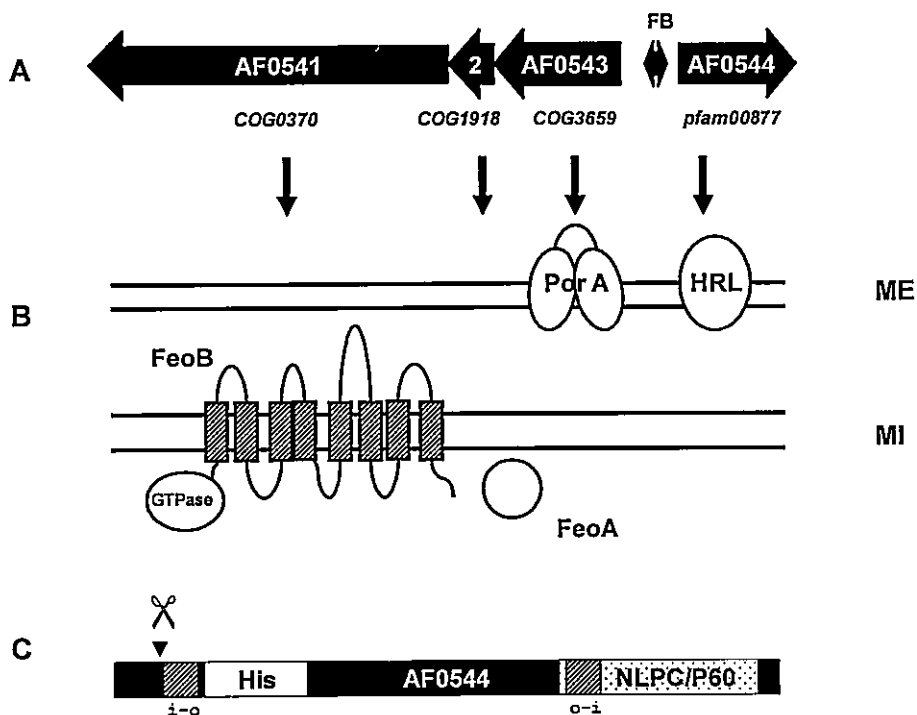


Figura 3. Sistema de transporte de FeII, FeoAB de *A.ferrooxidans*. (A) Estructura del locus de adquisición de FeII AF0541-AF0544. (B) Localización celular de los componentes del sistema de transporte de FeII y probable topología de FeoB. (C) Motivos presentes en la proteína HRL (lipoproteína rica en histidinas): >< Sitio probable de clivaje de péptido señal (SignalP), achurado: dominios de transmembrana i-o (TMPRED), his: Motivo rico en histidinas de localización extracelular (PSORT), NLPC/P60: Motivo pfam00877., FB: caja Fur, ME: membrana externa, MI: membrana interna.

FeoA, por su parte, es una proteína pequeña (75-100aa) de función desconocida, de localización probable en el citoplasma (con un pI inusualmente alto para proteínas citoplasmáticas, de entre 9 y 11) carente de péptido señal y de posibles hélices de transmembrana. En *A. ferrooxidans* se detecta un marco de lectura abierto de 100 aa (AF0542) adyacente a *feoB* cuyo producto predicho, aunque considerablemente divergente respecto del ortólogo FeoA de *E. coli*, pertenece al grupo de proteínas ortólogas COG1918 y comparte una similitud del 55% con una proteína de tipo FeoA de *Clostridium acetobutylicum* (C97027) y de *Methanosarcina barkeri* (ZP_00076679).

Aspectos Inusuales del Contexto Genético

El gen *feoA* se encuentra habitualmente organizado en un mismo operón con *feoB*. La dirección transcripcional y el espaciamiento entre los genes *feoA* y *feoB* en *A. ferrooxidans* sugieren también una organización en operón pero a diferencia de otros microorganismos incluiría adicionalmente, como primer gen del operón, a una porina de 418 aa (AF0543). Esta porina es afín a la subfamilia de porinas sustrato específicas tipo OprB (COG3659) de *Pseudomonas* (40% similar a ZP_00088080; 40% similar a NP_745707), implicadas en la difusión facilitada de carbohidratos a través de la membrana externa (Wylie & Worobec, 1995; Saravolac y col., 1991) pero que adicionalmente presentan alguna selectividad por iones (Wylie y col., 1993). Río arriba de esta porina es posible identificar una secuencia tipo caja Fur (Figura 3).

Divergente a este probable operón se encuentra codificada una proteína (AF0544) de posible localización en la membrana externa (pl 9,20). Esta proteína (365 aa) de función desconocida presenta un motivo C-terminal altamente conservado en la familia de lipoproteínas NLP/P60 (pfam00877), de la cual son miembros la proteína extracelular p60 requerida para la invasión de fibroblastos en *Listeria monocytogenes* (Bubert y col., 1992) y la hidrolasa de pared celular (BAC13697) de *Oceanobacillus iheyensis*. En su extremo N-terminal, esta proteína presenta un patrón repetitivo de histidinas semejante al de varias proteínas periplasmáticas implicadas en la unión de metales divalentes (SilE, PcoE, etc). En función del reconocido rol de los residuos histidina en la adsorción de metales divalentes (Ferris & Beveridge, 1985; Morgan, 1984), es posible que la proteína AF0544 tenga en *A. ferrooxidans* una función relacionada y participe en el secuestro de metales a nivel de la superficie celular.

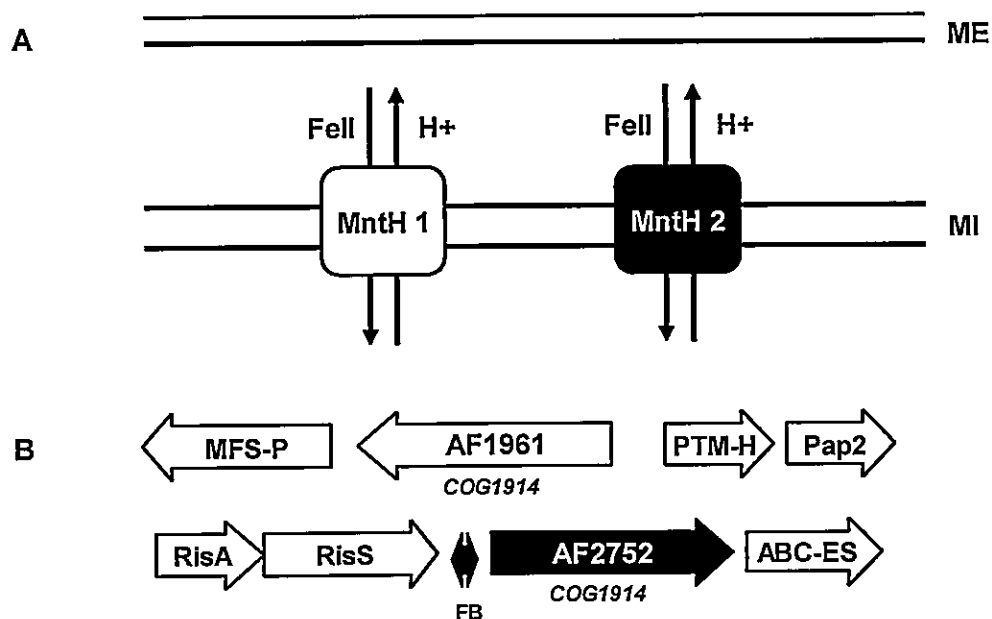


Figura 4. Sistema de transporte de FeII y/o MnII, MntH de *A.ferrooxidans*. (A) Localización celular de los transportadores MntH1 y MntH2. (B) Estructura de los loci de adquisición de FeII AF1961 y AF2752. Pap2: Fosfatasa ácida; RisA: Regulador transcripcional tipo OmpR; RisS: Sensor-histidina quinasa tipo EnvZ; MFS-P: Permeasa tipo MFS; PTM-H: Proteína de Transmembrana Hipotética; ABC-ES: Exportador ABC; FB: Caja Fur, ME: membrana externa, MI: membrana interna.

NRAMP (mntH)

Los transportadores NRAMP (Natural Resistance Associated Macrophage Protein) de eucariotas, presentes tanto en bacterias como en arqueas, constituyen una familia de proteínas de adquisición de cationes divalentes dependientes de H⁺ con especificidad por MnII y FeII (Goswami y col., 2001; Gunshin y col., 1997). El homólogo bacteriano, designado *mntH* (COG1914), transporta tanto MnII como FeII aunque ciertos antecedentes señalan la preferencia por MnII sobre FeII (Kehres y col., 2000; Makui y col., 2000). La expresión en bacterias de *mntH* responde a H₂O₂ (OxyR-dependiente) y a limitación de MnII (MntR-dependiente) y FeII (Fur-dependiente) (Kehres y col., 2002).

A.ferrooxidans codifica para dos proteínas tipo MntH1(AF1961) y MntH2 (AF2752) 52 y 53% similares al transportador MntH de *Chromobacterium violaceum* (NP_903148) y

52 y 47% similares al transportador MntH de *Rhodopseudomonas palustris* (ZP_00012807), respectivamente. El contexto genómico de estos dos homólogos es variable y sólo *mntH2* presenta una secuencia similar a una caja Fur en su posible región promotora (Figura 4).

3.1.1.2. Transportadores de FeIII

Prácticamente todos los microorganismos cuentan con sistemas de adquisición de FeIII asociado a sideróforos, que en la mayoría de los casos, ellos mismos producen y secretan. En bacterias gram negativas este tipo de transporte es especialmente complejo, dependiendo de un receptor de membrana externa con afinidad específica por un tipo químico de sideróforo (OMR TonB dependientes), de un sistema de transducción de energía entre membranas (sistema TonB) y de un sistema de transporte tipo ABC de membrana interna asociado a una proteína periplasmática de unión al sustrato específico.

Receptores de Sideróforos TonB Dependientes

Los receptores de membrana externa (OMR) dependientes de TonB reconocen y unen diversos tipos de ferrisideróforos con grado variable de especificidad y afinidad (Kd 0.1-100 nM). Se encuentran constituidos por un dominio C-terminal (barril: 22 hojas β) que atraviesa la membrana externa y un dominio globular N-terminal de localización periplasmática (corcho: 4 hojas β + 4 α -hélices), que cierra el receptor en ausencia del sustrato específico (Ferguson y col., 1998). A través de métodos bioinformáticos, se detectaron en *A. ferrooxidans* once receptores de membrana externa dependientes de TonB (Figura 5). El análisis de la secuencia aminoacídica de estos receptores identifica una secuencia señal y un posible motivo de clivaje en los primeros 30-40 residuos N-terminales (Figura 6).

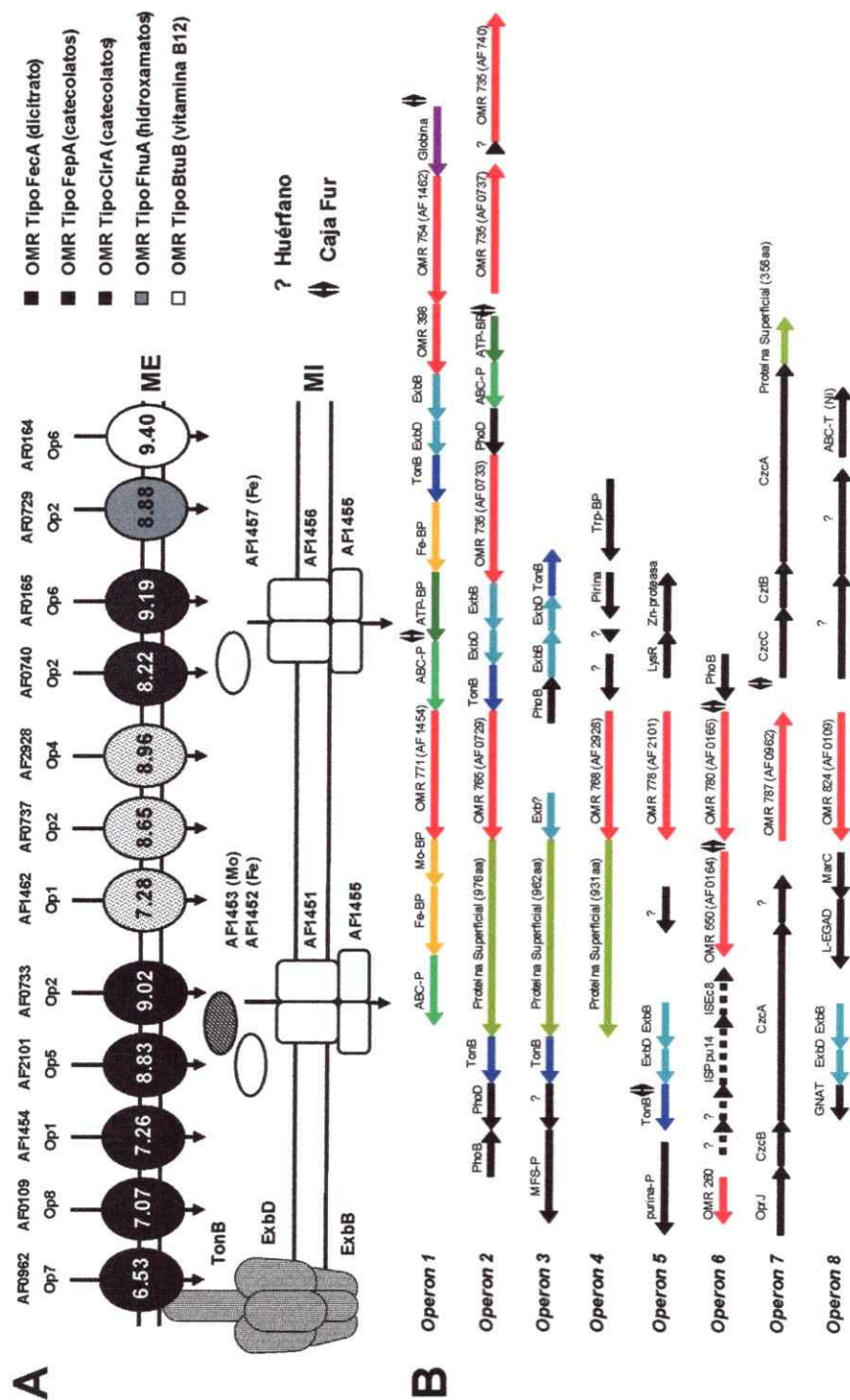


Figura 5. Sistemas de transporte de Felli-sideróforos. (A) Receptores de sideróforos de membrana externa (OMR) de *A. ferrooxidans* organizados según su afinidad por tipos químicos de sideróforos (designación a derecha) y su punto isoelectrico, transportadores ABC y sistema TonB. Se indica en la línea superior el nombre del ORF y el operon donde se encuentra codificado cada ORF. (B) Operones y regiones génicas que codifican para los componentes de los diversos sistemas de transporte de sideróforos de *A. ferrooxidans*. Los elementos se distinguen por el color de las flechas y se definen en la línea inmediata superior. Los genes sin relación directa con el transporte de sideróforos se representan en negro. ME: membrana externa, MI: membrana interna

La predicción de estructura secundaria para la forma madura de cada una de estas proteínas coincide en número aproximado (22-24) y distribución de hebras β con la de los OMR de *E. coli* caracterizados estructuralmente y funcionalmente, sugiriendo una topología de membrana comparable. Adicionalmente, en la mayoría de los ortólogos de *A. ferrooxidans* se encuentran conservados los dos motivos involucrados en contacto periplasmático con TonB, designados respectivamente caja TonB N-terminal (PS00430) y caja TonB C-terminal (PS01156) (Figura 6).

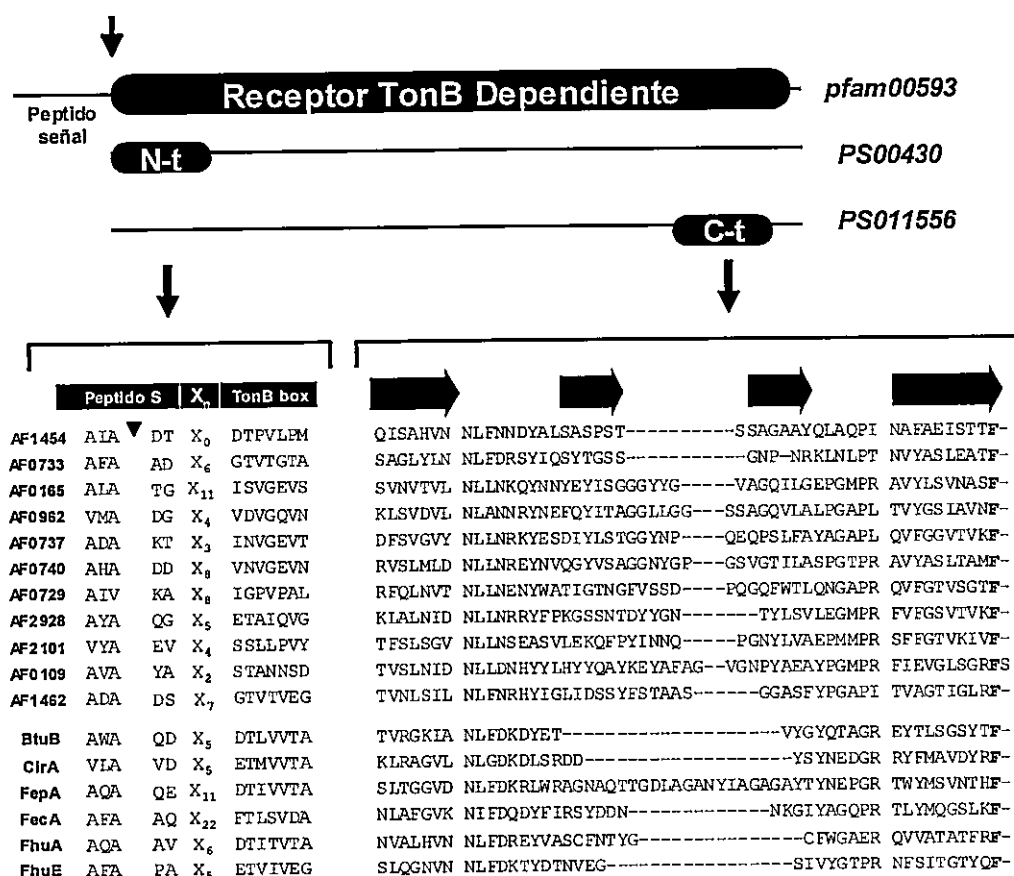


Figura 6. Motivos conservados en los receptores de sideróforos dependientes de TonB (pfam00593). Sitio probable de clivaje del péptido señal (Peptido S), distancia N-terminal a la Caja TonB N-terminal (X_n), probable Caja TonB N-terminal (PS00430) y probable Caja TonB C-terminal (PS01156). OMRs de *A. ferrooxidans* AF1454-AF1462; OMRs de *E. coli* BtuB, CirA, FepA, FecA, FhuA, FhuE.

A pesar de la divergencia de secuencia existente entre los OMR de *A. ferrooxidans* y sus ortólogos en las bases de datos, es posible distinguir diversos subgrupos en relación a su especificidad por sideróforos en base a la similitud global de secuencia (Figura 7).

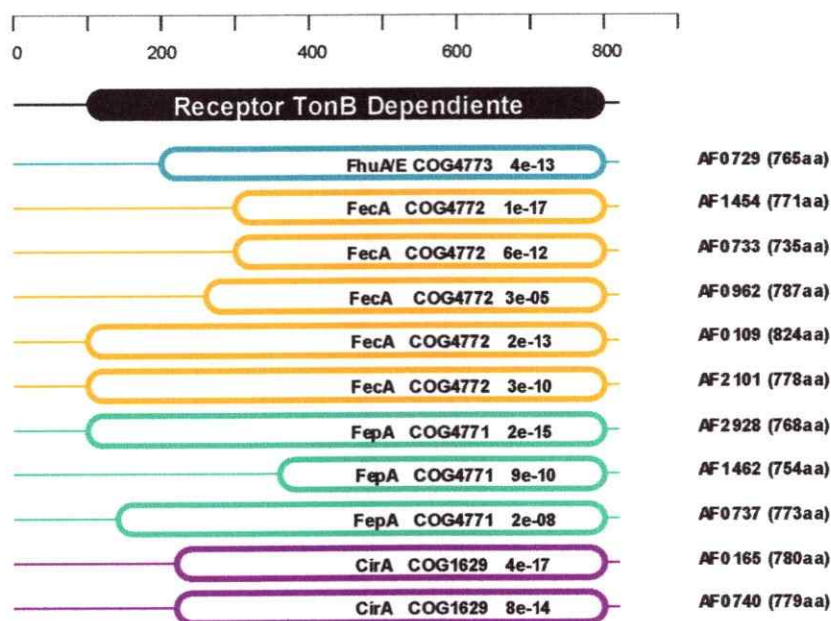


Figura 7. Especificidad probable de los receptores de sideróforos de *A. ferrooxidans*. Se indica el COG (cluster de genes ortólogos) y el ortólogo más afín a cada receptor, su probabilidad y entre paréntesis el tamaño del producto proteico predicho.

Cinco de los receptores de *A. ferrooxidans* (AF1454, AF0733, AF0109, AF2101, AF0962) presentan similitud a receptores de ferri-sideróforos de tipo dicitrato (tipo FecA), otros tres (AF2928, AF1462, AF0737) tendrían afinidad por catecolatos (tipo FepA) y dos de ellos (AF0165, AF0740) por catecolatos lineales (productos de degradación o intermediarios de la biosíntesis de catecolatos). Uno de los receptores (AF0729) se asemeja a receptores específicos para hidroxamatos (Figura 7).

Con la creciente secuenciación de genomas bacterianos ha sido posible detectar en la base de datos NCBI, ortólogos con un elevado nivel de conservación respecto de los OMR de *A. ferrooxidans* (AF0729) y otros moderadamente conservados (AF1462, AF0733,

AF1454, AF2928). Por tratarse de OMR no caracterizados estructural ni funcionalmente, esta conservación aunque respalda la funcionalidad de los ortólogos presentes en *A. ferrooxidans*, no permite confirmar la especificidad por ligando ni caracterizar a los residuos implicados en el reconocimiento y unión del ferri-sideróforo. Por otro lado, los receptores AF0740, AF0737, AF2101, AF0165, AF0962 y AF0109 son altamente divergentes respecto de las secuencias descritas a la fecha en las bases de datos.

Complejo TonB-ExbB-ExbD

El transporte de FeIII a través de membrana externa requiere de un complejo de transducción de energía, constituido por las proteínas TonB, ExbB y ExbD. Según los modelos más recientes TonB funciona a modo de lanzadera entre las dos membranas (Larsen y col., 2003; Higgs y col., 1998). A nivel de la membrana citoplasmática TonB establece contactos con las proteínas ExbB y ExbD, siendo energizado y adquiriendo la capacidad de contactar e inducir un cambio conformacional que abre los OMR de membrana externa, luego de lo cual retorna a su estado basal y se reasocia con la membrana interna (Letain & Postle, 1997). ExbB y ExbD son proteínas integrales de membrana citoplasmática aunque particionan en lados opuestos de ésta; ExbB se localiza hacia el citoplasma y ExbD hacia el periplasma. Ambas proteínas protegen de la degradación proteolítica y estabilizan a TonB (Ahmer y col., 1995; Fischer y col., 1989). Los tres genes se encuentran frecuentemente organizados en operón.

A. ferrooxidans posee en su genoma 5 copias del gen *tonB*, y 6 copias de *exbB* y de *exbD* en contextos génicos variados (Figura 5). Los residuos funcionales de ExbB, ExbD y TonB conservados entre bacterias están presentes a su vez en los ortólogos identificados en el genoma de *A. ferrooxidans*.

La proteína TonB consiste de dos dominios independientes. En su extremo N-terminal presenta una secuencia señal (TonB_{EC}: aa 12-32) que ancla la proteína a la

membrana citoplasmática, mientras que su porción central rica en residuos prolina, y su dominio C-terminal (TonB_{EC}: aa 101-239) atraviesan el espacio periplasmático. Los seis marcos de lectura codificantes para ortólogos de la proteína TonB (COG0810) identificados en el genoma de *A. ferrooxidans* presentan alto nivel de conservación de secuencia a nivel del dominio de transmembrana N-terminal (TonB_{EC}: aa 6-32) y del extremo distal del dominio C-terminal (TonB_{EC}: aa 162-239). Esto es consistente con su funcionalidad puesto que el dominio N-terminal sería capaz de almacenar energía potencial conformacional derivada de la fuerza protón-motriz (Larsen y col., 1999), mientras que el dominio C-terminal dirigiría el contacto de TonB con los OMR (Larsen y col., 1997). Sin embargo, al comparar las proteínas TonB de *A. ferrooxidans* con su ortólogo más similar en la base de datos, *Haemophilus somnus*, y los de *E. coli* y *P. aeruginosa*, se aprecia una considerable divergencia de secuencia en el dominio central de la proteína. Si bien todas las proteínas comparadas presentan en este segmento (TonB_{EC}: aa 39-121) un alto contenido de residuos prolina (TonB_{EC}: 16.7%; TonB_{PA}: 18.1%; TonB_{AF}: 16.1% - 20.7%), en los ortólogos de TonB de otras bacterias los residuos prolina se encuentran organizados según un patrón repetitivo de pares Glutámico-Prolina (EP) seguidos tras un breve espaciamento, por pares Lisina-Prolina (KP). Los ortólogos de *A. ferrooxidans*, por su parte, parecen haber sustituido los residuos ácidos de esta región de baja complejidad de secuencia por Alanina, Serina y residuos básicos, preferentemente.

Según análisis topológicos, la proteína ExbB presenta tres dominios de transmembrana (Kampfenkel & Braun, 1993). El extremo N-terminal de la proteína (ExbB_{EC}: aa 1-15) y un segmento C-terminal (ExbB_{EC}: aa 156-161) se localizan en el periplasma celular. ExbD es una proteína de menor tamaño, con un único dominio transmembrana que divide a la proteína en una región N-terminal citoplasmática y una región mayor C-terminal periplasmática (Kampfenkel & Braun, 1993). Los segmentos de transmembrana de ambas proteínas interactuarían a nivel de la membrana citoplasmática formando un canal para el

anclaje del dominio N-terminal de TonB en la membrana citoplasmática (Higgs y col, 1998). La conservación general de los dominios de transmembrana de los ortólogos de la proteína ExbB (COG0811) y ExbD (COG0848) de *A. ferrooxidans* entre sí y con otros ortólogos reportados en la base de datos es consecuente con la importancia funcional atribuida a estos segmentos según los modelos vigentes. Se conservan adicionalmente algunos bloques de secuencia en los dominios citoplasmáticos de ExbB. En el dominio periplasmático de ExbD, existen una serie de sustituciones no conservativas, que se traducen en el aumento del punto isoelectrónico de los ortólogos de *A. ferrooxidans* respecto de bacterias neutrófilas (ExbD_{EC}: 4.7; ExbD_{HP}: 8.7; ExbD_{AF}: 5.9 - 10.4).

Ni la abundancia ni la organización génica de *exbB*, *exbD* y *tonB* se conserva entre bacterias. Mientras *E. coli* posee un sistema único codificado por dos unidades transcripcionales independientes (*exbBD* y *tonB*) (y un sistema parálogo TolARQ), otros microorganismos presentan más de un ortólogo con funciones redundantes y específicas de *tonB*, del par *exbBD* o del sistema tripartito. Sin embargo, aún en los casos en que los tres genes se encuentran ligados, existe evidencia de que se transcriben independientemente en respuesta a hierro y que media el evento el regulador transcripcional Fur (Bosch y col., 2002). La abundancia y variada organización de los sistemas TonB de *A. ferrooxidans* queda evidenciada en la Figura 5.

Transportadores ABC Dependientes de Sideróforos

El transporte de FeIII hasta el citoplasma celular es mediado por transportadores de tipo ABC dependientes de una proteína periplasmática (PBP) de unión a sideróforos, de dos proteínas integrales de membrana y de dos proteínas citoplasmáticas con actividad ATPasa (Köster, 2001). La proteína periplasmática define la especificidad del transportador por el tipo químico de sideróforo, operando a modo de lanzadera entre el receptor de membrana externa y la permeasa de membrana citoplasmática (Mademidis y col., 1997;

Rohrbach y col., 1995). El transporte de sideróforos de tipo hidroxamato, catecolato o dicitrato depende de tres sistemas diferentes en *E. coli* K12 y de cuatro en *P. aeruginosa*. En *A. ferrooxidans* se identificaron únicamente dos sistemas ABC con afinidad por sideróforos, ambos presentes en el operón principal de transporte de sideróforos (Figura 5, Operón 1).

Los genes AF1457 y AF1452 de *A. ferrooxidans* codifican para proteínas periplasmáticas de unión a ferri-sideróforos. Ambas proteínas presentan especificidad por sideróforos de tipo hidroxamato, compartiendo respectivamente una similitud del 54% y del 52% con la proteína (COG0614) de *Wolinella succinogenes* (NP_907315). Río arriba de AF1452, y eventualmente en la misma unidad transcripcional que este gen, se encuentra el gen AF1453 que codifica para una proteína periplasmática con afinidad por molibdato (COG0725) semejante a la proteína de unión a Mo de *Methanosarcina barkeri* (ZP_00077942). Antecedentes en *E. coli* indican la existencia de mecanismos comunes de transporte para estos dos metales, aunque el molibdeno no requiere de sideróforos (Earhart, 1996). La estrecha relación de ligamiento entre este gen y un grupo de genes codificantes para un transportador ABC involucrado en el transporte de hierro sugiere que se trataría de un transportador bifuncional destinado a cubrir los requerimientos de Fe y Mo, ambos cofactores en una gran variedad de procesos celulares.

Todas la proteínas periplasmáticas de unión a sustrato (azúcares, aminoácidos y metales) tienen estructuras tridimensionales semejantes (Clarke y col., 2002; Rohrbach y col., 1995; Flocco & Mowbray, 1994; Oh y col., 1994), consistentes en dos dominios globulares conectados por un codo de flexibilidad variable que delimita un bolsillo central de unión para el ligando (Shilton y col., 1996; Wolf y col., 1996). A diferencia de otras proteínas periplasmáticas, la subfamilia de PBPs con afinidad por ferri-sideróforos carece del codo flexible que permite la apertura y cierre de la proteína para unir o liberar el sustrato (Köster, 2001), el cual es reemplazado por una α -hélice rígida. Al igual que FhuD,

los ortólogos de *A. ferrooxidans* AF1457 y AF1452 presentan una secuencia líder N-terminal, de 34 y 28 aminoácidos respectivamente, y localización probable en el periplasma. La predicción de estructura secundaria para estos dos ortólogos permite identificar la α -hélice central correspondiente a la región del codo de la PBP FhuD de *E. coli*, haciendo consistente su inclusión en la subfamilia de proteínas PBP con afinidad por sideróforos.

La secuencia aminoacídica deducida para los genes AF1456 y AF1451 presenta un alto nivel de similitud con otras proteínas integrales de membrana citoplasmática involucradas en la internalización de ferri-sideróforos. La secuencia más similar tanto a AF1456 (69% S) como a AF1451 (55% S) reportada en base de datos es la proteína de membrana citoplasmática tipo FecD (pfam01032) de *M. acetivorans* (NP_616173). Ambas proteínas presentan un elevado contenido de residuos hidrofóbicos (56%) que definen 10 segmentos transmembrana y 5 vueltas expuestas al periplasma. A diferencia de otras proteínas de *A. ferrooxidans* con dominios en el periplasma, las proteínas AF1456 y AF1451 presentan un alto número de residuos conservados con proteínas de *E. coli* y otras bacterias.

En este operón se encuentra también el gen AF1455, el cual codifica para una proteína citoplasmática similar a muchas otras proteínas de unión a ATP involucradas en el transporte de ferri-sideróforos. Esta proteína presenta el motivo A de unión a ATP (PS00017, PS50101) (Burkhardt & Braun, 1987) y es moderadamente apolar, consecuente con su esperada asociación a la membrana citoplasmática, desde donde dirigiría el transporte del hierro hasta el citoplasma a través de la hidrólisis de ATP. Presumiblemente, esta proteína operaría en asociación con los dos sistemas PBP-Permeasa (AF1456-57) y (AF1451-52/53) codificados en el operón principal.

Reductasas de Felli-Sideróforos

La liberación del hierro de su sideróforo dependería de la reducción del FeIII a FeII, con una consecuente pérdida de afinidad del sideróforo por el metal. Tal proceso ha sido adjudicado a varias enzimas del metabolismo celular (sulfito reductasa *cysIJ*, flavohemoglobina *hmpA*, ferredoxina *fhvF*) (Hantke, 2001; Patzer & Hantke, 1999; Fontecave y col., 1994). Genes ortólogos para algunas de estas funciones están presentes en el genoma de *A. ferrooxidans*, sin embargo, muchas otras proteínas podrían mediar en este paso. Funciones específicas relacionadas, como la de la esterasa Fes incluida en el operón de genes de biosíntesis y transporte de enterobactina en *E. coli* y otras bacterias, no se detectaron en *A. ferrooxidans*.

La proteína HmpA (EC1.6.99.7; EC1.14.12.17) tiene actividad dioxigenasa de óxido nítrico, y reductasa de dihidropteridina y de ferri-sideróforos. En algunas bacterias consiste de dos dominios, un dominio globina que une un grupo hemo y un dominio FAD/reductasa. En *A. ferrooxidans* y otras bacterias, dos proteínas independientes AF2017 (globina) + AF2018 (oxidasa/reductasa) codificadas por genes ligados cumplirían tal función, aunque no se descarta que ocurran eventos de "frameshifting" durante la traducción de estos genes. La proteína AF2017 es 57% similar al dominio N-terminal de la flavohemoproteína (565 aa) de *Streptomyces avermitilis* (NP_825453). Adicionalmente, se detectan en el genoma de *A. ferrooxidans* genes ortólogos al par *CysIJ* (EC1.8.1.2), que participan en la reducción de sulfito, pero que han sido indicados como responsables de la liberación de hierro asociado a ferricromos.

Aspectos Inusuales del Contexto Genético

Globina

Entre las funciones involucradas en el transporte de sideróforos detectadas en el genoma de *A. ferrooxidans*, un grupo de 13 genes se encuentra físicamente ligado

formando un posible operón de adquisición de FeIII (Figura 5, Operón 1). Integran este operón dos receptores TonB dependientes con distinta especificidad por sideróforos, los dos sistemas de transporte ABC con afinidad por hierro presentes en el genoma de esta bacteria, y un sistema TonB-ExbBD. La presencia de un gen codificante para una proteína tipo globina (AF1463), perteneciente a la subfamilia de hemoglobinas truncadas, como primer gen del operón es, sin embargo, inusual. La asociación de un gen de tipo globina a genes de transporte de sideróforos no ha sido reportada a la fecha en ninguna bacteria, y tal organización no parece estar conservada en los genomas reportados en base de datos. Ortólogos para este gen se detectan en algunos genomas dentro de operones de genes del complejo de fijación de nitrógeno *nif* (*B. fungorum*, *Nostoc* sp.), aunque también en contextos que *a priori* no tendrían relación directa con su función (ej: proteínas ribosomales en *M. loti*). En algunos casos aislados la globina se encuentra adyacente a proteínas de transporte de molibdeno (*B. cepacia*), de transportadores tipo *pot* de putrescina (*B. pertusis*) y de un transportador hipotético (*R. eutropha*).

Proteínas de la Capa-S

Contiguos a algunos de los genes involucrados en el transporte de sideróforos se detectaron tres marcos de lectura AF0728, AF2927 y AF0754 codificantes para proteínas de alto peso molecular, afines a proteínas de la capa S (ej: 43% S *Methanosarcina mazei*, NP_634494) (Figura 5, Operones 2-4). Proteínas similares (40-60%), de función hipotética, se encuentran codificadas en muchos de los genomas depositados en la base de datos (ej: 58% S *Gloeobacter violaceus* - NP_926147), e incluso una de ellas forma parte de un posible operón de transporte de ferri-sideróforos en *Nostoc punctiforme* (ej: 56 % S - ZP_00109441).

La capa S es una estructura cristalina asociada a la envoltura celular y formada por subunidades proteicas idénticas. Tales proteínas presentan motivos conservados en su

extremo N-terminal que se relacionan directamente con su capacidad de interacción con la envoltura celular, pero difieren ampliamente en su organización C-terminal. A semejanza de otras proteínas de la capa S, los tres ortólogos encontrados en *A. ferrooxidans* (Figura 8) presentan una secuencia señal N-terminal, un pI moderadamente ácido, un alto contenido de residuos hidrofóbicos (30%) y una distribución de estructura secundaria comparable (20% α -hélice y 40% hebra β) (Sàra & Sleytr, 2000). Sin embargo, en los ortólogos de *A. ferrooxidans* se reconocen dos motivos ausentes en otras proteínas de la capa S (PD120374), un motivo C-terminal fosfoesterasa (pfam 04185) y un motivo de unión para hemo D1 típico del grupo de citocromos cd1 (pfam02239). El estrecho ligamiento entre genes codificantes para este tipo de proteínas y genes relacionados con el transporte de sideróforos es sugerente.

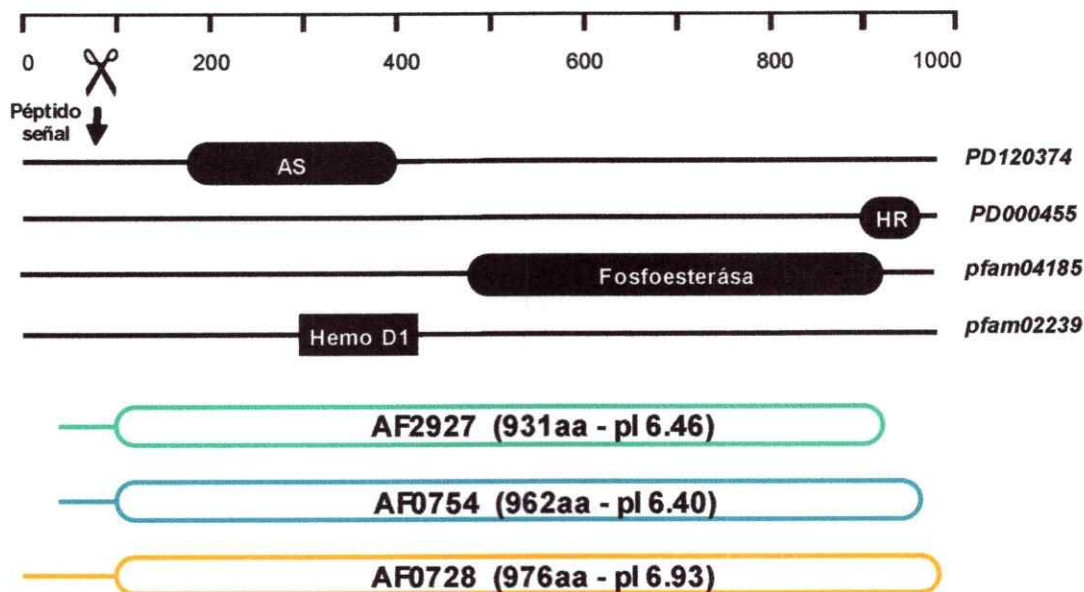


Figura 8. Proteínas superficiales de la capa S de *A. ferrooxidans*. Se indica el punto isoeléctrico y el tamaño del producto proteico predicho para los marcos de lectura AF2927, AF0754, AF0728. Motivos: (AS) Antígenos Superficial, (HR) Relacionado con Hemaglutininas.

3.1.1.3. Almacenamiento de Hierro

Para cubrir los requerimientos biosintéticos frente a deficiencias en la disponibilidad ambiental de hierro las bacterias almacenan reservas intracelulares del metal asociadas a proteínas de almacenamiento. Tres tipos de proteínas de almacenamiento, estructural y funcionalmente relacionadas, han sido descritas en bacterias: las ferritinas, las bacterioferritinas y la proteína Dps (Andrews, 1998). Las bacterioferritinas son la forma más ubicua en eubacterias, aunque en algunos casos (ej: *P. aeruginosa*; *E.coli*) éstas codifican y expresan los tres tipos de proteínas de almacenamiento, poseyendo incluso más de una copia de cada tipo. El genoma de *A. ferrooxidans* codifica exclusivamente para un gen de tipo bacterioferritina.

En el caso de las bacterioferritinas, veinticuatro subunidades idénticas u homólogas se asocian entre sí para formar una esfera hueca en cuya cavidad se acumulan depósitos de hasta 3000 átomos de hierro en forma de hidróxifosfato férrico y de hasta 12 grupos hemo (protoporphyrin IX o iron-coproporphyrin III) (Andrews y col., 1993).

La bacterioferritina AF1284 de *A. ferrooxidans* (53% S a Bfr de *Rhodobacter capsulatus* - Q59738) conserva en su secuencia de 161 aminoácidos todos los residuos implicados en el centro ferroxidasa (Figura 9). Existe así mismo, consistencia estructural entre la proteína Bfr de *A. ferrooxidans* y otras proteínas del tipo. Sin embargo, su extremo C-terminal podría considerarse trunco respecto de otras Bfr (~ 12 residuos). Aun cuando esta porción de la proteína es la más variable entre ortólogos y no implica a los ligandos del FeII (ni del hemo), su localización predicha en la interfase entre dímeros de Bfr podría especulativamente afectar el ensamblaje de los multímeros.

3.1.2. Identificación de Reguladores Dependientes de Hierro

Las bacterias se valen de dos tipos de estrategias para regular la expresión de genes involucrados en la adquisición de fuentes alternativas de hierro. Por un lado, existen sistemas de dos componentes (tipo PmrAB) que responden a la presencia de FeIII a nivel de periplasma induciendo la expresión de un número limitado de genes, y por otro metalorreguladores (tipo Fur o tipo DtxR) que detectan los niveles de FeII a nivel del citoplasma modificando la expresión génica global. En esta última categoría se incluye al regulador Fur, que es el principal responsable de la regulación hierro dependiente en bacterias. En un pequeño grupo de bacterias Gram positivas de alto contenido G+C (*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*), el regulador DtxR (IdeR o SirR) reemplaza a Fur en esta función (Hill y col., 1998; Dussurget y col., 1996; Boyd y col., 1990), aún cuando ortólogos de Fur especializados en otras funciones se encuentran presentes en el genoma.

