



UCH - FC  
Paz Paz Doc-microbiol  
2664  
c. 1

**Análisis estructural y funcional de una región génica involucrada en la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  y tiosulfato en *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 19859**

Tesis presentada a la  
Universidad de Chile

en cumplimiento de los requisitos para optar al grado de  
Doctor en Ciencias Biológicas  
Mención Microbiología  
Facultad de Ciencias



Entregada por

GLORIA PAZ LEVICÁN JAQUE

Dirigida por:

Dr. David S. Holmes  
Dra. Eugenia Jedlicki C.

2003

**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

*GLORIA PAZ LEVICÁN JAQUE*

ha sido aprobada por la comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas con mención en Microbiología, en el examen de defensa de Tesis rendido el 9 de Julio del 2003.

**Director de Tesis**

Dr. David Holmes

*David S. Holmes*

**Comisión de Evaluación de la Tesis**

Dr. Romilio Espejo

*R. Espejo*

Dr. Carlos Jerez

*C. Jerez*

Dr. Claudio Vásquez

.....



Para Mamá  
Para Oscar y Catalina



## AGRADECIMIENTOS

Agradezco sinceramente a todos quienes han contribuido al desarrollo de este trabajo.

Al Dr. David Holmes y a la Dra. Eugenia Jedlicki por brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio y por haberme apoyado permanentemente durante el transcurso de este trabajo. Agradezco muy especialmente a la Dra. Jedlicki por brindarme su apoyo, confianza y amistad durante estos años de trabajo en equipo.

Al Dr. Omar Orellana por su amistad y por su crítica pertinente y constructiva.

Al Dr. Héctor Toledo por su amistad y apoyo científico.

A mis compañeros de laboratorio con quienes hemos compartido largas jornadas de trabajo y camaradería.



## ÍNDICE DE MATERIAS

	Página
<b>INDICE DE MATERIAS</b> .....	iv
<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	ix
<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	x
<b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....	xiii
<b>RESUMEN</b> .....	xiv
<b>ABSTRACT</b> .....	xvii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	1
1. El metabolismo oxidativo de <i>A. ferrooxidans</i> .....	3
1.1. La oxidación de hierro.....	6
1.2. La oxidación de compuestos de azufre reducido.....	13
1.2.1. Papel de los microorganismos en las transformaciones de los compuestos azufrados.....	13
1.2.2. La oxidación de los compuestos de azufre reducido por <i>A. ferrooxidans</i> .....	15
4. Presentación del problema.....	18
5. Hipótesis.....	22
6. Objetivo general.....	22
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	23
<b>I MATERIALES</b> .....	23
1. Bacterias .....	23
2. Medios de cultivo.....	23
3. Vectores.....	24
4. Oligonucleótidos.....	25
5. Reactivos.....	25

<b>II</b>	<b>MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
1.	Clonamiento de los genes <i>cycA1</i> , <i>sdrA1</i> , <i>petA1</i> , <i>petC1</i> y <i>resB</i> en el vector de expresión pGEX-2T.....	28
1.1	Preparación de ácidos nucleicos.....	28
1.1.1	Preparación de DNA plasmidial en pequeña y mediana escala.....	28
1.1.2	Preparación de DNA cromosómico de <i>A. ferrooxidans</i> .....	28
1.1.3	Preparación de RNA total de <i>A. ferrooxidans</i> .....	29
1.2	Precipitación de los ácidos nucleicos.....	30
1.3	Digestión del DNA.....	30
1.4	Desfosforilación del DNA.....	30
1.5	Purificación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa.....	31
1.6	Reacción de amplificación de DNA, PCR.....	31
1.6.1	Reacción utilizando la enzima <i>Taq</i> DNA polimerasa.....	31
1.6.2	Reacción utilizando la enzima <i>Elongasa</i> .....	32
1.6.3	Diseño de los oligonucleótidos utilizados .....	32
1.7	Cuantificación de los ácidos nucleicos.....	32
1.8	Ligación de fragmentos de DNA en vectores.....	33
1.9	Transformación de <i>E. coli</i> .....	33
1.9.1	Preparación de células electrocompetentes.....	33
1.9.2	Electroporación.....	34
2.	Secuenciación de DNA.....	34
2.1	Marcación radiactiva del oligonucleótido.....	34
2.2	Reacción de secuenciación.....	34
3.	Reacción de RT-PCR.....	35
3.1	Tratamiento del RNA con DNAsa libre de Rnasa.....	35
3.2	Síntesis del cDNA.....	36
3.3	Amplificación del cDNA por la reacción de amplificación en cadena (PCR).....	36
4.	Extensión del partidor.....	36

5.	Introducción de DNAp a <i>A. ferrooxidans</i> por conjugación desde <i>E. coli</i> .....	37
5.1	Preparación de <i>E. coli</i> .....	37
5.2	Preparación de <i>A. ferrooxidans</i> .....	38
5.3	Conjugación de <i>A. ferrooxidans</i> y <i>E. coli</i> .....	38
5.4.	Selección de recombinantes.....	38
6.	Inmunodetección de las proteínas SdrA, Rieske y Citocromo <i>c<sub>1</sub></i> en <i>A. ferrooxidans</i> .....	39
6.1	Sobreexpresión de los genes por inducción con IPTG.....	39
6.2	Visualización de las proteínas sobreproducidas en SDS-PAGE.....	39
6.3	Aislamiento de las proteínas sobreproducidas desde la fracción soluble e insoluble de la célula.....	40
6.4	Obtención de las proteínas de fusión y obtención de los anticuerpos policlonales.....	40
6.5	Obtención de la membrana citoplasmática de <i>A. ferrooxidans</i> .....	41
6.6	Cuantificación de proteínas.....	42
6.7	Inmunodetección de proteínas por Western Blotting.....	42
7.	Determinación de la función del complejo <i>bc<sub>1</sub></i> en la oxidación de tiosulfato por <i>A. ferrooxidans</i> .....	43
7.1	Medición de la actividad respiratoria en <i>A. ferrooxidans</i> .....	43
7.2	Medición de la actividad tiosulfato quinona oxidoreductasa.....	44
7.3	Medición de la actividad citocromo <i>c</i> oxidasa en <i>A. ferrooxidans</i> .....	44
7.4	Identificación y cuantificación de componentes redox en <i>A. ferrooxidans</i> .....	45
8.	Análisis de secuencias de aminoácidos y nucleótidos.....	46
	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>48</b>
1.	Caracterización de la región génica y análisis de las proteínas codificadas.....	48
1.1	Clonamiento, secuenciación e identificación de marcos de lectura (ORF)	