3.1.2.1. Reguladores Dependientes de FeIII

A. ferrooxidans presentaría la capacidad de detectar ion férrico a nivel de periplasma a través de un sistema de transducción de señales de dos componentes (AF0968-AF0969) afin al sistema PmrA-PmrB (P30843-P30844) de *Salmonella enterica*. Tal sistema ha demostrado ser esencial para el crecimiento de *S. enterica* en altas concentraciones de ion férrico y para la resistencia a ciertos antibióticos peptídicos (catiónicos). Ambas respuestas dependen de la inducción de un pequeño conjunto de genes que median la modificación del lípido A (Gunn y col., 2000; Wosten & Groisman, 1999). La incorporación de 4-aminoarabinosa o fosfoetanolamina a los fosfatos 1- y 4'- del lípido A hace al lipopolisacárido más positivo y disminuye la unión de compuestos

cati6nicos y de Felll a la superficie celular (Chamnongpol y col., 2002; Helander y col., 1994).

En *A. ferrooxidans* el producto del gen AF0968 codifica para un regulador de respuesta (COG0745) cuyo ort6logo m6s similar (74%) en base de datos es la prote6na BasR/PmrA de *Neisseria cinerea* (AAG24269), con un dominio receptor de se6al que incluye al residuo hiperconservado Asp₅₁ y un dominio de uni6n a DNA del tipo h6lice alada. Esta prote6na ser6 fosforilada por el producto del gen adyacente, AF0969, 48% similar a la prote6na BasS/PmrB de *Neisseria gonorrhoeae* (AAG24266). La conservaci6n de secuencia del receptor de se6al de *A. ferrooxidans* respecto de sus ort6logos m6s similares se distribuye en una serie de segmentos aminoac6dicos que se corresponden con los bloques caracter6sticos de la familia de las prote6nas histidina quinasas, H, N, D, P y G (Parkinson, 1995). El residuo His₂₂₈ del ort6logo de *A. ferrooxidans* constituir6a el sitio de autofosforilaci6n. Se ha descrito que la prote6na PmrB detecta la presencia del i6n a trav6s del motivo ExxE presente en su dominio periplasm6tico y com6n a otras prote6nas que unen hierro (Wosten y col, 2000).

3.1.2.2. Reguladores Dependientes de Fell

Identificaci6n y Caracterizaci6n de reguladores tipo Fur

El genoma de *A. ferrooxidans* revela la presencia de tres marcos de lectura (AF2577, AF1477, AF1037) codificantes para prote6nas de esta familia de reguladores. Los tres ort6logos de Fur de *A. ferrooxidans* se designaron seg6n la funci6n del ort6logo m6s semejante en la base de datos, utilizando el sub6ndice apropiado: Fur_{Fe}, Fur_{H₂O₂} y Fur_{hemo}. Las caracter6sticas diferenciales de estos tres reguladores, inferidas a partir de la estructura primaria de las prote6nas predichas y el contexto gen6mico de cada ORF se describen a continuaci6n.

Fur_{Fe}

La secuencia aminoacídica deducida para Fur de *A. ferrooxidans* (AF2577) es 59% idéntica al regulador de *E. coli* (P06975), el miembro mejor caracterizado de la familia Fur, compartiendo con otros ortólogos valores de similitud de hasta un 81 %, como en el caso del regulador Fur de *Alteromonas* sp O-7 (BAB13366).

Fur tiene una longitud predicha de 158 aminoácidos, un peso molecular estimado de 17.909 Da y un punto isoelectrico de 5,01. En su secuencia aminoacídica y sus propiedades generales, se asemeja al regulador prototipo de la familia, la proteína Fur de *E. coli* y es en consecuencia el ortólogo de *A. ferrooxidans* candidato a participar en la regulación génica dependiente de hierro (*Fur_{Fe}*).

El alineamiento del subgrupo de proteínas afines a *Fur_{Fe}* revela la conservación de un motivo N-terminal tipo HTH involucrado en el reconocimiento y unión a DNA, así como también de una serie de residuos (H₉₀H₉₁D₉₂H₉₃ y/o H₉₀D₉₂E₁₁₁H₁₂₈) implicados en la unión del correpressor Fe(II) y de otros tantos (C₉₆XXC₉₉G₁₀₀ y/o H₃₆E₈₄H₉₃E₁₀₄) responsables de coordinar un átomo de Zn(II) importante en la estabilización estructural de la proteína (Figura 10). Sin embargo, *Fur_{Fe}* de *A. ferrooxidans* se distingue de sus homólogos por variaciones C-terminales que involucran a un par de cisteínas conservadas (motivo CXC-II) y los residuos distales. Mientras en la mayoría de los ortólogos caracterizados en la literatura o reportados en base de datos existen entre dos y cinco residuos de identidad variable entre las cisteínas del motivo CXC-II, *Fur_{Fe}* presenta un espaciamiento de 8 aa (Figura 10). La significancia de esta característica se desconoce.

El gen río arriba de *fur_{Fe}* en *A. ferrooxidans* codifica para una lipoproteína de membrana externa OmlA (Figura 10 B). El contexto genómico de *fur_{Fe}* se encuentra parcialmente conservado en varias proteobacterias: *Burkholderia*, *Ralstonia*, *Neisseria*, *Bordetella*, *Pseudomonas*, *Xylella* y *Xanthomonas* (Lowe y col., 2001).

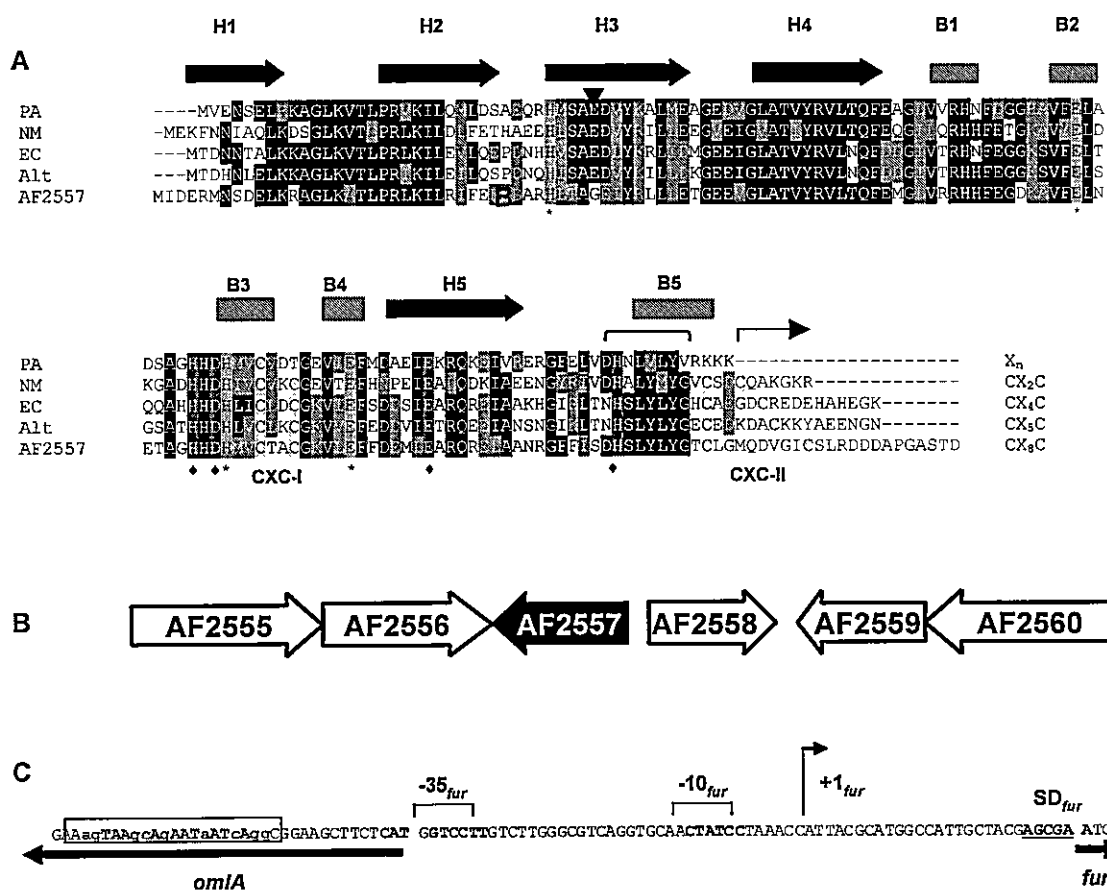


Figura 10. Fur_{Fe} de *A. ferrooxidans* ATCC23270. (A) Alineamiento de la proteína predicha para el gen *fur*_{Fe} y sus ortólogos en otras bacterias. PA: *Pseudomonas aeruginosa*, NM: *Neisseria meningitidis*, EC: *Escherichia coli*, Alt: *Alteromonas O-7 sp.*, AF: *A. ferrooxidans*. Se indican en la línea superior las hélices del motivo de unión a DNA (flecha = alfa hélice y caja = hebra beta) y en la línea inferior los residuos conservados de los motivos de unión a metales (Fe \bullet , Zn \bullet). Los motivos CXC-I y CXC-II se destacan al pie. (B) Contexto genómico de *fur*_{Fe}. AF2555: proteína de unión a GTP, AF2556: glutamato quinasa, AF2557: Fur, AF2558: lipoproteína OmlA, AF2559: hipotética, AF2560: Fosfolipasa. La dirección de las flechas indica la dirección transcriptional. (C) Región intergénica entre *omiA* y *fur* (invertida respecto de B). Se indican con corchete los hexámeros -10 y -35 , por subrayado el sitio SD probable y por recuadro una secuencia tipo caja Fur.

Mientras que Fur autorregula su expresión en varios microorganismos (de Lorenzo y col., 1988, 1998), en el grupo de bacterias que comparte la organización *omiA-fur*, no se ha indicado a la fecha, presencia de cajas Fur ni se ha demostrado unión de la proteína a su propio promotor. Por otro lado, mientras Fur de *E. coli* se ve sometido al control por los reguladores de estrés oxidativo SoxR y OxyR (Zheng y col., 1999), ni Fur de *P. aeruginosa* ni ninguno de los ortólogos que comparten el contexto *omiA-fur* parecen responder a este

tipo de regulación. El gen *fur_{Fe}* de *A. ferrooxidans* carece de secuencias similares a las cajas consenso descritas para los dos reguladores de estrés oxidativo señalados pero a diferencia de sus ortólogos presentaría una posible caja Fur, pobremente conservada (agTAAgcAgAATaATcAgg) respecto de la caja Fur consenso (de Lorenzo y col., 1987) 83 nt río arriba del sitio probable de inicio de la traducción.

En la región intergénica de *fur_{Fe}* es posible predecir un promotor del tipo sigma 70, con hexámeros -10 (CTATCC) y -35 (GTCCTT) pobremente conservados respecto de *E.coli*, a 33 pb del sitio de inicio de la traducción de *Fur_{Fe}* (Figura 10 C). La localización de la caja Fur de *A. ferrooxidans* respecto de este posible promotor pone en duda la autenticidad de dicha caja o del promotor. Inmediatamente río abajo de *fur* se aprecia un repetido invertido con capacidad de generar una horquilla de 10 pb de tallo y una estabilidad predicha de ΔG -10,6 Kcal (agc CGCAGCAGGA ct TCCTGCTGCG cgAAgTTcAcc AGGCCGCGCGC) que operaría como terminador de la transcripción.

Fur_{H2O2}

El segundo ortólogo de *A. ferrooxidans*, *Fur_{H2O2}* (AF1477), es tan sólo 28% idéntico al regulador Fur de *E.coli* (45% S). El ortólogo más similar disponible en la base de datos pública corresponde a un regulador putativo de *Rashtonia solanacaeorum* con el cual comparte 41% de identidad. Según el análisis de BlastP, los miembros caracterizados de la familia Fur más semejantes a *Fur_{H2O2}* a nivel de estructura primaria (42-47% S) serían algunos parálogos descritos en bacterias Gram + que controlan la expresión de funciones antioxidantes (Horsburgh y col., 2001; Hahn y col., 2000a, 2000b; Bsat y col., 1998). Este grupo de reguladores tipo Fur, es algo heterogéneo en cuanto a conservación de secuencia, mecanismo de regulación, patrones de inducción y número y tipo de genes blanco. Puede distinguirse en base a estas propiedades dos subtipos: tipo FurA y tipo PerR. *Fur_{H2O2}* de *A. ferrooxidans* comparte niveles de similitud equivalentes con ambos

subtipos (42% S a FurA y 42% S a PerR), valores que por otro lado son comparables a los que, tanto Fur_{H2O2} (45% S a Fur_{EC}) como FurA y PerR, comparten con el regulador Fur de respuesta a hierro en *E. coli*. Es por ello difícil asignar un rol funcional claro a Fur_{H2O2} tan sólo en base a homología de secuencia.

Aún cuando el alineamiento entre Fur_{H2O2} de *A. ferrooxidans* y las proteínas tipo FurA o PerR de bacterias Gram + y el regulador Fur de *E. coli* revela una conservación tan solo parcial a nivel de secuencia, resalta la conservación general a nivel de estructura secundaria (Figura 11). Es posible identificar un probable motivo HTH en el extremo N-terminal de Fur_{H2O2}, así como también dos motivos CXC (I y II) en el extremo C-terminal, intactos y acordes en espaciamiento con los presentes en todas las secuencias que forman esta subfamilia de reguladores. El estado redox de estos residuos tendría implicancias en el mecanismo de regulación, según se ha demostrado para FurS de *Streptomyces reticuli* (Ortiz de Orué Lucana & Schrempf, 2000) y CatR de *Streptomyces coelicolor* (Hahn y col., 2000b).

La conservación de los residuos implicados en el probable motivo de unión a metales de Fur de *E. coli* (H₈₈, H₉₀, C₉₃, C₉₆) entre miembros de esta subfamilia y Fur_{H2O2} de *A. ferrooxidans*, sugiere que la coordinación del correpresor y del átomo de ZnII estructural ocurrirían de modo semejante al demostrado en *E. coli* y otras proteínas de la familia. Adicionalmente, y a semejanza de los reguladores tipo FurA, el gen *fur_{H2O2}* de *A. ferrooxidans* se encuentra adyacente a un gen putativo con función peroxidasa tipo *bcp* (Figura 11 B). En el caso de FurA-FurS, el gen adyacente, una peroxidasa (CpeB, PRX) o catalása (KatG), es blanco directo de represión por el ortólogo de Fur (Pym y col., 2001; Ortiz de Orué Lucana & Schrempf, 2000; Zou y col., 1999).

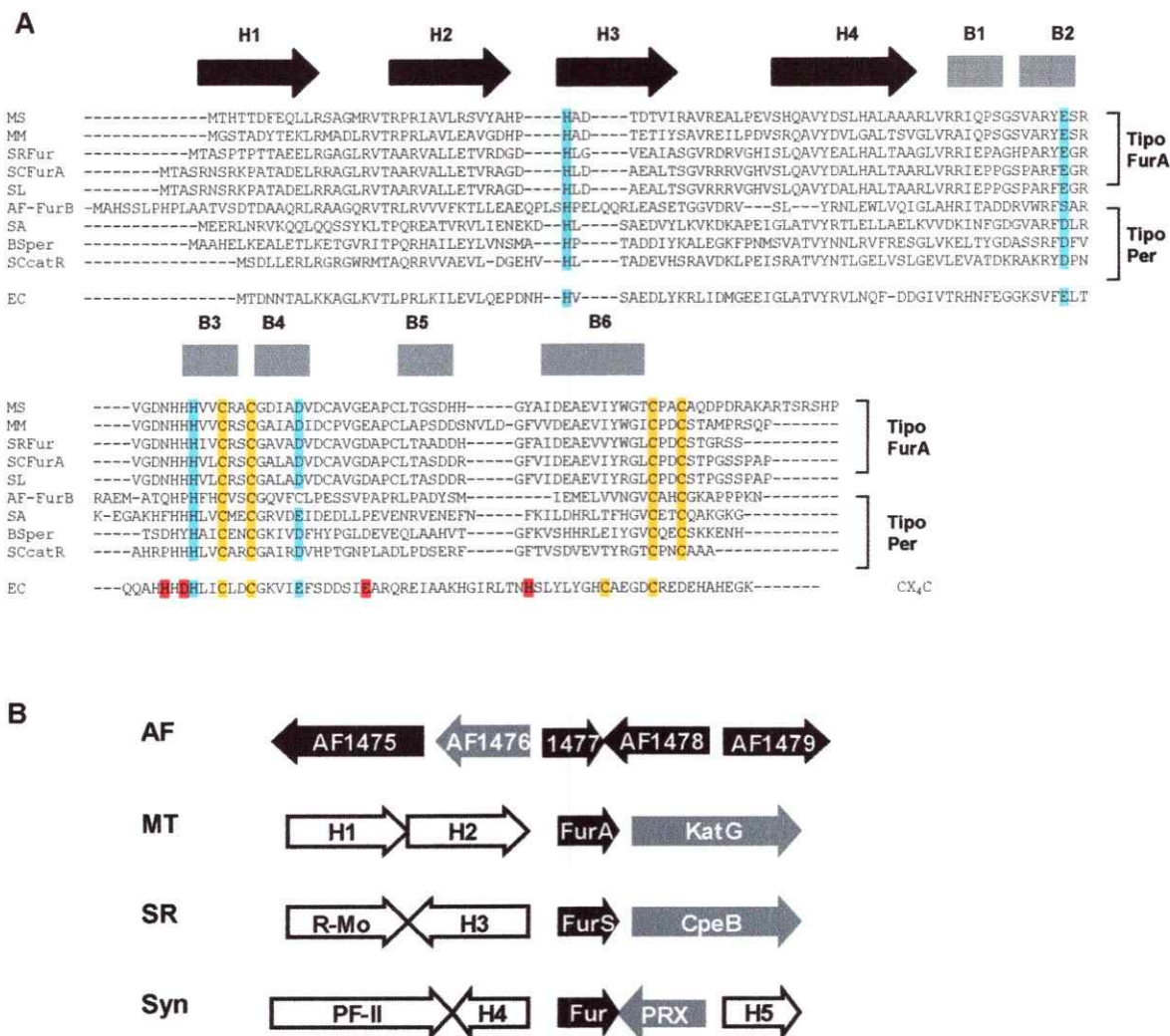


Figura 11. Fur_{H202} de *A. ferrooxidans* ATCC23270. (A) Alineamiento de la proteína predicha para el gen *fur*_{H202} y sus ortólogos en otras bacterias. MS: *Mycobacterium smegmatis*, MM: *Mycobacterium marinum*, SR: *Streptomyces reticuli*, SC: *Streptomyces coelicolor*, SL: *Streptomyces lividans*, AF: *A. ferrooxidans*, SA: *Staphylococcus aureus*, BS: *Bacillus subtilis*, EC: *Escherichia coli*. Se indican en la línea superior las hélices del motivo de unión a DNA (flecha = alfa hélice y caja = hebra beta) y en color los residuos conservados de los motivos de unión a metales (Fe rojo, Zn celeste). Los motivos CXXC-I y CXnC-II se destacan en amarillo. (B) Contexto genómico de *fur*_{H202} AF1477. La dirección de las flechas indica la dirección transcripcional. (AF) *A. ferrooxidans*: AF1475: PhoH, AF1476: proteína comigratoria con bacterioferritina (BCP), AF1477: Fur_{H202}, AF1478: CbbY, AF1479: supresor de DnaK; (MT) *M. tuberculosis*: H1: Hipotética 1, H2: Hipotética 2, FurA: regulador sensible a peróxido de KatG, KatG: catalásas; *S. reticuli* (SR) *S. reticuli*: regulador de asimilación de Mo (RMO), H3: Hipotética 3, FurS: regulador sensible a peróxido de CpeB, CpeB: catalásas-peroxidasa; (Syn) *Synechocystis* sp.: proteína del fotosistema II (PF-II), H4: Hipotética 4, Fur: regulador sensible a peróxido de PRX, PRX: peroxidasa, H5: Hipotética 5.

Así, dos indicios, una similitud de secuencia que podría ser considerada débil y un contexto genético conservado, sugieren que Fur_{H202} de *A. ferrooxidans* podría regular de

modo similar, la expresión de *bcp* y operar en esta bacteria como un regulador de respuesta frente a estrés oxidativo.

Fur_{Hemo}

El tercer ortólogo de Fur de *A. ferrooxidans*, *Fur_{Hemo}*, carece de varios de los motivos propios de la subfamilia de reguladores hierro dependientes representados por Fur de *E.coli*. Se asemeja, sin embargo, en un 56 - 63% a miembros de la familia Fur presentes en varias α -proteobacterias, que en su mayoría son de función desconocida.

En este grupo de secuencias se incluye un homólogo estructural de Fur designado Irr, descrito originalmente en *B. japonicum* y más recientemente también en *R. leguminosarum*, responsable de la regulación hierro dependiente de la biosíntesis del grupo hemo (Wexler y col., 2003; Hamza y col., 1998). Irr difiere de otras proteínas de la familia Fur en dos aspectos importantes. Mientras Fur se expresa de modo prácticamente constitutivo y requiere de la presencia de Fell para ser activo, el regulador Irr de *B. japonicum* es condicionalmente estable: se acumula en condiciones de limitación de hierro y se degrada cuando la bacteria es expuesta al metal. En este caso, la forma apo del regulador constituye el estado activo de la proteína (Qi & O'Brian, 2002; Qi y col., 1999). Se ha propuesto que la unión de un grupo hemo a un motivo N-terminal de la proteína induciría un cambio conformacional que la hace más susceptible a proteólisis o bien que el hemo catalice la formación localizada de especies reactivas del oxígeno (Qi y col., 1999).

El alineamiento de estas proteínas revela la conservación general a nivel de estructura la secundaria entre ellas (Figura 12), destacándose incluso la conservación de estructura primaria de la hélice de reconocimiento (H4) del motivo HTH respecto de la que caracteriza a los ortólogos afines a Fur de *E.coli*. Por otro lado resulta evidente la divergencia respecto de la proteína Fur de *E. coli* en el dominio C-terminal.

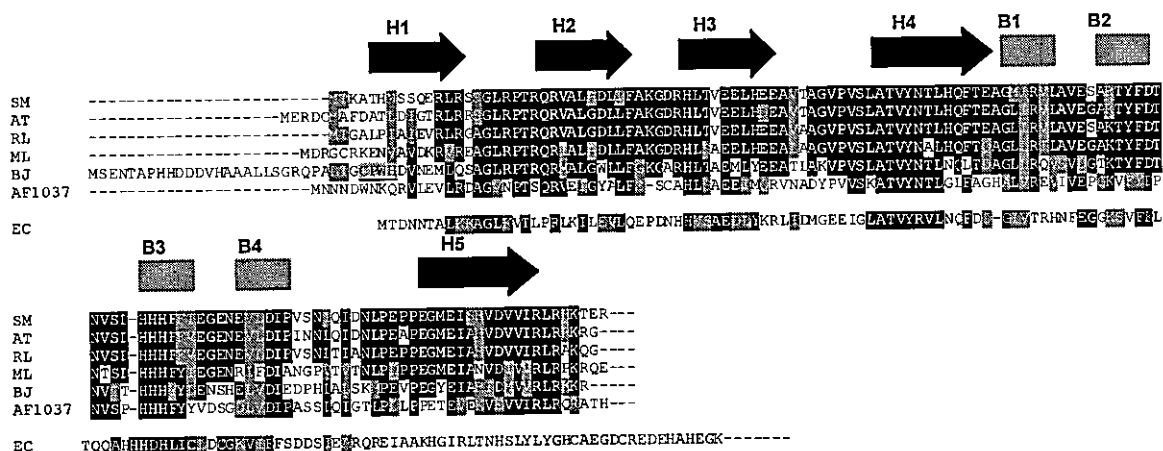


Figura 12. Fur_{Hemo} de *A. ferrooxidans* ATCC23270. (A) Alineamiento de la proteína predicha para el gen *fur_{Hemo}* y sus ortólogos en otras bacterias. BJ: *Bradirhizobium japonicum*, ML: *Mesorhizobium loti*, AF: *A. ferrooxidans*, SM: *Sinorhizobium meliloti*, AT: *Agrobacterium tumefaciens*, EC: *E. coli*. Se indican en la línea superior las hélices del motivo de unión a DNA (flecha = alfa hélice y caja = hebra beta). Se indican en la línea superior las hélices del motivo de unión a DNA (flecha = alfa hélice y caja = hebra beta) y por subrayado el motivo de unión del grupo hemo en la proteína Irr de *B. japonicum* (CPWH).

Este subgrupo de proteínas tipo Fur carece de la cisteína C-terminal presente en los miembros afines a Fur de *E. coli*, implicados en este subgrupo de proteínas en la coordinación del átomo estructural de Zn(II). Sin embargo, se conserva el motivo H,E,H,D que sustituye a las cisteínas en este papel en los miembros truncos de la subfamilia de reguladores hierro dependientes representados por Fur de *P. aeruginosa* (Pohl y col., 2003). El motivo N-terminal involucrado en unión del grupo hemo (C₂₉P₃₀W₃₁H₃₂) en el regulador Irr de *B. japonicum* está ausente en el ortólogo Fur_{Hemo} de *A. ferrooxidans* y en todas las demás proteínas de esta subfamilia. Se desconoce a la fecha el mecanismo de regulación subyacente para las proteínas sin este motivo.

Las características inferidas para el ortólogo Fur_{Fe} de *A. ferrooxidans* a partir del análisis bioinformático se conciben con los antecedentes generados para otros miembros de la subfamilia de reguladores Fur hierro dependientes y por lo tanto permiten afirmar que Fur_{Fe} sería el regulador de respuesta a hierro en *A. ferrooxidans*.

3.2. Análisis de la Expresión del Regulador Fur_{Fe} en *A. ferrooxidans*

A. ferrooxidans es capaz de crecer utilizando azufre elemental o ión ferroso como fuente de electrones y energía. Durante su crecimiento en azufre (pH 3-5) se enfrenta a condiciones de limitación de hierro, probablemente comparables a la mayoría de los microorganismos. Por el contrario, durante su crecimiento en hierro (pH 1-2) se ve sometido a una elevada concentración de ión ferroso soluble (6gr/L) y a medida que progresa la oxidación a cantidades crecientes de ión férrico.

Para abordar el estudio de la respuesta de homeostasis de hierro en *A. ferrooxidans* y determinar si el regulador Fur funciona en *A. ferrooxidans* cuando esta bacteria crece utilizando uno u otro sustrato energético, se analizaron los patrones de expresión del regulador, a nivel de proteína, en cultivos crecidos bajo concentraciones estándar de ambos sustratos (S: 5gr/L o Fe: 6gr/L) y adicionalmente frente a concentraciones crecientes del metal. Se inspeccionaron también los patrones de expresión de los otros reguladores tipo Fur detectados en el genoma de *A. ferrooxidans* a nivel de mRNA.

3.2.1. Análisis de la Expresión de Fur_{Fe} a Nivel de Proteína

Se evaluó la expresión de la proteína Fur_{Fe} en extractos de proteínas totales de cultivos logarítmicos de *A. ferrooxidans* crecidos en medio 9K-S y en medio 9K-Fe, conteniendo concentraciones iniciales variables de FeSO₄ (100, 200 y 400 mM), mediante Western blot (anti-Fur_{EC}). Se detectó una banda reactiva, cuyo tamaño aparente coincide con el peso molecular estimado de Fur, en extractos totales de *A. ferrooxidans* crecido en azufre (medio carente de hierro) y a las menores concentraciones de hierro evaluadas (9K-Fe100) (Figura 13 A). Por el contrario, la detección de Fur en los extractos de los cultivos crecidos a altas concentraciones de hierro (200 y 400 mM), disminuye acorde al incremento en la concentración del metal (Figura 13 A).

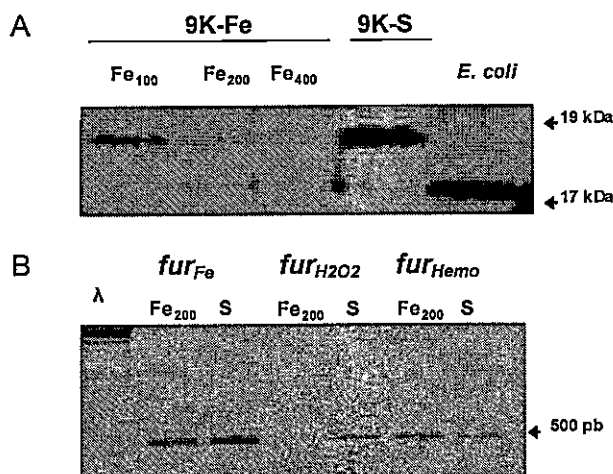


Figura 13. Expresión de Fur en *A. ferrooxidans* crecido en S^o y Fe. (A) Western blot sobre proteínas totales de *A. ferrooxidans* separadas por SDS-PAGE 18% utilizando anticuerpo contra Fur_{EC}. Los cultivos de *A. ferrooxidans* se crecieron en 9K-S^o o 9K- en presencia de concentraciones crecientes de hierro (100, 200 y 400 mM FeSO₄). Se incluye un extracto de *E. coli* como control positivo. Las cargas fueron normalizadas por cuantificación de proteínas totales. (B) RT-PCR para *fur*_{Fe}, *fur*_{H₂O₂} y *fur*_{Hemo} a partir de 1 μg de RNA total de cultivos crecidos en 9K-S^o 5% (S) o 9K-Fe₂₀₀ (Fe200). Estándar de peso molecular Lambda *Hind* III.

3.2.2. Análisis de la Expresión de Fur_{Fe}, Fur_{H₂O₂} y Fur_{Hemo} a Nivel de mRNA

Con el objeto de determinar si la expresión del ortólogo de *fur* de *A. ferrooxidans* (u otro de los genes tipo Fur presentes en el genoma de *A. ferrooxidans*) se veía afectada diferencialmente por la disponibilidad de hierro en el medio, se analizó mediante RT-PCR la expresión de sus mRNA.

Para ello se aisló RNA total a partir de cultivos de *A. ferrooxidans* en fase exponencial tardía, crecidos en medio 9KFe-200mM y 9KS-5%. Se generó cDNA a partir de RNA total (1 μg/reacción) utilizando partidores reversos específicos para cada ortólogo de *fur* (Tabla 2). En todos los casos se siguió la cinética de acumulación del producto de PCR, frente a un número creciente de ciclos de PCR. Fue posible establecer que los tres marcos de lectura se expresan a nivel de mRNA durante el crecimiento de *A. ferrooxidans* en S^o. Por otro lado, condiciones de reacción sub-saturantes (29 ciclos de PCR) indican expresión diferencial del gen *fur*_{H₂O₂}, no así de *fur*_{Fe} ni de *fur*_{Hemo} (Figura 13 B).

Puesto que se comprueba reactividad cruzada y reconocimiento específico de Fur_{Fe} en extractos de proteínas totales de cultivos crecidos en carencia de hierro o en presencia de bajas concentraciones del metal, se concluye que existe expresión variable del producto del gen *fur*_{Fe} y que la misma puede ser correlacionada con variaciones en la concentración externa de hierro. La expresión diferencial estaría dada a nivel postranscripcional, puesto que se detecta mRNA de *fur*_{Fe} en muestras de RNA total de cultivos crecidos a 200 mM, donde el nivel de proteína Fur_{Fe} se ve dramáticamente reducido.

3.3. Caracterización Funcional de Fur_{Fe} de *A. ferrooxidans* en un Sistema Heterólogo

Frente a la dificultad de obtener mutantes nulos en *A. ferrooxidans* y como alternativa para evaluar la función génica *in vivo*, se pretendió establecer mediante análisis de complementación de hospederos heterólogos deficientes en el regulador *fur*, si el ortólogo de *A. ferrooxidans* era capaz de suplir esta deficiencia. Con tal fin se emplearon las cepas mutantes *fur* de *E. coli* (H1780 y H1681: Hantke, 1987), portadoras de construcciones reporteras cuya expresión hierro y Fur dependiente (ver métodos) permite evaluar complementación de función mediante la determinación de actividad β-galactosidasa (β-gal).

3.3.1. Clonamiento de Fur_{Fe}

Se amplificó el gen *fur* a partir de DNA genómico de la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC23270 por medio de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), desde el codón de inicio de la traducción, empleando un partidor directo que contenía un sitio Shine Dalgarno (SD) consenso para *E. coli* y un espaciador SD-ATG promedio, conservando el contexto original de la región 5' del gen (Figura 14, Tabla 2). El producto de PCR se insertó en el sitio *Sma* I del vector multicopia pUC-18, generando el plásmido recombinante pFur1, de modo que las señales transcripcionales del vector (*P*_{lac}) dirigieran la expresión del gen.

Siguiendo una estrategia equivalente, se clonó a modo de control positivo el gen *fur* de *E. coli* K12, obteniendo el plásmido recombinante pEc-Fur. Ambos plásmidos fueron propagados en la cepa huésped DH5 α para luego ser transferidos a las cepas *fur*⁻ correspondientes.

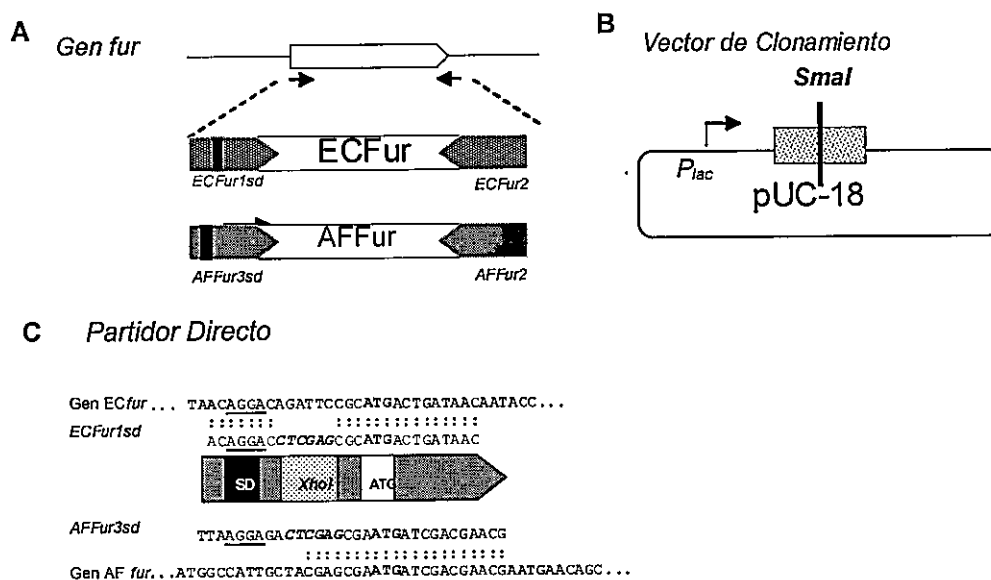


Figura 14. Estrategia de clonamiento del gen *fur* de *A. ferrooxidans*. (A) Localización de los partidores de PCR en el contexto de los genes *fur* de *A. ferrooxidans* y *E. coli* K12, productos de PCR esperados (B) Vector de clonamiento. SD: Shine Dalgarno; Plac: Promotor del gen *lacZ* (C) Diseño del partidor directo.

3.3.2. Análisis Fenotípico en Medio Indicador

Los plásmidos recombinantes pFur1 y pEc-Fur se introdujeron en la cepa reportera *fur*⁻ de *E. coli* H1780 (ver descripción en métodos).

Esta cepa H1780 (*fhu::λplac Mu53*) lleva en su cromosoma una fusión génica entre el gen *fhu* regulado por Fur y el gen reportero *lacZ*, el cual se expresa constitutivamente en el contexto génico *fur*⁻, independientemente de la presencia de hierro en el medio de crecimiento (fenotipo *lac*⁺: colonias rojas en medio indicador MacConkey-Fe). Por el contrario, en presencia de un gen *fur* capaz de complementar la deficiencia del regulador,

la represión del reportero *lacZ* (fenotipo *lac*⁻) otorga a las colonias resultantes una coloración blanquecina o translúcida.

Al transformar la cepa H1780 con el gen *fur* control de *E. coli* (pEc-Fur) se detectaron en medio indicador colonias blanquecinas, mientras que al introducir la construcción pFur1 que expresa el gen *fur*_{Fe} de *A. ferrooxidans* no se apreció el fenotipo esperado (Tabla 5).

Tabla 5. Fenotipo *lacZ* en los clones derivados de la cepas H1780 y H1681 en medio indicador MacConkey.

Cepa huésped	H1780		H1681	
	+ Fell ^a	- Fell ^b	+ Fell ^a	- Fell ^b
Plásmido				
<i>pEc-Fur</i>	Translúcido	Rojo	Translúcido	Rojo
<i>pFur1</i>	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
<i>pFur2</i>	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo
<i>pUC18</i>	Rojo	Rojo	Rojo	Rojo

con^a o sin^b suplemento de hierro (FeSO₄ 40 μM)

El mismo resultado se obtuvo al retransformar el plásmido pFur1 en la cepa reportera alternativa (H1681, *fhuF::λplac Mu53*), frente a un segundo promotor/operador dependiente de Fur y al transformar la cepa H1780 con el gen *fur*_{Fe} amplificado de una segunda cepa de *A. ferrooxidans* (ATCC19859); el plásmido obtenido se denominó pFur2. Estos resultados indicarían la incapacidad del ortólogo *fur*_{Fe} de *A. ferrooxidans* de complementar la deficiencia de *fur* en *E. coli*.

Puesto que algunos ortólogos de Fur complementan la deficiencia del represor en *E. coli* sólo de modo parcial (Achenbach & Yang, 1997; Ghassemian & Straus, 1996; Hickey & Cianciotto, 1994; Thomas & Sparling, 1994; Wooldridge y col., 1994), y que la evaluación de estos fenotipos en medio sólido puede verse complicada por variaciones en la regulación y la disponibilidad de hierro durante la maduración de las colonias (Newman &

Shapiro, 2000), se evaluaron los fenotipos de los clones recombinantes en medio líquido, por determinación de los niveles relativos de la actividad β -gal.

3.3.3. Ensayos de Actividad β -Galactosidasa

Para evaluar la funcionalidad del gen fur_{Fe} de *A. ferrooxidans* en cepas fur^- de *E. coli*, se cuantificaron los niveles de actividad β -gal en los clones recombinantes Fur1 (H1780: pFur1) y Fur2 (H1780: pFur2) y en el clon control fur^+ portador del represor de *E. coli* (H1780:pEc-Fur) mediante el método de Miller (Figura 15) en presencia/ausencia de hierro en medio LB.

En el caso del control positivo (pEc-Fur) se observó una severa disminución de la expresión de la fusión reportera en presencia de hierro, alcanzando tan sólo un 8% de la actividad manifestada en la condición totalmente desreprimida, definida para de la cepa huésped *fur* H1780 en ausencia de hierro (100%) (Figura 15, Tabla 6).

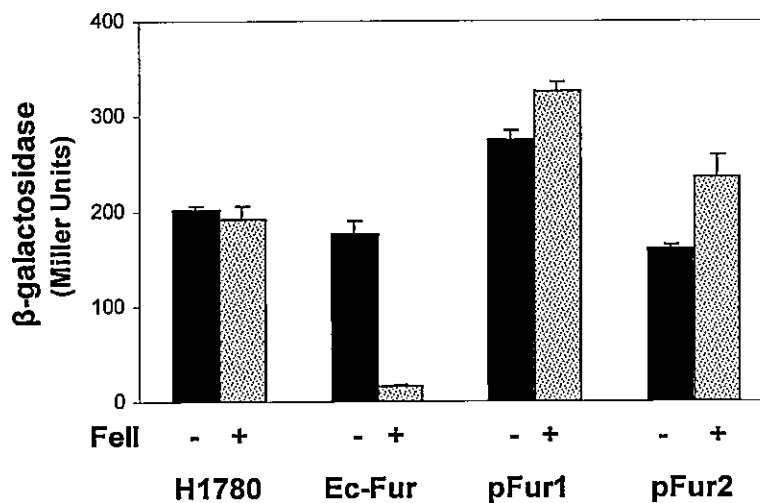


Figura 15. Niveles de actividad β -Galactosidasa en los clones recombinantes de *E. coli* H1780. Los valores de actividad β -Gal se expresan en unidad Miller arbitrarias ($OD_{420}/OD_{600} \cdot \text{ml} \cdot \text{min}$). Los clones se crecieron en condiciones de alta disponibilidad de hierro (+: LB + FeSO_4 40 μM) o de deficiencia de hierro (-: LB + 200 μM Ortofenantrolina). Los valores graficados representan el promedio y desvío estándar de un experimento representativo con 2-3 replicas. Clones: H1780:pUC-18; H1780:pEc-Fur; H1780/pFur1(ATCC23270); H1780/pFur2 (ATCC19859).

Los clones portadores del plásmido pFur1 no evidenciaron capacidad de represión del gen reportero *lacZ* en presencia de hierro, ni en el contexto del promotor/operador *fiu* (H1780) ni en el de *fhuF* (H1681, datos no mostrados). Por el contrario, en presencia de hierro, el clon H1780:pFur1 presentó niveles de actividad β -gal cercanos al doble del nivel basal de la mutante (condición desreprimida) y 20 veces mayores al nivel de actividad en condiciones de máxima represión.

Estos resultados indican que bajo condiciones de suficiencia de hierro, el gen *fur* codificado en el plásmido recombinante multicopia pFur1 no sólo demuestra ausencia de complementación de la función represora del regulador de *E. coli*, sino adicionalmente un comportamiento contrario al esperado. Este resultado, consistente con el fenotipo encontrado en medio indicador (ver Tabla 5), sugiere que el regulador Fur de *A. ferrooxidans* media la activación de un gen de *E. coli* clásicamente reprimido (vía caja Fur) por otros ortólogos de Fur.

Tabla 6. Niveles de expresión de la fusión reportera *fiu::lacZ* en los clones derivados de la cepa H1780.

Clon	Actividad B-Gal (%) ^a		Tasa relativa	
	- Fe	+ Fe	+Fe/CD	+Fe/MR
<i>fur</i> -	100*	96	1.0	11.9
<i>pEc-Fur</i>	88	8	0.1	1.0
<i>pFur1</i>	136	162	1.6	20.1

* desrepresión al máximo teórico (mutante en ausencia de hierro)

^a Valores de actividad β -Gal expresados como porcentajes relativos al estado completamente desreprimido (CD) definido para la cepa *fur* creciendo en condiciones de limitación de hierro (- Fe).