.....	48
1.2 Análisis de las proteínas codificadas por los genes <i>cycA1</i> , <i>sdrA1</i> y <i>petABC1</i> del operón <i>pet1</i> de <i>A. ferrooxidans</i> .....	52
1.2.1 El gen <i>cycA1</i> .....	52
1.2.2 El gen <i>sdrA1</i> .....	54
1.2.3 El gen <i>petA1</i> .....	56
1.2.4 El gen <i>petB1</i> .....	58
1.2.5 El gen <i>petC1</i> .....	61
1.3 Estudio de cotranscripción entre genes contiguos.....	64
1.4 Determinación de los sitios de inicio de la transcripción de los operones <i>pet</i> y <i>res</i> .....	67
1.5 Identificación de terminadores de la transcripción para los operones <i>pet</i> y <i>res</i> .....	70
1.6 Identificación de posibles sitios de unión al ribosoma en los genes del operón <i>pet</i> y <i>res</i> .....	70
1.7. Determinación del número de copias del operón <i>pet</i> y <i>res</i> en el genoma de <i>A. ferrooxidans</i> .....	73
1.8 Estudio de la expresión del operón <i>pet2</i> .....	82
2. Detección de las proteínas codificadas en el operón <i>pet1</i> y <i>res</i> .....	82
2.1 Clonamiento y sobreexpresión de los genes.....	82
2.2 Inmunodetección de las proteínas en <i>A. ferrooxidans</i> crecido en Fe <sup>2+</sup> o en S <sup>o</sup> .....	85
3. Estudio de la función de las proteínas ResB y del complejo <i>bc1</i> .....	87
3.1 Estudio de la función de las proteínas ResB y citocromo <i>c1</i> : la estrategia genética.....	87
3.1.1 Obtención de mutantes “knock out” de los genes <i>petC1</i> y <i>resB</i> de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC19859.....	90
i) Clonamiento de los genes <i>petC1</i> y <i>resB</i> interrumpidos con un cassette genético de resistencia a kanamicina.	

ii)	Transferencia conjugativa de <i>petC1::kan-mob</i> y <i>resB::kan-mob</i> desde <i>E. coli</i> a <i>A. ferrooxidans</i> y selección de clones resistentes a kanamicina.	
3.2	Estudio de la función del complejo <i>bc<sub>1</sub></i> en <i>A. ferrooxidans</i> : la estrategia biofísica.....	92
3.2.1	Función del complejo <i>bc<sub>1</sub></i> en la oxidación de Fe <sup>2+</sup> .....	93
	i) Efecto de inhibidores del complejo <i>bc<sub>1</sub></i> sobre el consumo de O <sub>2</sub> de <i>A. ferrooxidans</i> en presencia de Fe <sup>2+</sup> .	
3.2.2	Función del complejo <i>bc<sub>1</sub></i> en la oxidación de tiosulfato.....	94
	i) Efecto de inhibidores del complejo <i>bc<sub>1</sub></i> sobre el consumo de O <sub>2</sub> de <i>A. ferrooxidans</i> en presencia de tiosulfato.	
	ii) Actividad tiosulfato:quinona oxidoreductasa	
	iii) Actividad quinol oxidasa.	
	iv) Actividad citocromo <i>c</i> oxidasa.	
4.	Identificación de posibles quinol oxidasas alternativas al complejo <i>bc<sub>1</sub></i> en <i>A. ferrooxidans</i> .....	107
4.1	Detección de quinol oxidasas.....	107
4.2	Estudio de la expresión de los genes <i>cyd</i> y <i>cyo</i> .....	110
4.2.1.	Detección de mRNAs específicos.....	110
4.2.2.	Detección de los complejos <i>bd</i> y <i>bo<sub>3</sub></i> mediante espectrofotometría.....	111
	<b>DISCUSIÓN</b> .....	116
1.	Caracterización de la región génica que contiene a los operones <i>pet</i> y <i>res</i> y estudio de las proteínas codificadas.....	117
2.	Estudio de la función del complejo <i>bc<sub>1</sub></i> en la oxidación de compuestos de azufre reducido.....	125
2.1.	La estrategia genética.....	125
2.2.	La estrategia biofísica.....	127
3.	Vías quinol oxidasa alternativas al complejo <i>bc<sub>1</sub></i> .....	134
	<b>CONCLUSIONES</b> .....	139
	<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	142