^b Tasas de actividad relativa para los clones crecidos en alta disponibilidad de hierro (+ Fe) en relación al estado desreprimido (+Fe/CD) o en relación al estado de máxima represión (+Fe/MR) definido para el control positivo (*pEc-Fur*).

3.3.4. Ensayo de Resistencia a Estrés Oxidativo por H₂O₂

En la mayoría de los sistemas caracterizados a la fecha, la mutación del regulador Fur se manifiesta a través de efectos pleiotrópicos en la fisiología bacteriana. Deficiencias en el crecimiento (Staggs y col., 1994), pérdida de la capacidad de crecimiento aeróbico utilizando ácidos dicarboxílicos pequeños como única fuente de carbono (Hantke, 1987) y sensibilización frente a estrés oxidativo exógeno (Touati y col., 1995), constituyen algunos de estos efectos.

La desrepresión de los sistemas de asimilación de hierro en las mutantes *fur*⁻, se traduce en una elevada carga intracelular de hierro (70 μM; Keyer & Imlay, 1996). El hierro, al catalizar la producción de radicales libres del oxígeno, exacerba la sensibilidad frente a agentes de estrés oxidativo como el H₂O₂. Touati y col. (1995) han demostrado que Fur juega un papel importante en la resistencia a estrés oxidativo inducido por hierro, tanto de modo directo como indirecto. Por un lado Fur tiene la capacidad de quelar el hierro citoplasmático libre, minimizando el daño directo en función de los altos títulos de proteína que se logran en condiciones de estrés (10000/célula; Zheng y col., 1999), y además mantiene la homeostasis de hierro al regular las puertas de entrada y los sistemas citoplasmáticos de almacenamiento del ión. En consecuencia, es posible evaluar la capacidad de complementación de función por ortólogos de Fur en cepas de *E. coli fur*⁻ a través de curvas de sobrevivencia frente a estrés oxidativo por H₂O₂.

Se analizó la capacidad de pFur1 de restituir los niveles silvestres de resistencia a H₂O₂ en la cepa H1780 en presencia de hierro (LB~30μM Fe) bajo condiciones aeróbicas. Se estableció el número de UFC/ml de cada clon recombinante tras 20 min de exposición a 0, 1, 5, 10, 20 mM H₂O₂ y se calculó el porcentaje de sobrevivencia en cada punto (Tabla 7). Las diferencias más dramáticas en la resistencia de los clones recombinantes a H₂O₂ se aprecia a una concentración de 5mM.

Mientras la cepa silvestre *fur*⁺ es capaz de montar una respuesta adaptativa de resistencia frente a estrés por H₂O₂ tras 20 min de exposición (sobrevivencia del 95.6 %), la viabilidad de la mutante H1780 se ve claramente comprometida (sobrevivencia del 59.5%). Por su parte, la mutante complementada con la copia plasmidial de Fur de *E. coli* (pEc-Fur) recupera su capacidad de crecimiento (sobrevivencia del 68.1%), aunque no alcanza los niveles silvestres. En contraposición, la viabilidad del mutante *fur* portador del gen de *A. ferrooxidans* (pFur1) se vio drásticamente comprometida, cayendo a niveles inferiores al 1 %. El hecho que Fur de *A. ferrooxidans* expresado desde el plásmido pFur1 aumentara la sensibilidad de *E. coli* a H₂O₂, en lugar de conferirle protección, es consistente con los indicios de activación génica obtenidos en los ensayos de actividad de β-Gal. Este efecto puede ser interpretado como el resultado directo del aumento en la carga intracelular de hierro producto de la activación de los múltiples sistemas de asimilación del metal presentes en *E. coli*.

Tabla 7. Respuesta a estrés oxidativo por H₂O₂ en clones recombinantes de *E. coli* H1780.

Clon ^{a,b}	H ₂ O ₂ (mM)				
	0	1	5	10	20
<i>fur</i> ⁺	100	94.5	95.6	90.9	43.8
pEc-Fur	100	78.1	68.1	20.7	-
<i>fur</i> ⁻	100	60.9	59.5	22.0	-
pUC18	100	71.5	65.1	4.3	-
pFur1	100	53.0	-	-	-

^a Porcentaje de sobrevivencia de cultivos aeróbicos crecidos en presencia de hierro frente a la exposición a concentraciones crecientes de H₂O₂ (0, 1, 5, 10, 20 mM) durante 20 min.

(-): recuento inferior al límite de detección del método.

^b Cultivos empleados: *E. coli* K12 silvestre (*fur*⁺), *E. coli* H1780 (*fur*⁻), *E. coli* H1780:pUC-18 (pUC18), *E. coli* H1780:pEc-Fur (pEc-Fur) y *E. coli* H1780: pFur1 (pFur1).

3.3.5. Análisis de Expresión de Fur_{Fe} en *E. coli*

3.3.5.1. Análisis de Expresión de *fur*_{Fe} a Nivel de mRNA

Mediante la técnica de RT-PCR se evaluó la expresión a nivel de mRNA de los genes *fur* de *E. coli* (pEc-Fur) y de *A. ferrooxidans* (pFur1) en el huésped heterólogo H1780. Con tal propósito, se emplearon cultivos de los clones respectivos crecidos en presencia y ausencia de hierro.

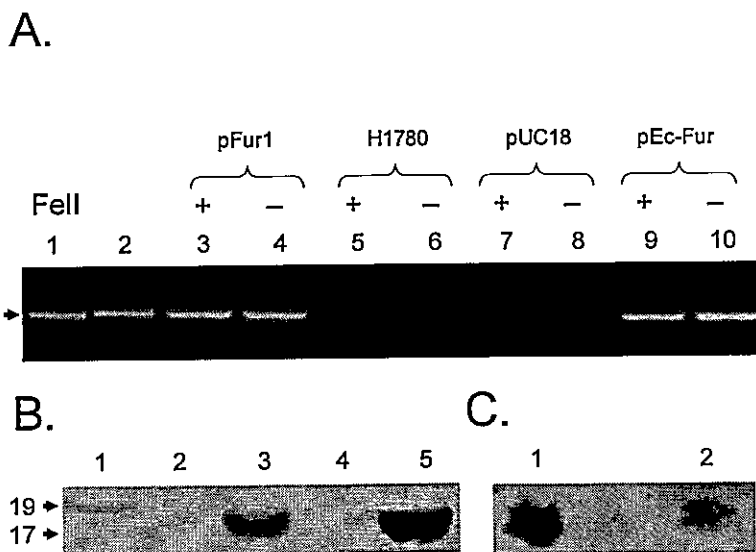


Figura 16. Expresión de los clones recombinantes de *E. coli* H1780. (A) Detección de los transcritos mRNA de *fur* (clonado en pFur1) or *fur*_{EC} (clonado en pEc-Fur) mediante RT-PCR. Carril 1: Estándar de peso molecular λ *Hind III* (banda de 564 bp indicada por la flecha) Carril 2: Producto de amplificación por PCR a partir de DNA plasmidial de pFur1, Carriles 3-10: Producto de amplificación por RT-PCR a partir de RNA total de cultivos de *E. coli* H1780 crecidos en presencia (+) o ausencia (-) de hierro, llevando respectivamente pFur1 (3 y 4), ausencia de plásmido (5 y 6), pUC18 (7 y 8) o pEc-Fur (9 y 10). (B) Western blot de proteínas totales separadas a través de SDS-PAGE 15% aisladas de las cepas y clones indicados a continuación utilizando anticuerpos contra Fur de *E. coli*. Carril 1: *A. ferrooxidans* crecido en azufre elemental, Carril 2: *E. coli* H1780, Carril 3 *E. coli* K12, Carril 4: *E. coli* H1780 portando pFur1, Carril 5: *E. coli* H1780 portando pEc-Fur. Las flechas indican el peso molecular aproximado estimado de los productos, en base a la migración relativa al estándar de peso molecular Broad Range (BioRad). (C) Western blot de las proteínas inmunoprecipitadas del clon Fur1 con anticuerpos contra Fur de *E. coli*. Carril 1: *A. ferrooxidans* crecido en azufre elemental, Carril 2: *E. coli* H1780 portando pFur1.

Se detectaron los mensajeros de los genes *fur* respectivos en el caso del clon control (H1780:pEc-Fur) de *E. coli* y el clon Fur1 de *A. ferrooxidans* (Figura 16A). Por el contrario, en el caso de la cepa huésped, en el del clon portador del vector de clonamiento pUC-18 y en el del clon Fur1, se aprecia ausencia de expresión del gen *fur* de *E. coli* (Figura 16A). Adicionalmente, se comprueba que la regulación de la expresión de los genes clonados es independiente de la presencia/ausencia de hierro en medio, de acuerdo con lo esperado bajo el diseño de clonamiento.

3.3.5.2. Análisis de Expresión de Fur_{Fe} a Nivel de Proteína

Utilizando la técnica de Western blot y antisuero generado contra la proteína Fur de *E. coli*, se evaluó la presencia de proteína Fur en extractos totales de los clones H1780:pUC-18, H1780:pEc-Fur, H1780:pFur1 y los respectivos controles positivos, *E. coli* K12 y *A. ferrooxidans* ATCC23270 (Figura 16 B).

La banda esperada de 17 kDa para Fur de *E. coli* se detecta en los extractos de la cepa silvestre (*E. coli* K12) y del clon portador de la construcción pEc-Fur, banda que por otro lado está ausente en los extractos de la cepa huésped no transformada.

Sin embargo, mientras que la banda reactiva esperada para el producto Fur de *A. ferrooxidans* es evidente en el extracto control obtenido de un cultivo de esta bacteria crecido en azufre, esta banda no se detecta en los extractos del clon Fur1. Esto podría significar, ausencia total del producto o bien expresión por debajo de los niveles detectables mediante Western blot, puesto que este clon expresa el mRNA del gen *fur* (Figura 16 A, carriles 3 y 4) y la reactividad cruzada con Fur se aprecia en el control positivo (Figura 16 B, carril 1).

3.3.5.3. Inmunoprecipitación de Fur_{Fe} del clon Fur1 de *E. coli*

A efectos de establecer entonces, si Fur de *A. ferrooxidans* se expresaba a bajos niveles en *E. coli* H1780 a partir de la construcción pFur1, se efectuaron ensayos de inmunoprecipitación del producto utilizando anticuerpos contra Fur de *E. coli*. Se emplearon para ello extractos de proteínas totales obtenidos a partir de 1L de cultivo del clon H1780:pFur1. El inmunoprecipitado se separó mediante SDS-PAGE 15% y se evaluó por Western blot para establecer la presencia de la banda reactiva esperada. Luego de este procedimiento, se apreció un producto del mismo tamaño (Figura 16 C, carril 2) que el de Fur obtenido a partir de *A. ferrooxidans* crecido en azufre (Figura 16 C, carril 1).

Se concluye que fur_{Fe} de *A. ferrooxidans*, si bien expresa a nivel de proteína en la cepa H1780 de *E. coli* conteniendo el plásmido pFur1, lo hace a una concentración menor que el clon conteniendo pEc-Fur o que la cepa silvestre de *E. coli* K12 (estimada en 1000 veces inferior).

3.3.6. Causas del Fenotipo Activador de Fur_{Fe} en *E. coli*

A efectos de comprender las diferencias funcionales presentadas por el ortólogo de Fur de *A. ferrooxidans* en la complementación de la cepa fur⁻ de *E. coli* H1780, se efectuó una inspección detallada de la estructura primaria de Fur de *A. ferrooxidans*. Para ello se alineó la secuencia establecida para el clon Fur1 con un grupo de 10 ortólogos, pertenecientes a la subfamilia de reguladores Fur de respuesta a hierro, disponibles en bases de datos (Anexo 16). Adicionalmente, se incluyeron en la comparación las proteínas Fur deducidas en base a las secuencias genómicas de *A. ferrooxidans* (ATCC23270) reportadas en las bases de datos de TIGR y de ERGO. Así mismo, se comparó la secuencia del gen fur de *A. ferrooxidans* de estas tres fuentes.

Este análisis reveló dos diferencias importantes. En primer lugar, la proteína Fur de *A. ferrooxidans* codificada en pFur1 presenta una sustitución en la posición 40 (E40G) respecto de las secuencias homólogas reportadas en TIGR y ERGO para la misma cepa de *A. ferrooxidans* y para otras bacterias. Esta sustitución ocurre en una posición altamente conservada entre ortólogos (Figura 10) inmersa en la hélice de posicionamiento (H3) del dominio de unión a DNA. Tal sustitución se detectó, además, en un segundo clon portador del gen *fur* de *A. ferrooxidans* ATCC23270 (pFur1b), generado a través de un evento de clonamiento independiente y en un clon portador del gen *fur* de la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC19859 (pFur2) (Figura 17). Dada la naturaleza no conservativa de esta sustitución, y considerando que el cambio pudiese comprometer la integridad de la hélice H3 y la operatividad del motivo HTH, se construyó un mutante G40E para la posición considerada.

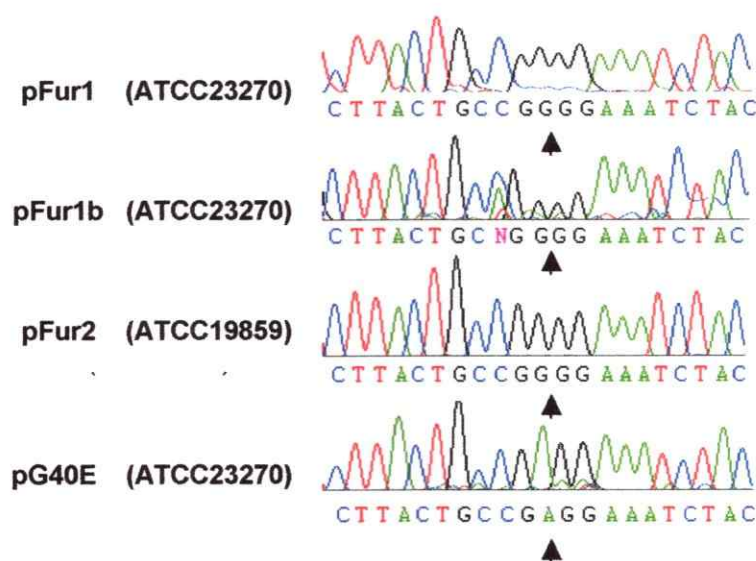


Figura 17. Cromatogramas de secuencia de los clones recombinantes de *E. coli* H1780 portadores de *fur*_{AF} en la región comprendida entre el codón 37 y 43. La flecha indica la sustitución.

El segundo aspecto considerado como causa probable de la diferencia fenotípica observada en *E. coli* H1780 en presencia de fur_{Fe} de *A. ferrooxidans*, se relaciona con el inusual espaciamiento entre cisteínas en el motivo CXC-II de Fur. Aunque existen ortólogos de Fur que carecen completamente de cisteínas en su secuencia y aún exhiben regulación hierro dependiente (Hamza y col., 1999; Loprasert y col., 1999; de Luca y col., 1998; Barton y col., 1996), la mayoría de las bacterias presentan al menos 4 residuos cisteína organizados en dos motivos CX_2C-I y CX_nC-II , cuya mutación perturba la estabilidad e integridad funcional de Fur (Bsat & Helmann, 1999; Althaus y col., 1999; Coy & Neilands, 1991). El espaciamiento del motivo CXC-I es, en todos los casos conocidos, de dos residuos, mientras que el espaciamiento del motivo CXC-II varía entre 2, 4 y 5 residuos (Figura 10 A, Anexo 16).

En el caso de Fur de *A. ferrooxidans*, el espaciamiento entre cisteínas C-terminales es de 8 residuos. La incidencia del espaciamiento aumentado en la estabilidad de la proteína o en su función se desconoce, pero dada la ausencia de ortólogos de Fur con variantes que se aparten de las regularidades antes mencionadas en la base de datos, se ahondó en las consecuencias de este cambio a través del análisis de mutantes afectadas en este motivo de la proteína.

Se analizó la contribución de estas características en el fenotipo activador de Fur de *A. ferrooxidans* en *E. coli* H1780 a través ensayos de complementación y medición de actividad β -Gal empleando las construcciones que se describen a continuación.

3.3.6.1. Complementación de *E. coli* H1780 por la Construcción Mutante G40E

Se generó un clon recombinante portador de la sustitución G40E (pG40E) mediante mutagénesis sitio dirigida sobre el gen fur_{Fe} de *A. ferrooxidans*. La sustitución se introdujo en el gen fur_{Fe} contenido en el plásmido pFur1 a través de la técnica de PCR divergente utilizando un partidor que contiene el codón GAG en lugar de GGG.

El producto de PCR así generado, fue religado en condiciones diluidas y transformado en *E. coli* H1780. La reversión fue pertinentemente corroborada por secuenciación (Figura 17, clon pG40E).

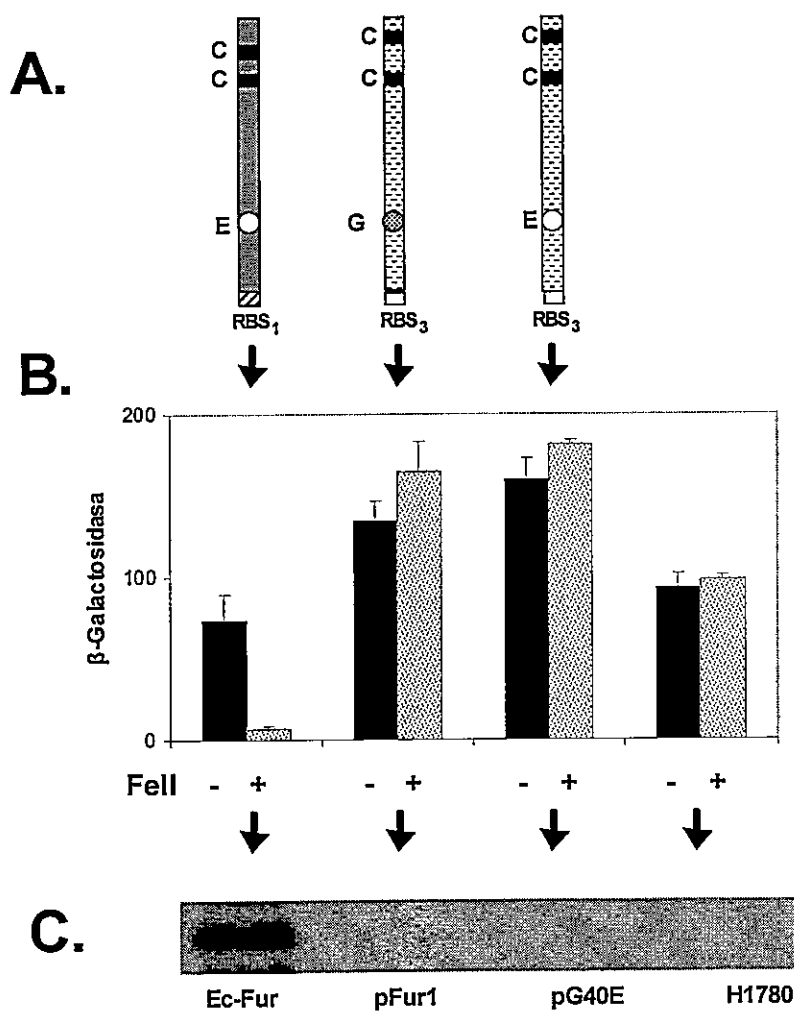


Figura 18. Mutante G40E del gen *fur* de *A. ferrooxidans*. (A) Esquema de los clones y construcciones empleadas en el presente ensayo (RBS: sitio de unión a ribosoma; se indican los residuos cisterna, ác. glutámico y glicina a través de C, E y G, respectivamente). (B) Niveles de Actividad β -Galactosidasa en los clones recombinantes de *E. coli* H1780 crecidos en presencia/ausencia de Fell. (C) Western blot de extractos de proteínas totales de los clones recombinantes de *E. coli* H1780. Clones: Fur de *E. coli* expresado desde pEc-Fur, Fur de *A. ferrooxidans* expresado desde pFur1, mutante G40E de Fur de *A. ferrooxidans* expresado desde pG40E, cepa huésped H1780 *fur*.

Mediante un ensayo de actividad β -Gal se evaluó la capacidad de este clon de complementar la deficiencia de *fur* en *E. coli* H1780. Adicionalmente se examinó la expresión a nivel de proteína de Fur de *A. ferrooxidans* en el mutante mediante Western blot. El clon pG40E portador del gen *fur_{Fe}* con la sustitución G40E en la hélice H3 del motivo HTH, no fue capaz de reprimir la expresión de la actividad β -Gal en la cepa H1780, sino que por el contrario presentó la misma capacidad activadora observada en presencia de pFur1 (Figura 18 B). De modo consistente con los resultados anteriores, tampoco se detectó el producto proteico mediante Western blot para el clon pG40E (Figura 18 C).

Se desprende de este resultado que la sustitución de la posición 40 del motivo HTH de Fur de *A. ferrooxidans* no es responsable del inusual fenotipo activador anteriormente descrito.

3.3.6.2. Complementación de *E. coli* H1780 por las Quimeras C-terminales

Para evaluar si el mayor espaciamento que afecta al motivo CXC-II de Fur de *A. ferrooxidans* era el causal del fenotipo activador producido en *E. coli*, se construyeron dos quimeras entre las proteínas Fur de *A. ferrooxidans* y de *E. coli*. Estas quimeras, designadas Af-Ec y Ec-Af, llevan el extremo N-terminal de un ortólogo y el C-terminal del otro desde un motivo (HLYLYS) totalmente conservado en ambas proteínas (Figura 19 A). Así, la construcción Af-Ec lleva el motivo de unión a DNA de *A. ferrooxidans* y un motivo CXC-II donde el espaciamento entre cisteínas es de 4 aminoácidos en lugar de 8.

Si el inusual espaciamento (CX₈C) de Fur de *A. ferrooxidans* constituye el factor que perturba la estabilidad de la proteína en *E. coli*, el producto codificado por la quimera Af-Ec podría eventualmente ser estable en *E. coli* H1780 y capaz de reprimir al gen reportero *lacZ*.

La construcción recíproca Ec-Af, por el contrario, debiera ser desestabilizada por la presencia de un C-terminal con un espaciamiento entre cisteínas de 8 residuos, y eventualmente, adquirir la capacidad activadora.

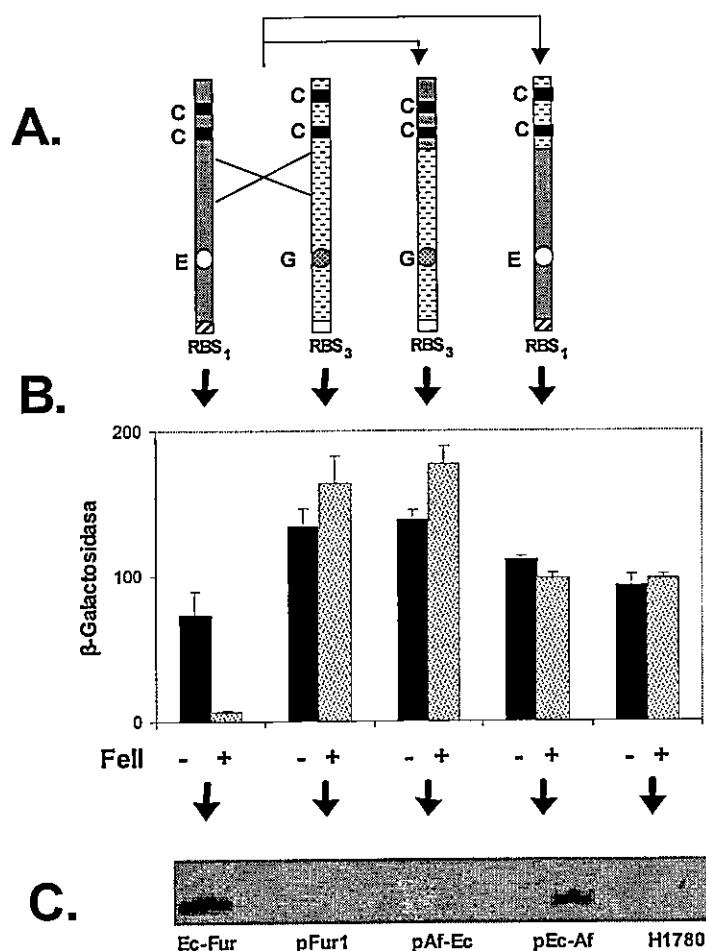


Figura 19. Quimeras C-terminales de Fur de *A. ferrooxidans* y *E. coli*. (A) Esquema de los clones y construcciones empleadas en el presente ensayo. (B) Niveles de Actividad β -Galactosidasa en los clones recombinantes de *E. coli* H1780. (C) Western blot de extractos de proteínas totales de los clones recombinantes de *E. coli* H1780. Clones: Fur de *E. coli* expresado desde pEc-Fur, Fur de *A. ferrooxidans* expresado desde pFur1, quimera C-terminal de Ec expresado desde pAf-Ec, quimera C-terminal de Af expresado desde pEc-Af, cepa huésped H1780 *fur*⁻.

Ambas construcciones resultaron, nuevamente, incapaces de complementar la deficiencia de *fur* en *E. coli* H1780. Contrariamente a lo predicho, la quimera Af-Ec induce la actividad β -Gal en esta cepa (Figura 19 B) y su producto proteico no es detectable mediante Western blot. (Figura 19 C). Por su parte, la quimera Ec-Af que lleva el extremo N-terminal de *E. coli* y el C-terminal considerado desestabilizante, si bien no fue capaz de reprimir la expresión de *lacZ*, tampoco se comportó como activador del mismo. Los niveles de actividad β -Gal de este clon en presencia o ausencia de hierro fueron equivalentes y comparables a los de la cepa mutante H1780 (Figura 19 B). Adicionalmente, la presencia de una banda reactiva en extractos de proteínas totales de este clon, ensayados a través de Western blot, indica que algún aspecto de la construcción provee una mayor estabilidad o un mayor nivel de expresión a su producto proteico (Figura 19 C).

Los resultados sugieren que el espaciamiento CX₈C presente en el ortólogo de *A. ferrooxidans* y en la quimera Ec-Af, no constituiría un aspecto crítico que compromete la estabilidad de la proteína Fur. Adicionalmente, los antecedentes generados para la mutante G40E y la quimera reciproca (Af-Ec), parecen indicar que estas dos construcciones comparten la característica que confiere la capacidad activadora, y que esta propiedad se correlaciona de modo directo con menores niveles de la proteína Fur, ya sea que los mismos respondan a una expresión disminuida o a una inestabilidad aumentada. El hecho que la quimera Ec-Af, cuyo producto proteico se expresa a niveles detectables mediante Western blot, no presentó la capacidad de activar el promotor *fiu::lacZ* en *E. coli* H1780, apoya tal conclusión. Sin embargo, la fusión del extremo C-terminal de la proteína de *A. ferrooxidans* al dominio de unión a DNA y de metales de Fur de *E. coli*, claramente afecta la capacidad del producto de responder a la presencia del metal correpressor. Probablemente, la fusión comprometa la integridad estructural del regulador, respecto de la proteína Fur de *E. coli*.

3.3.6.3. Característica Diferencial entre las Quimeras Ec-Af y Af-Ec.

Mientras que la proteína Fur de *E. coli* se expresa fuertemente desde pEc-Fur, los niveles de Fur en el clon que lleva la construcción equivalente de *A. ferrooxidans* (pFur1) son probadamente bajos, aún cuando ambas construcciones se expresan a nivel de mRNA en *E. coli* H1780. Por otro lado, la baja expresión de Fur1 y de la quimera Af-Ec se correlaciona con la capacidad activadora de estas construcciones en *E. coli*, mientras que la quimera recíproca Ec-Af, que expresa Fur, no presenta tal fenotipo. La presencia de proteína, a su vez no parece depender del espaciamiento de las cisteínas en el dominio C-terminal. En conjunto, estos antecedentes sugieren que alguna característica de la porción N-terminal o de la región 5' inmediatamente río arriba del ATG de la construcción pEc-Fur, equivalente a la construcción pEc-Af, imparte mayor estabilidad o favorece la expresión del producto.

Revisando la secuencia de estos clones se tomó conciencia de una diferencia en la región que controla el inicio de la traducción (RIT), entre los clones que llevan el N-terminal de *E. coli* y de *A. ferrooxidans*. Esta diferencia fue introducida a nivel del partidador de PCR directo (EC-Fur1sd) diseñado para clonar el gen *fur* de *E. coli* en los clones pEc-Fur y pEc-Af, ó bien a nivel del partidador directo (AF-Fur3sd) diseñado para clonar el gen *fur* de *A. ferrooxidans* en los clones pFur1, pG40E y pAf-Ec. En este punto es pertinente destacar algunos aspectos de la estrategia de clonamiento. A efectos de evitar problemas de expresión del gen *fur* de *A. ferrooxidans* en *E. coli*, y dada la ausencia de un sitio SD conservado respecto del consenso derivado para otros microorganismos, se introdujo una secuencia SD comúnmente reconocida por *E. coli* a través de PCR. El partidador empleado para amplificar el gen *fur* de *E. coli* (EC-Fur1sd, Tabla 24), se diseñó conservando la secuencia del gen entre las posiciones -16 y +12 relativas al ATG, a excepción de un sitio *Xho*I introducido en las posiciones -9 y -4 (tamaño del espaciador = 10 nt).

La contraparte empleada para amplificar el gen de *A. ferrooxidans* (partidor AF-Fur3sd, Tabla 4), lleva la secuencia SD de *fur* de *E. coli* (AGGA) 2 nucleótidos río arriba del sitio de restricción *Xho*I y un espaciador SD-ATG de 11 nucleótidos que preserva, por lo demás el contexto de secuencia del gen *fur_{Fe}* de *A. ferrooxidans* (Figura 14).

Al momento de iniciar el estudio no se consideró que estas diferencias pudiesen afectar la expresión del producto de clonamiento. Sin embargo, al evaluar la estructura secundaria del mRNA esperado para los clones pFur1 y pEc-Fur se aprecia que la estabilidad de una horquilla que compromete la región RIT, es doblemente estable en el caso del gen *fur_{Fe}* de *A. ferrooxidans* (Figura 20).

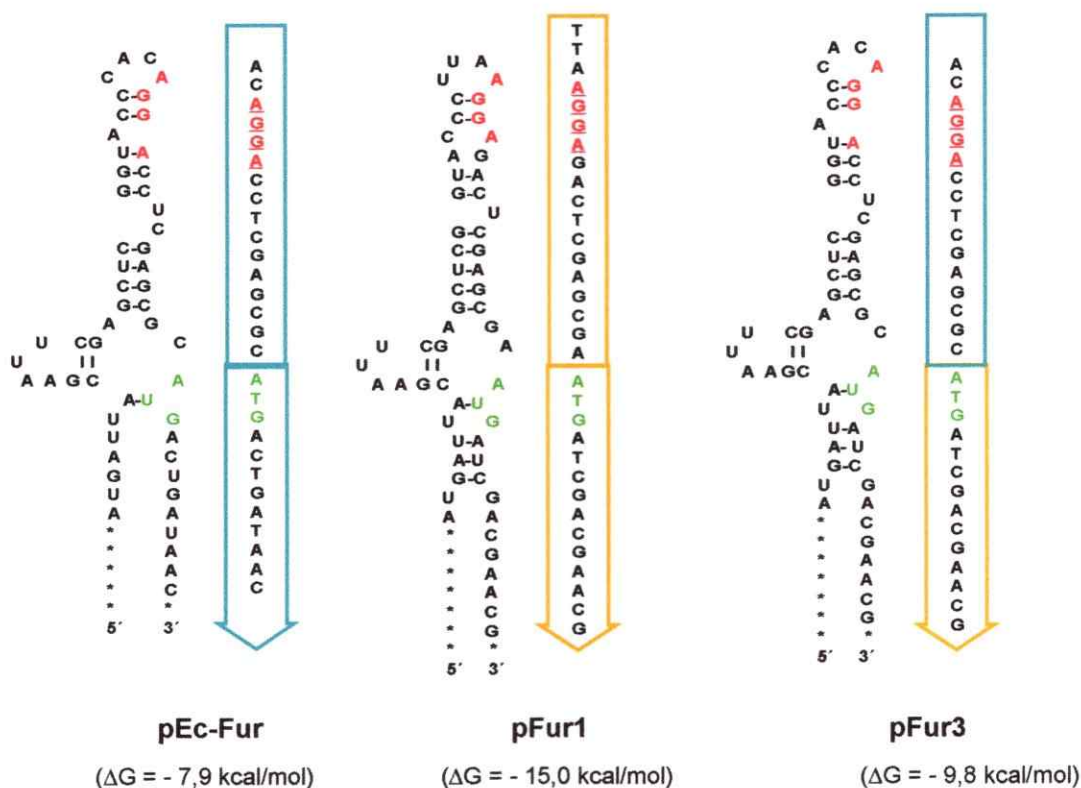


Figura 20. Predicción de estructura 2° de la región RIT de los mRNA de los clones pEc-Fur, pFur1 y pFur3 utilizando el programa mFold. En cada caso se efectuaron múltiples predicciones sobre segmentos de longitud variable hasta obtener la estructura más probable. El valor de ΔG corresponde al valor de energía libre para tal segmento. La flecha muestra la secuencia de los partidores utilizados en cada clonamiento. En azul se indican las secuencias comunes a los partidores Ec-Fur1sd y Af-Fur5sd y en amarillo las secuencias comunes a los partidores Af-Fur3sd y Af-Fur5sd.

Por este motivo se decidió poner a prueba si las diferencias en la región RIT de los clones generados por amplificación con el partidor AF-Fur3sd eran las determinantes de los bajos niveles de expresión de Fur de *A. ferrooxidans*. Con tal fin, se diseñó un nuevo partidor (AF-Fur5sd) consistente de la región río arriba del ATG del partidor EC-Fur1sd y la región río abajo del ATG del partidor AF-Fur3sd. Esta estrategia no sólo pretendió modificar el tamaño del espaciador, sino también el contexto genético de este (Figura 21 A).

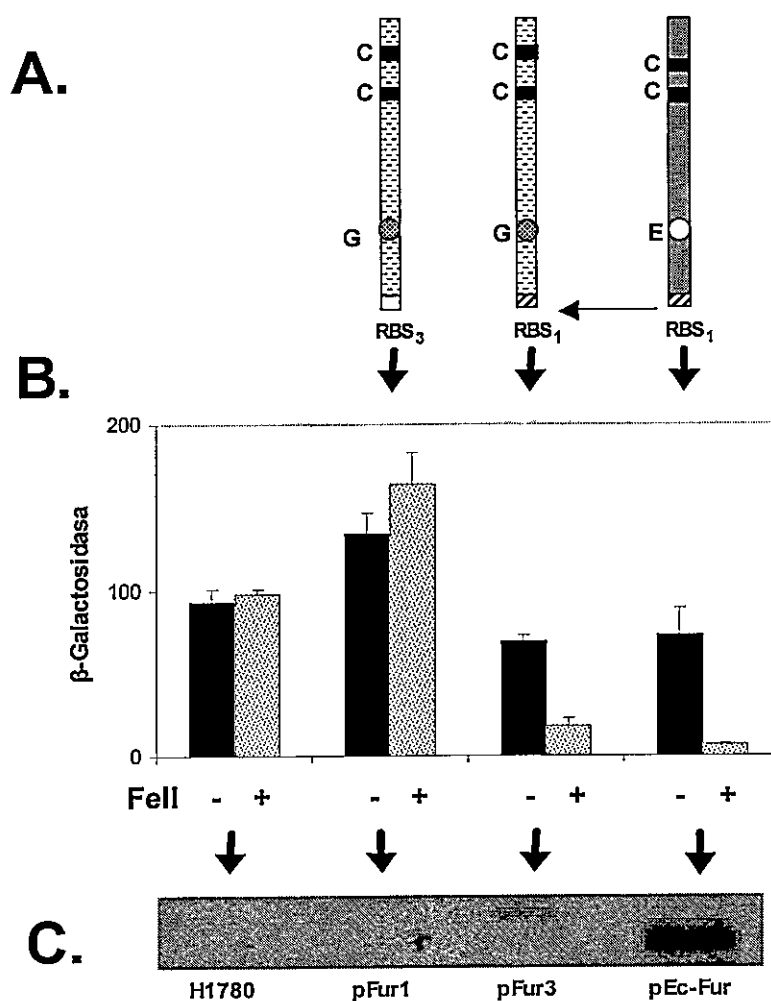


Figura 21. Modificación del espaciador SD-ATG del gen *fur_{Fo}* de *A. ferrooxidans*. (A) Esquema de los clones y construcciones empleadas en el presente ensayo. (B) Niveles de Actividad β -Galactosidasa en los clones recombinantes de *E. coli* H1780. (C) Western blot de extractos de proteínas totales de los clones recombinantes de *E. coli* H1780. Clones: cepa huésped H1780 *fur*⁻, *Fur_{Fo}* de *A. ferrooxidans* expresado desde pFur1, *Fur_{Fo}* de *A. ferrooxidans* expresado desde pFur3, *Fur* de *E. coli* expresado desde pEc-Fur.

Utilizando este nuevo partidor se amplificó el gen *fur* de *A. ferrooxidans* ATCC23270. El fragmento obtenido, se clonó en *E. coli* dando origen al clon designado H1780:pFur3, y se evaluó tanto su capacidad de expresión a nivel de proteína mediante Western blot, como de complementar la deficiencia del regulador *fur* por represión del promotor *fiu::lacZ* como en los puntos anteriores.

Confirmando la hipótesis sometida a prueba, este nuevo clon no sólo demostró expresarse a niveles detectables (Figura 21 C) sino que probó ser capaz de reprimir la expresión de *lacZ* en presencia de hierro a niveles comparables a los de la construcción control portadora del gen de *E. coli* (Figura 21 B). Estos resultados demuestran que Fur_{Fe} de *A. ferrooxidans* tiene la capacidad de funcionar como represor o activador de la transcripción de un gen reprimido por en *E. coli* dependiendo de los niveles celulares del regulador.

3.3.6.4. Actividad de Fur_{Fe} Expresado desde su Promotor de Origen

En función de los resultados anteriores, se analizaron la capacidad represora y los niveles de expresión de Fur_{Fe} de *A. ferrooxidans* en un nuevo clon que introduce en *E. coli* H1780, no sólo la secuencia codificante de gen *fur_{Fe}* de *A. ferrooxidans* sino la región que contiene a su promotor putativo (Figura 22). El gen fue amplificado por PCR desde la región media del gen *omlA* río arriba de *fur*, utilizando el partidor (AF-RIGFurA1) y clonado siguiendo una estrategia equivalente a la empleada para obtener las construcciones anteriores.

Confirmando los resultados generados en el punto anterior este nuevo clon, designado H1780:pFur4, reprimió la expresión de la actividad β-Gal en respuesta a la presencia de hierro en el medio de cultivo (Figura 22 A).

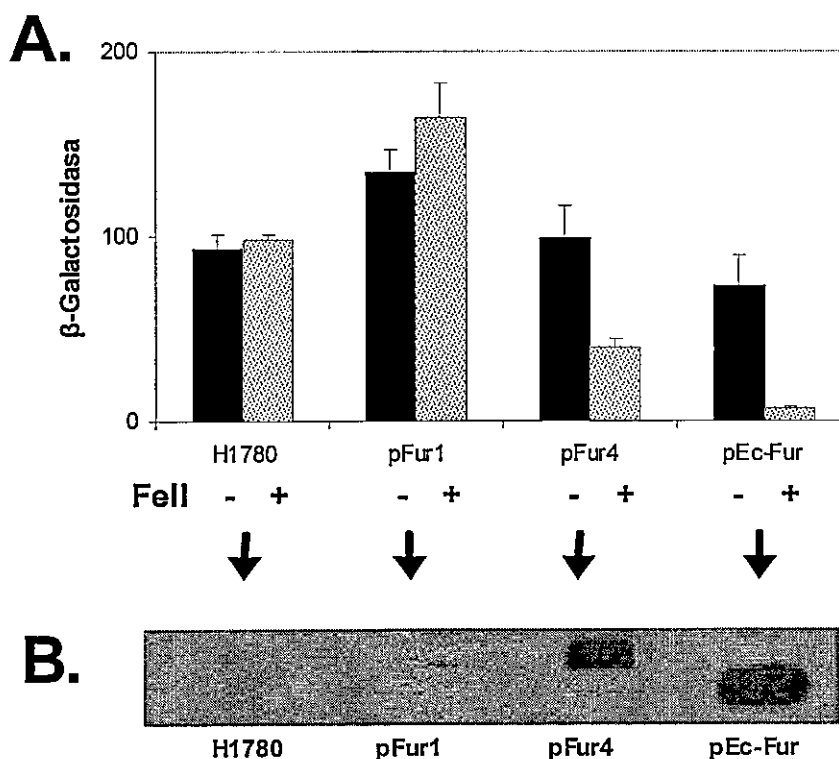


Figura 22. Actividad y expresión de Fur de *A. ferrooxidans* desde P_{furAF} . (A) Niveles de Actividad β -Galactosidasa en los clones recombinantes de *E. coli* H1780. (B) Western blot de extractos de proteínas totales de los clones recombinantes de *E. coli* H1780. Clones: cepa huésped H1780 fur^- , Fur de *A. ferrooxidans* expresado desde pFur1, Fur de *A. ferrooxidans* expresado desde su propio promotor en pFur3, Fur de *E. coli* expresado desde pEc-Fur.

Nuevamente fue posible correlacionar este fenotipo con la presencia de una banda reactiva del tamaño esperado para Fur de *A. ferrooxidans*, a través de ensayos de Western blot (Figura 22 B).

Queda así demostrado, que Fur_{Fe} de *A. ferrooxidans* es capaz de ser expresado de modo estable en *E. coli*, y más aún que las señales transcripcionales y traduccionales de este gen son reconocidas adecuadamente en *E. coli*. Además, se confirma que esta proteína, cuando se expresa a niveles detectables mediante Western blot, es capaz de unirse específicamente y reprimir el promotor dependiente de Fur *fiu* de *E. coli*.