## INDICE DE TABLAS

	Página
<b>Tabla 1.</b> Potenciales de reducción de algunas reacciones redox de importancia en <i>A. ferrooxidans</i> .....	7
<b>Tabla 2.</b> Listado de oligonucleótidos utilizados.....	25
<b>Tabla 3.</b> Programas de análisis y bases de datos disponibles en la internet utilizados para el análisis de las secuencias de aminoácidos y nucleótidos.....	47
<b>Tabla 4.</b> Secuencias Shine-Dalgarno putativas identificadas para algunos genes de los operones <i>pet</i> y <i>res</i> .....	72
<b>Tabla 5.</b> Efecto de los inhibidores del complejo <i>bc<sub>1</sub></i> sobre la actividad respiratoria de <i>A. ferrooxidans</i> en presencia de Fe <sup>2+</sup> .....	95
<b>Tabla 6.</b> Efecto de los inhibidores del complejo <i>bc<sub>1</sub></i> sobre la actividad respiratoria de <i>A. ferrooxidans</i> en presencia de tiosulfato.....	99
<b>Tabla 7.</b> Efecto de los inhibidores del complejo <i>bc<sub>1</sub></i> sobre la actividad respiratoria de <i>A. ferrooxidans</i> en presencia de DBH <sub>2</sub> .....	103
<b>Tabla 8.</b> Determinación de una actividad citocromo <i>c</i> oxidasa en células de <i>A. ferrooxidans</i> y medición de la actividad respiratoria en presencia de ascorbato.....	105
<b>Tabla 9.</b> Contenido de proteínas redox en <i>A. ferrooxidans</i> .....	113

## INDICE DE FIGURAS

		Página
<b>Figura 1.</b>	Modelo general de la oxidación de hierro por <i>A. ferrooxidans</i> .	9
<b>Figura 2.</b>	Ciclo biogeoquímico del azufre.....	14
<b>Figura 3.</b>	Modelos de la oxidación de compuestos de azufre reducido en <i>A. ferrooxidans</i> .....	16
<b>Figura 4.</b>	Genotipo y fenotipo de una mutante de <i>A. ferrooxidans</i> .....	19
<b>Figura 5.</b>	Clonamiento de la región génica localizada río arriba del gen <i>resB</i> .....	49
<b>Figura 6.</b>	Secuencia de DNA (5'-3') deducida de la región localizada río arriba del gen <i>resB</i> .....	51
<b>Figura 7.</b>	Alineamiento múltiple de la secuencia completa de aminoácidos del citocromo <i>c<sub>4</sub></i> de <i>A. ferrooxidans</i> y otros <i>c<sub>4</sub></i> bacterianos.....	53
<b>Figura 8.</b>	Alineamiento múltiple de la secuencia completa de aminoácidos de la proteína SDR de <i>A. ferrooxidans</i> y otras deshidrogenasas bacterianas.....	55
<b>Figura 9.</b>	Alineamiento múltiple de la secuencia completa de aminoácidos de la proteína Rieske de <i>A. ferrooxidans</i> y otras proteínas Rieske bacterianas.....	57
<b>Figura 10.</b>	Alineamiento múltiple de la secuencia completa de aminoácidos del citocromo <i>b</i> de <i>A. ferrooxidans</i> y otros citocromos <i>b</i> bacterianos.....	59
<b>Figura 11.</b>	Alineamiento parcial de los aminoácidos de una secuencia consenso de la subunidad IV (SUIV-C) y el citocromo <i>b</i> de <i>A. ferrooxidans</i> .....	62

<b>Figura 12.</b>	Alineamiento múltiple de la secuencia completa de aminoácidos del citocromo <i>c</i> <sub>1</sub> de <i>A. ferrooxidans</i> y otros citocromos <i>c</i> <sub>1</sub> bacterianos.....	<b>63</b>
<b>Figura 13.</b>	La región génica estudiada contiene dos operones: el operón <i>pet</i> y el operón <i>res</i> .....	<b>66</b>
<b>Figura 14.</b>	Determinación del sitio de inicio de la transcripción del operón <i>pet</i> .....	<b>68</b>
<b>Figura 15.</b>	Determinación del sitio de inicio de la transcripción del operón <i>res</i> .....	<b>69</b>
<b>Figura 16.</b>	Localización y secuencia de un posible terminador de la transcripción independiente de <i>rho</i> .....	<b>71</b>
<b>Figura 17.</b>	Composición y organización de los operones <i>pet 1</i> y <i>pet2</i> en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270.....	<b>74</b>
<b>Figura 18.</b>	Alineamiento de las secuencias completas de aminoácidos de los citocromos <i>c</i> <sub>4</sub> codificados por los genes <i>cycA1</i> ( <i>Citc</i> <sub>4</sub> -1) y <i>cycA2</i> ( <i>Citc</i> <sub>4</sub> -2) de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	<b>76</b>
<b>Figura 19.</b>	Alineamiento de las secuencias completas de aminoácidos de las proteínas SDR codificadas por los genes <i>sdrA1</i> (SDR-1) y <i>sdrA2</i> (SDR-2) de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	<b>77</b>
<b>Figura 20.</b>	Alineamiento de las secuencias completas de aminoácidos de las proteínas Rieske codificadas por los genes <i>petA1</i> (Rieske-1) y <i>petA2</i> (Rieske-2) de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	<b>78</b>
<b>Figura 21.</b>	Alineamiento de las secuencias completas de aminoácidos de los citocromos <i>b</i> codificados por los genes <i>petB1</i> ( <i>Cit b</i> -1) y <i>petB2</i> ( <i>Cit b</i> -2) de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270.....	<b>79</b>
<b>Figura 22.</b>	Alineamiento de las secuencias completas de aminoácidos de los citocromos <i>c</i> <sub>1</sub> codificados por los genes <i>petC1</i> ( <i>Cit c</i> <sub>1</sub> -1) y <i>petC2</i> ( <i>Cit c</i> <sub>1</sub> -2) de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	<b>80</b>



<b>Figura 23.</b>	Composición y organización del operón <i>pet2</i> en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 19859.....	<b>81</b>
<b>Figura 24.</b>	Determinación de la expresión del operón <i>pet2</i> en <i>A. ferrooxidans</i> .....	<b>83</b>
<b>Figura 25.</b>	Estrategia de clonamiento y sobreexpresión de los genes de los operones <i>pet</i> y <i>res</i> en el vector de expresión pGEX-2T.....	<b>84</b>
<b>Figura 26.</b>	Sobreexpresión de algunos genes de los operones <i>pet1</i> y <i>res</i> de <i>A. ferrooxidans</i> en <i>E. coli</i> JM109.....	<b>86</b>
<b>Figuar 27.</b>	Inmunodetección de las proteínas SDR, Rieske y citocromo <i>c<sub>1</sub></i> de <i>A. ferrooxidans</i> .....	<b>88</b>
<b>Figura 28.</b>	Estrategia genética desarrollada para clonar los genes <i>petC1</i> y <i>resB</i> interrumpidos con un cassette genético de resistencia a kanamicina.....	<b>91</b>
<b>Figura 29.</b>	Modelo de la función del complejo <i>bc<sub>1</sub></i> en la oxidación de tiosulfato en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 19859.....	<b>97</b>
<b>Figura 30.</b>	Detección de los genes <i>cyd</i> y <i>cyo</i> en <i>A. ferrooxidans</i> .....	<b>109</b>
<b>Figura 31.</b>	Detección de la expresión de los genes <i>cyd</i> y <i>cyo</i> se expresan en <i>A. ferrooxidans</i> .....	<b>112</b>
<b>Figura 32.</b>	Participación de citocromo <i>c<sub>4</sub></i> codificado en el operón <i>pet1</i> en la oxidación de hierro en <i>A. ferrooxidans</i> .....	<b>121</b>
<b>Figura 33.</b>	Modelo de oxidación de tiosulfato por <i>A. ferrooxidans</i> .....	<b>136</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

DB:	Decilubiquinona
DBH <sub>2</sub> :	Decilubiquinol
DEPC:	Dietilpirocarbonato
DMSO:	Dimetilsulfóxido
DTT:	Ditiotreitrol
EDTA:	Ácido etilén diaminotetraacético
GST:	Glutation S transferasa
kb:	kilobases
ORF:	Marco abierto de lectura
PCR:	Reacción de polimerización en cadena
PHDBT:	Pentadecil-hidroxi-dioxobenzotiazol
pI:	Punto isoeléctrico
PMSF:	Polimetilsulfonilfluoruro
Q:	Quinona
QH <sub>2</sub> :	Quinol
RT:	Transcripción reversa
RT-PCR:	Transcripción reversa- Reacción de polimerización en cadena
SDS:	Dodecilsulfato de sodio
TMAO:	Trimetilamina-N-óxido
Tris:	Tris (hidroximetil) aminometano
UHDBT:	Undecil-hidroxi-dioxobenzotiazol
UHNQ:	Undecil-hidroxi-naftoquinona

## RESUMEN

*A. ferrooxidans* es una  $\gamma$ -proteobacteria que obtiene la energía primaria a través de la oxidación de ion ferroso, compuestos de azufre reducido, hidrógeno molecular o formiato. Como aceptores de electrones puede utilizar oxígeno, azufre elemental o ion férrico. Fija CO<sub>2</sub> y N<sub>2</sub> atmosférico. Además, esta bacteria forma parte de las comunidades biolixiviantes involucradas en la recuperación de metales de importancia económica.

Esta investigación se ha basado en la caracterización de la región génica de una mutante de *A. ferrooxidans*, que no podía oxidar el hierro, pero sí los compuestos de azufre reducido como tiosulfato. Esta mutante tenía el gen *resB* interrumpido con la secuencia de inserción ISAfe1. Se determinó que río abajo de gen *resB*, se encontraba el gen *resC* y un gen que codificaba para una proteína hipotética. En otros organismos como *Bacillus subtilis* los genes *resBC* codifican para las proteínas ResBC que participan en la biogénesis de citocromos de tipo *c*. Río arriba de *resB* se identificó una secuencia que codificaba para un citocromo *c<sub>1</sub>*. El citocromo *c<sub>1</sub>* es un constituyente del complejo citocromo *bc<sub>1</sub>* (quinol:citocromo *c* oxidoreductasa) en todos los organismos estudiados. Basados en estas observaciones planteamos que el fenotipo de esta mutante se debía a que la interrupción de *resB* con la secuencia de inserción ISAfe1 impedía la maduración del citocromo *c<sub>1</sub>*. Por su parte, la inactivación de este citocromo impedía la oxidación de hierro, pero no tiosulfato, sugiriendo que el citocromo de *c<sub>1</sub>* era esencial para la oxidación de Fe<sup>2+</sup>, pero no para la oxidación de tiosulfato.

En este trabajo se clonó y caracterizó la región génica localizada río arriba del gen que codificaba para ResB, confirmándose la presencia de los genes *cycA1*, *sdrA1*, *petA1*, *petB1* y *petC1* que codificaban para un citocromo *c<sub>4</sub>*, una proteína SDR (Short-Chain dehydrogenase reductase) y las tres subunidades del complejo *bc<sub>1</sub>* (Rieske, citocromo *b* y citocromo *c<sub>1</sub>*), respectivamente. Experimentos de RT-PCR demostraron que todos estos genes se organizaban en un operón que fue denominado "operón *pet1*". Por su parte, los genes *resB*, *resC* y el gen que codificaba para la proteína

hipotética constituyen una unidad de transcripción independiente que fue denominada operón *res*. Basados en experimentos de extensión del partidador se identificaron posibles promotores para cada operón. Un análisis bioinformático realizado sobre la secuencia de DNA deducida reveló la presencia de un posible terminador *rho* independiente para el operón *pet*. A partir de los resultados de los análisis bioinformáticos y experimentales se estableció que *A. ferrooxidans* poseía dos copias no idénticas del operón *pet*. La segunda copia identificada (operón *pet2*), poseía los genes: *cycA2*, *sdrA2*, *petABC2* y el gen *iro*, este último codificaba para una proteína similar la proteína hipip descrita previamente en *A. ferrooxidans*.

Debido a que *A. ferrooxidans* no ha podido ser manipulado genéticamente de manera eficiente, no fue posible obtener evidencias genéticas acerca de la función de las proteínas Res en la biogénesis del citocromos *c<sub>1</sub>* y otros citocromos de tipo *c* y de las proteínas redox codificadas en los operones *pet1* y *res*.