3.4. Ensayos de Unión *In Vitro* de Fur_{Fe} a Cajas Fur de *E. coli*

Los antecedentes obtenidos *in vivo* indican que Fur_{Fe} de *A. ferrooxidans* es capaz de reprimir diferencialmente, en función de la disponibilidad de hierro, al menos dos promotores dependientes de Fur de *E. coli*. Implícita en esta observación está la afirmación que Fur de *A. ferrooxidans* puede reconocer de modo específico cajas Fur de *E. coli* y unirse a ellas con la afinidad suficiente como para reprimir la expresión del gen asociado. Para probar si Fur se estaba uniendo de modo específico a la caja Fur de los promotores evaluados en este estudio se efectuó un ensayo de retardo de la movilidad electroforética (EMSA). Se emplearon, en este caso, extractos totales de proteína aislados de la cepa Δfur QC-1732 y de los clones recombinantes derivados de ésta, que portan a pEc-Fur y pFur3 y expresan respectivamente altos títulos de las proteínas Fur de *E. coli* y de *A. ferrooxidans*. Se empleó como sonda la caja Fur del gen *fhuF* de *E. coli* (Tabla 2), generada según de Lorenzo y col. (1988) y marcada en su extremo 5' con ³²P. Adicionalmente, se evaluó la capacidad del anticuerpo anti-Fur de *E. coli* de producir "supershift" de la banda retardada (Figura 23).

Mientras que el extracto aislado de la mutante *fur* de *E. coli* QC-1732 fue incapaz de retardar la migración de la sonda (Figura 23, carril 2), el extracto obtenido del clon que expresa la proteína de *A. ferrooxidans* manifestó un claro retardo de la misma (carril 6). La magnitud del cambio en la migración de la sonda fue equivalente al producido por el extracto aislado del clon Ec-Fur (carril 3).

Frente a la adición del anticuerpo anti-Fur de *E. coli* el "supershift" en la migración del complejo retardado Fur + Caja Fur demuestra que el efecto es mediado específicamente por las proteínas sobrepresadas en ambos clones (carriles 4 y 7). Por otra parte, en presencia de cantidades competitivas de sonda fría, el retardo observado en ambos casos se pierde, demostrando la especificidad de la unión a la sonda *fhuF* (carriles 5 y 8).

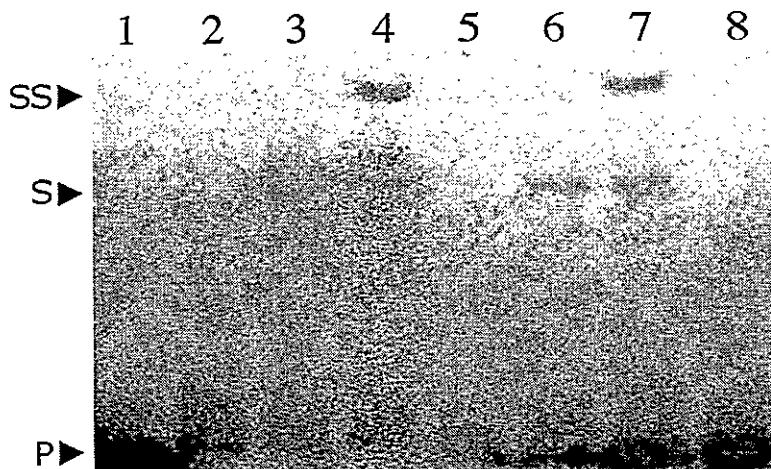


Figura 23. Unión específica de Fur de *A. ferrooxidans* a la caja Fur del gen *fhuF* de *E. coli* mediante análisis de retardo y super- retardo. Carril 1: sonda pura, Carril 2: sonda con extracto de la cepa QC-1732 de *E. coli*, Carril 3: sonda en presencia de Fur de *E. coli* en el extracto del clon QC-1732:pEc-Fur, Carril 4: sonda en presencia de Fur de *E. coli* y anticuerpo anti-Fur, Carril 5: sonda en presencia de Fur de *E. coli*, anticuerpo anti-Fur y sonda fría, Carril 6: sonda en presencia de Fur de *A. ferrooxidans* en el extracto del clon QC-1732:pFur1, Carril 7: sonda en presencia de Fur de *A. ferrooxidans* y anticuerpo anti-Fur, Carril 8: sonda en presencia de Fur de *A. ferrooxidans*, anticuerpo anti-Fur y sonda fría. P = sonda, S = retardo and SS = super-retardo.

Estos resultados demuestran que Fur de *A. ferrooxidans* expresado en *E. coli* es capaz de reconocer, unir específicamente y retardar la migración de la caja Fur del gen *fhuF* de *E. coli* en presencia de Mn(II) como metal correpresor.

3.5. Búsqueda de Cajas Fur

En virtud de la conservación de los sitios de regulación en numerosos genomas bacterianos, de la similitud de secuencia entre los ortólogos de Fur de *A. ferrooxidans* y de *E. coli* (sección 3.1.2.2) y de la capacidad de Fur de *A. ferrooxidans* de unir específicamente una caja Fur de *E. coli in vitro* (sección 3.4), es factible esperar que existan cajas Fur conservadas en el genoma de *A. ferrooxidans*.

Este aspecto se evaluó a través de dos estrategias complementarias de tipo global: una búsqueda de secuencias reconocibles por el represor de *E. coli* en una genoteca de *A. ferrooxidans* a través del ensayo conocido como FURTA y una búsqueda bioinformática de secuencias similares a cajas Fur en el genoma de *A. ferrooxidans*.

3.5.1. Ensayos de Titulación de Fur en *E. coli* H1717

El ensayo de titulación de Fur (FURTA, Stojiljkovic, 1994) permite identificar posibles cajas Fur clonadas en un plásmido multicopia. En él, se utiliza la cepa H1717 de *E. coli* (*fhuF::lacZ*, Hantke, 1987), silvestre para el represor *fur* y portadora de una construcción reportera que condiciona la expresión de la actividad β -Gal al control del promotor Fur dependiente del gen *fhuF*. Siendo este operador uno de los primeros en desreprimirse, al disminuir los niveles de represor activo Fe-Fur en el citoplasma, es posible establecer por un efecto de competencia (consecuencia del alto número de copias del vector), la presencia en el plásmido de cajas con una afinidad por el represor al menos comparable a la del operador *fhuF*. En medio indicador MacConkey-Fe, la cepa H1717 presenta fenotipo Lac⁻ (colonias translúcidas). Por el contrario, clones con fenotipo Lac⁺ (colonias rojas) indican presencia potencial de cajas Fur. Este ensayo, si bien diseñado originalmente para identificar genes regulados por Fur en *E. coli*, ha demostrado ser útil en la identificación de genes blanco de regulación por Fur en otras bacterias (Tsolis y col., 1995; Bereswill y col., 1998).

3.5.1.1. Determinación de Cajas Fur Río Arriba del Gen *fur* de *A. ferrooxidans*.

Numerosos antecedentes demuestran unión efectiva y capacidad de represión hierro dependiente mediada por Fur de diversos ortólogos de *fur* (Delany y col., 2002; van Vliet y col., 2000; de Lorenzo y col., 1988; Chan y col., 1995) y muchos otros sugieren la capacidad de autorregulación en base la presencia de cajas Fur en la región promotora, identificadas ya sea por similitud de secuencia o por ensayos de tipo FURTA (Loprasert y col., 1999; Bereswill y col., 1998; Thomas & Sparling, 1994; Hickey & Cianciotto, 1994).

Para establecer la eventual capacidad de regulación Fur dependiente del gen *fur_{Fe}* de *A. ferrooxidans* como indicio de su posible capacidad de autorregulación, se empleó el ensayo FURTA. Con este fin, se clonó la región intergénica *fur-omIA* en el vector de

clonamiento pGEM-T Easy y se introdujo en la cepa de *E. coli* H1717. Los transformantes obtenidos presentaron fenotipo lac⁻ en medio MacConkey-Fe (colonias translúcidas), resultado que se interpreta como indicativo de la ausencia de cajas Fur en la región promotora tanto del gen *fur* como de *omlA*. Estos resultados son coherentes con la baja conservación de la secuencia tipo caja Fur identificada en la región del intergénica *fur-omlA* durante el análisis bioinformático (sección 3.1.2.2.).

3.5.1.2. Determinación Experimental de Cajas Fur en el Genoma de *A. ferrooxidans*

Con el fin de evaluar la presencia de sitios operadores conservados en *A. ferrooxidans* y de establecer posibles blancos de regulación por Fur en el genoma de esta bacteria, se transformó la cepa de *E. coli* H1717 con la genoteca de *A. ferrooxidans* ATCC19859. Se incluyeron como controles de este ensayo, el vector y una caja Fur conocida clonada en el mismo vector (FB-fhuF1+2, Tabla 4).

Aislamiento y Selección de Clones Furta +

Del total de los clones recombinantes Amp^R (3×10^5 clones), 125 se detectaron en medio MacConkey-Fe por su neta coloración rojiza. Los clones con fenotipo Lac + se rescataron tras 24 h de incubación en medio indicador MacConkey-Fe a 37°C y se repicaron a medio fresco, registrándose sus fenotipos FURTA durante 36 h de incubación a 37°C. Los fenotipos lacZ se categorizaron luego, según intensidad de coloración adquirida por las colonias y el tiempo de incubación transcurrido.

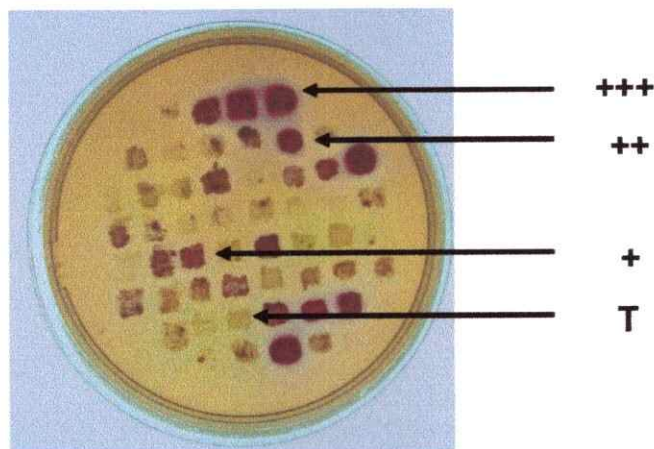


Figura 24. Fenotipo de los Clones FURTA positivos (rojos) y negativos (T: translúcidos) tras 36 hs de incubación a 37°C en medio indicador agar MacConkey-Fe (Amp). Categorías fenotípicas de los clones FURTA según intensidad de coloración y el tiempo de incubación transcurrido (+++, ++, +).

Se seleccionaron para su posterior secuenciación los clones FURTA de las categorías fenotípicas (+++) y (++) , con fenotipo reproducible luego de tres transferencias sucesivas en medio indicador fresco, así como también algunos de los que permanecieron translúcidos tras 36 h de incubación a modo de control negativo (Figura 24).

Análisis de Secuencia de los Clones Furta +

Las secuencias obtenidas a partir de tales clones se localizaron en el genoma anotado de *A. ferrooxidans*, identificando los marcos de lectura abiertos y posibles regiones promotoras. La presencia de cajas Fur se evaluó indirectamente a través de alineamientos de secuencia entre los genes identificados en los clones FURTA y homólogos de estos, regulados por Fur en otras bacterias. Alternativamente, se realizó la inspección directa de la secuencia de las regiones no codificantes o asociadas a posibles promotores. Los clones FURTA + más probables se presentan en la Tabla 8.

Tabla 8. Funciones codificadas en la secuencia de los clones FURTA +.

Clon pGTF	Posición relativa al gen	Gen	Función	Nt idénticos a caja Fur consenso
C24	5'	<i>mntH</i>	Transportador MnII/FelI	12
C30	5'	<i>iscR</i>	Regulador, formación centros Fe-S	8
D10	3'	<i>feoB</i>	Transportador de FeII/ β -Ala sintasa	7
D7	5'	<i>copB</i>	Eflujo de Cu ⁺	10
B22	5'	<i>rarA</i>	Reductasa de metaloides	8
B51	5'	<i>moeB</i>	Asimilación de molibdeno	11
A10	5'	<i>fdx1</i>	Ferredoxina	10
D29	5'	<i>fdx2</i>	Ferredoxina	9
B46	CDS	<i>HiPIP</i>	Proteína de alto potencial redox	10
C2	5'	<i>hdrB</i>	Reductasa de heterosulfuros	10
D12	5'	<i>hup</i>	Maduración de la hidrogenasa	10
A29	5'	<i>dsbG</i>	Isomerasa de puentes disulfuro	10
B28	-	NC	No codificante	13

Entre los clones FURTA + aislados mediante este ensayo, el clon pGTF-C24 resultó portador de la región 5' del gen *mntH* que codifica para un transportador de FeII regulado por Fur en *E. coli* (Patzner & Hantke, 2001). La caja Fur asociada al gen *mntH* ha sido identificada en *E. coli* y se corresponde parcialmente en localización y conservación con la caja detectada en *A. ferrooxidans*. El clon pGTF-C30 resultó portador de la región río arriba del regulador *IscR*, involucrado en la regulación del operón de genes involucrados en la formación de centros Fe-S (*Isc*). Aunque en *E. coli* este operón no es regulado por Fur, su contraparte en otras bacterias (*Stf*) si lo es (Zheng y col., 2001a, 1998). La inspección de la región del promotor predicho para *iscR_{AF}* revela una secuencia tipo caja Fur superpuesta al probable hexámero -35, aunque su identidad es baja. El clon pGTF-D10, por su parte, mostró contener la porción C-terminal del *feoB* y la secuencia completa del gen río abajo de éste. Si bien *FeoB* es un transportador de FeII regulado por Fur en varias bacterias, el gen adyacente no es un blanco conocido de regulación por Fur ni su asociación con *feoB* se encuentra conservada en otros genomas. Tampoco es obvia su relación con el metabolismo del hierro por codificar para una sintetasa de β -Alanina.

Algunos clones FURTA + codificaron para transportadores de metales, involucrados en el eflujo de Cu (pGTF-D7: *copB*) y de cationes Co/Zn/Cd (pGTF-B22: *czc*) o en la asimilación de molibdeno (pGTF-B51: *moeB*). Varios clones codificaron para proteínas con centros Fe-S. Entre éstas, los clones pGTF-A10 y pGTF-D29, codificaron para ferredoxinas, el clon pGTF-B46 para una proteína tipo HiPIP, el clon pGTF-C2 para la subunidad HdrB de la reductasa de heterosúlfuros y el clon pGTF-D12 para una subunidad de la reductasa involucrada en la maduración de la hidrogenasa.

En función de la naturaleza del ensayo FURTA, la expresión de proteínas que alteren los títulos de hierro incidirá directamente sobre los títulos de represor activo Fe-Fur y afectará los resultados del ensayo. La titulación del correpresor por otras proteínas que unen hierro, ya sean ferritinas, citocromos ó proteínas con centros Fe-S, resultará en eventuales falsos positivos. Sin embargo, a excepción del clon pGTF-B46, los clones FURTA + de *A. ferrooxidans* aislados mediante este ensayo portan fragmentos parciales de los genes codificantes para estas metaloproteínas.

Secuencias similares a cajas Fur fueron identificadas en un cierto número de clones codificantes para proteínas nunca antes descritas como blanco de regulación por Fur. Entre éstas, se incluye el clon pGTF-B22 portador de la región 5' de la reductasa de metaloides *RarA* y organizada en un posible operón con una proteína de eflujo de cationes tipo *Czc*. También en esta categoría se incluye el clon pGTF-A46, codificante para la porción C-terminal de la deshidrogenasa de coproporfirinógeno III (O₂-independiente), *hemN*, involucrada en la biosíntesis del grupo hemo y un gen hipotético adyacente. Tres clones independientes, pGTF-A29 –D40 y A-43, codificaron para segmentos superpuestos de la región promotora asociada al operón AF0779-AF0800 (*DsbG*), una isomerasa periplasmática de puentes disulfuro, cuya función se relaciona con el mantenimiento de la integridad de las proteínas redox extra-citoplasmáticas o con dominios expuestos a este compartimiento celular. Adicionalmente, dos clones incluyeron en su secuencia a genes de

origen viral (pGTF-C44 y -C46). Uno de los clones aislados (pGTF-B28) resultó portador de una región enteramente no codificante pero que incluye una secuencia similar al consenso de caja Fur en 13 de sus 19 posiciones.

Los clones translúcidos secuenciados fueron elegidos al azar y sus secuencia carecieron de inserto (sólo vector) o portaron segmentos pequeños (pGTF-C7 y D13) o bien correspondieron a segmentos internos de genes codificantes para funciones no relacionadas con el metabolismo metálico (pGTF-C8: poliquétido sintetasa I; pGTF-B25: Phe-tRNA sintetasa; pGTF-B8: halogenasa).

Debe destacarse que algunos de los clones FURTA + carecieron de cajas Fur reconocibles. Sin embargo, las funciones encerradas en muchos de los clones aislados son candidatas a ser reguladas por hierro en *A. ferrooxidans*, por estar relacionadas de modo directo o indirecto con el metabolismo de este metal. Estos resultados sugieren que la identidad de las cajas reconocidas por el represor Fur de *E. coli* en la genoteca de *A. ferrooxidans* podría diferir de las secuencias típicamente asociadas a los genes reconocidos en *E. coli* (conservadas respecto del consenso). Cabe destacar que la secuencia de referencia a partir de la cual se pretendió identificar cajas en las secuencias FURTA no es más que el consenso derivado del conjunto conocido de promotores dependientes de Fur en *E. coli*.

Esta secuencia rara vez se encuentra como tal en los promotores regulados por Fur de *E. coli* o de otras bacterias, y en realidad existe una población de variantes naturales de cajas Fur con distinto grado de identidad respecto al consenso. Por esta razón, se optó por evaluar la presencia de cajas Fur en el genoma de *A. ferrooxidans* a través de métodos bioinformáticos.

3.5.2. Predicción de Cajas Fur en *A. ferrooxidans* por la Teoría de la Información

La búsqueda de sitios de regulación utilizando modelos cuantitativos (Schneider, 1997), que consideran no un consenso sino una población de sitios reales, resulta en predicciones más acertadas. Esta estrategia ha sido empleada en la identificación de cajas para los reguladores bacterianos Fis, PurR, Lpr y OxyR entre otros (Zheng y col., 2001b; Mironov y col., 1999; Shultzaberger & Schneider, 1999; Hengen y col., 1997). Más recientemente, también se han predicho cajas Fur en un grupo de enterobacterias (Panina y col., 2001) y en *B.subtilis* (Baichoo y col, 2002b).

3.5.2.1. Construcción de la Matriz de Información, Validación y Filtros

Utilizando 26 cajas determinadas experimentalmente de *E. coli*, o alternativamente 67 cajas de un conjunto de bacterias (*E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. typhimurium* y *S. aureus*), se construyeron dos matrices de información para barrer la secuencia del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC23270 en busca de posibles cajas Fur.

A efectos de evaluar la utilidad del método y definir la significancia de los puntajes predichos sobre una secuencia blanco dada, se establecieron en primer término los puntajes de las cajas Fur utilizadas para alimentar el modelo, comparándose los valores obtenidos al emplear la matriz restrictiva construida en base a cajas Fur de *E. coli* exclusivamente (Matriz *E.coli* = MEC) con aquellos generados en función del conjunto de cajas de varios microorganismos (Matriz Conjunto Bacterias = MCB). Adicionalmente, se validó la capacidad predictiva del método sobre operones de regulación conocida por Fur de diversos microorganismos (sección 3.5.3). Si bien en el caso de las cajas de *E. coli* ambas matrices asignaron puntajes semejantes y positivos, algunas de la cajas de otras bacterias, que recibieron un puntaje significativo al emplear la matriz MCB, no fueron detectadas por la matriz MEC. Resultados comparables se obtuvieron sobre los operones

de prueba, siendo posible además detectar un amplio rango de cajas de menor puntaje en el entorno inmediato de las cajas de mayor puntaje.

Para efectuar la búsqueda en el genoma de *A. ferrooxidans* se prefirió la matriz de información que entregara la menor cantidad de resultados de falsos positivos, aún cuando su empleo jugara en detrimento de la predicción de sitios verdaderos de bajo nivel de conservación (falsos negativos). Se evaluó, sin embargo, la correspondencia entre las predicciones efectuadas por ambas matrices en las cajas candidatas seleccionadas luego de un primer análisis con la matriz restrictiva (MEC). Se seleccionaron como posibles cajas Fur de *A. ferrooxidans* todas aquellas secuencias cuyo puntaje superó el valor real de la caja Fur de *E. coli* con menor contenido de información ($\text{Puntaje}_{\text{MEC}} \text{Caja Fur EC-ExbB} = 5,52$) y se anotaron seguidamente en la secuencia del genoma de esta bacteria.

A efectos de retener aquellas secuencias con mayor probabilidad de ser verdaderas cajas Fur, aún cuando nuevamente se incurriera en falsos negativos, se emplearon criterios de filtro adicionales. En primer término, se descartaron todas aquellas secuencias cuya distancia relativa al sitio de inicio de la traducción del marco de lectura abierto más próximo, fuera mayor a 600 nt. En el laboratorio se han detectado para *A. ferrooxidans* transcritos con secuencias líder de hasta 440 nt, a través ensayos de extensión del partidor (Levican, 2003). Adicionalmente, se consideró que ésta es una distancia prudencial capaz de salvar posibles errores de anotación del inicio de la traducción de los genes de *A. ferrooxidans*. Entre los criterios de selección se tomó en cuenta además, la identidad efectiva respecto del consenso de caja Fur de *E. coli*, la conservación de residuos definidos como relevantes a la interacción del represor con su sitio de unión a nivel de DNA y la naturaleza del gen blanco asociado. Ensayos de protección frente al radical hidroxilo de cajas Fur han revelado un patrón de protección por la unión del represor de dos base protegidas cada 4 bases no protegidas (de Lorenzo y col., 1988) y más recientemente se ha demostrado que el enlace flanqueante a la última timina del hexámero GATAAT de la

caja Fur es protegido en presencia del represor (Escolar y col., 1998). Adicionalmente, ensayos de pérdida de las timinas de la caja Fur, por interferencia con uridina y corrección por la UDG glicosilasa, han demostrado que la timina 6 de la hebra directa y las timinas 2 y 5 de la hebra complementaria disminuyen de modo significativo la unión de Fur a su caja (Escolar y col., 1998). Las cajas preseleccionadas por contenido de información y posición relativa al ATG, fueron categorizadas por el nivel de conservación de los residuos protegidos.

3.5.2.2. Búsqueda Global de Cajas Fur en el Genoma de *A. ferrooxidans*

Se predijeron en el genoma de *A. ferrooxidans* un total de 316 secuencias de 19 nt, repartidas entre ambas hebras, con un contenido de información mayor a 5.52 (es decir al menos comparable a la caja Fur peor evaluada de *E.coli*). Un 77% de estas cajas se encontró en la misma orientación que el marco de lectura abierto más próximo, aunque dado el carácter palindrómico de las cajas Fur, su orientación respecto del gen posiblemente sea irrelevante. Tan sólo un 45% (143 cajas) de estas cajas se encontró a una distancia relativa al inicio del gen putativo adyacente inferior a 600 nt, ya sea de genes independientes o de posibles operones (sólo el 26% del total de las cajas predichas se localizó a menos de 300 nt del ATG). De las cajas encontradas río arriba de genes pertenecientes a posibles operones, un porcentaje cercano al 20% se encontró asociado al primer gen del operón y un 40% en regiones intergénicas internas al operón. Casi un 40% de las cajas encontradas a una distancia prudencial del sitio de inicio de la traducción se encuentran asociadas a genes de función conocida. El porcentaje remanente se reparte entre proteínas hipotéticas conservadas en varios genomas y proteínas huérfanas.

Entre las 143 cajas candidatas predichas por este método, ninguna presenta más de 14 nt idénticos al consenso, indicio que se condice con los resultados obtenidos mediante el ensayo FURTA (sección 3.5.1.2). El 65 % de las cajas identificadas presenta entre 9 y 13

nt conservados respecto de la caja Fur consenso, siendo la categoría de identidad más frecuente de 10/19 nt. Un 40 % de las cajas candidatas presenta conservación mayor al 66% de los residuos protegidos por Fur durante su unión al DNA. En base a estos criterios las 143 cajas fueron categorizadas, siendo las mejor evaluadas inspeccionadas en mayor detalle.

Finalmente 98 secuencias se consideran como putativas cajas Fur en *A. ferrooxidans* (Tabla 9). Varios de los genes blanco asociados a estas cajas pertenecen a categorías funcionales que son habituales blanco de regulación por Fur en otros microorganismos, aún cuando los genes involucrados no sean necesariamente homólogos. Los candidatos más probables se analizan en las secciones subsiguientes.

Tabla 9. Cajas Fur predichas por métodos bioinformáticos en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC23270

Caja Fur	Característica	ORF	Secuencia Caja Fur	dATG (nt)	Puntaje (bits)
Consenso			GATAATGATAATCATTATC		26.1
	Transporte de Fe y afines				
FB-1 *	Región no codificante (pGTF-B28)	AF0464	GAAAATGATAATTGTTCCG	-	17.2
FB-2	Secresión Colicina V	AF0850	TATAATAGTGTCATTATT	301	14.0
FB-3	Secresión Colicina V	AF0849	TAAAATGACAATCCGATACT	410	10.6
FB-4*	Transportador de Fe NRAMP, mntH (pGTF-C24)	AF2752	ATAAACGGGAATCATTCTC	46	11.3
FB-5	His Lipoprotein -Porin-FeoAB	AF0543	TGTAATAAGACTCATTCCGT	21	11.7
FB-6	TonB Operón 5	AF2095	TAAATTCATCCCATTTTC	1	13.0
FB-7	Transporter - OMR TonB dep Operón 8	AF0108	GATAATCACTACTACTCTGC	122	9.7
FB-8	Globina Operón 1	AF1463	TGATATTATAGTTATTCTT	161	9.7
FB-9	Permeasa - Fe(III) ABC Operón 1	AF1456	GATATCCAGATTTTTATC	55	8.7
FB-10	OMR TonB dep Operón 6	AF0164	TACTATCAGATTTATAATT	521	6.2
FB-11	OMR TonB dep Operón 6	AF0165	CAATATCGTTATCATCCTT	35	6.4
FB-12	ATP-BP ABC Operón 2	AF0736	TGTTTGATACTTATATC	573	5.3
FB-13	CzcC exportador de multidroga Operón 7	AF0963	TATAGCGGTATTGCACTTG	247	6.5
FB-14	ORF Huérfano Operón 7	AF0979	GAAAAGGATTTTATCCGC	55	7.6
FB-15	Exportador de Cu, ATPasa tipo ActP-Operón7	AF0978	GCAAATGATAAGCATCCCTT	144	13.1
FB-16	Exportador de Cu, ATPasa tipo P	AF0420	GAAAAAAGTAACCAATTTGG	276	7.7
FB-17	Proteína Transmembrana	AF0311	GACAACGGTAATCTTTTGC	27	10.4
FB-18	Permeasa L-Asp	AF1197	AAATACGGTAATTTATTTG	159	10.4
FB-19	Permeasa-oligopéptidos ABC	AF0113	AGTAATGGTAAGCTGTTCTG	266	9.3
FB-20	Exportador de antibióticos	AF0108	AATATCGATAACCTTTTGG	140	7.2
FB-21	Exportador de antibióticos	AF0108	GGTTATCACAATCATAACT	362	6.9
FB-22	Flavohemoglobina	AF2017	GATATTGATAGCCATCTGT	+15	8.6
	Metabolismo energético				
FB-23	citocromoC1, AAF76300 Operón PET 1	AF0004	CGCAACAATAAGCATTATC	164	11.7
FB-24	citocromoB, AAF76299 Operón PET 1	AF0005	GGAATAATAATAAATCGG	402	10.1
FB-25	citocromoB, AAF76299 Operón PET 1	AF0005	TATTATTATACCGGTTTC	408	9.6
FB-26	citocromoC, CAA07031	AF1517	AATTTTCATATTTGATCTC	+9	5.1
FB-27	citocromoC1, CAC44746 PET1	AF0349	GTTTTTCATATCCTTATC	621	5.2
FB-28	citocromo C oxidasa tipo aa3, subunidad II	AF3007	TATAATAATAGTTAAACTC	397	10.3
FB-29	Ferredoxina	AF2057	CACAAGAGAATCAATATC	304	10.5
FB-30	Ferredoxina	AF2057	TATTATGGAATCAGTCTGT	236	7.5
FB-31	Ferredoxina	AF1407	GGAAATCGCATTTATCATC	95	5.6
FB-32	Cisteína desulfurasa NifS	AF1411	TGGAAGGATTTGGCATATTC	+93	5.1
FB-33	NifV, HesB	AF1417	ATCATTTGATAACAAATATC	26	10.1
FB-34	Fe-Mo proteína NifX	AF1432	GAAAATGGTATTCTCTCTG	+87	7.5

FB-35	<i>Hipotética divergente a NifX</i>	AF1432	GAAAAGCGTTTTAATTTTT	39	6.7
FB-36	<i>Transferasa de Sulfato-adenilato (sub2), NodP</i>	AF0134	GAATATCAATATAGTAATC	219	5.5
Reguladores					
FB-37	<i>Regulador COG3829 (PAS) dep de sigma-54</i>	AF0471	TTCTATGATACGAATTCCT	26	6.9
FB-38	<i>Regulador COG0745 (OmpR fam) similar a KdpE</i>	AF0792	TATATCTACAAGCATTTTC	308	11.2
FB-39	<i>Regulador COG1733 (MarR fam)</i>	AF0473	CAAAATAGTAAGTATATTT	35	8.7
FB-40	<i>Regulador COG1733 (MarR fam)</i>	AF0473	AAATATACTTACTATTTTG	41	7.5
FB-41	<i>Regulador COG0745 (OmpR fam) similar a qseB</i>	AF0968	CAGAAGAATACGCATTTTT	15	6.3
FB-42	<i>Regulador COG1309 similar a scbR</i>	AF0811	GAAAAGCACATGCATTTCC	36	5.8
Detoxificación / Reparación					
FB-43	<i>Peroxiredoxina 2 / glutaredoxina</i>	AF2488	TAAAAATATCAAGTATT	92	9.0
FB-44	<i>Isomerasa tiol:disulfuro, DsbG (pGTFD40)</i>	AF0780	GACTTTGATATGCAATTTT	31	8.2
FB-45	<i>Tipo Glutación-S-transferasa</i>	AF0474	AAATATACTTACTATTTTG	153	7.5
FB-46	<i>DNA-inducible por daño, Pol IV 2</i>	AF0419	GCAATGATATTTTTTTTG	329	10.3
Misceláneos					
FB-47	<i>DNA polimerasa III, subunidad B</i>	AF2853	TATAAAATATTTTATATT	52	9.4
FB-48	<i>leucyl/phenylalanyl-tRNA transferasa</i>	AF2611	GGTAACTATAACCGTTTTG	51	11.3
FB-49	<i>leucyl/phenylalanyl-tRNA transferasa</i>	AF2611	GGTATAGTTACCAAGTAGT	45	5.1
FB-50	<i>Proteína ribosomal S9 (30S)</i>	AF0037	GGTAATAAATTTTATCCTT	215	8.3
FB-51	<i>Proteína ribosomal L10 (50S)</i>	AF2542	GCTAAAGATTTCCGTTTCC	129	5.7
FB-52	<i>S-adenosilmeltonina: tRNA ribosiltransferasa</i>	AF0946	CATAATGAAATCTTTTTT	+6	14.8
FB-53	<i>Glucosa-6-P-Isomerasa</i>	AF0176	TATATTAATATTCATTTTT	220/87	16.0
FB-54	<i>NADH-ubiquinona oxidoreductasa, Nuol</i>	AF0447	GAGAATCATATGCAATTTT	+10	12.3
FB-55	<i>Glicosil transferasa I</i>	AF2774	AAATATTGATGCCATTTGC	177	11.6
FB-56	<i>Glicosiltransferasa, biosíntesis de antígeno O</i>	AF1591	AAATATCGTATTCATTAGC	+15	9.7
FB-57	<i>Oxidoreductasa</i>	AF2855	TATATGCAATTTTATTTGT	123	7.6
FB-58	<i>3-Isopropilmalato deshidrogenasa</i>	AF0932	GAAAAAATAGCCATATTT	+3	7.5
FB-59	<i>NADH:polisulfuro oxidoreductasa, Nox5</i>	AF1176	AAATATATATTTGTTTTT	369	7.4
FB-60	<i>ATP sintasa F1, subunidad epsilon</i>	AF2955	GGATATCATTGCCATTCCT	261	7.1
FB-61	<i>Corimato Sintasa (2,3-DHB)</i>	AF1020	TGCAATGGTTTTCGGTTTC	166	6.9
FB-62	<i>Ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa</i>	AF0857	ACTTTTTTATATCAATATG	23	6.1
FB-63	<i>Acetiltransferasa (GNAT), ActC</i>	AF2005	TATTTTCGAACCTATTCTC	603	5.6
FB-64	<i>Biosíntesis Histidina</i>	AF0061	GGGTATTATTGTTATTTT	37	5.5
FB-65	<i>LplA, lipato ligasa A</i>	AF0359	GATAACCATAGGCAACGC	396	5.5
FB-66	<i>N-aciltransferasa</i>	AF2255	CAATATCGTATTCATCCCT	292	5.3
FB-67	<i>Benzoilformato decarboxilasa</i>	AF0306	TTTAACTACTAGTATTAGT	18	5.1
FB-68	<i>Benzoilformato decarboxilasa</i>	AF0306	TTTAACTACTAGTATTAGT	18	5.1
FB-69	<i>Dehalogenasa</i>	AF0793	GAATACAGCACCCATTTTC	153	5.1
FB-70	<i>Fosfoglucomutasa</i>	AF0710	AGTTACCACATCAAGTTTC	601	5.0
FB-71	<i>Peptidasa de sigma32</i>	AF0433	TATAATCAGTCTAAATTC	20	6.0
FB-72	<i>Forma bacilar, MreB/FtsI</i>	AF0505	GATATTTAAACGAATTCCT	+2	5.1
FB-73	<i>Ensamblaje del pili, TraF</i>	AF1829	AACAAGTATATTAATTTGT	23	5.3
FB-74	<i>Transposasa</i>	AF0555	CAATATGAATATCAATAGC	+15	10.4
FB-75	<i>Quelata de MgII, ComM</i>	AF0554	GCTATGATATTCATATTG	73	9.9
FB-76	<i>Bacteriófago</i>	AF1849	GTATATTATAATCATTACC	16	11.5
FB-77	<i>Transposasa A</i>	AF2958	CAGATGATACTCTATTGT	63	6.4
FB-78	<i>Transposasa, IS1595</i>	AF0908	CGTATTATAATTTTTCTG	547	6.0
FB-79	<i>Glicoproteína gp2</i>	AF0388	GGCAATGATACCAATTTTC	26	13.1
Función desconocida					
FB-80	<i>ORF Huérfano</i>	AF1763	GAAAATCATATCAATACG	482	12.5
FB-81	<i>ORF Huérfano</i>	AF0039	TATAATAATACGCATACTT	208	12.1
FB-82	<i>Proteína Hipotética</i>	AF1306	GATAAAGCCACCAATATC	197	12.0
FB-83	<i>ORF Huérfano</i>	AF1763	AGTTATGATATTCATATTG	395	10.8
FB-84	<i>ORF Huérfano</i>	AF1763	GATTATGATTTTCATCCCTG	476	10.3
FB-85	<i>Proteína Hipotética</i>	AF1306	GATAATGGTTGGCTTTATC	197	9.9
FB-86	<i>ORF Huérfano</i>	AF2853	TATAAAAATAATTTATATT	26	9.4
FB-87	<i>ORF Huérfano</i>	AF2982	TTCTATTATAATTATATTT	465	8.7
FB-88	<i>ORF Huérfano</i>	AF1851	TATATCGACATCCATATTC	+15	8.4
FB-89	<i>Proteína Hipotética</i>	AF0111	TCCTATAAATTCATATC	156	8.4
FB-90	<i>ORF Huérfano</i>	AF1238	AAAAACGATAGCAATCTC	106	8.2
FB-91	<i>Proteína Hipotética</i>	AF0897	GGTAACCGAATATATCAGT	364	8.2
FB-92	<i>Proteína Hipotética</i>	AF0276	AATAAATAAATTTATCTTC	116	7.8
FB-93	<i>Proteína Hipotética</i>	AF0470	TTCTATGATACGAATTCCT	284	6.9
FB-94	<i>ORF Huérfano</i>	AF1847	TATAATCATACCGGAATG	10	6.7
FB-95	<i>ORF Huérfano</i>	AF1333	AATAARCATAACCAATAC	261	6.0
FB-96	<i>ORF Huérfano</i>	AF1590	TTAAACCATAGGTAATCTT	157	5.8
FB-97	<i>Proteína Hipotética</i>	AF0111	AAAATTCATATCATCATG	150	5.6
FB-98	<i>ORF Huérfano</i>	AF2982	TATTATAATTATATTTCTC	462	5.3

* (FURTA +)

Cajas Asociadas a Genes de Homeostasis Metálica

Algunas de las cajas identificadas se encuentran asociadas a genes involucrados en el transporte de hierro (FB-2/B-12). En las Figuras 1, 2 y 3 se indica la localización de estas probables cajas en el contexto genético de las funciones de transporte de hierro detectadas durante la reconstrucción bioinformática (sección 3.1).

A semejanza de lo que ocurre en otros microorganismos (Bjarnason y col., 2003; McHugh y col., 2003; Ochsner y col., 2002; Occhino y col., 1998), se detectó una putativa caja Fur río arriba del gen TonB (FB-6) de uno de los operones de transporte de sideróforos de *A. ferrooxidans* (Operón5, Figura 5). Al menos un componente de los transportadores ABC incluidos en los operones de transporte de sideróforos 1 y 2 (Figura 5) sería regulado por Fur en *A. ferrooxidans*, eventualmente controlando la expresión de los genes río abajo. En los genomas bacterianos conocidos los sistemas de transporte ABC y de transducción de energía TonB, son numéricamente menos abundantes que los receptores de sideróforos, hecho que también se cumple en *A. ferrooxidans*. Bajo este contexto, la regulación diferencial de los componentes del operón permitiría ajustar el nivel de expresión de estos elementos a las de los receptores de sideróforos (de afinidad diversa) más numerosos y dispersos en el genoma. El gen de la globina AF1463, dispuesto como primer gen del operón principal de transporte de sideróforos de *A. ferrooxidans* (Operón 1, Figura 5), lleva una caja Fur medianamente conservada en su eventual región promotora (FB-8).

Adicionalmente, el transportador de FeII MntH (AF2752) y el sistema de transporte de FeII FeoAB-PorA (AF0541/3), estarían bajo el control de Fur en *A. ferrooxidans*. Tanto la expresión de *mntH* como de *feoB* es controlada por Fur según la disponibilidad de hierro en varios microorganismos (Kehres y col., 2002; Hantke & Braun, 2000).

Resultó interesante que los marcos de lectura AF0978 y AF0420, codificantes para dos ATPasa tipo P ortólogas a los exportadores de cobre ActP (FB-15) y PcoD (FB-16)

respectivamente, presenten cajas tipo Fur en sus regiones 5'. En vista que uno de los clones FURTA + aislados de la genoteca de *A. ferrooxidans* (pGTF-D7) codifica para un ortólogo de la ATPasa CopB, la regulación por Fur de este grupo de proteínas resulta más probable. En *H. pylori* la proteína CopA es regulada por Fur (Beier, y col., 1997).

Cajas Asociadas a Genes del Metabolismo Energético

Un número considerable de cajas fueron predichas en el entorno de genes implicados en varios aspectos del metabolismo energético de *A. ferrooxidans*.

Se detectaron cajas Fur, de puntaje promedio, en las regiones 5' de genes codificantes para proteínas redox involucradas en el transporte de electrones asociado a la oxidación tanto de FeII (*pet I*; FB-23/ FB-26) como de azufre (*pet II*; FB-27). Ambos operones se localizan en regiones del genoma de *A. ferrooxidans* que están algo por debajo del % G+C promedio (genoma= 58.8 %; *pet I* _{5Kb}= 48,9 %; *pet II* _{5Kb} = 54,3%), hecho que podría aumentar la probabilidad de ocurrencia azarosa de cajas Fur, ricas en A+T, en estas regiones del genoma. Sin embargo, el hecho que las cajas predichas en uno y otro operón no sean conservadas ni en secuencia ni en localización relativa al gen blanco, a pesar de la organización génica semejante y la elevada identidad de secuencia entre estos operones, argumenta en favor de que los sitios predichos sean probables cajas Fur.

El empleo de este método de predicción, reveló la presencia de probables cajas Fur en la región promotora de diversas metaloproteínas, implicadas por ejemplo en la fijación de nitrógeno (FB-32/FB-35) y en la generación de poder reductor (FB-54). Una amplia variedad de oxidoreductasas asociadas a procesos biosintéticos también registran la presencia de posibles cajas Fur.

Cajas Asociadas a Funciones Misceláneas

Probables cajas Fur fueron detectadas en una serie de genes no relacionados de modo directo con la adquisición o utilización de hierro.

Un sistema de secreción de microcinas (tipo ColV) detectado en el genoma de *A. ferrooxidans*, similar al transportador ABC para colicina V de *E. coli* presenta dos cajas Fur de alto puntaje (FB2/FB-3) y superpuestas a un probable promotor. La organización de este operón está parcialmente conservada respecto del sistema CvaAB, que en *E. coli* es regulado por Fur de modo hierro dependiente (Boyer & Tai.1998).

Cinco reguladores transcripcionales tipo COG3829, COG0745, COG1733 y COG1309 (FB37/FB-42), de implicancia desconocida registran presencia de posibles cajas Fur en su región 5'. Al menos tres proteínas involucradas en el mantenimiento de las condiciones redox citoplasmáticas y del estado redox de ciertas proteínas de membrana (peroxirredoxina, glutatión transferasa, isomerasa de puentes disulfuro), así como una polimerasa de tipo inducible por daño (*din*), se encuentran entre los genes asociados a las cajas Fur predichas (FB43/FB46).

3.5.3. Operadores Complejos en el Genoma de *A. ferrooxidans*

La caja Fur, en su interpretación más simple, es una secuencia palindrómica de 19 nt que se ajusta al consenso GATAATGATAATCATTATC (de Lorenzo y col., 1987). Sin embargo, con la identificación de cajas en un número creciente de genes y la profundización del análisis del mecanismo molecular de acción del represor Fur, se hizo evidente que la interpretación vigente de la caja Fur era una sobre simplificación. Para lograr coherencia entre los antecedentes de secuencia, protección (frente a DNasa I o modificación química) y estequiometría de unión dímero:caja (en ensayos de retardo), se han efectuado varios intentos de reinterpretar la estructura y organización de la caja Fur (Baichoo & Helmann, 2002; Lavrrar y col., 2002; Escolar y col., 1999). Aunque tales

sus detalles, todas coinciden en que los sitios de unión de Fur consisten de una serie de unidades repetitivas GATAAT adyacentes, de orientación permutable y de conservación de secuencia variable, que dirigen la polimerización de Fur a lo largo de sus promotores blanco (Escolar y col., 2000; Escolar y col., 1998; Le Cam y col., 1994; de Lorenzo y col., 1988).

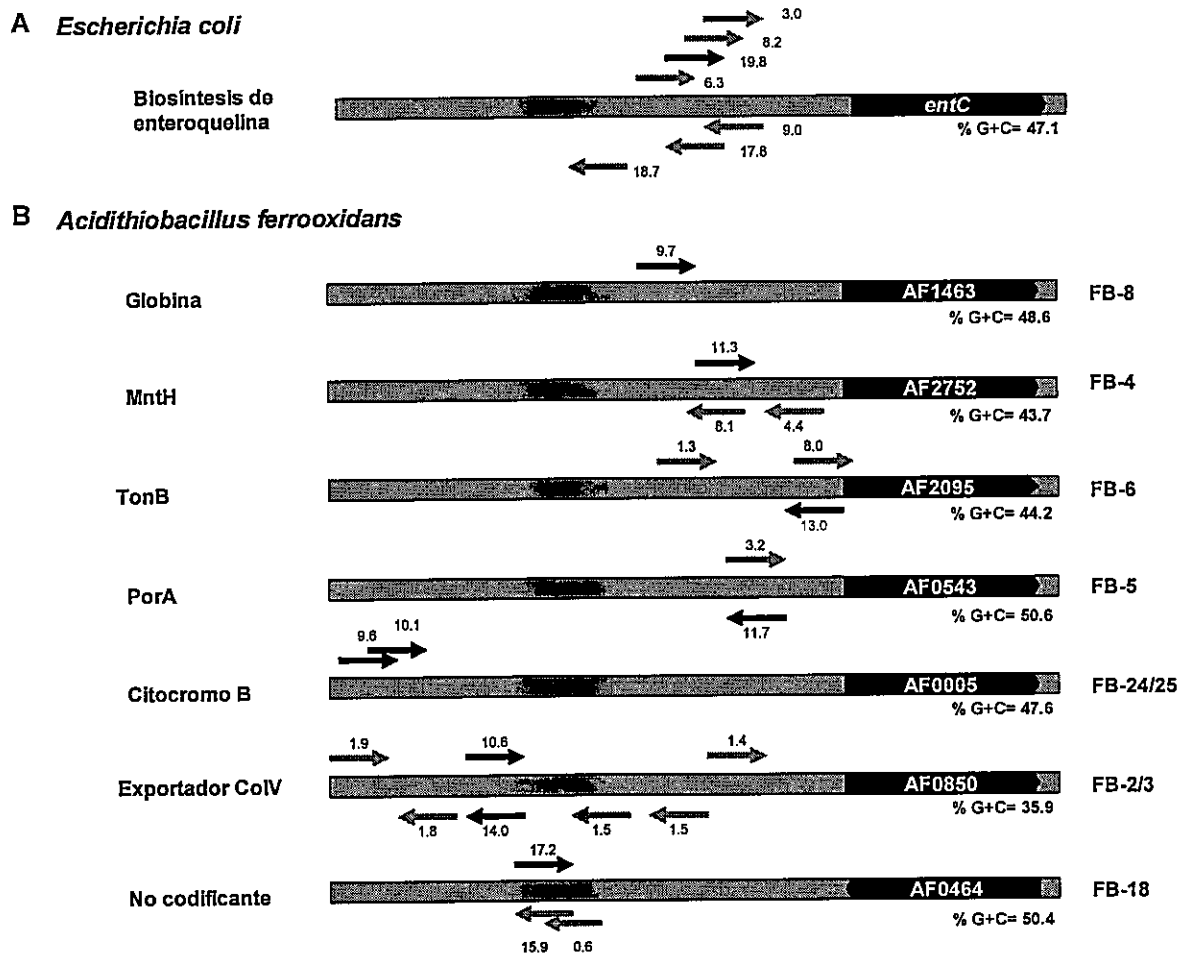


Figura 25. Organización superpuesta de cajas Fur en la región promotora de genes regulados por Fur en *A. ferrooxidans* según predicciones bioinformáticas. Se muestran las cajas de bajo puntaje (flechas en gris) en el entorno de las cajas Fur candidatas (flecha en negro); el valor asociado a las flechas corresponde al puntaje asignado a cada caja según su contenido de información. Se indica la función de los genes a izquierda y la designación de las cajas a derecha.

El programa de predicción de cajas, desarrollado en nuestro laboratorio, detectó en los promotores regulados por Fur de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *H. pylori* y *B. subtilis*, utilizados para validar la metodología de predicción, una serie de cajas Fur con menor contenido de información (bajo puntaje) superpuestas (en 3 o 6 nt) con la caja Fur de máximo puntaje (correspondiente a la caja utilizada para entrenar las matrices MEC y/o MCB) (Figura 25 A). Por el contrario, al evaluar la presencia de cajas de menor puntaje (utilizando ambas matrices) en el entorno de las cajas Fur más probables de *A. ferrooxidans*, sólo en contados casos fue posible comprobar superposición; de existir superposición ésta se limitó a unas pocas cajas (Figura 25 B) y aparece asociado a islas de bajo contenido de G+C y de baja complejidad de secuencia (datos no mostrados).

3.5.4. La Caja Fur Consenso de *A. ferrooxidans*

El alineamiento de las cajas con mayor contenido de información (puntaje >10 bits) y de regulación por Fur más probable, ya sea en función de la regulación hierro dependiente de sus ortólogos en otras bacterias o por tener alguna implicancia funcional aparente en la respuesta celular a hierro, permite derivar una secuencia consenso preliminar de la caja Fur en *A. ferrooxidans* (Figura 26 A y B).

La caja Fur consenso de *A. ferrooxidans* se ajusta moderadamente al consenso global de caja Fur, con 11 de las 19 posiciones conservadas de modo absoluto. Las variantes individuales identificadas en *A. ferrooxidans* presentan una mediana de 10 residuos idénticos al consenso global, y en ningún caso más de 14 nucleótidos idénticos a éste. En contraposición, la mediana de la distribución de las cajas demostradas experimentalmente en *E. coli* y *P. aeruginosa* es 14 (calculado a partir de Ochsner & Vasil, 1996 y Stojiljkovic, 1994), pero existen microorganismos donde las posiciones conservadas varían entre 7 y 13 (Thompson y col., 2002). Sin embargo, el consenso derivado para *A.*

ferrooxidans conserva mayoritariamente las posiciones correspondientes a los nucleótidos implicados en el contacto DNA-proteína descritos por Escolar y col. (1998) (Figura 26 C).

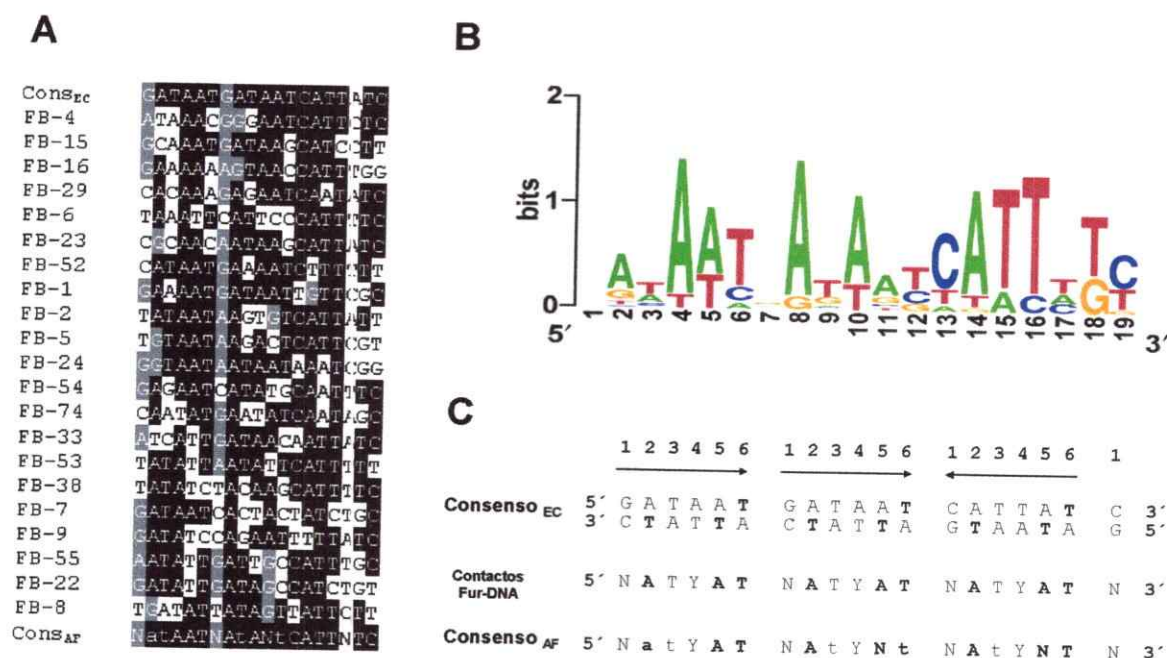


Figura 26. Consenso de caja Fur de *A. ferrooxidans* (A) Alineamiento de las 21 cajas Fur más probables identificadas en *A. ferrooxidans* por FURTA y por predicción bioinformática. (B) Esquema LOGOS del Consenso de caja Fur derivado para *A. ferrooxidans*. La frecuencia del nucleótido en cada posición de la caja se indica en bits. (C) Conservación de los nucleótidos teóricamente implicados en el contacto Fur-DNA según Escolar y col., 1998. Las posiciones relevantes se presentan en negritas.

4. DISCUSION

4.1. Un Modelo de la Respuesta de Homeostasis de Hierro en *A. ferrooxidans*

El análisis bioinformático de la secuencia del genoma de *A. ferrooxidans* reveló la presencia de una variedad de genes asociados a funciones de transporte y almacenamiento de hierro, además de varios reguladores de la familia Fur. Por analogía con otros sistemas conocidos, estos genes funcionarían de modo conjunto y coordinado para permitir a *A. ferrooxidans* balancear los requerimientos biosintéticos-bioenergéticos frente a las variaciones en la biodisponibilidad de hierro, asociada a las múltiples posibles condiciones de crecimiento de esta bacteria (Rawlings y col., 2002). Aunque las predicciones derivadas de este análisis requieren de verificación experimental se pueden inferir ciertos aspectos de la respuesta de homeostasis de hierro en *A. ferrooxidans* (Figura 27).

Se ha sugerido que las bacterias ácido tolerantes podrían encontrarse frente a suficiente cantidad de hierro soluble, como para cubrir los requerimientos metabólicos sin la necesidad de recurrir a las complejas estrategias propias de los microorganismos aeróbicos y neutrófilos que necesitan resolver el problema de la limitación de hierro (Hantke, 2001). La presencia en el genoma de *A. ferrooxidans* de un sistema de adquisición de FeII tipo FeoB, involucrado en la asimilación directa del ión en sistemas anaerobios donde el FeII es estable y suficientemente soluble, sugiere que este transportador podría funcionar de modo análogo para transportar el FeII soluble durante el crecimiento de *A. ferrooxidans* en condiciones de acidez extrema. También podrían participar en el transporte directo de hierro bajo condiciones ácidas las dos ATPasas tipo NRAMP detectadas en su genoma (Saier, 2000).

pH 1,6

pH 5,0

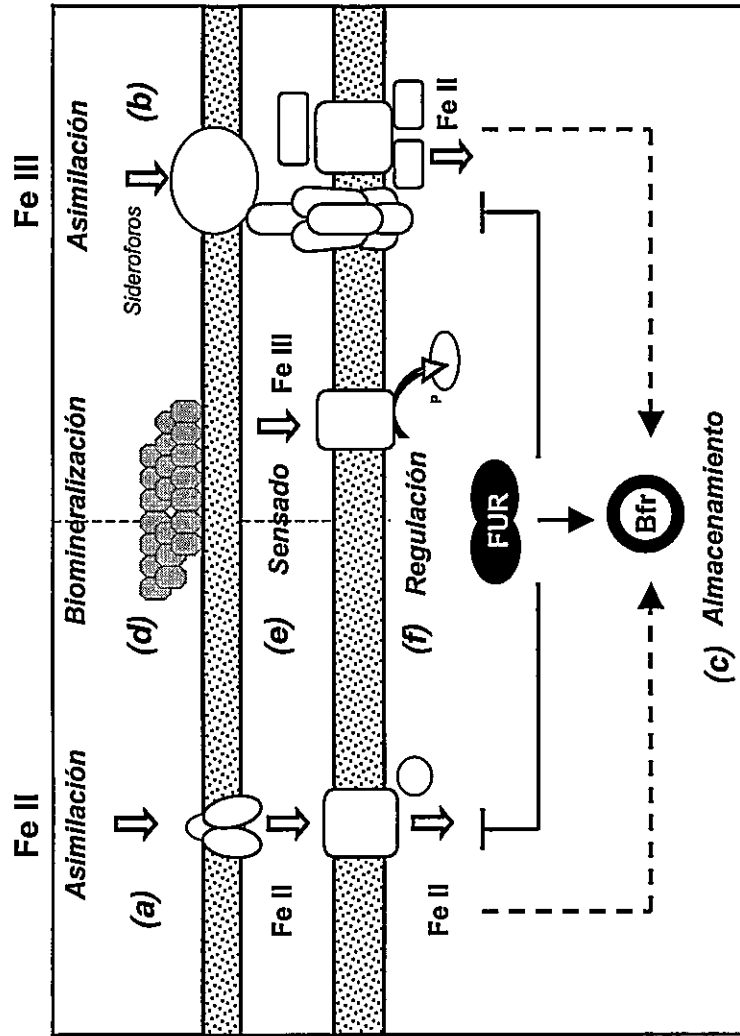


Figura 27. Modelo de la respuesta de homeostasis de hierro en *A. ferrooxidans*. Sistemas de adquisición de hierro (a) en estado ferroso ó (b) férrico asociado a sideroforos, conferirían a *A.ferrooxidans* la capacidad cubrir sus requerimientos biosintéticos de hierro en presencia de altas y bajas concentraciones de hierro condicionadas por el pH y la disponibilidad de O_2 del medio. Durante el crecimiento en condiciones de alta disponibilidad de hierro, sistemas de almacenamiento de hierro (c) intracelular y (d) extracelular acumularían el metal para cubrir los requerimientos de hierro asociados a periodos de limitación y/o disminuir los efectos deletéreos asociados a excesos intracelulares del metal. En respuesta a la presencia/ausencia de hierro en el ambiente, sistemas de regulación sensibles a la concentración (e) extracitoplasmática ó (f) citoplasmática coordinan la expresión de metaloproteínas, sistemas de almacenamiento y transporte de hierro.

La presencia de cajas Fur asociadas a ambos sistemas es consecuente con su participación en la adquisición controlada del metal.

La inclusión en el operón FeoAB de un gen codificante para una porina, permite especular acerca de su participación en el transporte de hierro o de alguna forma complejada de éste, desde el espacio extracelular. Se ha descrito que porinas sustrato específicas tipo OprB, similares a la detectada en *A. ferrooxidans*, presentan alguna selectividad por iones, transportando el ortólogo OprB de *P. aeruginosa* aniones y el de *P. putida* cationes (Wylie y col., 1993).

Por otro lado, la presencia de sistemas de adquisición de hierro en estado férrico asociado a sideróforos, conferiría a *A. ferrooxidans* la capacidad de cubrir sus requerimientos biosintéticos en condiciones de limitación del metal, posiblemente durante el crecimiento de la bacteria en azufre o en condiciones de pH fuera de su rango óptimo. A semejanza de otros microorganismos capaces de recuperar FeIII complejado a sideróforos, *A. ferrooxidans* codifica para receptores de membrana externa dependientes de TonB con afinidad por distintos tipos químicos de sideróforos, para transportadores de membrana interna de tipo ABC y para sistemas de transducción de energía entre membranas. Es interesante destacar que la inspección del genoma de *A. ferrooxidans* no permitió identificar proteínas involucradas en la biosíntesis de los principales sideróforos descritos en *E. coli* y otros microorganismos.

Aun cuando la mayoría de las bacterias presenta una diversidad de receptores con afinidad por distintos tipos de sideróforos ya sean endógenos o exógenos (ej: *E. coli* seis; *P. aeruginosa*: veintitrés), resultó inesperado detectar tal abundancia y diversidad de receptores en un microorganismo acidófilo como *A. ferrooxidans*, el cual podría, especulativamente, prescindir de este tipo de mecanismo de transporte de alta afinidad. El análisis de la secuencia aminoacídica predicha y de algunos parámetros bioquímicos calculados en base a ésta, revela que mientras bacterias neutrófilas, como *E. coli* y *P.*

aeruginosa presentan receptores con puntos isoeléctricos en el rango neutro (6-7), varios de los receptores de *A. ferrooxidans* poseen puntos isoeléctricos en un rango amplio que van desde levemente ácidos ($pI=6,5$) a francamente básicos ($pI=9,4$). Este aspecto, sumado al hecho que los receptores de bacteria acidófila *H. pylori* (únicamente 4 receptores con afinidad por dicitrato) también presenten puntos isoeléctricos superiores a ocho, es consistente con que tal característica sería el reflejo de adaptaciones propias de microorganismos de ambientes ácidos en la adquisición de ferri-sideróforos.

Adicionalmente, llaman la atención ciertos aspectos algo inusuales en cuanto a la organización génica de algunos de los elementos involucrados en el transporte de hierro, entre ellos: la estrecha asociación entre el gen codificante para una proteína de tipo globina y el operón principal de transporte de sideróforos, y la presencia de proteínas de la capa S adyacentes a receptores de sideróforos y distancias que propician su consideración como operones.

La globina pertenece a la subfamilia de hemoglobinas truncadas, identificadas en una gran variedad de organismos (Watts y col., 2001) cuyo rol aunque poco definido, se diferenciaría del clásico rol de almacenamiento y transporte de O_2 atribuido a otras globinas (Wittenberg y col., 2002). La asociación de un gen de tipo globina a genes de transporte de sideróforos no ha sido reportada a la fecha en ninguna bacteria, y tal organización no parece estar conservada en los genomas reportados en base de datos. En relación a su nuevo contexto genético, la globina de *A. ferrooxidans* podría operar como sensor de oxígeno y disminuir los riesgos asociados a la presencia simultánea de hierro y oxígeno a nivel intracelular, o bien podría sensar los niveles de hierro por titulación de grupos hemo y regular en consecuencia su propia expresión y la del operón asociado.

Por otro lado, el estrecho ligamiento entre genes codificantes para proteínas de la capa S y genes relacionados con el transporte de sideróforos es sugerente. Aunque se han atribuido papeles funcionales diversos a las proteínas de la capa S de diferentes

microorganismos, que van desde protección inmune y adhesión en patógenos hasta localización y concentración de enzimas extracelulares (Sàra & Sleytr, 2000), no existe evidencia previa que indique la participación de estas proteínas en el transporte de hierro. Sin embargo, se ha descrito que la capa S de *Synechococcus* funciona como molde para la mineralización de calcio y sulfato, y que su recambio preserva la integridad de la envoltura celular (Shenton y col., 1997; Schultze-Lam y col., 1992). Así mismo, el hecho de que la capa S de cianobacterias induzca la precipitación de minerales (celestita y strontianita) sugiere que ésta podría operar como matriz de inmovilización de metales asociados a la disposición regular de grupos funcionales afines por cationes divalentes (grupos carboxilo, hidroxilo y amino) tanto del látice como de los poros (Schultze-Lam & Beveridge, 1994). Adicionalmente, existe evidencia de que la capa S favorecería la unión de porfirinas (Garduno y col., 1995). Por lo tanto, se considera la posibilidad de que las proteínas de *A. ferrooxidans* participen en la acumulación/liberación de hierro a nivel de superficie extracelular asociada a precipitados de fosfato férrico o hidróxidos férricos acomplejados a proteínas de la capa S.

Adicionalmente, *A. ferrooxidans* poseería la capacidad de generar reservas intracelulares de hierro en virtud de la presencia en su genoma de una proteína de almacenamiento tipo bacterioferritina. Así, durante el crecimiento en condiciones de alta disponibilidad de hierro, sistemas de almacenamiento de hierro intracelular y extracelular acumularían el metal para cubrir los requerimientos de hierro asociados a periodos de limitación y/o disminuir los efectos deletéreos asociados a excesos intracelulares del metal. Cabe mencionar sin embargo, que a diferencia de las ferritinas que almacenan alrededor del 50% del hierro total durante el crecimiento bacteriano en condiciones de suficiencia de hierro (Abdul-Tehrani y col., 1999), el rol fisiológico de las bacterioferritinas y de los grupos hemo asociados a su estructura es menos claro (Andrews, 1998) y en algunos sistemas como *E. coli* o *Brucella melitensis* esta proteína no sería esencial en el almacenamiento de

hierro (Denoel y col., 1998). La importancia de esta proteína en *A. ferrooxidans* se desconoce.

Se identificaron en el genoma de *A. ferrooxidans* tres reguladores de la familia Fur. Dos de ellos, si bien conservan los residuos implicados en la unión del cofactor metálico y la organización estructural del motivo HTH de unión a DNA, claramente se han diferenciado funcionalmente del prototipo de la familia implicado en la regulación hierro dependiente. Por el momento, su función sólo puede ser sugerida en base a similitud de secuencia y conservación del contexto genético. Uno de los ortólogos pertenecería a la subfamilia de reguladores Per, encargados de controlar la expresión de funciones de tipo antioxidantes en una variedad de bacterias. En *A. ferrooxidans* este regulador controlaría la expresión del gen de la peroxidasa inmediatamente adyacente. Por su parte, el segundo ortólogo puede ser adjudicado en función de una gran conservación a nivel de secuencia aminoacídica global a una subfamilia de reguladores (Irr) descritos exclusivamente en α -proteobacterias, e involucrados en la regulación de la biosíntesis del grupo hemo.

A semejanza de otras bacterias, *A. ferrooxidans* cuenta con un regulador altamente conservado de la familia Fur, candidato a cumplir el rol de regulador central de la homeostasis de hierro en *A. ferrooxidans*. Su caracterización funcional así lo corrobora.

4.2. *A. ferrooxidans* Codifica para un Ortólogo del Regulador Fur

Sobre la base de una similitud de secuencia superior al 50 % respecto de los dos ortólogos de Fur mejor caracterizados, funcional y estructuralmente (Fur de *E. coli* y Fur de *P. aeruginosa*), se identificó en el genoma de *A. ferrooxidans* un posible ortólogo de este regulador. La conservación de varios motivos funcionales específicos sustenta su asignación a la subfamilia de reguladores Fur de respuesta a hierro (Figura 28 A).

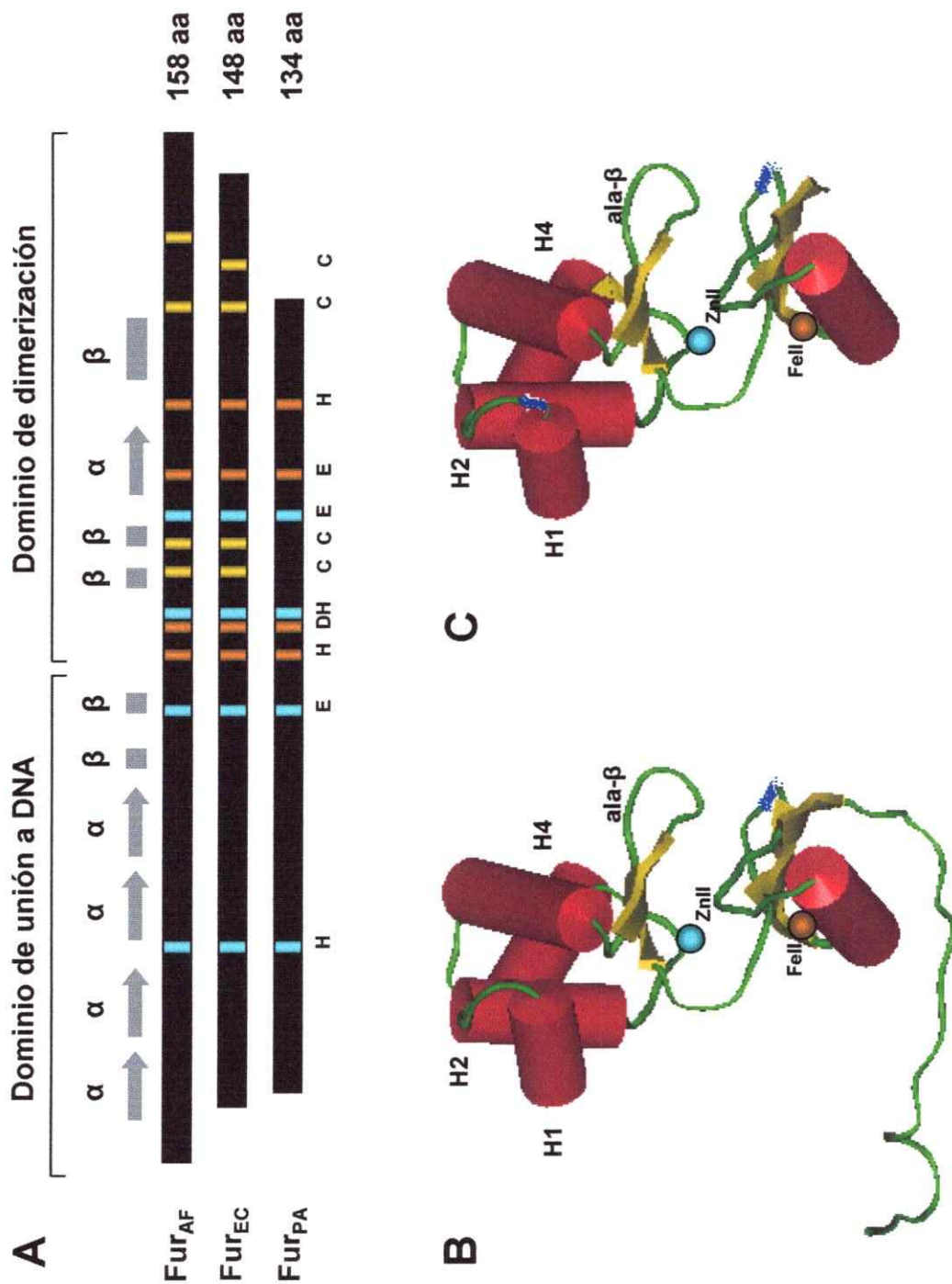


Figura 28. Modelo Estructural de Fur_{Fe} en base a la estructura cristalográfica de Fur de *P. aeruginosa*, generado con MODELLER (A) Esquema de los dominios, residuos y motivos funcionales de la proteína Fur de *A. ferrooxidans* (Fur_{AF}), *E. coli* (Fur_{EC}) y *P. aeruginosa* (Fur_{PA}). En la línea superior se indica la estructura secundaria consenso para las tres proteínas. Se destacan los residuos implicados en la coordinación del corresponsor FeIII (naranja) y del átomo estructural ZnII (celeste) según Fur_{PA} (Pohl et al., 2003). (B) Modelo de la proteína Fur_{Fe} de *A. ferrooxidans* (158aa). (C) Modelo del fragmento comprendido entre los residuos 6 y 134 de la proteína Fur de *A. ferrooxidans* (Truncada)

En base a la organización comparable a nivel de estructura secundaria entre el regulador Fur de *P. aeruginosa* y de *A. ferrooxidans* ha sido posible generar un modelo estructural para la proteína de esta bacteria (Figura 28). El modelo comprueba la conservación e idéntica disposición espacial de los residuos implicados en la unión del correpresor (H₉₀ D₉₂ E₁₁₁ H₁₂₈), generando una esfera de coordinación octahédrica para el átomo de hierro, localizada enteramente en el dominio de dimerización de la proteína. Se aprecia también, la organización comparable del sitio de coordinación del átomo estructural de ZnII propuesto para el ortólogo de *P. aeruginosa*, implicando a dos residuos del dominio N-terminal de unión a DNA (H₃₆ E₈₄) y dos residuos pertenecientes al dominio de dimerización (H₉₃ E₁₀₄). El entorno tetrahédrico regular generado por las cadenas laterales de estos cuatro residuos sitúa al ZnII entre los dominios del monómero y es consecuente con el papel estructural atribuido a este átomo.

La ubicación del par C₉₆-C₉₉, propuesto en el grupo de ortólogos semejantes a Fur de *E. coli* como responsable de la coordinación del ZnII, se localiza en el modelo de la proteína Fur de *A. ferrooxidans* alejado del entorno de coordinación sugerido para el ZnII según la estructura cristalina de *P. aeruginosa*. Esta discrepancia no puede ser resuelta hasta que se cristalice un ortólogo más similar a Fur de *E. coli*, que incluya los cuatro residuos cisteína presentes en la mayoría de las proteínas de la familia y la extensión C-terminal faltante en los ortólogos semejantes a Fur de *P. aeruginosa*. Esta extensión, es en el caso del ortólogo de *A. ferrooxidans* de 20 aminoácidos y carece de estructura secundaria (Figura 28 C).

4.3. El Regulador Fur_{Fe} de *A. ferrooxidans* es Funcional en *E. coli*.

En virtud de que la proteína predicha para el gen *fur* de *A. ferrooxidans* demostró poseer un alto nivel de conservación del motivo implicado en la unión a DNA respecto del ortólogo de *E. coli*, además de todos los residuos que participan en la coordinación del metal estructural y del cofactor de regulación, se investigó su capacidad de funcionar como represor dependiente de hierro en las cepas *fur*⁻ de *E. coli* H1780 y H1681 (Hantke, 1987).

Cuando la proteína Fur de *A. ferrooxidans* fue expresada en *E. coli* a los niveles silvestres característicos de esta bacteria (Zheng y col., 1999), ya sea a partir de un protomor artificial idóneo (pFur3) o a partir de su promotor original (pFur4), ésta reprime eficientemente la expresión del gen reportero *lacZ*, desde los promotores *fiu* y *fhuF* en respuesta a hierro. La capacidad de complementar la deficiencia del regulador en *E. coli* demuestran, en primer lugar, que la proteína Fur de *A. ferrooxidans* es funcional. Indirectamente, estos resultados indican que Fur de *A. ferrooxidans* es capaz de sensar el cofactor, activarse en respuesta a hierro y unirse específicamente a, al menos, dos cajas Fur de *E. coli*. Experimentos de unión *in vitro* permitieron corroborar la autenticidad y especificidad de esta interacción. Así, la conservación del motivo HTH, la capacidad de unión a una caja conservada de *E. coli in vitro* y la capacidad de reprimir un gen blanco de Fur de *E. coli in vivo* sugieren que este regulador funcionaría en *A. ferrooxidans* de modo análogo al descrito en *E. coli*.

Adicionalmente, este resultado indica que ninguna de las dos variaciones de secuencia detectadas en el ortólogo de Fur de *A. ferrooxidans*, ya sea la sustitución E40G en el motivo HTH o el inusual espaciamiento entre cisteínas (CX₈C) C-terminales, perturba la capacidad funcional de esta proteína. No se puede descartar *a priori*, sin embargo, que estas diferencias tengan un significado funcional en *A. ferrooxidans*.

4.4. El Motivo CX₈C de Fur_{Fe} Afecta la Polimerización

A excepción de un pequeño grupo de ortólogos de Fur entre los que se cuenta Fur de *P. aeruginosa* y que son truncos en su extremo C-terminal, en todos los miembros de la familia Fur existe en este dominio un segundo motivo CXC de espaciamiento más o menos conservado (CX₂C, CX₄C, CX₅C). Fur de *A. ferrooxidans* se diferencia de los ortólogos reportados en base de datos en esta característica, presentado un espaciamiento algo atípico (CX₈C). En los miembros que poseen el segundo motivo CXC, la sustitución de las cisteínas por alanina resulta en la total desrepresión de los genes blancos y en la ausencia de la proteína en extractos inmunoprecipitados (Bsat & Helmann, 1999; Coy y col., 1994). Aunque el rol de estas cisteínas no ha sido claramente definido, evidencia de variada índole permite involucrar al motivo CXC en la interacción proteína-proteína asociada a los eventos de polimerización de Fur.

Por un lado, la unión del correpresor induce cambios conformacionales en la proteína, tanto a nivel del dominio de unión a DNA como del dominio C-terminal. Con la ocupación del segundo sitio de unión a metales (para el metal regulador), la proteína Fur de *E. coli* adquiere la capacidad de polimerizar sobre el DNA (Althaus y col., 1999) y paralelamente la cola C-terminal (G₁₃₀-K₁₄₇) se vuelve menos accesible al solvente (Gonzales de Perédo y col., 2001). Por otra parte, la evidencia generada para el represor Fur de *Anabaena* involucra de modo directo a las cisteínas del motivo C-terminal en la formación de oligómeros, por cuanto este evento demostró ser dependiente del estado redox de las cisteínas (Hernández y col., 2002).

El producto de la quimera Ec-Af, que fusiona la mayor parte de la proteína Fur de *E. coli* con el extremo C-terminal del ortólogo de *A. ferrooxidans* (CX₈C), aunque estable como proteína, no fue capaz de reprimir el promotor *fiu* en presencia de hierro al ser expresado en *E. coli*. Puesto que los niveles de actividad β-Gal manifestados en el clon portador de esta construcción fueron equivalentes a los del mutante *fur*⁻ se infiere que la fusión

perturba la capacidad de la proteína de unir el correpresor o bien afecta su capacidad de polimerizar para reprimir su promotor blanco. Esta fusión intercambia la cola C-terminal de Fur de *E. coli* por la de *A. ferrooxidans*, detrás del punto donde la mayoría de los ortólogos de Fur pierden similitud. La proteína sintetizada por la quimera Ec-Af es idéntica a la proteína silvestre de *E. coli* en todo el segmento que incluye los motivos de unión a DNA y a metales. Por otra parte, este segmento se corresponde en longitud con la totalidad de la proteína Fur de los miembros carboxi-truncos de la familia (ej, Fur de *P. aeruginosa*) (Figura 28 A).

Según el modelo estructural generado para una versión truncada de Fur de *A. ferrooxidans* (aa 5-134), en base a la estructura cristalográfica de la proteína Fur de *P. aeruginosa*, la cola C-terminal presente en las proteínas Fur silvestres de *E. coli* y de *A. ferrooxidans* o en el producto quimerico de ambas, Ec-Af, no afectaría *a priori* la disposición espacial de los residuos y motivos funcionales del represor (Figura 28 C).

Puesto que el dominio C-terminal de Fur ha sido implicado en la dimerización (Pohl y col., 2003; Holm y col., 1994; Stojilkovic & Hantke, 1985) y formación de oligómeros de orden superior (Delany y col., 2002; Frechon & Le Cam, 1994; Le Cam y col., 1994) se favorece la idea de que la incapacidad de la quimera de reprimir un promotor dependiente de Fur respondería a la perturbación de su capacidad de polimerizar.

En virtud de los patrones de protección del DNA por Fur (Escolar y col., 2000; Ochsner & Vasil, 1996) y de la organización repetitiva de los sitios de unión a DNA del represor (Escolar y col., 1998), se ha propuesto el modo de interacción del represor con el DNA a partir del modelo estructural de Fur de *P. aeruginosa* (Pohl y col., 2003). Según este modelo la caja básica (3 hexámeros) es unida por dos dímeros en cara opuestas de la doble hebra de DNA. Ambos dímeros se superponen a nivel del hexámero central. En presencia de mayor número de repetidos a nivel del DNA, el modelo propone un arreglo secuencial de dímeros separados por 5 bases.

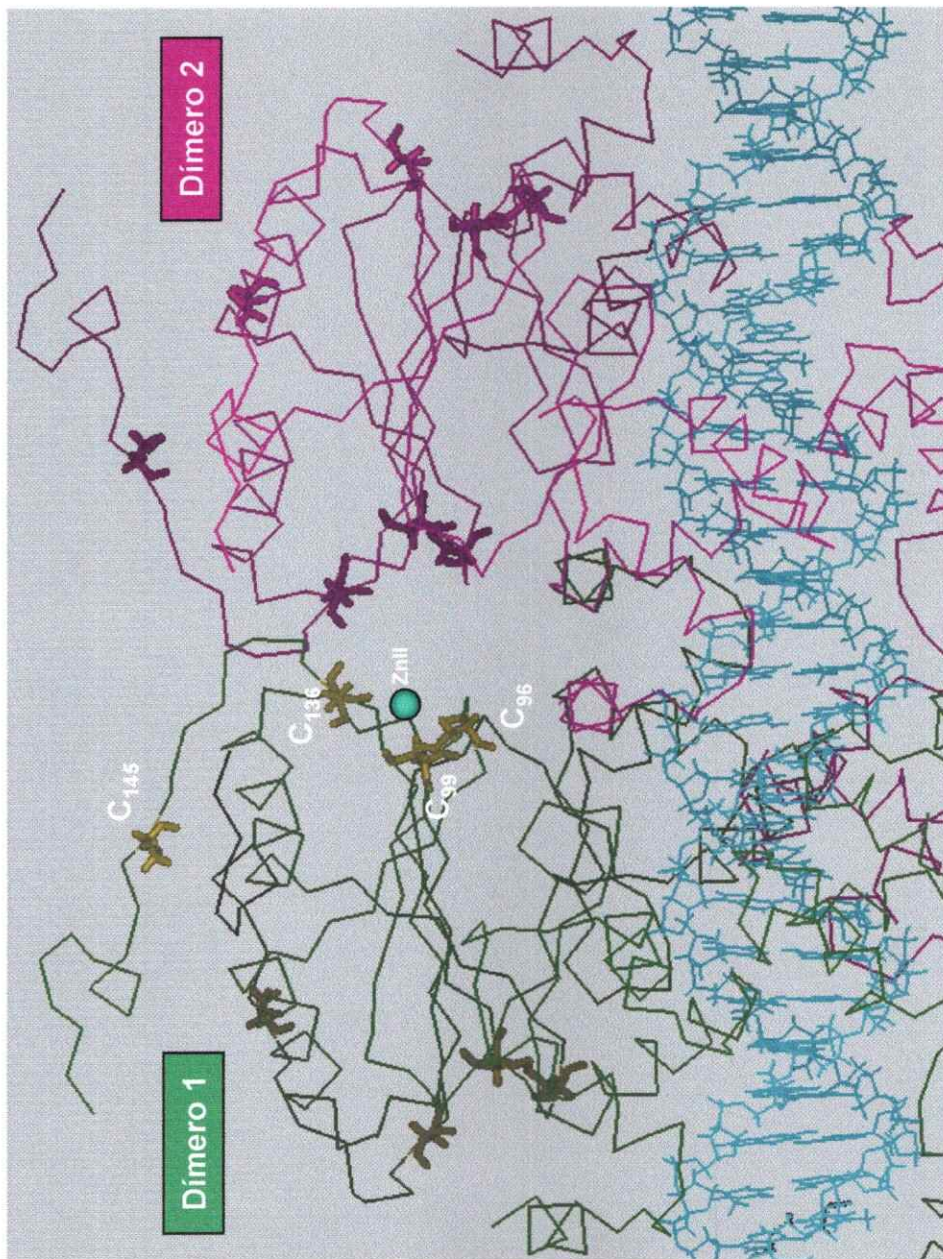


Figura 29. Modelo de la interacción Fur_{Fe} DNA. Acoplamiento de dos dímeros de Fur de *A. ferrooxidans* sobre una molécula de DNA-B (repetición de la caja Fur consenso). La imagen está centrada en la interfase entre dos dímeros adyacentes. Se indican los motivos CXC-I (C96-C99) y CXC-II (C136-C145) de Fur de *A. ferrooxidans* y el átomo de ZnII coordinado por estos residuos.

Sobre la base de este arreglo, se efectuó el "docking" del modelo estructural generado para Fur de *A. ferrooxidans* al DNA (Figura 29). Resulta aparente, en este contexto, que las cuatro cisteínas de cada monómero de Fur podrían participar en la coordinación tetraédrica de un segundo átomo de ZnII a nivel de la interfase entre dos dímeros. Esta interacción aproximaría la cola C-terminal al extremo N-terminal del dímero de Fur inmediatamente adyacente ó incluso al DNA.

Del alineamiento entre ortólogos de Fur se desprende que las porciones más variables de la proteína son los extremos N- y C-terminales, no sólo en cuanto a secuencia, sino también en tamaño. Si tal divergencia se ha seleccionado en forma paralela, de modo de compensar cambios puntuales entre los respectivos extremos N- y C-terminales para preservar la capacidad de interacción proteína-proteína, el efecto de intercambiar los extremos entre estos dos ortólogos de Fur (Fur_{EC} y Fur_{AF}), o eventualmente cualquier otro par, afectaría la capacidad de la proteína de polimerizar o de estabilizar el polímero.

4.5. Fur de *A. ferrooxidans* Activa la Expresión Génica en *E. coli* Cuando se Expresa a Bajas Concentraciones.

En presencia de bajos títulos de Fur de *A. ferrooxidans* en las cepas reporteras de *E. coli*, la actividad β -galactosidasa aumentó su expresión 20 veces respecto del valor reprimido en presencia de hierro, desde los promotores dependientes de Fur *fiu* y *fhuF*. Este cambio en la actividad representa un aumento neto de la expresión del reportero de dos veces el nivel desreprimido, e indica que a bajas títulos celulares, Fur de *A. ferrooxidans* se comporta como activador de la expresión génica. Corroborando esta observación, y haciendo su efecto extensivo a otros promotores regulados por Fur, la presencia de bajos títulos del regulador de *A. ferrooxidans* exacerban la sensibilidad de la mutante *fur*⁻ de *E. coli* a estrés oxidativo por H₂O₂.