A través de la técnica de Western blotting se detectó a las proteínas SDR, Rieske y citocromo *c<sub>1</sub>* en *A. ferrooxidans* crecido en  $\text{Fe}^{2+}$  y en  $\text{S}^{\circ}$ , sugiriendo que éstas desarrollaban un papel funcional en la bacteria en la transferencia de electrones durante la oxidación de ambos sustratos.

En *A. ferrooxidans*, se ha establecido que durante la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$ , el complejo *bc<sub>1</sub>* participa en el flujo invertido (o "uphill") de electrones entre el  $\text{Fe}^{2+}$  y el  $\text{NAD(P)}^+$ , lo cual lleva a la generación de  $\text{NAD(P)H}$ . La función de este complejo en la oxidación de otros sustratos como los compuestos de azufre reducido era desconocida hasta el momento de comenzar esta investigación. Se investigó la función del complejo *bc<sub>1</sub>* en la oxidación de tiosulfato, utilizando métodos espectrofotométricos y polarográficos en combinación con el uso de inhibidores específicos. Se midió el consumo de oxígeno en células que utilizaban tiosulfato como única fuente de electrones, en ausencia y en presencia de inhibidores específicos del complejo *bc<sub>1</sub>* (estigmatelina, mixotiazol y antimicina A). La medición del consumo de oxígeno se realizó en células crecidas en  $\text{S}^{\circ}$  o  $\text{Fe}^{2+}$ , determinándose que los compuestos utilizados inhibían la actividad respiratoria (55%, 63% y 38%, respectivamente) de las células crecidas en azufre elemental, pero no ejercían efecto sobre las células crecidas en  $\text{Fe}^{2+}$ . Los resultados obtenidos sugieren que, en *A. ferrooxidans*, la oxidación de tiosulfato procede a través de una vía que involucra al

complejo  $bc_1$ , el cual funcionaría en el flujo directo de electrones entre el tiosulfato y el oxígeno. Por otra parte, el consumo de oxígeno remanente en las células sugirió la existencia de vías alternativas para el transporte de electrones, las cuales podrían ser utilizadas si el complejo  $bc_1$  está inhibido o inactivado.

Los análisis espectrofotométricos realizados sobre células enteras de *A. ferrooxidans* revelaron la presencia de un pico de absorbancia máximo a 630 nm, el cual es típico de la quinol oxidasa  $bd$ . La probable utilización de la quinol oxidasa  $bd$  como un sistema alternativo para el transporte de electrones nos llevó a examinar el genoma de *A. ferrooxidans* para estudiar la presencia de genes que pudiesen codificar para éste u otros complejos alternativos. Se detectaron genes que potencialmente codifican para los complejos quinol oxidasa  $bd$  (*cydAB*) y  $bo_3$  (*cyoABCDE*), los cuales, según los análisis bioinformáticos, tenían una organización tipo operón. Su actividad transcripcional fue confirmada por RT-PCR.

Los resultados anteriormente expuestos, sugieren que en *A. ferrooxidans* existen vías transportadoras de electrones alternativas entre el tiosulfato y el oxígeno. Una de estas vías involucra al complejo  $bc_1$ , el cual funcionaría como un intermediario entre el quinol y el citocromo  $c$ . Los electrones podrían fluir finalmente hacia el oxígeno a través de la citocromo  $c$  oxidasa. Este es un típico flujo de electrones de tipo “downhill” descrito para la mitocondria y muchas bacterias. Alternativamente, los electrones podrían fluir desde el quinol hacia el oxígeno a través de los complejos  $bd$  y  $bo_3$ . De esta manera, la inactivación del complejo  $bc_1$ , debido a la presencia de inhibidores o a la inactivación de un gen crítico con ISAfe1, eliminaría el flujo “downhill” desde el tiosulfato hacia el oxígeno vía el complejo  $bc_1$ , pero no impediría el flujo de electrones hacia el oxígeno vía los complejos  $bd$  o  $bo_3$ . Por otro lado, el complejo  $bc_1$  constituye la única vía para transportar electrones entre el  $Fe^{2+}$  y el  $NAD(P)^+$  durante la oxidación de  $Fe^{2+}$  debido a estos su inactivación por inhibidores o ISAfe1, impediría el crecimiento de *A. ferrooxidans* en  $Fe^{2+}$ . Estos modelos de oxidación apoyan la hipótesis de esta tesis.

## ABSTRACT

*A. ferrooxidans* is a  $\gamma$ -proteobacteria that obtains energy by the oxidation of iron, various forms of reduced sulfur, hydrogen and possibly formate. Oxygen, sulfur and ferric ions can serve as electrons acceptors. It fixes CO<sub>2</sub> and N<sub>2</sub>. In addition, this microorganism is frequently encountered in bioleaching environments and is thought to play an important role in the recovery of economically important metals.

This investigation is based on an earlier description of a mutant of *A. ferrooxidans* that could not oxidize iron, but could oxidize sulfur and reduced sulfur compounds such as thiosulfate. It was observed that the *resB* gene of this mutant was interrupted by the insertion sequence element IS<sub>Afe1</sub>, whereas the wild type lacked IS<sub>Afe1</sub> in this position. *resC* and a possible gene encoding an unknown protein were mapped downstream of *resB*. In other organisms such as *Bacillus subtilis*, ResB and ResC have been shown to be involved in cytochrome *c* biogenesis. Upstream of *resB* an incomplete sequence encoding a possible cytochrome *c*<sub>1</sub> was identified. Cytochrome *c*<sub>1</sub> is a component of the cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex (quinol:cytochrome *c* oxidoreductase) in all organisms studied. Based on these observations, the hypothesis was proposed that the mutant phenotype resulted from the insertion of IS<sub>Afe1</sub> into *resB* preventing proper maturation of a *c*-type cytochrome, possible *c*<sub>1</sub> of the *bc*<sub>1</sub> complex. Inactivation of the *c*-type cytochrome prevented iron oxidation but not sulfur oxidation, suggesting that the *c*-type cytochrome was not essential for sulfur oxidation.