Evidencia de variada índole destaca la importancia funcional de los altos títulos celulares del regulador Fur. Por un lado, se requiere una gran cantidad de proteína para reprimir la expresión de los muchos genes que constituyen el regulón Fur y por otro, el mecanismo inherente de represión por Fur involucra polimerización de un número variable de dímeros a nivel del promotor de cada uno de los genes blanco (Escolar y col., 1998; Frechon y col., 1994; Le Cam y col., 1994).

Mientras que numerosos estudios respaldan la observación de que en ausencia total del represor Fur se produce la desrepresión generalizada de los genes blanco, pocos estudios presentan antecedentes acerca de los efectos de la perturbación en los títulos del represor. Se ha descrito la existencia de un mutante de *V. anguillarum* que lleva una sustitución del codón AUG de inicio de la traducción por AUU (Tomalsky y col., 1994) y de un mutante no estructural de *P. aeruginosa* (Barton y col., 1996), que presentan niveles disminuidos de expresión del represor Fur. En ambos casos, el efecto fenotípico de la disminución de los niveles celulares de Fur ha sido interpretado como desrepresión de los genes blanco evaluados, aún cuando los valores reportados manifiestan un aumento por sobre el valor desreprimido y comparable al obtenido en este estudio.

Estimaciones derivadas a partir de ensayos de inmunoprecipitación de Fur de *A. ferrooxidans* indican que la construcción activadora (pFur1) expresa unas 1000 veces menos represor que un cultivo logarítmico de *E. coli* (valores teóricos: 5000 Fur/célula). La baja expresión de Fur_{Fe} respondería a la ineficiente capacidad traduccional de la construcción pFur1. Tal efecto, por su parte, estaría asociado a la mayor estabilidad de una horquilla que compromete la región de inicio de la traducción (RIT) en el transcrito del gen *fur* de *A. ferrooxidans*. La estabilidad de la estructura predicha es comparable a los valores reportados como causal de la disminución en varios órdenes de magnitud de los niveles de expresión de varios genes y/o construcciones sintéticas (de Smith & van Duin, 1990; Gross y col., 1990).

El hecho que la expresión de Fur_{AF} en *E. coli* a bajos títulos de proteína aumentara dramáticamente la sensibilidad de la mutante *fur*⁻ de *E. coli* frente a estrés oxidativo se interpretó como una indicación más de su capacidad activadora. La mutación del gen *fur* en *E. coli* exacerba la sensibilidad de la célula a agentes exógenos de estrés oxidativo, en virtud del aumento en los niveles citoplasmáticos de hierro (Keyer & Imlay, 1996; Touati y col., 1995). Por el contrario, la expresión a niveles silvestres del represor Fur de *E. coli* provee protección frente a H₂O₂ tanto al titular el hierro citoplasmático como al regular la expresión de genes de homeostasis de hierro y defensas antioxidantes.

La consecuencia obvia de la expresión disminuida del represor Fur sería entonces un aumento relativo en los niveles citoplasmáticos de hierro, por el simple hecho de que existe menos represor disponible para titular el metal, y especulativamente también por una reducida capacidad de represión de los múltiples genes de adquisición de hierro codificados en *E. coli*. Sin embargo, la sensibilidad aumentada a H₂O₂ del mutante *fur*⁻ expresando bajos títulos de Fur no puede sino ser explicable por un efecto de inducción generalizado de los usuales blancos de represión por Fur.

4.6. El Efecto Activador Podría Involucrar a la Caja Fur

Puesto que el efecto activador de Fur de *A. ferrooxidans* en *E. coli* se manifestó sobre dos promotores dependientes de Fur y parece ser extensivo a un número indefinido de genes asociados al metabolismo de este metal, surge la pregunta acerca de cual es el mecanismo molecular subyacente a tal repuesta. Esta pregunta es especialmente interesante bajo la evidencia acumulada a la fecha en relación a la activación génica mediada por Fur. Mientras que el mecanismo de represión por Fur es bien comprendido y está conservado en distintos microorganismos, el mecanismo de activación mediado por este regulador permanece obscuro.

En *E. coli* se ha señalado que la regulación positiva por Fur responde a mecanismos post-transcripcionales de tipo antisentido (Massé & Gottesman, 2002) y que es independiente de cajas Fur (Touati, 2001). Por el contrario, evidencia generada en *H. pylori*, en relación a un promotor inducido por hierro demuestra interacción directa entre el regulador y cajas Fur asociadas a la región promotora del gen *pfr* (Delany y col., 2001b). En este caso, sin embargo, la forma apo de la proteína Fur actúa como represor y la activación observada es la resultante de la desrepresión del promotor en presencia del metal. Adicionalmente, tanto en *S. typhimurium* como *H. pylori*, Fur induce la expresión de un conjunto de genes involucrados en la respuesta de tolerancia a ácido, de modo independiente de hierro y a través de una serie de secuencias operadoras aún no caracterizadas (Bijlsma y col., 2002; Hall & Foster, 1996). En base a estos antecedentes Fur sigue siendo reconocido como represor y sus efectos positivos sobre ciertos promotores, considerados indirectos o independientes de cajas Fur. Sin embargo, es claro que no es posible hacer generalizaciones acerca de la regulación positiva Fur-dependiente, puesto que ésta no se ejerce a través de un único mecanismo.

Sumando complejidad al sistema, la evidencia generada en este trabajo y los antecedentes publicados para dos mutantes no estructurales de Fur de *V. anguillarum* (Tolmasky y col., 1994) y *P. aeruginosa* (Barton y col., 1996), sugerirían que Fur puede también inducir la expresión génica a través de la interacción entre la proteína y las cajas Fur (o algún otro elemento no identificado asociado a sus promotores blanco), cuando el regulador se expresa a bajos títulos.

Una respuesta antagónica, descrita para el gen *fur* de *H. pylori*, respalda esta proposición. En este caso, es el aumento en la expresión del represor Fur por sobre sus niveles silvestres que resulta en una mayor represión del gen *fur* (Delany y col., 2002). Consecuentemente, es posible argumentar que la respuesta mediada por Fur sobre sus

genes blanco depende, no solo de la concentración de hierro como se acepta habitualmente, sino también de sus propios títulos celulares.

4.7. Represión o Activación de la Expresión Génica Según los Títulos de Fur y la Organización de los Promotores Blanco.

El mecanismo molecular subyacente, aunque desconocido, puede ser sugerido en base a la evidencia acumulada en los últimos años y relacionada por un lado con la caracterización estructural del regulador (Pohl y col., 2003; Althaus y col., 1999) y por otro con la evidente complejidad asociada a los sitios de regulación reconocidos por la proteína Fur (Delany y col., 2002; Delany y col., 2001a,b; Escolar y col., 2000).

A pesar de que existen diferencias especie-específicas, evidencia genética y bioquímica, señala que la proteína Fur es capaz de unirse a DNA tanto en su forma mono (Zn_1Fur) como bi-metálica ($FeZnFur$ o Zn_2Fur), pero que sólo esta última puede polimerizar en torno del DNA blanco y ejercer represión de la expresión a nivel de promotor (Althaus y col., 1999).

Así, en presencia de altos títulos de Fur y de hierro, se formará suficiente complejo $FeZnFur$ capaz de reconocer y unirse específicamente a las distintas cajas Fur distribuidas en el genoma, de polimerizar en su entorno y de reprimir eficientemente la expresión de los genes blanco asociados (Figura 30 A). Por el contrario, en presencia de bajos títulos de la proteína, se formará complejo $FeZnFur$ limitado por la concentración del represor, frente a altas o bajas concentraciones del correpresor. En tal situación dos aspectos de la respuesta se verán afectados: por un lado la capacidad de cubrir los numerosos blancos de regulación y, por otro, la capacidad de polimerizar entorno de cada uno de ellos. Así, en presencia de concentraciones limitantes del complejo represor se hará evidente la organización jerárquica del regulón.

La evidencia acumulada entorno de los promotores dependientes de Fur en numerosos microorganismos indica que la organización de los mismos es diversa y compleja. Los distintos genes regulados por Fur pueden presentar cajas discretas, grupos de cajas superpuestas o incluso más de un grupo de cajas por promotor, con diferente afinidad relativa por el represor y diferente posición relativa a los elementos del promotor. Esta complejidad permite explicar cómo un regulador simple como Fur puede ejercer tal diversidad de tipos y grados de respuesta, y modular la expresión de una gran cantidad de genes blanco. En base a estos antecedentes y los resultados presentados en este trabajo, se propone un modelo que explica el mecanismo de represión y activación dependiente de la proteína Fur (Figura 30).

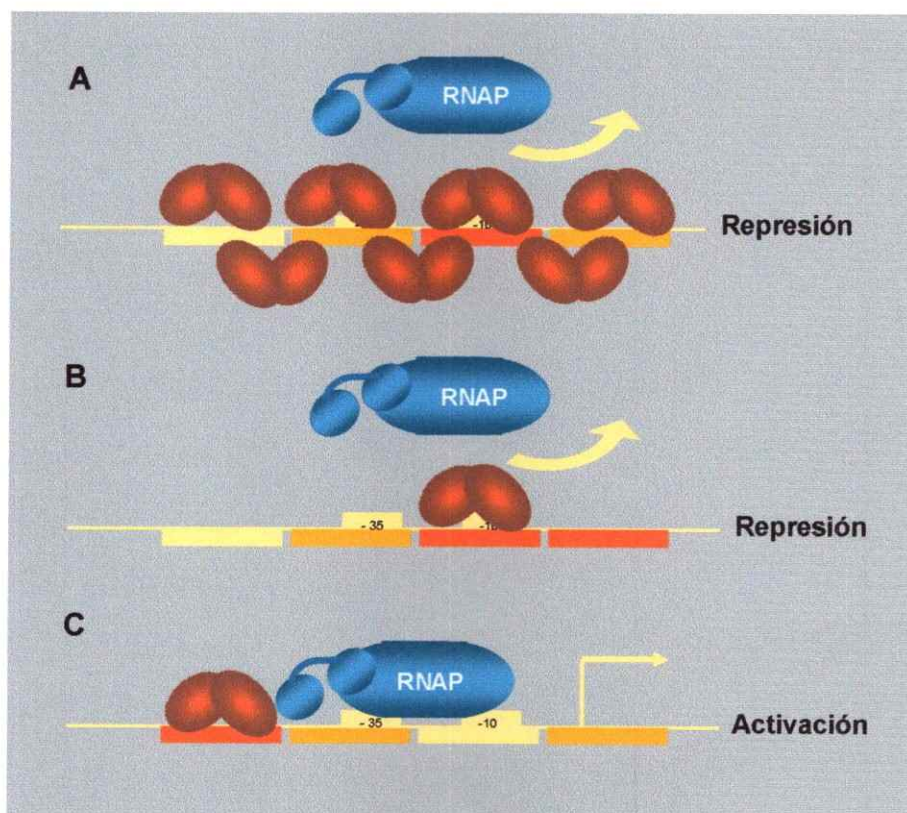


Figura 30. Modelo de regulación diferencial por Fur de *A. ferrooxidans* según los títulos del represor y la organización de los sitios operadores en relación a los elementos del promotor. (A) Represión en presencia de altos títulos del regulador y el metal corepresor, (B) Represión en presencia de bajos títulos del regulador activo, (C) Activación en presencia de bajos títulos del regulador activo. Caja Fur de alta afinidad por Fur (rojo), Caja Fur de baja afinidad por Fur (amarillo). Se indican los hexámeros -35 y -10 de los respectivos promotores.

Siendo el represor titulado preferentemente por aquellos promotores con sitios de alta afinidad por Fur, es posible entonces, que dependiendo de la organización específica de cada promotor, algunos de ellos sean reprimidos por el complejo FeZnFur limitante (Figura 30 B) y otros activados, si la unión de Fur favoreciera indirectamente o facilitara de modo directo el acceso de la RNAP al promotor, por ejemplo a través de la interacción con la subunidad α de la RNAP (Figura 30 C).

Durante la preparación de este manuscrito se ha presentado nueva evidencia en *H. pylori* que ejemplifica la complejidad de la arquitectura de los promotores regulados por Fur y apoya el modelo de activación aquí propuesto. En esta bacteria, Fur se autorregula modulando los niveles de proteína en respuesta a la presencia de hierro. La modulación se logra en virtud de la afinidad diferencial del regulador, en sus distintos estados metálicos (Zn1Fur vs FeZnFur), por tres sitios operadores asociados a su promotor.

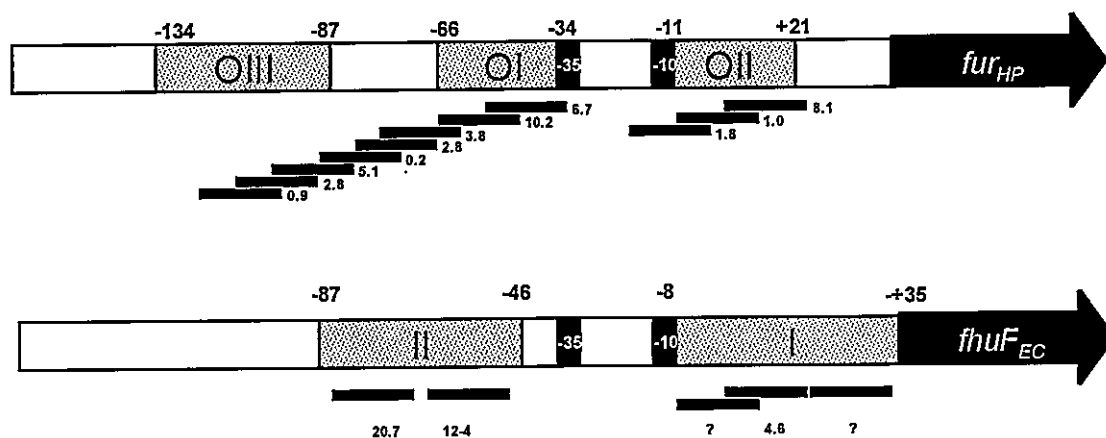


Figura 31. Arquitectura de los promotores dependientes de Fur. (A) Promotor P_{fur} de *H. pylori*, se indica la posición relativa al sitio de inicio de la transcripción de los operadores OI, OII y OIII según Delany y col. (2003). (B) P_{muF} de *E. coli*, se indica la posición relativa al sitio de inicio de la transcripción de las regiones protegidas por Fur frente a DNAsa I (Zheng y col., 2001b). En la línea inferior se presenta la localización de las cajas Fur predichas y su puntaje relativo al contenido de información.

El operador I (OI) se localiza inmediatamente río arriba del hexámero -35 de P_{fur} y constituye el sitio de represión en función de su mayor afinidad relativa por la forma activada del represor Fur (FeZnFur). El operador II (OII), de menor afinidad por el represor activo, se localiza sobre el hexámero -10 de P_{fur} . Su rol no ha sido claramente establecido pero probablemente funcionaría como marco de polimerización durante la represión del gen. El operador III (OIII), localizado entre la posición -87 y -134 de P_{fur} , constituiría un sitio de antirepresión, en virtud de su mayor afinidad relativa por la forma de Fur sin el correpresor. Según el modelo planteado por Delany y col. (2003), la ocupación de OIII vs OII determinaría la desrepresión en ausencia de hierro o la represión del gen en presencia del metal. Este mecanismo aseguraría la expresión del represor por encima de un nivel umbral crítico, necesario para su adecuado funcionamiento como represor hierro dependiente de un regulón complejo. Por debajo de este umbral, el operador I tendría la capacidad de funcionar como tercer elemento del promotor P_{fur} (elemento UP), uniendo el dominio C-terminal de la RNAP para inducir la transcripción y restituir los niveles de la proteína. Los antecedentes de activación de los genes *fiu* y *fhuF* de *E. coli* en presencia de bajos títulos del represor Fur de *A. ferrooxidans* son compatibles con esta interpretación, aunque sugieren que Fur media el contacto entre el sitio UP y la RNAP.

Al comparar la arquitectura del promotor P_{fur} de *H. pylori* con la organización del promotor *fhuF* de *E. coli* (cepa H1681) en función de los patrones de protección por Fur frente a DNAsal (Zheng y col., 2001b) y el análisis del contenido de información de P_{fhuF} , pueden apreciarse ciertas semejanzas (Figura 31). La región río arriba del hexámero -35 de P_{fhuF} coincide en localización relativa al promotor y en extensión, con el operador OI de P_{fur} , el cual actúa alternativamente como sitio de represión o elemento UP en *H. pylori*. En ambos casos, la caja predicha con mayor contenido de información localiza en este operador. Este análisis sugiere que el sitio río arriba del hexámero -35 de P_{fhuF} , podría

funcionar en la activación mediada por Fur de *A. ferrooxidans*, no como "elemento UP" sino como sitio de activación.

El modelo propuesto suma entonces a las ya reconocidas variables involucradas en el mecanismo de regulación por Fur (concentración de hierro y fuerza relativa), variaciones en la concentración del regulador Fur y otorga una mayor importancia a la localización relativa de las cajas Fur respecto de los elementos -10 y -35 de los diversos promotores blanco. En virtud de la evidencia obtenida en *A. ferrooxidans* que demuestra variación en los niveles de expresión del regulador Fur frente a variaciones en la concentración de hierro en el medio de crecimiento, el mecanismo sugerido podría ser especialmente relevante.

4.8. *A. ferrooxidans* Expresa el Regulador Fur en Azufre y sus Niveles en Hierro Disminuyen con un Aumento en la Concentración del Metal

Según el modelo clásico de regulación por Fur, la expresión del propio regulador es esencialmente constitutiva y de un alto nivel basal. Sin embargo, en algunas bacterias se han descrito variaciones en los títulos de Fur, asociadas al control autorregulatorio y hierro dependiente de su propio gen. Cabe destacar, que a diferencia del efecto todo o nada que ejerce Fur sobre la mayoría de sus promotores blanco, la regulación de su propio gen produce un cambio en el título de la proteína que alcanza como máximo una diferencia de 5 veces, entre la condición reprimida en presencia de hierro, y la desreprimida en carencia del metal (Delany y col., 2002, 2003).

El análisis de la expresión del regulador Fur en *A. ferrooxidans* indicó la presencia de niveles variables del represor según la carga de hierro en el medio de crecimiento. Sin embargo, la magnitud del cambio entre los niveles detectados en las condiciones de mayor (en azufre) y menor (en hierro) expresión es superior a lo descrito en otros sistemas. Por otro lado, el cambio en el título del represor de *A. ferrooxidans*, no pudo ser correlacionado

con un cambio en los niveles del mRNA. El gen se expresó a niveles comparables en ambas condiciones de crecimiento. Esta evidencia se condice con los antecedentes generados en el sistema heterólogo FURTA, que indicaron ausencia de una caja Fur conservada y/o reconocible por el represor de *E. coli*, en la región promotora de la transcripción del gen *fur* de *A. ferrooxidans*. En consecuencia, se favorece la idea de que la expresión variable de represor Fur en esta bacteria responde a algún tipo de mecanismo de control post-transcripcional.

Adicionalmente, al evaluar la expresión de la proteína a otras concentraciones de hierro, por sobre y por debajo de la concentración óptima de crecimiento de la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC23270 (200 mM FeSO₄), resultó evidente que la disminución en los títulos de la proteína Fur puede ser correlacionada con el incremento de la concentración inicial de hierro en el medio de crecimiento.

Se desconoce la causa o el factor responsable de tal variación, pero ciertamente abre nuevos interrogantes, no sólo respecto del mecanismo específico de regulación por Fur en *A. ferrooxidans* sino también en relación con el mecanismo general de regulación por Fur en bacterias. Existen antecedentes de expresión diferencial para un parálogo de Fur, el regulador Irr. En *B. japonicum* Irr es condicionalmente estable: se acumula en condiciones de limitación de hierro y se degrada cuando las células son expuestas al metal. Se ha planteado que la unión de un grupo hemo (Fe-porfirina) a un motivo específico N-terminal, desestabilizaría la proteína y la haría susceptible a degradación (Qi y col., 1999). La universalidad de este mecanismo es, sin embargo, cuestionable por cuanto el motivo implicado ha sido identificado exclusivamente en el regulador de *B. japonicum*. De todas formas, no se puede descartar que la integridad de la proteína Fur de *A. ferrooxidans* esté sometida a algún tipo de control condicional de la estabilidad, dependiente de hierro.

4.9. Existen en el Genoma de *A. ferrooxidans* Cajas Fur de Baja Identidad y Diferente Organización Respecto de Otras Bacterias

La presencia en diversos genomas bacterianos de un homólogo del regulador Fur, generalmente se correlaciona con la presencia de cajas Fur conservadas. En virtud de la presencia del gen en *A. ferrooxidans*, de la similitud global de secuencia entre las proteínas Fur de esta bacteria y *E. coli* y, más aún de la alta conservación a nivel del motivo HTH entre Fur de *A. ferrooxidans* y otros ortólogos, se especuló sobre la presencia de cajas Fur en el genoma de esta bacteria. Este supuesto por otro lado, adquirió fuerza frente a la evidencia experimental generada tanto *in vivo* como *in vitro*, que validó la compatibilidad funcional entre los reguladores de *A. ferrooxidans* y *E. coli*.

La identificación de cajas Fur en el genoma de *A. ferrooxidans* no sólo fue de interés para validar la posible conservación del mecanismo de regulación, sino adicionalmente para explorar la naturaleza de los eventuales blancos de regulación hierro dependiente en esta bacteria.

La búsqueda de sitios de regulación por Fur reveló la existencia de secuencias tipo caja Fur asociadas a una variedad de posibles genes blanco, aunque sólo unos pocos de estos contaron con precedentes de regulación dependiente de Fur en otras bacterias (ej: *tonB*, *mntH*, *sufR*, etc) (Kehres y col., 2002; Hantke, 2001; Zheng y col., 2001a). Un cierto número de las cajas detectadas, pudieron ser relacionadas con diversos aspectos del metabolismo del hierro (ej: transportadores, *hmpA*, etc) o del metabolismo energético (ej: ferredoxinas, citocromos, oxidoreductasas, etc), y si bien carecen de una contraparte homóloga, pertenecen a categorías funcionales que suelen ser reguladas por Fur en otras bacterias (McHugh y col., 2003; Baichoo y col., 2002a; Thompson y col., 2002).

A partir de las cajas más probables (en cuanto a contenido de información y presencia en otros microorganismos) se derivó un posible consenso de caja Fur para *A. ferrooxidans*. Este consenso conserva, en promedio, sólo 11 de las 19 posiciones que

definen la caja Fur tradicional. La similitud de las cajas Fur de *A. ferrooxidans* con respecto del consenso global es claramente inferior a la de otras bacterias (Ochsner & Vasil, 1996; Stojiljkovic, 1994) y comparable, a la fecha, únicamente con la descrita en *S. oneidensis* (Thompson y col., 2002).

Se ha señalado que la mínima conservación de secuencia respecto del consenso para que una caja Fur funcione como tal, es de 11 nucleótidos (Newman & Shapiro, 1999). No obstante, existe en la literatura evidencia experimental que demuestra que cajas aún más disímiles pueden unir y reprimir la expresión del blanco asociado (Thompson y col., 2002; Ochsner & Vasil, 1996; Tsolis y col., 1996). A pesar de estos antecedentes, no es claro si las cajas de menor conservación son efectivamente funcionales *in vivo* por sí solas. Recientemente se ha demostrado unión del regulador Fur y represión hierro dependiente de un promotor cuya caja Fur conserva escasos siete residuos del consenso de 19 nucleótidos (Friedman & O'Brian, 2003).

Sin embargo, dado que la posición específica de los residuos variantes es de importancia para la operatividad de la caja Fur (Escolar y col., 1998; Coy, 1995; de Lorenzo y col., 1988), cajas de menos de 11 nucleótidos idénticos al consenso pueden ser igualmente funcionales que cajas más conservadas, de no estar afectadas en los residuos relevantes a la interacción DNA-proteína (Escolar y col., 1999). El consenso derivado para *A. ferrooxidans* conserva mayoritariamente tales posiciones.

Por otro lado, además de la conservación de secuencia de la caja clásica (19 nt), variaciones en la organización de los sitios de regulación asociadas a los promotores dependientes de Fur (en cuanto a conservación y números de los hexámeros) puede determinar que cajas aparentemente menos conservadas, sean blanco de unión y represión por el regulador al contar con un mayor número de hexámeros menos conservados. Esta noción, si bien dificulta la estrategia de identificación de cajas Fur, válida

la posibilidad que las secuencias de baja conservación detectadas en *A. ferrooxidans* sean cajas funcionales *in vivo*.

El análisis del contenido de información de los promotores dependientes de Fur entrega una medida de la complejidad de tal organización. Al efectuar este análisis sobre una serie de promotores regulados por Fur en *E. coli*, *P. aeruginosa*, *H. pylori* y *B. subtilis*, fue posible establecer la presencia de una serie de cajas "tipo Fur" de bajo contenido de información, superpuestas entre sí y con la caja Fur reconocida en base a evidencia experimental. Sin embargo, esta observación no se corrobora en los promotores seleccionados a partir del ensayo FURTA o a través de aproximaciones bioinformáticas, como candidatos a ser regulados por Fur en *A. ferrooxidans*.

Es posible que el regulador Fur de *A. ferrooxidans* reconozca otras secuencias distintas de la caja Fur consenso validada en la mayoría de las bacterias. Se ha descrito que cambios conformacionales sutiles asociados a mutaciones puntuales (Delany y col., 2002; Hall & Foster, 1996), al efecto de la perturbación transiente del pH intracelular durante la respuesta de tolerancia a ácido (Hall & Foster, 1996; Saito y col., 1991) o a la unión de otros iones divalentes en el sitio del correpressor (Fuangthong y col., 2002; Bsat y col., 1998; Chen y col., 1995; 1993) determinan la capacidad del regulador Fur de reconocer otras secuencias diferentes de la caja Fur "tipo". En base a estos antecedentes, es posible suponer que existan diferencias sutiles en la conformación de Fur de *A. ferrooxidans* y que éstas hayan sido compensadas a nivel de la secuencia del genoma por variaciones en la naturaleza de la caja Fur reconocida por el regulador de esta bacteria. Alternativamente, es posible que en *A. ferrooxidans* las cajas Fur hayan degenerado y que cascadas de regulación medien de modo indirecto el control hierro dependiente gatillado por Fur sobre unos pocos puntos de control. Estudios de unión de Fur de *A. ferrooxidans* a las posibles cajas Fur identificadas en este trabajo entregará información al respecto.

La presencia de cajas Fur asociadas a varios genes putativos codificantes para funciones relacionadas con el transporte de hierro, es consecuente con el rol tradicional de Fur de represor de genes de adquisición de hierro. Por el contrario, la presencia de cajas Fur asociadas a exportadores de Cu y otros metales divalentes y de varias proteínas del metabolismo energético, no se condice con el papel clásico de represor de Fur; sí por el contrario con un posible papel de activador transcripcional.

Si bien estos resultados permiten especular sobre la validez de la interpretación del mecanismo de regulación diferencial mediado por bajos títulos del regulador Fur, la caracterización bioquímica de los promotores de genes consecuentes con uno y otro rol regulatorio (en cuanto a sitios de inicio de la transcripción, unión específica de la proteína purificada, determinación de zonas de protección por la proteína unida) es necesaria para establecer la importancia de la localización relativa de las cajas respecto de los elementos de cada promotor y validar o negar el modelo planteado en esta tesis.

5. CONCLUSIONES

1. El ortólogo del regulador Fur AF2557 codificado en el genoma de *A. ferrooxidans* es asignado a la subfamilia de reguladores Fur de respuesta a hierro sobre la base de su alta similitud de secuencia, su comparable organización estructural y la conservación de los motivos implicados en la función de este grupo de proteínas.
2. El regulador Fur AF2557 de *A. ferrooxidans* complementa la deficiencia del gen *fur* en *E. coli* reprimiendo la expresión de al menos dos promotores dependiente de Fur en respuesta a la presencia de hierro en el medio de crecimiento, cuando es expresado a altos títulos de proteína.
3. El regulador Fur AF2557 de *A. ferrooxidans* une específicamente la caja Fur presente en el promotor del gen *fhuF* de *E. coli in vitro* en presencia de manganeso.
4. El regulador Fur AF2557 de *A. ferrooxidans* activa la expresión de genes habitualmente reprimidos por Fur en *E. coli* cuando es expresado a bajos títulos de proteína. En virtud de estos antecedentes, se agrega a las ya reconocidas variables involucradas en el mecanismo de regulación por Fur (concentración de hierro y fuerza relativa de la caja Fur), la concentración del propio regulador Fur.
5. Se sugiere que la localización relativa de las cajas Fur, respecto de los elementos -10 y -35 de los diversos promotores blanco, es relevante al efecto neto de regulación por Fur cuando éste se expresa en la célula a bajos títulos. Así, la regulación diferencial puede ser explicada por diferencias operador-específicas.
6. La concentración de proteína Fur de *A. ferrooxidans* se expresa a niveles variables según la carga de hierro en el medio de crecimiento, cambio que no puede ser correlacionado con un cambio en los niveles del mRNA. En consecuencia, se favorece

la idea de que la expresión variable de represor Fur en esta bacteria responde a algún tipo de mecanismo de control post-transcripcional dependiente de hierro.

7. La búsqueda de sitios de regulación por Fur en el genoma de *A. ferrooxidans* revela la presencia de secuencias "tipo caja Fur" de baja similitud al consenso global. Existen, sin embargo, cajas que conservan las posiciones definidas como relevantes al contacto Fur:DNA en *E. coli*.

8. En los promotores candidatos a ser regulados por Fur en *A. ferrooxidans*, detectados a través del ensayo FURTA o de la predicción bioinformática de cajas Fur, no se reconocen otras secuencias similares a cajas Fur (con menor contenido de información respecto del modelo de alimentación) superpuestas a la caja Fur principal (con mayor contenido de información respecto del modelo de alimentación).

9. Las secuencias tipo caja Fur detectadas en el genoma de *A. ferrooxidans* pueden ser relacionadas con diversos aspectos del metabolismo del hierro, del transporte de otros iones, del metabolismo energético y con varias funciones misceláneas, y si bien en muchos casos carecen de una contraparte homóloga, pertenecen a categorías funcionales que suelen ser reguladas por Fur en otras bacterias. La secuencia consenso de Caja Fur derivada para *A. ferrooxidans* es "NATYATNATYNTNAYTNTN".

10. La presencia y conservación en el genoma de *A. ferrooxidans* de genes de transporte de ion ferroso y de ferri-sideróforos, y de genes de almacenamiento intracelular del metal indica, por analogía con sistemas conocidos, que esta bacteria es capaz de montar una respuesta integral para preservar la homeostasis de hierro. La abundancia y diversidad de receptores encontrada en un microorganismo acidófilo como *A. ferrooxidans*, el cual, especulativamente podría prescindir de mecanismos de transporte de hierro de alta afinidad, sugiere que ellos permitirían a esta bacteria proveerse del metal necesario para biosíntesis frente a disponibilidades variables asociadas a otras condiciones de crecimiento.

11. La importancia de Fur de *A. ferrooxidans* como regulador central de la respuesta de homeostasis de hierro necesita validación experimental. En virtud de los antecedentes derivados de este trabajo, que suman un nuevo nivel de complejidad al mecanismo de regulación por Fur, es factible suponer que las diferencias en los niveles de expresión de Fur manifestados por *A. ferrooxidans* durante su crecimiento en hierro y azufre son un reflejo de la necesidad de balancear una inusual elevada demanda de hierro como fuente de energía, con la típica necesidad de proteger a la célula frente a excesos del metal. Una aproximación global, sea ésta transcriptómica o proteómica, para comparar la expresión diferencial entre condiciones de crecimiento, o alternativamente entre *A. ferrooxidans* silvestre y una cepa mutante para el gen *fur* permitirán responder a esta interrogante.

6. BIBLIOGRAFIA

- Aiba, H., Adhya, S. & de Crombrughe, B. 1981. Evidence for two functional *gal* promoters in intact *Escherichia coli* cells. *J. Biol. Chem.* 256: 11905–11910.
- Abdul-Tehrani, H., Hudson, A.J., Chang, Y.S., Timms, A.R., Hawkins, C., Williams, J.M., Harrison, P.M., Guest, J.R., Andrews, S.C. 1999. Ferritin mutants of *Escherichia coli* are iron deficient and growth impaired, and *fur* mutants are iron deficient. *J. Bacteriol.* 181: 1415-1428.
- Achenbach, L.A. & Yang, W. 1997. The *fur* gene from *Klebsiella pneumoniae*: characterization, genomic organization and phylogenetic analysis. *Gene*.185: 201-207.
- Adrait, A., Jacquamet, L., Le Pape, L., Gonzalez de Perédo, A., Aberdam, D., Hazemann, J.L, y col. 1999. Spectroscopic and saturation magnetization properties of the manganese- and cobalt-substituted Fur (ferric uptake regulation) protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 38: 6248-6260.
- Ahmer, B.M.M., Thomas, M.G., Larsen, R.A. & K. Postle. 1995. Characterization of the *exbBD* operon of *Escherichia coli* and the role of ExbB and ExbD in TonB function and stability. *J. Bacteriol.* 177: 4742–4747.
- Althaus, E.W., Outten, C.E., Olson, K.E., Cao, H. & O'Halloran, T.V. 1999. The ferric uptake regulation (Fur) repressor is a zinc metalloprotein. *Biochemistry*. 38: 6559-6569.
- Andrews, S.C., Robinson, A.K. & Rodríguez-Quifones, F. 2003. Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiol. Rev.* 27: 215-237.
- Andrews, S.C. 1998. Iron storage in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 40: 281-351.
- Andrews, S.C., Le Brun, N.E., Barynin, V., Thomson, A.J., Moore, G.R., Guest, J.R. & Harrison, P.M. 1995. Site-directed replacement of the coaxial heme ligands of bacterioferritin generates heme free variants. *J. Biol. Chem.* 270: 23268-23274.
- Andrews, S.C., Smith, J.M., Hawkins, C., Williams, J.M., Harrison, P.M., Guest, J.R. 1993. Overproduction, purification and characterization of the bacterioferritin of *Escherichia coli* and a C-terminally extended variant. *Eur. J. Biochem.* 213: 329-338.
- Bagg, A. & Neilands, J.B.1987. Ferric uptake regulation protein acts as a repressor, employing iron (II) as a cofactor to bind the operator of an iron transport operon in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 26: 5471-5477.
- Baichoo, N., Wang, T., Ye, R. & Helmann, J.D. 2002a. Global analysis of the *Bacillus subtilis* Fur regulon and the iron starvation stimulon. *Mol. Microbiol.* 45: 1613-1629
- Baichoo, N. & Helmann, J.D. 2002b. Recognition of DNA by Fur: a reinterpretation of the Fur box consensus sequence. *J. Bacteriol.*184: 5826-5832.
- Barton, H.A., Johnson, Z., Cox, C.D., Vasil, A.I. & Vasil, M.L. 1996. Ferric uptake regulator mutants of *Pseudomonas aeruginosa* with distinct alterations in the iron-dependent repression of exotoxin A and siderophores in aerobic and microaerobic environments. *Mol. Microbiol.* 21: 1001-1017.
- Beier, D., Spohn, G., Rappuoli, R. & Scarlato, V. 1997. Identification and characterization of an operon of *Helicobacter pylori* that is involved in motility and stress adaptation. *J. Bacteriol.* 179: 4676-4683.
- Bereswill, S., Lichte, F., Vey, T., Fassbinder, F. & Kist, M. 1998a. Cloning and characterization of the *fur* gene from *Helicobacter pylori*. *FEMS Microbiol. Lett.* 159: 193-200.
- Bijlsma, J.J.E., Waidner, B., van Vliet, A.H.M., Hughes, N.J., Håg, S., Bereswill, S., Kelly, J., y col. 2002. The *Helicobacter pylori* homologue of the ferric uptake regulator is involved in acid resistance. *Infect. Immun.* 70: 606-611.
- Bjarnason, J., Southward, C.M. & Surette, M.G. 2003. Genomic Profiling of Iron-Responsive Genes in *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* by High-Throughput Screening of a Random Promoter Library. *J. Bacteriol.* 185: 4973–4982.

- Bosch, M., Garrido, E., Llagostera, M., Perez de Rozas, A.M., Badiola, I. & Barbe, J. 2002. *Pasteurella multocida* *exbB*, *exbD* and *tonB* genes are physically linked but independently transcribed. FEMS Microbiol. Lett. 210: 201-208.
- Boyd, J., Oza, M.N. & Murphy, J.R. 1990. Molecular cloning and DNA sequence analysis of a diphtheria toxin iron-dependent regulatory element (*dtxR*) from *Corynebacterium diphtheriae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 5968-5972.
- Boyer, A.E. & Tai, P.C. 1998. Characterization of the *cvaA* and *cvi* promoters of the colicin V export system: iron dependent transcription of *cvaA* is modulated by downstream sequences. J. Bacteriol. 180: 1662-1672.
- Brickman, T.J., Ozenberger, B.A. & McIntosh, M.A. 1990. Regulation of divergent transcription from the iron-responsive *fepB-entC* promoter-operator regions in *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 212: 669-682.
- Bsat, N. & Helmann, J.D. 1999. Interaction of *Bacillus subtilis* Fur (Ferric Uptake Repressor) with the *dhb* Operator *In Vitro* and *In Vivo*. J. Bacteriol. 181: 4299-4307.
- Bsat, N., Herbig, A., Casillas-Martinez, L., Setlow, P. & Helmann, J.D. 1998. *Bacillus subtilis* contains multiple Fur homologues: identification of the iron uptake (Fur) and peroxide regulon (PerR) repressors. Mol. Microbiol. 29: 189-198.
- Bubert, A., Kuhn, M., Goebel, W. & Kohler, S. 1992. Structural and functional properties of the p60 proteins from different *Listeria* species. J. Bacteriol. 174: 8166-8171.
- Burkhardt, R., & Braun, V.. 1987. Nucleotide sequence of *fhuC* and *fhuD* genes involved in iron(III)-hydroxamate transport: domains in FhuC homologous to ATP binding proteins. Mol. Gen. Genet. 209: 49-55.
- Chamnongpol, S., Dodson, W., Cromie, M.J., Harris, Z.L. & Groisman, E.A. 2002. Fe(III)-mediated cellular toxicity. Mol. Microbiol. 45: 711-719.
- Chan, V.L., Louie, H. & Bingham, H.L. 1995. Cloning and transcription regulation of the ferric uptake regulatory gene of *Campylobacter jejuni* TGH9011. Gene. 164: 25-31.
- Chen, L., James, L.P. & Helmann, J.D. 1993. Metalloregulation in *Bacillus subtilis*: isolation and characterization of two genes differentially regulated by metal ions. J. Bacteriol. 175: 5428-5437.
- Chen, L., Keramati, L. & Helmann, J.D. 1995. Coordinate regulation of *Bacillus subtilis* peroxide stress genes by hydrogen peroxide and metal ions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92: 8190-8194.
- Clarke, T.E., Braun, V., Winkelmann, G., Tari, L.W. & Vogel, H.J. 2002. X-ray crystallographic structures of the *Escherichia coli* periplasmic protein FhuD bound to hydroxamate-type siderophores and the antibiotic albomycin. J. Biol. Chem. 277: 13966-13972.
- Colmer, A.R. & Hinkel, M.E. 1947. The role of microorganisms in acid mine drainage: a preliminary report. Science. 106: 253-256.
- Coy, M. 1995. The interaction of the ferric uptake regulation protein with DNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 212: 784-792.
- Coy, M., Doyle, C., Besser, J. & Neilands, J.B. 1994. Site directed mutagenesis of the ferric uptake regulation gene of *Escherichia coli*. Biometals. 7: 292-298.
- Coy, M. & Neilands, J.B. 1991. Structural dynamics and functional domains of the Fur protein. Biochemistry. 30: 8201-8210.
- Crosa, J.H. 1997. Signal Transduction and Transcriptional and Posttranscriptional Control of Iron-Regulated Genes in Bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 319-336.
- de Lorenzo, V., Herrero, M., Giovannini, F. & Neilands J.B. 1988. Fur (ferric uptake regulator) protein and CAP (catabolite activator protein) modulate transcription of *fur* gene in *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. 173: 537-546.
- de Lorenzo, V., Giovannini, F., Herrero, M. & Neilands, J.B. 1988. Metal ion regulation of gene expression. Fur repressor-operator interaction at the promoter region of the aerobactin system of pColV-K30. J. Mol. Biol. 203: 875-884.

- de Lorenzo, V., Wee, S., Herrero, M. & Neilands, J.B. 1987. Operator sequences of the aerobactin operon of plasmid ColV-K30 binding the ferric uptake regulation (*fur*) repressor. *J. Bacteriol.* 169: 2624-2630.
- de Luca, N. G., Wexler, M., Pereira, M. J., Yeoman, K. H. & Johnston, A. W. B. 1998. Is the *fur* gene of *Rhizobium leguminosarum* essential? *FEMS Microbiol. Lett.* 168: 289-295.
- de Smith, M.H. & van Duin, J. 1990. Secondary structure of the ribosome binding site determines translational efficiency: A quantitative analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87: 7668-7672.
- Delany, I., Spohn, G., Rappuoli, R. & Scarlato, V. 2003. An anti-repression Fur operator upstream of the promoter is required for iron-mediated transcriptional autoregulation in *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* 50: 1329-1338.
- Delany, I., Spohn, G., Pacheco, A.B., Ievam R., Alaimom C., Rappuoli, R. & Scarlato, V. 2002. Autoregulation of *Helicobacter pylori* Fur revealed by functional analysis of the iron-binding site. *Mol. Microbiol.* 46: 1107-1122.
- Delany, I., Pacheco, A.B.F., Spohn, G., Rappuoli, R. & Scarlato, V. 2001a. Iron-dependent transcription of the *fbpB* gene of *Helicobacter pylori* is controlled by the Fur repressor protein. *J. Bacteriol.* 183: 4932-4937.
- Delany, I., Spohn, G., Rappuoli, R. & Scarlato, V. 2001b. The Fur repressor controls transcription of iron-activated and iron-repressed genes in *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* 42: 1297-1309.
- Denoel, P.A., Crawford, R.M., Zygmunt, M.S., Tibor, A., Weynants, V.E., Godfroid, F., Hoover, D.L. & Letesson, J.J. 1997. Survival of a bacterioferritin deletion mutant of *Brucella melitensis* 16M in human monocyte-derived macrophages. *Infect. Immun.* 65: 4337-4340.
- Desai, P.J., Angerer, A. & Genco, C.A. 1996. Analysis of Fur binding to operator sequences within the *Neisseria gonorrhoeae* *fbpA* promoter. *J. Bacteriol.* 178: 5020-5023.
- Dubrac, S. & Touati, D. 2000. Fur positive regulation of iron superoxide dismutase in *Escherichia coli*: functional analysis of the *sodB* promoter. *J. Bacteriol.* 182: 3802-3808.
- Dussurget, O., Rodriguez, M. & Smith, I. 1996. An IdeR mutant of *Mycobacterium smegmatis* has derepressed siderophore production and altered oxidative stress response. *Mol. Microbiol.* 22: 535-544.
- Earhart, C.F. 1996 Uptake and metabolism of iron and molybdenum. En: Neidhardt, F.C. (ed.), *Escherichia coli and Salmonella*. Cellular and Molecular Biology. pp. 1075-1090. 2nd Ed. ASM Press, Washington DC.
- Escolar, L., Pérez-Martín, J. & de Lorenzo, V. 2000. Evidence of an unusually long operator for the Fur repressor in the aerobactin promoter of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 275: 24709-24714.
- Escolar, L., Pérez-Martín, J. & de Lorenzo, V. 1999. Opening the iron box: Transcriptional metalloregulation by the Fur protein. *J. Bacteriol.* 181: 6223-6229.
- Escolar, L., Pérez-Martín, J. & de Lorenzo, V. 1998a. Coordinated Repression *In Vitro* of the Divergent *fepA-fes* Promoters of *Escherichia coli* by the Iron Uptake Regulation (Fur) Protein. *J. Bacteriol.* 180: 2579-2582.
- Escolar, L., Pérez-Martín, J. & de Lorenzo, V. 1998b. Binding of the Fur (ferric uptake regulator) repressor of *Escherichia coli* to arrays of the GATAAT sequence. *J. Mol. Biol.* 283: 537-547.
- Escolar, L., de Lorenzo, V. & Pérez-Martín, J. 1997. Metalloregulation *in vitro* of the aerobactin promoter of *Escherichia coli* by the Fur (ferric uptake regulation) protein. *Mol. Microbiol.* 26: 799-808.
- Ferguson, A.D., Hofmann, E., Coulton, J.W., Diederichs, K. & Welte, W. 1998. Siderophore-mediated iron transport: Crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science* 282: 2215-2220.
- Ferris, F.G. & Beveridge, T.J. 1985. Site specificity of metallic ion binding in *Escherichia coli* K-12 lipopolysaccharide. *Can. J. Microbiol.* 32: 52-55.

- Fischer, E., Günter, K. & Braun, V. 1989. Involvement of ExbB and TonB in transport across the outer membrane of *Escherichia coli*: phenotypic complementation of *exb* mutants by overexpressed *tonB* and physical stabilization of TonB by ExbB. *J. Bacteriol.* 171: 5127–5134.
- Flocco, M.M. & Mowbray, S.L. 1994. The 1.9 angstrom X-ray structure of a closed unliganded form of the periplasmic glucose/galactose receptor from *Salmonella typhimurium*. *J. Biol. Chem.* 269: 8931–8936.
- Fontecave, M., Coves, J. & Pierre, J.L. 1994. Ferric reductases or flavin reductases? *Biometals.* 7: 3-8.
- Foster, J.W. & Hall, H.K. 1992. Effect of *Salmonella typhimurium* ferric uptake regulator (*fur*) mutations on iron- and pH-regulated protein synthesis. *J. Bacteriol.* 174: 4317–4323.
- Frechon, D. & Le Cam, E. 1994. Fur (ferric uptake regulation) protein interaction with target DNA: comparison of gel retardation, footprinting and electron microscopy analyses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201: 346-355.
- Fridovich, I. 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.* 201: 1203-1209.
- Friedman, Y.E. & O'Brian, M.R. 2003. A novel DNA-binding Site for the Ferric Uptake Regulator (Fur) Protein from *Bradyrhizobium japonicum*. *J. Biol. Chem.* 278: 38395-38401.
- Fuangthong, M., Herbig, A.F., Bsat, N. & Helmann, J.D. 2002. Regulation of the *Bacillus subtilis fur* and *perR* Genes by PerR: Not All Members of the PerR Regulon Are Peroxide Inducible. *J. Bacteriol.* 184: 3276–3286.
- Gaballa, A. & Helmann, J.D. 1998. Identification of a zinc-specific metalloregulatory protein, Zur, controlling zinc transport operons in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 180: 5815-5821.
- Garduno, R., Phipps, B.M. & Kay, W.W. 1995. Physical and functional S-layer reconstitution in *Aeromonas salmonicida*. *J. Bacteriol.* 177: 2684–2694.
- Ghassemian, M. & Straus, N.A. 1996. Fur regulates the expression of iron-stress genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain PCC 7942. *Microbiology.* 142: 1469-1476.
- Gonzalez de Perédo, A., Saint-Pierre, C., Adrait, A., Jacquamet, L., Latour, J.M., Michaud-Soret, I. & Forest, E. 1999. Identification of the two zinc-bound cysteines in the ferric uptake regulation protein from *Escherichia coli*: chemical modification and mass spectrometry analysis. *Biochemistry.* 38: 8582–8589.
- Goswami, T., Bhattacharjee, A., Babal, P., Searle, S., Moore, E., Li, M. & Blackwell, J.M. 2001. Natural-resistance-associated macrophage protein 1 is an H⁺/bivalent cation antiporter. *Biochem. J.* 354: 511–519.
- Griggs, D.W. & Konisky, J. 1989. Mechanism for iron-regulated transcription of the *Escherichia coli* *cir* gene: metal-dependent binding of Fur protein to the promoters. *J. Bacteriol.* 171: 1048-1052.
- Gross, G., Mielke, C., Hollatz, I., Blöcker, H. & Frank, R. 1990. RNA Primary Sequence or Secondary Structure in the Translational Initiation Region Controls Expression of Two Variant Interferon- β Genes in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 265: 17627-17636.
- Gruer, M.J. & Guest, J.R. 1994. Two genetically-distinct and differentially-regulated aconitases (*AcnA* and *AcnB*) in *Escherichia coli*. *Microbiology.* 140: 2531-2541.
- Gunn, J.S. & Miller, S.I. 1996. PhoP-PhoQ Activates Transcription of *pmrAB*, Encoding a Two-Component Regulatory System Involved in *Salmonella typhimurium* Antimicrobial Peptide Resistance. *J. Bacteriol.* 178: 6857–6864.
- Gunshin, H., Mackenzie, B., Berger, U. V., Gunshin, Y., Romero, M. F., Boron, W. F., Nussberger, S., Gollan, J. L. & Hediger, M. A. 1997. Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. *Nature.* 388: 482–488.
- Hagen, F.S. & Young, E. 1978. Effect of RNase III on the efficiency of translation of bacteriophage T7 lysozyme mRNA. *J. Virol.* 26: 793-804.

- Hahn, J.S., Oh, S.Y. & Roe, J.H. 2000a. Regulation of the *furA* and *catC* Operon, Encoding a Ferric Uptake Regulator Homologue and Catalase-Peroxidase, Respectively, in *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *J. Bacteriol.* 182: 3767-74.
- Hahn, J.S., Oh, S.Y., Chater, K.F., Cho, Y.H. & Roe, J.H. 2000b. H₂O₂-sensitive *Fur*-like repressor *CatR* regulating the major catalase gene in *Streptomyces coelicolor*. *J. Biol. Chem.* 275: 38254-38260.
- Hall, H.K. & Foster, J.W. 1996. The role of *fur* in the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* is physiologically and genetically separable from its role in iron acquisition. *J. Bacteriol.* 178: 5683-5691.
- Hamza, I., Chauhan, S., Hassett, R. & O'Brian, M.R. 1998. The Bacterial Irr Protein Is Required for Coordination of heme Biosynthesis with Iron Availability. *J. Biol. Chem.* 273: 21669-21674.
- Hantke, K. & Braun, V. 2000. The art of keeping low and high iron concentrations in balance. En: Storz, G. & Hengge-Aronis, R. (eds.) *Bacterial Stress Responses*. pp 275-88 ASM Press.
- Hantke, K. 2001. Iron and metal regulation in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* 4: 172-177.
- Hantke, K. 1997. Ferrous iron uptake by a magnesium transport system is toxic for *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 179: 6201-6204.
- Hantke, K. 1987. Selection procedure for deregulated iron transport mutants (*fur*) in *Escherichia coli* K12: *fur* not only affects iron metabolism. *Mol. Gen. Genet.* 210: 135-139.
- Hassett, D.J., Howell, M.L., Ochsner, U.A., Vasil, M.L., Johnson, Z. & Dean, G.E. 1997. An operon containing *fumC* and *sodA* encoding fumarase C and manganese superoxide dismutase is controlled by the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: *fur* mutants produce elevated alginate levels. *J. Bacteriol.* 179: 1452-1459.
- Helander, I.M., Kilpelainen, I. & Vaara, M. 1994. Increased substitution of phosphate groups in lipopolysaccharides and lipid A of the polymyxin resistant *pmrA* mutants of *Salmonella typhimurium*: a ³¹P-NMR study. *Mol. Microbiol.* 11: 481-487.
- Hengen, P.N., Bartram, S.L., Stewart, L.E. & Schneider, T.D. 1997. Information analysis of Fis binding sites. *Nuc. Acid. Res.* 25: 4994-5002.
- Hernández, J.A., Bes, M.T., Fillat, M.F., Neira, J.L. & Peleato, M.L. 2002. Biochemical analysis of the recombinant Fur (ferric uptake regulator) protein from *Anabaena* PCC 7119: factors affecting its oligomerization state. *Biochem. J.* 366: 315-322.
- Hickey, E.K. & Cianciotto, N.P. 1994. Cloning and sequencing of the *Legionella pneumophila fur* gene. *Gene.* 143: 117-121.
- Higgs, P.I., Myers, P.S. & Postle, K. 1998. Interactions in the TonB-dependent energy transduction complex: ExbB and ExbD form homomultimers. *J. Bacteriol.* 180: 6031-6038.
- Hill, P.J., Cockayne, A., Landers, P., Morrissey, J.A., Sims, C.M. & Williams, P. 1998. SirR, a novel iron-dependent repressor in *Staphylococcus epidermidis*. *Infect. Immun.* 66: 4123-4129.
- Holm, L., Sander, C., Ruterjans, H., Schnarr, M., Fogh, R., Boelens, R. & Kaptein, R. 1994. LexA repressor and iron uptake regulator from *Escherichia coli*: new members of the CAP-like DNA binding domain superfamily. *Protein. Eng.* 7: 1449-1453.
- Holmes, D.S. 1998. Biorecovery of Metals from Mining Wastes, En: AM Martin (ed.). *Bioconversion of Waste Materials to Industrial Products*. pp 517-545. Chapman Hall, London.
- Horsburgh, M.J., Ingham, E. & Foster, S.J. 2001. In *Staphylococcus aureus*, Fur is an interactive regulator with PerR, contributes to virulence, and is necessary for oxidative stress resistance through positive regulation of catalase and iron homeostasis. *J. Bacteriol.* 183: 468-475.
- Hunt, M.D., Pettis, G.S. & McIntosh, M.A. 1994. Promoter and operator determinants for *fur*-mediated iron regulation in the bidirectional *fepA-fes* control region of the *Escherichia coli* enterobactin gene system. *J. Bacteriol.* 176: 3944-3955.
- Inglede, W.J. 1982. *Thiobacillus ferrooxidans*. The bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph. *Biochim. Biophys. Acta.* 683: 89-117.

- Jacquemet, L., Aberdam, D., Adrait, A., Hazemann, J.L., Latour, J.M. & Michaud-Soret, I. 1998. X-ray absorption spectroscopy of a new zinc site in the Fur protein from *Escherichia coli*. *Biochemistry*. 37: 2564–2571.
- Jeréz, C.A., Varela, P., Osorio, G., Seeger, M., Amaro, A.M. & Toledo, H. 1995. Differential gene expression of *Thiobacillus ferrooxidans* under different environmental conditions. pp. 111-121. En: Holmes, D.S. y Smith, R.W. (eds). *Mineral Bioprocessing II*.
- Kammler, M., Schon, C. & Hantke, K. 1993. Characterization of the ferrous iron uptake system of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175: 6212-6219.
- Kampfenkel, K. & Braun, V. 1993. Topology of the ExbB protein in the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 268: 6050-6057.
- Kehres, D.G., Janakiraman, A., Slauch, J.M. & Maguire, M.E. 2002. Regulation of *Salmonella enterica* Serovar *Typhimurium* *mntH* Transcription by H₂O₂, Fell, and MnlI. *J. Bacteriol.* 184: 3151-3158.
- Kehres, D.G., Zaharik, M.L., Finlay, B.B. & Maguire, M.E. 2000. The NRAMP proteins of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* are selective manganese transporters involved in the response to reactive oxygen. *Mol. Microbiol.* 36: 1085–1100.
- Kelly, D.P. 1982. Biochemistry of the chemolithotrophic oxidation of sulfur. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 298: 499-528.
- Keyer, K & Imlay, J.A. 1996. Superoxide accelerates DNA damage by elevating free-iron levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93: 13635-13640.
- Köster, W. 2001. ABC transporter-mediated uptake of iron, siderophores, heme and vitamin B12. *Res. Microbiol.* 152: 291-301.
- Kupka, D. & Kupsáková, I. 1999. Iron II oxidation kinetics in *Thiobacillus ferrooxidans* in the presence of heavy metals. En: Amils, R & Ballester, A (eds.) *Biohydrometallurgy and The Environment Towards the Beginig of the 21st Century*. pp 381-96. Elsevier Science.
- Larsen, R.A., Letain, T.E. & Postle, K. 2003. *In vivo* evidence of TonB shuttling between the cytoplasmic and outer membrane in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 49: 211–218.
- Larsen, R.A., Thomas, M.G. & Postle, K. 1999. Proton motive force, ExbB and ligand-bound FepA drive conformational changes in TonB. *Mol. Microbiol.* 31: 1809-1824.
- Larsen, R.A., Foster-Hartnett, D., McIntosh, M.A. & Postle, K. 1997. Regions of *Escherichia coli* TonB and FepA proteins essential for *in vivo* physical interactions. *J. Bacteriol.* 179: 3213-3221.
- Lavrrar, J.L., Christofersen, C.A. & McIntosh, M.A. 2002. Fur- DNA interactions at the bi-directional *fepDGC-entS* promoter region in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 322: 983-995.
- Le Cam, E., Fréchon, D., Barray, M., Fourcade, A. & Delain, E. 1994. Observation of binding and polymerization of Fur repressor onto operator-containing DNA with electron and atomic force microscopes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91: 11816-11820.
- Leduc, L.G. & Ferroni, G.D. 1994. The chemolithotrophic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Rev.* 14: 103–120.
- Letain, T.E. & Postle, K. 1997. TonB protein appears to transducer energy by shuttling between the cytoplasmic membrane and the outer membrane in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 24: 271-283.
- Levicán, G.P. 2003. Análisis estructural y funcional de una región génica involucrada en la oxidación de hierro y tiosulfato en *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC19859. Tesis para optar al grado de Doctor en Microbiología. Pp 153.
- Lewin, A.C., Doughty, P.A., Flegg, L., Moore, G.R. & Spiro, S. 2002. The ferric uptake regulator of *Pseudomonas aeruginosa* has no essential cysteine residues and does not contain a structural zinc ion. *Microbiology.* 148: 2449-2456.
- Litwin, C.M. & Calderwood, S.B. 1993. Role of iron in regulation of virulence genes. *Clin. Microbiol. Rev.* 6: 137-149.

- Loprasert, S., Sallabhan, R., Atichartpongkul, S. & Mongkolsuk, S. 1999. Characterization of a ferric uptake regulator (*fur*) gene from *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* with unusual primary structure, genome organization, and expression patterns. *Gene*. 239: 251-258.
- Lowe, C.A., Asghar, A.H., Shalom, G., Shaw, J.G. & Thomas, M.S. 2001. The *Burkholderia cepacia fur* gene: co-localization with *omIA* and absence regulation by iron. *Microbiology*. 147: 1303-1314.
- Mademidis, A., Killmann, H., Kraas, W., Flechsler, I., Jung, G. & Braun, V. 1997. ATP-dependent ferric hydroxamate transport system in *Escherichia coli*: periplasmic FhuD interacts with a periplasmic and with a transmembrane cytoplasmic region of the integral membrane protein FhuB, as revealed by competitive peptide mapping. *Mol. Microbiol.* 26: 1109-1123.
- Makemson, J.C. & Hastings, J.W. 1982. Iron represses bioluminescence in *Vibrio harveyi*. *Curr. Microbiol.* 7: 181-186.
- Makui, H., Roig, E., Cole, S.T., Helmann, J.D., Gros, P., & Cellier, M.F.. 2000. Identification of the *Escherichia coli* K-12 NRAMP orthologue (MntH) as a selective divalent metal ion transporter. *Mol. Microbiol.* 35: 1065-1078.
- Massé E & Gottesman S. 2002. A small RNA regulates the expression of genes involved in iron metabolism in *Escherichia coli*. *Proc.Natl.Acad.Sci. USA*, 99: 4620-25.
- McCarter, L., & Silverman, M. 1989. Iron regulation of swarmer cell differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* 171: 731-736.
- McHugh, J.P., Rodríguez-Quiñones, F., Abdul-Tehrani, H., Svistunenko, D.A., Poole, R.K., Cooper, C.E. & Andrews S.C. 2003. Global Iron-dependent Gene Regulation in *Escherichia coli*. A New Mechanism For Iron Homeostasis *J. Biol. Chem.* 278: 29478-29486.
- Michaud-Soret, I., Adrait, A., Jacquino, M., Forest, E., Touati, D. & Latour, J.M. 1997. Electrospray ionization mass spectrometry analysis of the apo- and metal substituted forms of the Fur Protein. *FEBS Lett.* 413: 473-476.
- Miller, J.H. 1972. *Experiments in Molecular Genetics*. pp: 352-55. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Mironov, A.A., Koonin, E.V., Roytberg, M.A. & Gelfand, M.S. 1999. Computer analysis of transcription regulatory patterns in completely sequenced bacterial genomes. *Nuc. Acid. Res.* 27: 2981-2989.
- Morgan, W. T. 1984. The histidine-rich glycoprotein of serum has a domain rich in histidine, proline, and glycine that binds heme and metals. *Biochemistry*. 24:1496-1501.
- Mowbray, S. L. & L. B. Cole. 1992. 1.7 Å X-ray structure of the periplasmic ribose receptor from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 225: 155-175.
- Newman, D.L. & Shapiro, J.A. 1999. Differential *fiu-lacZ* fusion regulation linked to *Escherichia coli* colony development. *Mol. Microbiol.* 33: 18-32.
- Niederhoffer, E.C., Naranjo, C.M., Bradley, K.L. & Fee, J.A. 1990. Control of *Escherichia coli* superoxide dismutase (*sodA* and *sodB*) genes by the ferric uptake regulation (*fur*) locus. *J. Bacteriol.* 172: 1930-1938.
- Occhino, D.A., Wyckoff, E.E., Henderson, D.P., Wrona, T.J. & Payne, S.M. 1998. *Vibrio cholerae* iron transport: haem transport genes are inked to one of two sets of *tonB*, *exbB*, *exbD* genes. *Mol. Microbiol.* 29: 1493-1507.
- Ochsner, U.A., Wilderman, P.J., Vasil, A.I. & Vasil, M.L. 2002. GeneChip expression analysis of the iron starvation response in *Pseudomonas aeruginosa*: identification of novel pyoverdine biosynthesis genes. *Mol. Microbiol.* 45: 1277-1287.
- Ochsner, U.A., Johnson, Z., Lamont, I.L., Cunliffe, H.E. & Vasil, M.L. 1996. Exotoxin A production in *Pseudomonas aeruginosa* requires the iron-regulated *pvdS* gene encoding an alternative sigma factor. *Mol. Microbiol.* 21: 1019-1028.
- Ochsner, U.A. & Vasil, M.L. 1996. Gene repression by the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: cycle selection of iron-regulated genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 93: 4409-4414.

- Oh, B.H., Kang, C.H., De Bondt, H., Kim, S.H., Nikaido, K., Joshi, A.K. & Ames, G.F. 1994. The bacterial periplasmic histidine-binding protein structure/function analysis of the ligand-binding site and comparison with related proteins. *J. Biol. Chem.* 269: 4135-4143.
- Ohmura, N., Sasaki, K., Matsumoto, N. & Saiki, H. 2002. Anaerobic Respiration Using Fe³⁺, S⁰, and H₂ in the Chemolithoautotrophic Bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 184: 2081-2087.
- Ortiz de Orue Lucana, D. & Schrempf, H. 2000. The DNA-binding characteristics of the *Streptomyces reticuli* regulator FurS depend on the redox state of its cysteine residues. *Mol. Gen. Genet.* 264: 341-353.
- Panina, E.M., Mironov, A.A. & Gelfand, M.S. 2001. Comparative analysis of Fur regulons in gamma-proteobacteria. *Nuc. Acid. Res.* 29: 5195-5206.
- Parkinson, J.S. 1995. Genetic approaches for Signaling Pathways and Proteins. En: Hoch, J.A & Silhavy, T.J. (eds). *Two Component Signal Transduction*. pp. 9-23. ASM Press, Washington, D.C.
- Patzer, S.I. & Hantke, K. 1998. The ZnuABC high-affinity zinc uptake system and its regulator Zur in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 28: 1199-1210.
- Patzer, S.I. & Hantke, K. 1999. SufS is a NifS-like protein, and SufD is necessary for stability of the [2Fe-2S] FhuF protein in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 181: 3307-3309.
- Pizarro, J., Jedlicki, E., Orellana, O., Romero, J. & Espejo, R.T. 1996. Bacterial populations in samples of bioleached copper ore as revealed by analysis of DNA obtained before and after cultivation. *Appl. Environ. Microbiol.* 62:1323-1328.
- Pohl, E., Haller, J.C., Mijovilovich, A., Meyer-Klaucke, W., Garman, E. & Vasil, M.L. 2003. Architecture of a protein central to iron homeostasis: crystal structure and spectroscopic analysis of the ferric uptake regulator. *Mol. Microbiol.* 47: 903-915.
- Pym, A.S., Domenech, P., Honore, N., Song, J., Deretic, V. & Cole, S.T. 2001. Regulation of catalase-peroxidase (KatG) expression, isoniazid sensitivity and virulence by *furA* of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* 40: 879-889.
- Qi, Z. & O'Brian, M. R. 2002. Interaction between the bacterial iron response regulator and ferrochelatase mediates genetic control of heme biosynthesis. *Mol. Cell.* 9: 155-162.
- Qi, Z., Hamza, I. & O'Brian, M.R. 1999. Heme is an effector molecule for iron-dependent degradation of the bacterial iron response regulator (Irr) protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 13056-13061.
- Rawlings, D.E. 2002. Heavy Metal Mining Using Microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 65-91.
- Rawlings, D.E., Tributsch, H. & Hansford, G.S. 1999. Reasons why "*Leptospirillum*"-like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores. *Microbiology.* 145: 5-13.
- Rawlings, D.E. & Silver, S. 1995. Mining with microbes. *Nature Biotechnology.* 13: 773-778.
- Rohrbach, M.R., Braun, V. & Köster, W. 1995. Ferrichrome transport in *Escherichia coli* K-12: Altered substrate specificity of mutated periplasmic FhuD and interaction of FhuD with the integral membrane protein FhuB. *J. Bacteriol.* 177: 7186-7193.
- Saier, M.H. Jr. 2000. A functional-phylogenetic classification system for transmembrane solute transporters. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64: 354-411.
- Saito, T., Duly, D. & Williams, R.J. 1991. The histidines of the iron-uptake regulation protein, Fur. *Eur. J. Biochem.* 197: 39-42.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. & Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Lab. Press, Plainview NY. 2nd Ed.
- Sand, W., Gerke, T., Hallmann, R. & Schippers, A. 1995. Sulfur chemistry, biofilm, and the (in)direct attack mechanism—a critical evaluation of bioleaching. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43: 961-966.
- Sàra, M. & Sleytr, U.B. 2000. Minireview: S-Layer Proteins. *J. Bacteriol.* 182: 859-868.

- Saravolac, E.G., Taylor, N.F., Benz, R. & Hancock, R.E. 1991. Purification of glucose-inducible outer membrane protein OprB of *Pseudomonas putida* and reconstitution of glucose-specific pores. *J. Bacteriol.* 173: 4970-4976.
- Schneider, T. D. 1997. Information content of individual genetic sequences. *J. Theor. Biol.* 189: 427-441.
- Schultze-Lam, S. & Beveridge, T.J.. 1994. Nucleation of celestite and strontianite in a cyanobacterial S-layer. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 447- 453.
- Schultze-Lam, S., Harauz, G. & Beveridge, T.J. 1992. Participation of a cyanobacterial S layer in fine-grain mineral formation. *J. Bacteriol.* 174: 7971-7981.
- Shenton, W., Pum, D., Sleytr, U.B. & Mann, S. 1997. Synthesis of cadmium sulphide super-lattices using self-assembled bacterial S-layers. *Nature.* 389: 585-587.
- Shilton BH, Flocco MM, Nilsson M, Mowbray SL. Conformational changes of three periplasmic receptors for bacterial chemotaxis and transport: the maltose-, glucose/galactose- and ribose-binding proteins. *J. Mol. Biol.* 264: 350-363.
- Shultzaberger, RK & Schneider, T.D. 1999. Using sequence logos and information analysis of Lrp DNA binding sites to investigate discrepancies between natural selection and SELEX. *Nuc. Acid. Res.* 27: 882-887.
- Staggs, T.M., Fetherston, J.D. & Perry, R.D. 1994. Pleiotropic Effects of a *Yersinia pestis fur* Mutation. *J. Bacteriol.* 176: 7614-7624.
- Stojiljkovic, I. & Hantke, K. 1995. Functional domains of the *Escherichia coli* ferric uptake regulator protein (Fur). *Mol. Gen. Genet.* 247: 199-205.
- Stojiljkovic, I., Baumler, A.J. & Hantke, K. 1994. Fur regulon in gram-negative bacteria. Identification and characterization of new iron-regulated *Escherichia coli* genes by a Fur titration assay. *J. Mol. Biol.* 236: 531-545.
- Sugio, T., Domatsu, C., Munakata, O., Tano, T. & Imai, K. 1985. Role of ferric iron-reducing system on sulfur oxidation of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1401-1406.
- Tardat, B. & Touati, D. 1993. Iron and oxygen regulation of *Escherichia coli* MnSOD expression: competition between the global regulators Fur and ArcA for binding to DNA. *Mol. Microbiol.* 9: 53-63.
- Thomas, C.E. & Sparling, P.F. 1994. Identification and cloning of a *fur* homologue from *Neisseria meningitidis*. *Mol. Microbiol.* 11: 725-737.
- Thompson, D.K., Beliaev, A.S., Giometti, C.S., Tollaksen, S.L., Khare, T., Lies, D.P., y col. 2002. Transcriptional and proteomic analysis of a ferric uptake regulator (*fur*) mutant of *Shewanella oneidensis*: possible involvement of *fur* in energy metabolism, transcriptional regulation, and oxidative stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 881-892.
- Tolmasky, M.E., Wertheimer, A.M., Actis, L.A. & Crosa, J.H. 1994. Characterization of the *Vibrio anguillarum fur* gene: role in regulation of expression of the FatA outer membrane protein and catechols. *J. Bacteriol.* 176: 213-220.
- Tomb, J.F., White, O., Kerlavage, A.R., Clayton, R.A., Sutton, G.G., Fleischmann, R.D., Ketchum, K.A. y col. 1997. The complete genome sequence of the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nature.* 388: 539-547.
- Touati D. 2000. Iron and oxidative stress in bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* 373: 1-6.
- Touati, D., Jacques, M., Tardat, B., Bouchard, L. & Despied, S. 1995. Lethal oxidative damage and mutagenesis are generated by iron in delta *fur* mutants of *Escherichia coli*: protective role of superoxide dismutase. *J. Bacteriol.* 177: 2305-2314.
- Tsolis, R.M., Baumler, A.J., Heffron, F., Stojiljkovic, I. 1996. Contribution of TonB- and Feo-mediated iron uptake to growth of *Salmonella typhimurium* in the mouse. *Infect. Immun.* 64: 4549-4556.
- Tsolis, R.M., Baumler, A.J., Stojiljkovic, I. & Heffron, F. 1995. Fur regulon of *Salmonella typhimurium*: identification of new iron-regulated genes. *J. Bacteriol.* 177: 4628-4637.

- van Vliet, A.H., Rock, J.D., Madeleine, L.N. & Ketley, J.M. 2000. The iron-responsive regulator Fur of *Campylobacter jejuni* is expressed from two separate promoters. *FEMS. Microbiol. Lett.* 188: 115-118.
- Velayudhan, J., Hughes, N.J., McColm, A.A., Bagshaw, J., Clayton, C.L., Andrews, S.C. & Kelly, D.J. 2000. Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. *Mol. Microbiol.* 37: 274-286.
- Vian, M., Creo, C., Dalmastrì, C., Gionni, A., Palazzolo, P. & Levi, G. 1986. *Thiobacillus ferrooxidans* selection in continuous culture. En: Lawrence, R.W., Branion, R.M.R., Ebner, H.G. (eds.) *Fundamental and Applied Biohydrometallurgy*, pp. 395-406. Elsevier, Amsterdam.
- Watnick, P.I., Eto, T., Takahashi, H. & Calderwood, S.B. 1997. Purification of *Vibrio cholerae* Fur and estimation of intracellular abundance by antibody sandwich enzyme-linked immunoassay. *J. Bacteriol.* 179: 243-247.
- Watts RA, P. W. Hunt, A. N. Hvitved, M. S. Hargrove, W. J. Peacock, and E. S. Dennis. 2001. A hemoglobin from plants homologous to truncated hemoglobins of microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98: 10119-10124.
- Wexler, M., Todd, J. D., Kolade, O., Bellini, D., Hemmings, A. M., Sawers, G. & Johnston, A. W. B. 2003. Fur is not the global regulator of iron uptake genes in *Rhizobium leguminosarum*. *Microbiology.* 149: 1357-1365.
- Wittenberg, J.B., Bolognesi, M., Wittenberg, B.A. & Guertin, M. 2002. Truncated Hemoglobins: A New Family of Hemoglobins Widely Distributed in Bacteria, Unicellular Eukaryotes and Plants. *J. Biol. Chem.* 277: 871-874.
- Wolf, A., Lee, K.C., Kirsch, J.F. & Ames, G.F.L. 1996. Ligand-dependent conformational plasticity of the periplasmic histidine-binding protein HisJ. Involvement in transport specificity. *J. Biol. Chem.* 271: 21243-21250.
- Wooldridge, K.G., Williams, P.H. & Ketley, J.M. 1994. Iron-responsive genetic regulation in *Campylobacter jejuni*: cloning and characterization of a fur homolog. *J. Bacteriol.* 176: 5852-5856.
- Wosten, M.M., Kox, L.F., Chamnongpol, S., Soncini, F.C. & Groisman, E.A. 2000. A signal transduction system that responds to extracellular iron. *Cell.* 103: 113-125.
- Wosten, M.M. & Groisman, E.A. 1999. Molecular characterization of the PmrA regulon. *J Biol Chem.* 274: 27185-27190.
- Wylie, J.L., Bernegger-Egli, C., O'Neil, J.D. & Worobec, E.A. 1993. Biophysical characterization of OprB, a glucose-inducible porin of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 25: 547-556.
- Wylie, J.L. & Worobec, E.A. 1995. The OprB Porin Plays a Central Role in Carbohydrate Uptake in *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 177: 3021-3026.
- Xiong, A., Singh, V.K., Cabrera, G. & Jayaswal, R.K. 2000. Molecular characterization of the ferric-uptake regulator, fur, from *Staphylococcus aureus*. *Microbiology.* 146: 659-668.
- Yates JR & Holmes DS. 1987. Two families of repeated DNA sequences in *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* 169:1861-1870.
- Zahrt, T.C., Song, J., Siple, J. & Deretic, V. 2001. Mycobacterial FurA is a negative regulator of catalase-peroxidase gene *katG*. *Mol. Microbiol.* 39: 1174-1185.
- Zheleznova, E.E., Crosa, J.H. & Brennan, R.G. 2000. Characterization of the DNA- and metal-binding properties of *Vibrio anguillarum* fur reveals conservation of a structural Zn (2+) ion. *J. Bacteriol.* 182: 6264-6267.
- Zheng, M., Wang, X., Templeton, L.J., Smulski, D.R., LaRossa, R.A. & Storz, G. 2001a. DNA microarray-mediated transcriptional profiling of the *Escherichia coli* response to hydrogen peroxide. *J. Bacteriol.* 183: 4562-4570.

- Zheng, M., Wang, X., Doan, B., Lewis, K. A., Schneider, T.D. & Storz, G. 2001b. Computation-Directed Identification of OxyR DNA Binding Sites in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 183: 4571-4579.
- Zheng, M., Doan, B., Schneider, T.D. & Storz, G. 1999. OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *J. Bacteriol.* 181: 4639-4643.
- Zheng, L., Cash, V.L., Flint, D.H. & Dean, D.R. 1998. Assembly of iron-sulfur clusters -Identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* 273: 13264-13272.
- Zou, P., Borovok, I., Ortiz de Orue Lucana, D., Muller, D. & Schrempf, H. 1999. The mycelium-associated *Streptomyces reticuli* catalase-peroxidase, its gene and regulation by FurS. *Microbiology.* 145: 549-559.

7. ANEXO

1) Feo A

```

EC -----MOYTPDTAMSTGFSREI SPA-YRQKLLSYGLPGSSFNWVAPICDSEHLETFRVSLVLRKDLALSTVAFSC-----
PA -----SALQPSRSYSTGYSPISNG-YRQKLLSYGLPGAAHVRVSLIAPGDFEONETRQTSBALRDKDLALSTVVPD-----
MM -----MRLHLGSRWIAMDVSLQDKPDSRHWGFAKGER-D-YRQKLLSYGLPGAEFFVTSVAPICDSEHLETFRVSLVLRKDLALSTVAFSC-----
SO -----KLSSEISPFDRITISEGRDLDPQVRRKLLSMGHTNTRFSETRRRAPICSGPEDDIRGSSILCARRDADIIEVSKAND-----
PyF -----MLKLSDFPITMREGETEVVNDQSEVNV---ASKLLSMGHTPCVVRVSRKPE---EALIGVSSALAGWESKIIVRRR-----
PyA -----MSDITYPITALGEGETEVVNLGSPN---ASKLLSMGHPGVAVRVEKRGPE---EALIGVSSALAGWESKIIVRRR-----
PyH -----MHVPIITSKEEETEVVNLGSPN---ASKLLSMGHPGVAVRVEKRGPE---EALIGVSSALAGWESKIIVRRR-----
AF -----MNSSIISPPEPFYGDREDFHEETETGKI---MCKRLMGVGRRDILRVVTEGPGKR---GATVQGGGALAGWVQIQRRVAILPTESPHTGEKT
CA -----MINKAPFHNISAARDSEURDTGTEV---MCKRLMGVGRRDILRVVTEGPGKR---GATVQGGGALAGWVQIQRRVAILPTESPHTGEKT
MB -----MSEKDCRREELAKKA---LRRRITPGEFTSSSRIRGCGERN---EAVNNGARYALCKEAMKIMVPEP-----
    
```

2) PorA

```

AF-omp40 -----MKNLALGAAARVAVVGVAVTSADQPIAFCVATCAQCGTIPSSNHLIC---ANRIRGFKGAVPFTYYICGAVTEAGLQAN-----
ST-ompC -----MVKLSVAVPALVSENAHAIIVNKL---ENKLEPKGCGHYSSDKDS---D---STYRSGFKGFTQNDLQYGCIVYLCQND-----
AF-porA MAQVRTSALDTLMTATGFRHASSSRHLCSEFTYVHTCEAVYIIGAYITPEHPHAIALLICATGFPFSCVIAEHPATGNGPIPTDTEPKYLEPVRHLLPETSAGHAD
    Peptido señal

AF-omp40 -----LIPKHAQILNMLGSHVTEGAQ-AQLMADWINAPVPTQLCSEKRIPEGLEMTAGNELMITY---ENRQSLLPGRAGAMLEADDVETGIGYAVCFEDTSLDPAVYS-----
ST-ompC -----LESNDSWRVAFAAC---LKFADGSEFDYRNQGVYDVTWIDLEGGITTYCADNHC---ORGEVATYINDFGIVLDFLQIQKNSVSGENTNGRSLN-----
AF-porA SEHISNLSGSHRPFSEKREACIGGEYDTRKGLRFGKESLDAIHSRQVQVREIIGTSSHWAPDAIFYDRAFRQVWLDLNTVAVGVVYFDVTNALGLINSFGLTP
    PEEGGD H.magnetotacticum

AF-omp40 -----YNTFGSGSGLLNHCKTISSEKICYMCPILTAEVSGSGCERKCTHISNVEYOCQMGHYVAFVASE---LPIILHII---LYIVTIPATVHAAITAN-----
ST-ompC -----KNGDGYSESLVVALPEEISGGAHITKRTADQNTANALVYNG---GRADITGGLDANMIVLALMAQTEI---ARRGTSNGSN---PISYGENKAKSSSAL-----
AF-porA TETVNVPEIATVPYSGLGEVGHNEHLSKAVFAGDQPCISADR-GVAVLHSGELHMKKDEDELDNDWGRYILMCEMNYQSSIDVLVLSSESSGIIVAVGSHLSE
    PEEGGD H.magnetotacticum

AF-omp40 -----LYEMTLTDMIDVEAARYVNAVVEQDTLS-----TIVGLNIVVFNPHAAVGLVLLATRGGS---IDITIPCRIGAFINGVYNTIHOEQAGF-----
ST-ompC -----YQDFDGRPSVYLLSKGKLSINRYASVSDDIVY-----ICVCAITVFRKMSYVDEKLLH-----DGDVDAQNTEDIVALG-LVYQ-----
AF-porA RELGAFVOMGGCPQVFNVPEVTLGLRLHPFASPPDLSVGMKAWLRSRFDALGVKPADIRGAETSSEITVAPLTHEVSLQPDLYIQIRNYIPSTVBLRKHGHEF-----
    
```

FeoB

EC -----KKKIKLIIKGNPNSEKTKLLEKLTGSHQVGNMAGVIVVERKGGFSTTHOHTVMDLPGYSHITTISSOTLDEQIACHUISELADEINVDASNIERNIMYLTJOLLELIIICMAINMICHAE
ST -----MKKIKLIIKGNPNSEKTKLLEKLTGSHQVGNMAGVIVVERKGGFSTTHOHTVMDLPGYSHITTISSOTLDEQIACHUISELADEINVDASNIERNIMYLTJOLLELIIICMAINMICHAE
HP -----MKKIKLIIKGNPNSEKTKLLEKLTGSHQVGNMAGVIVVERKGGFSTTHOHTVMDLPGYSHITTISSOTLDEQIACHUISELADEINVDASNIERNIMYLTJOLLELIIICMAINMICHAE
AF -----MSDCHGTQRNPFCSAELPVIAIAENPNSEKTKLLEKLTGSHQVGNMAGVIVVERKGGFSTTHOHTVMDLPGYSHITTISSOTLDEQIACHUISELADEINVDASNIERNIMYLTJOLLELIIICMAINMICHAE

G1

G2

G3

G4

EC -----KONLIEIALESARLGCVEVPELIVTTFPGIEAKLALRYKANENBEIHYAOPFNEOSLAKVPSDI LKORRIILKOLEG-DVYSRAYAGEAONDI SLALRDEADDFE LADAROCIAICICISTLTLA
ST -----KOOVIVDVALSTRLLCCVVELLVEIHERGIEAKLALRYKANENBEIHYAOPFNEOSLAKVPSDI LKORRIILKOLEG-DVYSRAYAGEAONDI SLALRDEADDFE LADAROCIAICICISTLTLA
HP -----KEGIINDEKLSKELGVCVPTSAVSKERQNTTEILLEIIR-----KRRHANNDNDELHYAOPFNEOSLAKVPSDI LKORRIILKOLEG-DVYSRAYAGEAONDI SLALRDEADDFE LADAROCIAICICISTLTLA
AF -----AHEGVRREHELEAPAGSEVVPVAVARQRSELSMEALIQONDRHPCGNLDYGCLEAPALITALGTLDPGCPAHRRETEIICILEGNIDPEPKIHLRCQSEBEGSTDETPADLMDRRRFAQOEMTIAHRRGPAE

EC -----EPSGFTADKRIIANKLGLCPLEPIFMYYLIFINGCAPLIEIVSSVVEVHGHQMGYTLHPFMTLIIHQGGGNTVPLIPFGICVLELSIEDSGYARAAPADRLLQALSLGKSTFPLIIHGCGNV
ST -----EPSGFTADKRIIANKLGLCPLEPIFMYYLIFINGCAPLIEIVSSVVEVHGHQMGYTLHPFMTLIIHQGGGNTVPLIPFGICVLELSIEDSGYARAAPADRLLQALSLGKSTFPLIIHGCGNV
HP -----ASFEIYVDKIMURRYGIELEIEMIESSEHLEGGSCAKALEI-----EKFISDIEKENAVEN-----EELASVGDSEHIGGCATSEIPIVAVEGEELAFEGYARAAPADRLLQALSLGKSTFPLIIHGCGNV
AF -----LROQIADRIELVANDLTCFHELEIWHYLEFESVSGENVFLDFEQCSSEHLEGGSCAKALEI-----EKFISDIEKENAVEN-----EELASVGDSEHIGGCATSEIPIVAVEGEELAFEGYARAAPADRLLQALSLGKSTFPLIIHGCGNV