In this work, the putative *c*<sub>1</sub> gene and its upstream region were cloned and sequenced. The identification of *c*<sub>1</sub> was confirmed and, upstream of *c*<sub>1</sub>, genes (*cycA1*, *sdrA1*, *petA1* y *petB1*) were detected potentially encoding a cytochrome *c*<sub>4</sub>, SDR protein (short-chain dehydrogenase reductase) and the remaining subunits of the *bc*<sub>1</sub> complex (Rieske and cytochrome *b*). All these genes, together with *c*<sub>1</sub> were organized in a potential operon. Results of RT-PCR experiments, demonstrating co-expression of the genes of this potential operon and those of the previously identified *resB* and *resC*

genes, support the contention that this region consists of two operons that we denominate as the *pet1* operon and the *res* operon. Possible promoters of the two operons were identified based on primer extension experiments. A possible *rho*-independent stop was detected by bioinformatic analysis between the *pet1* and *res* operons supporting the idea that they operate as two independent transcription units. Additional bioinformatic analysis of the genome sequence of *A. ferrooxidans* (sequence from the Institute of GenomeResearch) revealed the presence of a second, but non identical copy of the *pet* operon, which we denominate as *pet2*. *pet2* encodes the genes *cycA2*, *sdrA2*, *petABC* and the gene *iro*. *iro* potentially encodes a HiPiP-like protein that has been identified previously in *A. ferrooxidans*. Because *A. ferrooxidans* cannot be genetically manipulated in an efficient way, it proved impossible, despite repeated attempts, to obtain genetic evidences for the function of the proteins encoded by the *pet1* and *res* operons. Consequently, alternative methods were used to obtain validation for our hypothesis. Polyclonal antibodies were developed against several putative proteins predicted to be encoded by the *pet1* and *res* operons. Western blotting demonstrated that SDR, Rieske and citochrome *c<sub>1</sub>* were present in *A. ferrooxidans* grown in Fe<sup>2+</sup> or in S<sup>0</sup>, suggesting that they played a functional role in electron transfer in both conditions.

In *A. ferrooxidans*, the *bc<sub>1</sub>* complex has recently been shown to be capable of reverse electron flow between Fe<sup>2+</sup> and NAD(P)<sup>+</sup> during iron oxidation, generating NAD(P)H. However, although reverse electron flow had long been suspected, no evidence existed for this phenomenon at the time of the initiation of the present studies. In order to determinate the role of the *bc<sub>1</sub>* complex in thiosulfate oxidation, we used spectroscopic and polarographic methods in conjunction with the use of specific inhibitors to measure oxygen consumption of cells grown in either iron or thiosulfate. When the oxygen consumption was measure in presence of thiosulfate and different specifics inhibitors of *bc<sub>1</sub>* complex such as stigmatelin, myxotiazol and antimycin A, a reduction of respiratory activity of 55%, 63% and 38%, respectively was observed in cells grown in thiosulfate, but not iron. These results suggested that, in *A. ferrooxidans*, the *bc<sub>1</sub>* complex is involved in thiosulfate oxidation by transferring electrons between thiosulfate and oxygen. On the other hand, the oxygen consumption remaining in the

cells suggest the existence of alternatives transfer electron routes can be used if the *bc<sub>1</sub>* complex is inhibited. Spectroscopic analysis on whole cells revealed the presence of a peak wavelength of 630 nm, which is typical for a quinol oxidase *bd* complex. The discovery of the probably utilization of quinol oxidases *bd* complex as an alternative electron transfer systems, prompted an examination of the *A. ferrooxidans* genome for the presence of genes that could potentially encode this complex or other alternative complexes and, if present, an evaluation of their transcriptional activity during growth in thiosulfate and iron. Genes potentially encoding a *bd* (*cydAB*) and *bo<sub>3</sub>* (*cyoABCDE*) complex were detected in the genome in operon-like organizations by bioinformatic analysis. Their transcriptional activity was confirmed by RT-PCR. The results obtained suggest that, in *A. ferrooxidans*, the electrons extracted from the oxidation of thiosulfate can pass to oxygen via more than one pathway. One pathway involves the *bc<sub>1</sub>* complex as an intermediary between quinol and cytochrome *c*, ultimately depositing electrons in oxygen via cytochrome oxidase. This is a typical “downhill” flow of electrons exemplified in mitochondria and many species of bacteria. Alternatively, electrons can pass from quinol to oxygen via a *bd* or *bo<sub>3</sub>* complex. Thus, inactivation of the *bc<sub>1</sub>* complex, either by inhibitors or by the presence of ISAFel in a critical gene, will eliminate downhill flow from thiosulfate via the *bc<sub>1</sub>* complex but will not necessarily impede growth because either the *bd* or *bo<sub>3</sub>* complex can assume the responsibility of electron transfer to oxygen. On the other hand, the *bc<sub>1</sub>* complex represents the only pathway for electrons to flow “uphill” to reduce NADH during the oxidation of iron. Therefore, its inactivation by inhibitors or by the action of ISAFel, prevents growth of *A. ferrooxidans* on iron, consistent with the hypothesis of this thesis.



## INTRODUCCIÓN

Los organismos capaces de utilizar compuestos inorgánicos como fuente de energía primaria inicialmente se describieron por el científico ruso Sergei Winogradski en 1890. Esta condición metabólica conocida como "quimiolitotrofia" fue inicialmente estudiada en bacterias oxidantes del azufre pertenecientes al género *Beggiatoa*. En principio, se postuló que este tipo de metabolismo poseía un carácter más evolucionado que la organotrofia, no obstante, la construcción de árboles filogenéticos basados en la secuencia del rRNA 16S puso de manifiesto su carácter ancestral (Woese, 1987). Por esta razón el estudio detallado del metabolismo quimiolitotrófico podría contribuir al entendimiento de la evolución de las vías metabólicas, contribuyendo así al desarrollo de un área fundamental de la biología.

La oxidación de hierro es particularmente interesante, ya que este elemento debió estar ampliamente distribuido en la tierra primitiva, constituyendo una fuente energética abundante para la vida emergente (Walker y Brimblecombe, 1985). El  $\text{Fe}^{2+}$  es altamente reactivo con el oxígeno, por esta razón se postula que el advenimiento de la fotosíntesis aerobia y la concomitante liberación de oxígeno a la atmósfera restringieron su oxidación biológica a condiciones de anaerobiosis o extremas de acidez extrema (Anbar y Knoll, 2002; Madigan y cols., 1997). Actualmente, los organismos que utilizan el ion ferroso como fuente de energía son bacterias y arqueas acidófilas y/o anaerobias estrictas.

*Acidithiobacillus ferrooxidans* (Kelly y Wood, 2000) es una  $\gamma$ -proteobacteria que posee capacidad de oxidar el hierro y otros compuestos inorgánicos como compuestos de azufre reducido e hidrógeno molecular. Este microorganismo fue inicialmente descrito por Colmer y Hinckler en 1947 y posteriormente se le asoció con las comunidades microbianas implicadas en los procesos de biolixiviación involucrados en la recuperación de metales (Bryner y cols., 1954). Las vías metabólicas poco usuales de esta bacteria y su uso potencial en procesos de biolixiviación generaron así un interés creciente por estudiar su biología.

Actualmente, sabemos que esta bacteria oxida compuestos inorgánicos en condiciones extremas de acidez y que es un organismo aerobio facultativo capaz de fijar  $\text{CO}_2$  (Gale y Beck, 1967) y  $\text{N}_2$  atmosférico (Mackintosh, 1978). No obstante, no es posible una descripción detallada de sus vías metabólicas. La limitación al progreso en esta área se debe fundamentalmente a la falta de herramientas genéticas que permitan el estudio detallado de genes y productos. Además, a pesar que se han realizado intentos por establecer un sistema adecuado de clasificación de las diferentes especies y cepas de tiobacilos (Harrison, 1982) esto no ha sido posible debido a la gran diversidad filogenética del grupo (Karavaiko y cols., 2003).

*A. ferrooxidans* posee una gran diversidad metabólica, pero sin duda una línea primordial de investigación es la que intenta dilucidar los mecanismos implicados en la oxidación de diferentes sustratos. El trabajo de investigación que abordaremos tiene como objetivo determinar la naturaleza de algunos de los componentes implicados en la oxidación de hierro y tiosulfato. Para ello, se estudiará el papel funcional de los productos

de una región génica (Cabrejos y cols., 1999) en la oxidación de ambos sustratos. A continuación se expondrán los antecedentes teóricos y experimentales que delinear este trabajo.

### 1. El metabolismo oxidativo de *A. ferrooxidans*.

*A. ferrooxidans* es un organismo quimiolitotrófico capaz de oxidar compuestos inorgánicos como ion ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ), compuestos de azufre reducido ( $\text{S}^{\circ}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ,  $\text{S}_3\text{O}_6^{2-}$ , etc.) o hidrógeno molecular ( $\text{H}_2$ ). También se ha informado de su capacidad para oxidar formiato (Pronk y cols., 1991). Esta bacteria fija el  $\text{CO}_2$  ambiental a través del ciclo de Calvin-Benson y presenta un tipo de respiración aerobia, pero cuando utiliza  $\text{H}_2$  como dador de electrones, puede utilizar aceptores alternativos como  $\text{S}^{\circ}$  y  $\text{Fe}^{3+}$  (Ohmura y cols., 2002a; Drobner y cols., 1990).

En general se ha establecido que los principios bioenergéticos de la respiración aerobia y anaerobia de las bacterias son similares, y no difieren sustancialmente de los principios que delinear la función mitocondrial en eucariontes. No obstante, las bacterias extremófilas y particularmente los acidófilos como *A. ferrooxidans* presentan algunas particularidades en su metabolismo energético que son importantes de considerar.

Los sistemas respiratorios bacterianos típicos llevan a cabo la oxidación de un sustrato de bajo potencial redox. Los electrones liberados en esta reacción se transportan hasta un aceptor final de alto potencial redox a través de componentes redox integrados o asociados a la membrana citoplasmática. La energía liberada durante la transferencia de electrones se utiliza para translocar protones a través de la membrana, generando un gradiente electroquímico de protones ( $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ ) o una "fuerza protón motriz" (FPM) que

puede ser utilizada para la síntesis de ATP (Gennis, 1996), el transporte de solutos (Davidson, 2002) o el movimiento flagelar (Bourret y Stock, 2002). Este mecanismo de conservación de la energía conduce a la acidificación del periplasma bacteriano, por lo que pH periplasmático (pH 5,0) es normalmente más ácido que el citoplasmático (pH 6,5). No obstante, dado que *A. ferrooxidans* vive en condiciones altamente ácidas, dispone de los protones circundantes en el medio para generar un gradiente natural de protones entre el periplasma y el citoplasma, estableciéndose así el  $\Delta\mu_{H^+}$  requerido para síntesis de ATP. Los protones que ingresan al citoplasma a través de la ATP sintasa (Brown y Rawling, 1993) son utilizados en la reducción del oxígeno y del NAD(P)<sup>+</sup> generándose H<sub>2</sub>O y NAD(P)H. De esta manera, en *A. ferrooxidans* el transporte de electrones contribuiría al mantenimiento del gradiente de protones y no a la generación de éste como ocurre en la vasta mayoría de los organismos.