EC -----FVWCGARTLHARRERITIMZAPEMSCCARLAHAPAPAPFEGCA-----SILAVESYILGIVVAVLTLKAYTARGEATPEVWELLYVYHVVYSITITWORLDGFTIRAGVIVSIFSAENSISLSCS--IVDNI
ST -----BSWCGARTLHARRERITIMZAPEMSCCARLAHAPAPAPFEGCA-----SILAVESYILGIVVAVLTLKAYTARGEATPEVWELLYVYHVVYSITITWORLDGFTIRAGVIVSIFSAENSISLSCS--IVDNI
HP -----PAYAGARTLONVNERITIMZAPEMSCCARLIPYHVEVSEPESSAGFHEGAVYGAVALMAYLAKLANSCEPESHEMEKVPFESRQVWVSEITISLWAKAGTYLVSEHILFSAENPKS-----
AF -----PALMGSEFIDEDEFCRMIIMZAPEMSCCARLIPYHVEVSEPESSAGFHEGAVYGAVALMAYLAKLANSCEPESHEMEKVPFESRQVWVSEITISLWAKAGTYLVSEHILFSAENPKS-----PCIGMIFGLRSTDE

EC -----NPSALZASVSRVITPVEKPKGHEEDMKQDPLGIFTEZAAKEVIGTLNITVTEIOEENENENENEEFSEIDETWOSKIFLSVLAMN--PIEASKSDLEAGMGVDOOKFES--AAALAZLEVLLYVPC
ST -----NPSALZASVSRVITPVEKPKGHEEDMKQDPLGIFTEZAAKEVIGTLNITVTEIOEENENENENEEFSEIDETWOSKIFLSVLAMN--PIEASKSDLEAGMGVDOOKFES--AAALAZLEVLLYVPC
HP -----DZAKKAYKOESLWAKDITISSAAKEEKEKTEEDKKNKN--SICRSGAYLKEKSEMOFTARLKSLSVTGFAKEVYVTLG-----HPSLONKXSLFRGELFVFS--VFSIIEVEVEHIFPC
AF -----DHEIPLQCFSALEPEHEEESHODNNEPELISELAEAPAKVIVIGTLNITVTEIOEENENENENEEFSEIDETWOSKIFLSVLAMN--PIEASKSDLEAGMGVDOOKFES--AAALAZLEVLLYVPC

EC -----ISGALRESSRSMGFSLLGINLAFSTFYONVNSOHEVYSHVCLVLELNI-----GLRRARSVVIELLAIRKSVSCCAASTGTGDCH
ST -----ISGALRESSRSMGFSLLGINLAFSTFYONVNSOHEVYSHVCLVLELNI-----GLRRARSVVIELLAIRKSVSCCAASTGTGDCH
HP -----FATLITREAE-----KLEKAYLPEETAYASLTAVATCLLV-----SILRRARSVVIELLAIRKSVSCCAASTGTGDCH
AF -----AETGLRREREVNSMSESHLGTCAISSTHICSSIAKFGHSJAWPAPAPAFVGCFLYGOGRALSKELNARRRGA-----

Motivos GTPasa= G1: Caja Walker A; G2 y G3: Caja Walker B, G4: puente H ala guanina, G4: unión GMP, Recuadro: dominios de transmembrana, Línea Punteada: vueltas periplasmáticas, Línea continua: vueltas citoplasmáticas

9) Permeasa

```

MA  MNRNRINRETRRNSTTLLAFLVHFFSEGLIGRVESEFLVILAVSVEPCTLLDLYTFLHILPRFANVVGALSSGCFQCFSEIVSPDILGCEGAFGAAEFLPSEFV
EC-FepG  -----MIVSRALITLCHHSGSALHIEGIRSGAFLMGGDPSLCTFLGALRPRVAVHGAALGSCAFPLHGMNIPSPDHLFDLQNSYLWVFLPQD
AF1451  -----MFLVIVLADGALLESSEHIFPLSFLVWQVSSFLLEPCAVGFLHMLCHALRPLSVLNGALIDSEPLSCQAFNFIADPDLQWSSAFKMMFLGSSW
AF1456  -----SIRVIRLIRLHFLVLLTISGSSFLGRVPLP-----LSSLAVS--G--NMLLHMLHMLHLLILAVLAVGALSVSGCFQCFSEIVSISLGVLSGAAFGAALIVLQPSG

```



```

MA  MIITPAIFGLAVAVIYFVSKRHKNTVLEWVEGGIAPALFHALLCKRYLADIDKMITLAVVYLMGSLSESSSIIAAGVLLGCTALLLGGKENVLSVSCHEAFSGNTFCVRLLLIFC
EC-FepG  -----LATAISAVLGHVTSILVWILLAWRNHIDTTPGRIHIEGALVLEFNMLLKS--LETALAGLIDASSINSFTWKTSPSPHILMLIDAAVLSNRLLDGDSTCALGVSVGSLILGIV
AF1451  -----LIVAAIEFGLAVAVIYFVHPEPFFHIMAVGGIDASALTALLVWVVAADPGLIIVVYLMGSLNPPRCPYHATLIFGQISLMLLGGKENVLSVSGHEAFSGNTFCVRLLLIFV
AF1456  -----LAOVSEIQCGLAVAVIYFVHPELHIVWMLVYGGIISALTALLVWVVAADPGLIIVVYLMGSLNPPRCPYHATLIFGQISLMLLGGKENVLSVSGHEAFSGNTFCVRLLLIFV

```



```

MA  -----LILLTAAVSSGELGICGLIIFPAAPHIVGELHMLLPASISLGAFLIIMVLCVATISSEIIFGWHVAFEGAPFVIMKQKYSQWR
EC-FepG  -----VWLTAAFDLAAEGLSILAPHTARPSLTAWGHVTCALGALLIARALGSCQIIMVYVHGGVWVLSGGIYLVHILLESKTK--
AF1451  -----ATLILAAVWVLAGKIGVGLSIFPHKRRHIEGEGURHLLISELGLAFLIILAPAEMLISEFTVHGGVPLLEVPELHILGSRKRVV
AF1456  -----ATLILAAVWVLAGKIGVGLSIFPHIARIVGPEMLVAPASALHFLIMVADLIRTPASSVEIIFGWHVAFEGAPFVIMKQKYSQWR

```

10) ATP-BP

```

AV  -----MIEGQINCFVAVLLEDFVLDNESSHICLLGPNVGRHITLITLGLTPEASSEIPLRSHRPHSSEEGFNGVGVYFC
sid7  -----MDSMRISASIMAFVAVLLEDFVLDNESSHICLLGPNVGRHITLITLGLTPEASSEIPLRSHRPHSSEEGFNGVGVYFC
MB  -----MVMSNIDHRAPESSNGRNFQYQNLISHEKGVYICLLGPNVGRHITLITLGLTPEASSEIPLRSHRPHSSEEGFNGVGVYFC
EC-FepC  -----MTESVARHAGEITLIGQYVAVAGVVEPDDGFTFSGPNVGRHITLITLGLTPEASSEIPLRSHRPHSSEEGFNGVGVYFC
EC-FhuC  MQEYVNHSDTTFAPIHISRVKPG--LHIFP--ITFPAKMTSILGPNVGRHITLITLGLTPEASSEIPLRSHRPHSSEEGFNGVGVYFC

```

Gl:Caja Walker A box

```

AV  AHPPEPPEVGEQVAVGPTAEGSIFGQEGGRKVAEALFLGLSAPKASTTESGGEROVLILADALGQPIIIMDEPFSGLVNGKVR
sid7  DRGAVVPELVCCVMDGCPVPSVLLGGARANTVCAKALEPLGADQLFAITELSGGROVLIADALGQAPILHLEDFVGLVNGKVR
MB  SNGSIFASNLVLDGCPVPELTVPTVFNKYKIAEALRGLLHGGVITLISGGEROVLILADALGQAPILHLEDFVGLVNGKVR
EC-FepC  NAITPGDIHGGVAVRQVHPHPRWKEGEZAVTMSATDITHLGQSVTILSGGRCRAWVAVVLAQPTAILLEDFVGLVNGKVR
EC-FhuC  QLPFAEGVPRVAVGPTVHGLGGRFAVAREKSEASLWTKPLHGLVDSVSGGERKRAWVAVVLAQPSRCLLEDFVGLVNGKVR

```

```

AV  VAVHICVAGVAVLLEDFVLDNESSHICLLGPNVGRHITLITLGLTPEASSEIPLRSHRPHSSEEGFNGVGVYFC
sid7  VAVHICVAGVAVLLEDFVLDNESSHICLLGPNVGRHITLITLGLTPEASSEIPLRSHRPHSSEEGFNGVGVYFC
MB  VAVHICVAGVAVLLEDFVLDNESSHICLLGPNVGRHITLITLGLTPEASSEIPLRSHRPHSSEEGFNGVGVYFC
EC-FepC  VAVHICVAGVAVLLEDFVLDNESSHICLLGPNVGRHITLITLGLTPEASSEIPLRSHRPHSSEEGFNGVGVYFC
EC-FhuC  VAVHICVAGVAVLLEDFVLDNESSHICLLGPNVGRHITLITLGLTPEASSEIPLRSHRPHSSEEGFNGVGVYFC

```

11) Globina

```

TFu  -----MVRVPRENSGTRLSALGEASTYVPGAMTSQHDDOMVPSVSGEETFTPARHETVCGAAE---PVVPSMIE--EDVGPAAE
MT  -----NPKSTVANGAKTFDAVSRFAQVAEL---EVVPSMIE--E-DGAGAE
BS  -----MGQSFNAPVARGDELSCVWTEVRAASH---PILVPSMIE--SDCTEAR
BA  -----MSKQPMHVAAGGQCCEILVWTEVYVSKH---PDLVPSMIE--DCTEAR
SA  -----MTTIRPTEC--KEAYDLYVETVWVKS---EPLVPSMIE--GDFAEISR
RS  -----MTDAASGQELAVLGGGARREILVRFVLDLPAPFAEVAHPE--PSVPSMIE
FM  -----MSTESTNPPDQGSNQPQEQREQLVAVLGGGARREILVRFVLDLPAPFAEVAHPE--PSVPSMIE
BP  -----MKRANAVSSGDPFGRSFMGLRDLFFDSTDSRMTDVTDDAPSPPEALVGGGARREILVRFVLDLPAPFAEVAHPE--PTGCGSRP
LI  -----MSFFIPGGGPPGPIPLGLVIGSGE--SISVPSMIE--EMLGCKRI
AF1463  MNMEQERSAVLKLVSINDAVLSEGGHPCGSETLDIRHFGEEESIVRAVTDMPFVPIFPTSRVARVAVKVEKREAVVEHHPVHHS---PQVPSGSKHFWKAVV
Arab  -----MQSLQDKASVLSGVDQAEAFIDESNLKRG--LQTFINSTNFTVYDIEE--EWFQSSN--SNKSDAIQ
BF  -----MDPLRSAAAPARARWTRCTRCXYLQLQVVDVSGHQPRAAQVPAFCVFLQPPHRLLAICAEAGLEPLVLCIMRRLRITPVARAGHCVAS

```

```

TFu  -----RVALTINLWGGRTYEEPRGHILPFRIFRIGASERTVITR---AVDDRETPAHLECCVLEIYVAVAVVPEDAQPPMVQVRSFTVTSNERDRGDEGETIRISLR---
MT  -----RPMLEQVWGGRTYEEPRGHILPFRIFRIGASERTVITR---AVDDRETPAHLECCVLEIYVAVAVVPEDAQPPMVQVRSFTVTSNERDRGDEGETIRISLR---
BS  -----QKQKTIWLGGEPPYVEEPRGHILPFRIFRIGASERTVITR---AVDDRETPAHLECCVLEIYVAVAVVPEDAQPPMVQVRSFTVTSNERDRGDEGETIRISLR---
BA  -----QKQKTIWLGGEPPYVEEPRGHILPFRIFRIGASERTVITR---AVDDRETPAHLECCVLEIYVAVAVVPEDAQPPMVQVRSFTVTSNERDRGDEGETIRISLR---
SA  -----QKQKTIWLGGEPPYVEEPRGHILPFRIFRIGASERTVITR---AVDDRETPAHLECCVLEIYVAVAVVPEDAQPPMVQVRSFTVTSNERDRGDEGETIRISLR---
RS  -----RPMLEQVWGGRTYEEPRGHILPFRIFRIGASERTVITR---AVDDRETPAHLECCVLEIYVAVAVVPEDAQPPMVQVRSFTVTSNERDRGDEGETIRISLR---
FM  -----RPMLEQVWGGRTYEEPRGHILPFRIFRIGASERTVITR---AVDDRETPAHLECCVLEIYVAVAVVPEDAQPPMVQVRSFTVTSNERDRGDEGETIRISLR---
BP  -----RPMLEQVWGGRTYEEPRGHILPFRIFRIGASERTVITR---AVDDRETPAHLECCVLEIYVAVAVVPEDAQPPMVQVRSFTVTSNERDRGDEGETIRISLR---
LI  -----LTAADVAVCGHIVHGHILPFRIFRIGASERTVITR---AVDDRETPAHLECCVLEIYVAVAVVPEDAQPPMVQVRSFTVTSNERDRGDEGETIRISLR---
AF1463  LTAADVAVCGHIVHGHILPFRIFRIGASERTVITR---AVDDRETPAHLECCVLEIYVAVAVVPEDAQPPMVQVRSFTVTSNERDRGDEGETIRISLR---
Arab  NQVETVWGGRTYEEPRGHILPFRIFRIGASERTVITR---AVDDRETPAHLECCVLEIYVAVAVVPEDAQPPMVQVRSFTVTSNERDRGDEGETIRISLR---
BF  -----RPMLEQVWGGRTYEEPRGHILPFRIFRIGASERTVITR---AVDDRETPAHLECCVLEIYVAVAVVPEDAQPPMVQVRSFTVTSNERDRGDEGETIRISLR---

```

12) Antígenos de Superficie

AF0754 -----FSSVFAFVYVNTFQVAFVHAKQDRVHVLPTRGVVPEVLLNGARV-----VYDAMVYHYVAANGAFAQDTIHYKCKTTEG
 AF0728 --MNRMAKAVICVILAGPLCYLPSAENPHNHLSSKQDPCNIANYIATPTGRVIVPVCAIKCTGH-----PQVLAADQVHTAVANGAIPROTIHYDGNHRR
 AF2927 MGTDRPSSRAMTSPFLIRVYVPHRRKYVSHFYHRTFLPLSGCEPALLAGPAAAGSAVDEKDPSSSECHRESARAEAVMIIHHRISPRTPSRRWRDLTDCGAAVYV

AF0754 [E]LAAMKCAKEAF[PTD]AIN-----[R]DVI[CH]S[ST]QGM[AG]E[HI]H[V]A[GG]GS[DV]A[FT]VQ[EN]K[HI]
 AF0728 [D]E[A]A[RI]A[AV]Q[P]M[AV]ATP[DS]G[TA]INP[Q]H[AG]A[GV]VYI[P]K[EG]V[LI]T[A]K[AT]L[A]E[SD]S[A]I[P]S[S]V[S]S[DE]F[Q]G[TA]S[PD]G[TF]A[IG]D[S]S[A]V[A]R[S]V[Q]S[K]K[HI]
 AF2927 [A]P[CG]V[S]L[PT]D[GH]Y[L]L[L]T[S]G-----[F]K[R]N[A]D[A]H[G]P[S]S[S]P[S]V[L]I[E]D[V]S[N]P[R]P[OT]T[V]P[PI]N[S]C[HA]I[S]A[G]K[T]L[V]S[EG]D[IN]L[F]Q[K]T[---]P

AF0754 [R]VYPLA[K]P[FP]P[AY]VYVY[Q]G[H]I[G]P[R]L[F]Y[ED]S[V]A[G]H[R]P[R]HLYVY[GM]S[NS]L[AR]I[NC]O[TC]-----[W]IYV[V]G[V]Y[F]F[A]V[TF]P[CH]S-----[K]L[V]V[S]L[NG]E[N]A[V]L[V]C[S]S[SH]
 AF0728 [R]VYPLC[K]A[FP]P[AY]VYVY[Q]G[H]I[G]K[V]Y[V]Y[ED]S[V]V[CF]N[GH]LYVY[GM]A[NS]L[AR]I[SH]A[IG]-----[W]IYV[V]G[V]Y[F]F[A]V[AL]A[IN]-----[Q]L[V]V[S]D[HA]G[H]V[V]W[D]P[CS]E[V]I
 AF2927 S---[G]P[RT]D[G]-[H]P[T]L[G]R[S]G[L]G-[L]V[K]P[L]T[A]G[L]S[S]E[GR]I[L]E[N]F[Y]N[S]S[V]I[D]D[Q]R[R]V[L]R[V]P[P]G[S]E[GR]R[S]C[A]S[ES]P[F]W[V]P[Q]H[R]Q[V]VY[S]S[M]R[E]T[V]Y

AF0754 [F]VYV[PT]H[PT]N[TC]G[V]H[P]T[A]R[V]M[HS]I[V]V[V]A[H]H[R]V[A]E[S]A[L]E[R]S[HS]I[DS]I-----[Y]P[DA]P[GS]Y[P]D[G]L[AG]S-----[N]E[V]M[A]G[I]N[D]V[A]V[ND]Q
 AF0728 [F]E[PT]E[A]V[HS]I[V]A[G]V[H]P[T]A[V]M[PH]S[H]V[E]V[Q]A[N]H[V]E[V]T[Q]M[V]E[V]Y[V]D[S]I-----[Y]P[DA]P[GS]Y[P]D[G]L[AG]S-----[N]E[V]M[A]G[I]N[D]V[A]V[ND]R
 AF2927 I[ET]G[N]D[S]K[V]I[V]A[R]E[TP]G[N]R[PL]L[D]E[A]R[Q]R[S]V[A]E[R]S[E]V[V]D[TC]K[V]R[A]G[V]L[V]G[E]V[R]R[A]G[T]E[V]S[V]S[Q]E[N]L[E]P[A]N[A]L[G]I[S]P[D]H[Q]I[N]A[T]L[S]Q[M]A[E]A[V]L[S]A

AF0754 --[P]G[N]G[L]I[P]T[E]W[Y]P[A]E[H]H[A]L[Y]V[A]K[G]L[S]G[S]P[N]E[H]E[Q]H[N]D[S]M[V]R[Q]H[M]-----[F]I[L]P[A]T[Q]E[S]L[N]D[G]E[T]P[Q]C[E]T[R]E[T]E[V]K[T]D[A
 AF0728 --[P]G[R]L[G]I[P]T[A]W[Y]P[S]L[V]V[A]N[A]L[Y]S[C]A[K]G[L]G[P]H[L]Q[V]Y[E]G[N]N[H]G[V]I[Q]V[A]L[E]I-----[A]H[L]D[V]I[E]K[S]H[N]D[G]E[T]S[A]C[P]R[A]E[Q]V[K]I[T]T
 AF2927 G[A]M[P]S[D]G[L]P[T]A[V]S[Q]D[V]P[S]P[D]A[V]I[V]N-N[K]S[T]G[A]P[C]I[C]S[G]Y[P]E[C]I[A]S[S]P[E]P[N]Q[V]I[L]Q[L]S[L]G[L]Q[E]I[P]H[L]K[V]D[L]S[E]T[S]V[L]K[N]H[S]L[L]S[H]I[Q]V[M]D

AF0754 [L]R[K]H[Y]V[V]I[L]R[N]K[T]E[D]E[H]S[D]Q[T]A[G]A[D]P[H]L[D]Y[G]S[C]L[P]N[L]Y[L]A[H]H[N]L[V]M[A]D[G]E[V]T[A]G[G]H[W]T[S]A[S]D[S]I[V]Q[F]H[V]E[V]Y[S]G[R]L[A]N[P]G[W]I[S]L[V]P
 AF0728 [L]R[K]H[Y]V[V]I[L]R[N]K[T]E[D]E[D]L[G]Y[A]G[G]A[D]P[H]E[D]M[N]Q[S]L[P]N[L]Y[L]A[H]H[N]A[L]F[M]A[D]G[E]V[T]A[G]G[H]W[D]G[A]S[D]S[D]V[Q]P[V]E[V]Y[S]H[R]G[L]E[N]-----[A]G[E]
 AF2927 [L]R[K]H[H]Y[V]V[I]L[R]K[E]N[S]D[V]L[G]I[L]P[R]S-N[D]E[S]I[T]E[P]L[V]A[V]T[Q]H[R]L[D]E[V]I[D]H[E]L[V]T[E]A[S]E[P]W[A]R[T]A[R]E[S]I[N]G[K]I[N]N[V]A[G]G[S]Y[E]G[E]T[R]N[V]V

AF0754 [A]E[FG]G[V]L[V]Q[N]E[V]A[V]Y[N]L-SALCKW[N]P[W]S[F]A[R]L[E]N[D]L[S]E[Q]V[E]D[E]G[E]E[V]P[S]O[A]S[N]E-----[K]E[D]H[A]T[Q]E[S]G[D]R[M]I[L]
 AF0728 [S]E[S]L[K]P[T]E[A]N[P]Y[D]I[Q]-----[L]G[H]N[P]H[S]E[S]P[R]L[E]N[D]L[S]E[Q]V[E]D[E]G[E]N[A]R[F]D[S]V[IR]-----[S]I[L]H[R]E[V]R[N]S[A]D[R]M[I]L
 AF2927 [L]C[G]E[R]R[A]N[P]T[H]M[P]D[L]L[P]C[E]D[V]A[A]P[S]A[G]R[Y]Q[Q]I[L]S[A]M[L]P[Q]L[V]R[E]G[F]E[V]D[L]E[R]S[A]H[V]I[P]L[S]R[H]P[Y]Q[E]I[I]Q[A]Y[P]A[N]E[V]A[V]H[P]E[S]L[N]A[V]P

AF0754 [Y]Y[E]E[V]N[L]K[A]H[L]S[K]E[P]E[Y]I[V]H[P]D[D]H[T]A[R]---K[S]Y[V]T[D]Y[V]A[N]H[D]Y[A]K[E]I[H]Y[L]S[T]H[E]R[R]I[S]A[V]L[T]E[D]D[A]Q[S]G[A]D[H]I[N]A[H]R[T]E[A]L[A]G[V]W[K]V[L]E[T]
 AF0728 [Y]Y[E]E[V]N[L]K[A]H[L]S[K]E[P]E[Y]I[V]H[P]D[D]H[T]A[G]I---S[P]Y[V]T[D]Y[V]A[N]H[D]Y[A]K[E]I[H]Y[L]S[T]H[E]R[R]I[S]A[V]L[T]E[D]D[A]Q[S]G[A]D[H]I[N]A[H]R[T]E[A]L[A]G[V]W[K]V[L]E[T]
 AF2927 [Y]Y[E]E[V]E[R]Y[E]R[N]G[L]I[L]S[L]R[F]D[H]T[E]K[F]G[A]M[D]G[V]N[P]E[L]V[A]N[D]L[V]L[L]A[E]R[E]H[R]Y[A]D[T]E[L]I[V]E[D]D[A]G[E]P[D]H[E]A[H]E[L]E[V]E[S]V[E]S[E]A[S]E

AF0754 [L]Y[S]O[V]N[L]K[E]A[E]L[G]L[P]P[S]O[M]I[Q]A[N]C[V]I[S]G[I]W[D]H[P]D[F]A[P]T-C[V]L[E]N[Q]V[P]V[F]H[A]G[K]D[H]Y[L]L[R]R[E]A[G]A[T]G[H]Y[L]T[A]N[E]T[A]V[R]E[OT]N[S]A[Z]I[P]A[S]K[A]D[T]Y[T]E[T]
 AF0728 [L]S[O]V[N]I[N]K[E]A[E]L[G]L[P]P[S]O[M]I[Q]A[N]S[V]A[G]I[N]T[D]H[P]D[F]A[P]T[P]A[V]L[S]O[V]E[V]S[F]E[K]S[N]R[T]L[R]R[E]A[G]A[T]G[H]M[L]T[A]---E[L]S[A]P[D]G[H]R[R]A[P]V[S]A[N]Y[T]E[T]
 AF2927 [H]P[N]T[N]E[L]E[L]E[S]L[G]L[P]P[S]A[L]L[E]A[R]P[A]D[H]D-----L[R]Q-----R-[E]S[E]E[C]P[S]G[M]L[Q]S[T]A[L]A[R]W[F]S[A]R[S]G[---S]A[Q]N[L]R[L]H[D]K[Y]W[A]R[T]E[N]D[S]E[A

AF0754 [L]L[K]V[G]P[E]C[K]K[O]E[W]I[A]S[K]E[R]K[S]Y[V]M[A]Y[L]R[A]T[S]A[C]D[P]P[A]V[A]Y[S]G[E]K[E]---
 AF0728 [L]L[K]V[G]P[E]C[K]K[O]E[W]I[A]S[K]E[R]K[S]Y[V]M[A]Y[L]R[A]T[S]A[C]D[P]P[A]V[A]Y[S]G[E]K[E]K[L]H
 AF2927 E[D]S[Q]T[A]Y[N]G[L]E[S]I[M]H[T]P[Q]P[E]

14) PmrB

AF0969 -----KISLGRSLGKSHVYVYVLSLSEALSTILNLRDNYDASLQVYALPPQIMRNITYRYREPVDVDSVRIVVEPELWVQCQVDVSKLTPQ-----SSSEHTIA
 CT -----MGRKTAIPPLORRLIAGAVLAIKAVATSEITEXREARLFDIDILGCAVLSRGEWETVGAQLVSPSSASLSLPSRILFHFTRDSARWLAQH---DAPSFHTLR
 GM -----MGGSQPNCHLRRRLIMAGVTHASLILAGFCSDIAVREARLQDILRGLKALIGR---HAQTSDFWMSFMGSIHNFPSARLSPFLGNVPRPKLPLPTTIPSEFQND
 RM MAGAGRLKHAGRESEKGLSLSWISATIAKAVLSESSASAFREARLIDDLRGLGCHLFDACHLEAPHLADAGRLPHSDSEARVIVOTLSPGGDSARQIDALERS---APHLGLGFE
 NG -----MGRFFKILRREKLVMSLAIWMEYDMLKAVESLSTETHEFAADDDLECAVLYGPF-----DSKSELPECGCHLRIKMPQQEDPVVSLRHH---DAPSFHTLR
 ST -----MRRFRPAMTLRORLITKILKILKQILSTLMLWHESTLQDLFEQNR-----

AF0969 VEGQE--TRVEFRQGPDEAHAVAGSITDRSIAARTASARRTLLEHLDVPELLEFSTHIVLHESDAPLQSTIQAQDQONADRPESLSEEQVLECHLRFQAIHRLLESLRILLEGRRFTAL
 CT QGGFP--VAVETIVHG-PSAMTAVAPHTDRIEALNSALRLIAGEHIDRDLALVMRIVESAARVVEVLEHLDLQZGPGVFLPERGCHLELWVYGMNRLIQLSLLIGORRRIAL
 GM -----VAVETIVHG-PSAMTAVAPHTDRIEALNSALRLIAGEHIDRDLALVMRIVESAARVVEVLEHLDLQZGPGVFLPERGCHLELWVYGMNRLIQLSLLIGORRRIAL
 RM -----VAVETIVHG-PSAMTAVAPHTDRIEALNSALRLIAGEHIDRDLALVMRIVESAARVVEVLEHLDLQZGPGVFLPERGCHLELWVYGMNRLIQLSLLIGORRRIAL
 NG AGLDDYFVAVIRIT-EQGEAVYDNGFHEHMLKSEKSLDILARLHLLITVLLSEARERHWSQSLKCRINGPALSVMYHESLSEVATLILKEDDERRRORREAL
 ST -----LNRN-----NDRHINHEIRESVASTLIRKPSYSLGILCYQVAFETRELAELCELEAATADILAEKHSSTLEESVYSALNCLLFRPTTLRREHRTAL

AF0969 SAEHLRLEPTALSILGKMLEPDLSECKORRILPLGCSREPSHLLDOLLGAFQVATQSFPEVTL--DAVAPRQEDVPLALPAAITHEPLTA-STAVVCSAAAFYSLNNVQVDA
 CT SAEHLRLEPTALSILGKMLEPDLSECKORRILPLGCSREPSHLLDOLLGAFQVATQSFPEVTL--DAVAPRQEDVPLALPAAITHEPLTA-STAVVCSAAAFYSLNNVQVDA
 GM SAEHLRLEPTALSILGKMLEPDLSECKORRILPLGCSREPSHLLDOLLGAFQVATQSFPEVTL--DAVAPRQEDVPLALPAAITHEPLTA-STAVVCSAAAFYSLNNVQVDA
 RM SAEHLRLEPTALSILGKMLEPDLSECKORRILPLGCSREPSHLLDOLLGAFQVATQSFPEVTL--DAVAPRQEDVPLALPAAITHEPLTA-STAVVCSAAAFYSLNNVQVDA
 NG SAEHLRLEPTALSILGKMLEPDLSECKORRILPLGCSREPSHLLDOLLGAFQVATQSFPEVTL--DAVAPRQEDVPLALPAAITHEPLTA-STAVVCSAAAFYSLNNVQVDA
 ST SAEHLRLEPTALSILGKMLEPDLSECKORRILPLGCSREPSHLLDOLLGAFQVATQSFPEVTL--DAVAPRQEDVPLALPAAITHEPLTA-STAVVCSAAAFYSLNNVQVDA

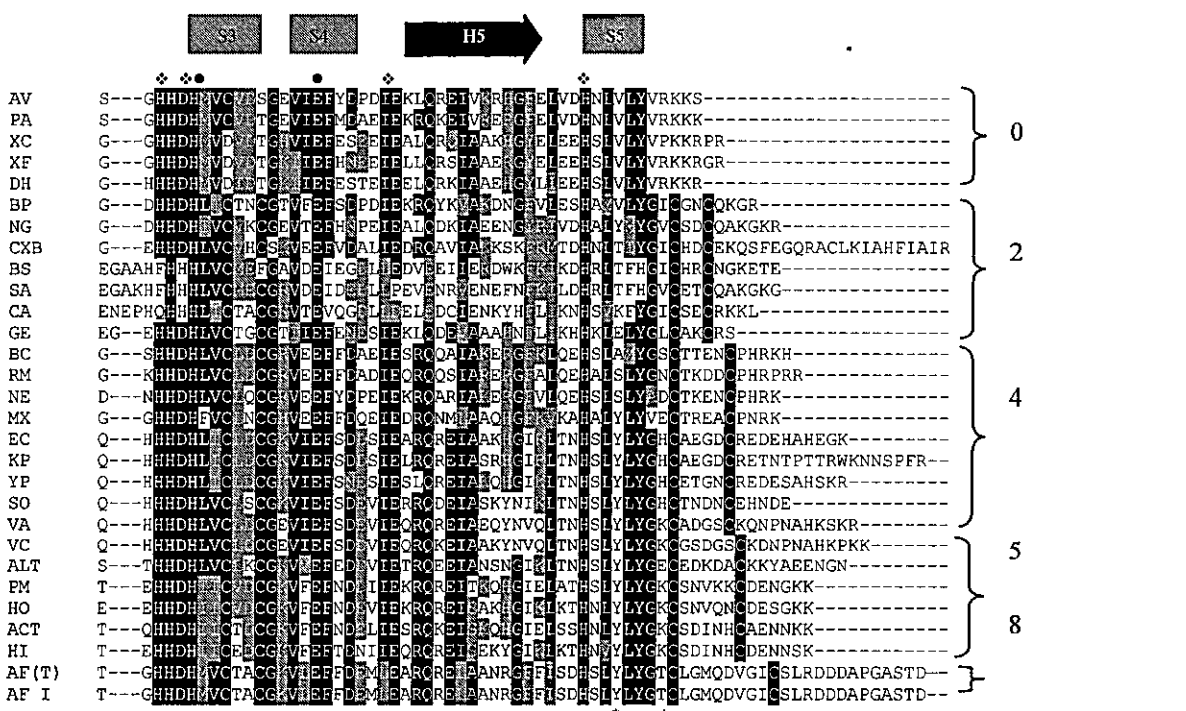
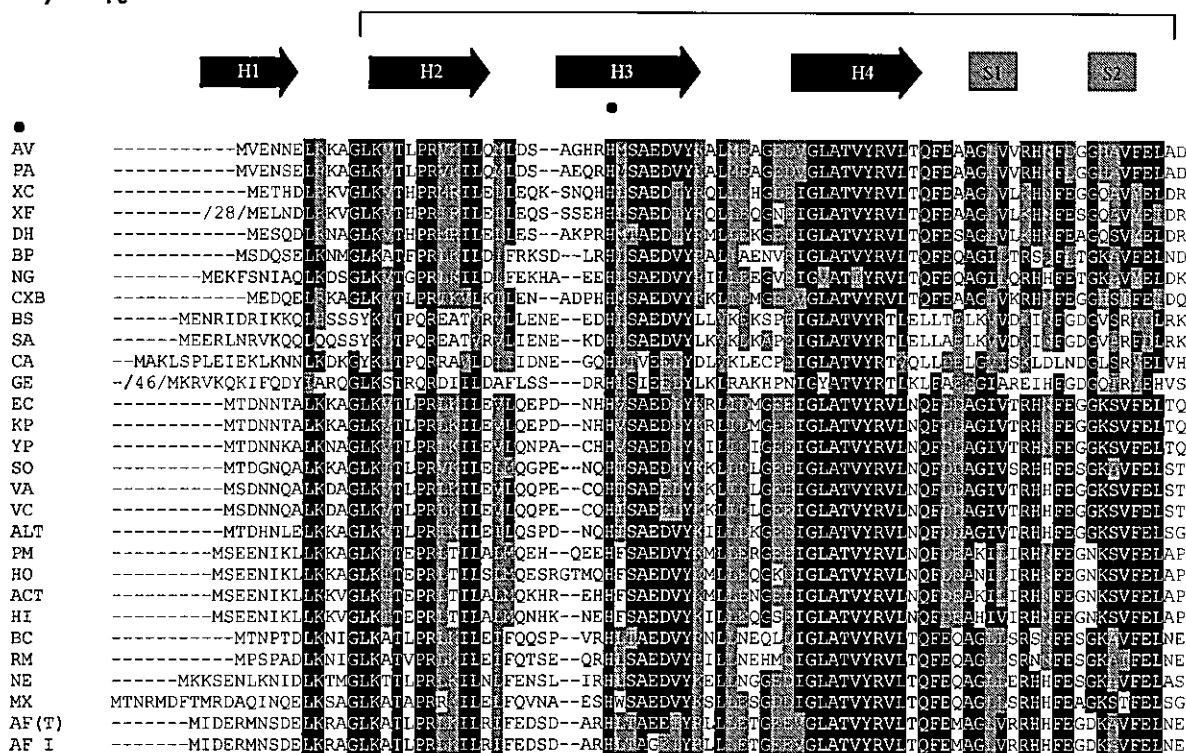
AF0969 LRVYVENSEVYVAYGGEYAHVHMGPGGILADLRNDFEYFRPCHTGGGLGGLVVEATLACGLGQNLIRSRKCSGLHLYRQNV-----
 CT LRVYVENSEVYVAYGGEYAHVHMGPGGILADLRNDFEYFRPCHTGGGLGGLVVEATLACGLGQNLIRSRKCSGLHLYRQNV-----
 GM LRVYVENSEVYVAYGGEYAHVHMGPGGILADLRNDFEYFRPCHTGGGLGGLVVEATLACGLGQNLIRSRKCSGLHLYRQNV-----
 RM LRVYVENSEVYVAYGGEYAHVHMGPGGILADLRNDFEYFRPCHTGGGLGGLVVEATLACGLGQNLIRSRKCSGLHLYRQNV-----
 NG LRVYVENSEVYVAYGGEYAHVHMGPGGILADLRNDFEYFRPCHTGGGLGGLVVEATLACGLGQNLIRSRKCSGLHLYRQNV-----
 ST LRVYVENSEVYVAYGGEYAHVHMGPGGILADLRNDFEYFRPCHTGGGLGGLVVEATLACGLGQNLIRSRKCSGLHLYRQNV-----

15) PmrA

AF0968 -----NRILLVEDIRNLEKNSALNHSYAVDHYPKETLRNLANQEQHAEELGLKLDGCTHEQRVAGCQSPHLELARSIADESEELIGADDYLVKPEF
 CT -----NRILLVEDIRNLEKNSALNHSYAVDHYPKETLRNLANQEQHAEELGLKLDGCTHEQRVAGCQSPHLELARSIADESEELIGADDYLVKPEF
 GM MPKPVDDSVCPASVPHGELNRILLVEDIRNLEKNSALNHSYAVDHYPKETLRNLANQEQHAEELGLKLDGCTHEQRVAGCQSPHLELARSIADESEELIGADDYLVKPEF
 RM -----MMSDTVMENANRILLVEDIRNLEKNSALNHSYAVDHYPKETLRNLANQEQHAEELGLKLDGCTHEQRVAGCQSPHLELARSIADESEELIGADDYLVKPEF
 NC -----NRILLVEDIRNLEKNSALNHSYAVDHYPKETLRNLANQEQHAEELGLKLDGCTHEQRVAGCQSPHLELARSIADESEELIGADDYLVKPEF
 ST -----NRILLVEDIRNLEKNSALNHSYAVDHYPKETLRNLANQEQHAEELGLKLDGCTHEQRVAGCQSPHLELARSIADESEELIGADDYLVKPEF
 EC -----NRILLVEDIRNLEKNSALNHSYAVDHYPKETLRNLANQEQHAEELGLKLDGCTHEQRVAGCQSPHLELARSIADESEELIGADDYLVKPEF
 YP -----NRILLVEDIRNLEKNSALNHSYAVDHYPKETLRNLANQEQHAEELGLKLDGCTHEQRVAGCQSPHLELARSIADESEELIGADDYLVKPEF
 HI -----NRILLVEDIRNLEKNSALNHSYAVDHYPKETLRNLANQEQHAEELGLKLDGCTHEQRVAGCQSPHLELARSIADESEELIGADDYLVKPEF

AF0968 MELLARPAARRPQQGQSPYVUGDSKLDLSSITLQSGEL--SLDQWDFALLKLLRFGCLSLACLEHRYGNDGQVESNHTSLELHRLKAKVLRNVRCAWSPQGP--
 CT MELLARPAARRPQQGQSPYVUGDSKLDLSSITLQSGEL--SLDQWDFALLKLLRFGCLSLACLEHRYGNDGQVESNHTSLELHRLKAKVLRNVRCAWSPQGP--
 GM MELLARPAARRPQQGQSPYVUGDSKLDLSSITLQSGEL--SLDQWDFALLKLLRFGCLSLACLEHRYGNDGQVESNHTSLELHRLKAKVLRNVRCAWSPQGP--
 RM MELLARPAARRPQQGQSPYVUGDSKLDLSSITLQSGEL--SLDQWDFALLKLLRFGCLSLACLEHRYGNDGQVESNHTSLELHRLKAKVLRNVRCAWSPQGP--
 NC MELLARPAARRPQQGQSPYVUGDSKLDLSSITLQSGEL--SLDQWDFALLKLLRFGCLSLACLEHRYGNDGQVESNHTSLELHRLKAKVLRNVRCAWSPQGP--
 ST MELLARPAARRPQQGQSPYVUGDSKLDLSSITLQSGEL--SLDQWDFALLKLLRFGCLSLACLEHRYGNDGQVESNHTSLELHRLKAKVLRNVRCAWSPQGP--
 EC MELLARPAARRPQQGQSPYVUGDSKLDLSSITLQSGEL--SLDQWDFALLKLLRFGCLSLACLEHRYGNDGQVESNHTSLELHRLKAKVLRNVRCAWSPQGP--
 YP MELLARPAARRPQQGQSPYVUGDSKLDLSSITLQSGEL--SLDQWDFALLKLLRFGCLSLACLEHRYGNDGQVESNHTSLELHRLKAKVLRNVRCAWSPQGP--
 HI MELLARPAARRPQQGQSPYVUGDSKLDLSSITLQSGEL--SLDQWDFALLKLLRFGCLSLACLEHRYGNDGQVESNHTSLELHRLKAKVLRNVRCAWSPQGP--

16) Fur_{F0} AF2557



Origen de las secuencias:

ACT: *Actinobacillus actinomycetemcomitans*
AF (T): *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC23270 (TIGR)
AF I: *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC23270 (pFur1).
AF: *Acidithiobacillus ferrooxidans*
ALT: *Alteromonas* sp. O-7
Arab: *Arabidopsis* sp.
AV: *Azotobacter vinelandii*
BC: *Burkholderia cepacia*
BF: *Burkholderia fungorum*
BP: *Bordetella pertussis*
BS: *Bacillus subtilis*
CA: *Clostridium acetobutylicum*
CT *Chlorobium tepidum* TLS
CV : *Chromobacterium violaceum*
CXB: *Coxiella burnetii*
DH: *Desulfotobacterium hafniense*
EC: *Escherichia coli*
GE: *Geobacter metallireducens*
GM *Geobacter metallireducens*
HI: *Haemophilus influenzae*
HO: *Histophilus ovis*
HP: *Helicobacter pylori*
HS: *Haemophilus somnus*
KP: *Klebsiella pneumoniae*
MA : *Methanosarcina acetivorans*
MB: *Methanosarcina barkeri*
MM: *Magnetospirillum magnetotacticum*
MT: *Mycobacterium tuberculosis*
MX: *Magnetococcus* sp. MC-1
NC *Neisseria cinerea*
NE: *Nitrosomonas europaea*
NG: *Neisseria gonorrhoeae*
PA: *Pseudomonas aeruginosa*
PM: *Pasteurella multocida*
PyA: *Pyrococcus abyssi*
PyF: *Pyrococcus furiosus*
PyH: *Pyrococcus horikoshii*
RM *Ralstonia metallidurans*
RS: *Ralstonia solanacearum*
SA: *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* Mu50
SE *Salmonella enteritidis*
SO: *Shewanella oneidensis* MR-1
ST *Salmonella typhimurium* LT2
VA: *Vibrio anguillarum*
VC: *Vibrio cholerae*
WS: *Wolinella succinogenes*
XC: *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*
XF: *Xylella fastidiosa* 9a5c
YP: *Yersinia pesitidis*