El estudio del metabolismo oxidativo de *A. ferrooxidans* se ha centrado fundamentalmente en la oxidación de Fe<sup>2+</sup> y de compuestos de azufre reducido. Bajo estas condiciones de crecimiento se ha descrito una cantidad considerable de componentes redox, cuyo número se ha visto incrementado con la información deducida del análisis del genoma de este microorganismo. Muchas de las proteínas redox identificadas se purificaron y su actividad oxidoreductora se ensayó *in vitro*, la información obtenida en estos experimentos sustenta gran parte de los modelos de oxidación que más adelante analizaremos.

Los compuestos redox descritos en esta bacteria incluyen una amplia variedad de citocromos de tipo c (Ohmura y cols., 2002a; Yarzabal y cols., 2002a; Giudici-Ortoni y

cols., 2000; Cavazza y cols., 1996; Vakova-Valchanova y Chan, 1994; Mansch y Sand, 1992), proteínas con centros Fe-S (Brugna y cols., 1999; Kusano y cols., 1992; Fry y cols., 1986), quinona-8 (Short y cols., 1969), complejo citocromo *bc<sub>1</sub>* (Elbehti y cols., 2000; 1999), quinol oxidasa (Kamimura y cols., 2001), citocromo c oxidasa (Appia-Ayme y cols., 1998a; Kai y cols., 1992), rusticianina (Cox y Boxer, 1978; Blake y Shute, 1993) e hidrogenasa (Ohmura y cols., 2002a; Fisher y cols., 1996), entre otros. Muchas de las enzimas caracterizadas muestran una actividad óptima y una mayor estabilidad en un rango de pH de 2,0-3,5 de lo cual se deduce que funcionan en el periplasma o asociados a las membranas celulares (Yamanaka y Fukumori, 1995).

A la fecha, la mayoría de los componentes redox conocidos han sido identificados en células crecidas en hierro. Existen pocos ejemplos en los que se compara los niveles de estos componentes bajo diferentes condiciones de crecimiento. La rusticianina por ejemplo, se sintetiza más en hierro que en azufre (Jedlicki y cols., 1986; Cox y Boxer, 1978; Copley y Haddock, 1975). Recientemente se ha identificado un citocromo de tipo-*c* que está presente sólo bajo condiciones de anaerobiosis cuando *A. ferrooxidans* utiliza S<sup>0</sup> o F<sup>+3</sup> como aceptor de electrones (Ohmura y cols., 2002a). Por otro lado, se ha determinado que el crecimiento de *A. ferrooxidans* en hierro o azufre es inhibido diferencialmente por compuestos como cianuro de potasio (KCN) y azida de sodio (NaN<sub>3</sub>), sugiriendo que bajo estas condiciones se sintetizan diferentes oxidasas terminales (Harahuc y cols., 2000).

### 1. 1. La oxidación de hierro.

*A. ferrooxidans* oxida  $\text{Fe}^{2+}$  a un pH óptimo de 2.0. La ecuación que define la reacción total de oxidación es:  $2\text{Fe}^{2+} + 1/2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ \rightarrow 2\text{Fe}^{3+} + \text{H}_2\text{O}$

El potencial de reducción del par  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  en el medio de crecimiento ( $E_{m,2}$ ) ha sido estimado en 770 mV (Ingledey y cols., 1977). Por otro lado, el  $E_{m,7}$  del par  $\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}$  es de 810 mV (Clark, 1960) (Tabla 1). Estos valores indican que la reacción oxidativa genera bajos niveles de energía disponible. No obstante, debido a que la bacteria vive en condiciones altamente ácidas puede mantener un  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$  a través de la membrana citoplasmática que es utilizado para la síntesis de ATP y NAD(P)H.

En *A. ferrooxidans* los electrones liberados durante la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  pueden ser transportados por dos vías diferentes: 1) la vía entre el  $\text{Fe}^{2+}$  y el oxígeno que está destinada al mantenimiento del  $\Delta\mu_{\text{H}^+}$  y representa aproximadamente el 90% de los electrones transportados y 2) la vía entre el  $\text{Fe}^{2+}$  y el  $\text{NAD(P)}^+$  que está destinada a la generación de NAD(P)H necesario para la fijación de  $\text{CO}_2$  y otros procesos anabólicos y representa menos del 10% del flujo de electrones (Ingledey, 1982). *A. ferrooxidans* posee una tasa oxidativa del  $\text{Fe}^{2+}$  muy alta que se refleja en el consumo de oxígeno elevado de esta bacteria. Una estimación indica que la tasa respiratoria de *A. ferrooxidans* es aproximadamente 10 veces superior a estimada en la mitocondria de corazón de bovino (Ingledey y Copley, 1980). Para alcanzar altas tasas oxidativas, la célula sintetiza niveles elevados de los componentes redox involucrados en las cadenas transportadoras de electrones. Un ejemplo representativo queda dado por la rusticianina y los citocromos

Tabla 1

Potenciales de reducción de algunas reacciones redox de importancia en *A. ferrooxidans* (Tomado de Kelly, 1982).

Pareja de reacción	E°(V)
$H_2/H^++e^-$	- 0,421
$S_2O_3^{2-}/HS+HSO_3^-$	- 0,402
$NAD(P)^+/NAD(P)H$	- 0,320
$H_2SO_3+H_2O/H_2SO_4+2H^++2e^-$	- 0,280
$S^0/HS^-$	- 0,270
$S_2O_3^{2-}+3H_2O/H_2SO_3+2H^++4e^-$	- 0,020
$S_4O_6^{2-}/S_2O_3^{2-}$	+ 0,024
$S_4O_6^{2-}+6H_2O/4H_2SO_3+4H^++6e^-$	+ 0,090
$Fe^{2+}/Fe^{3+}$	+ 0,770
$O_2/H_2O$	+ 0,810

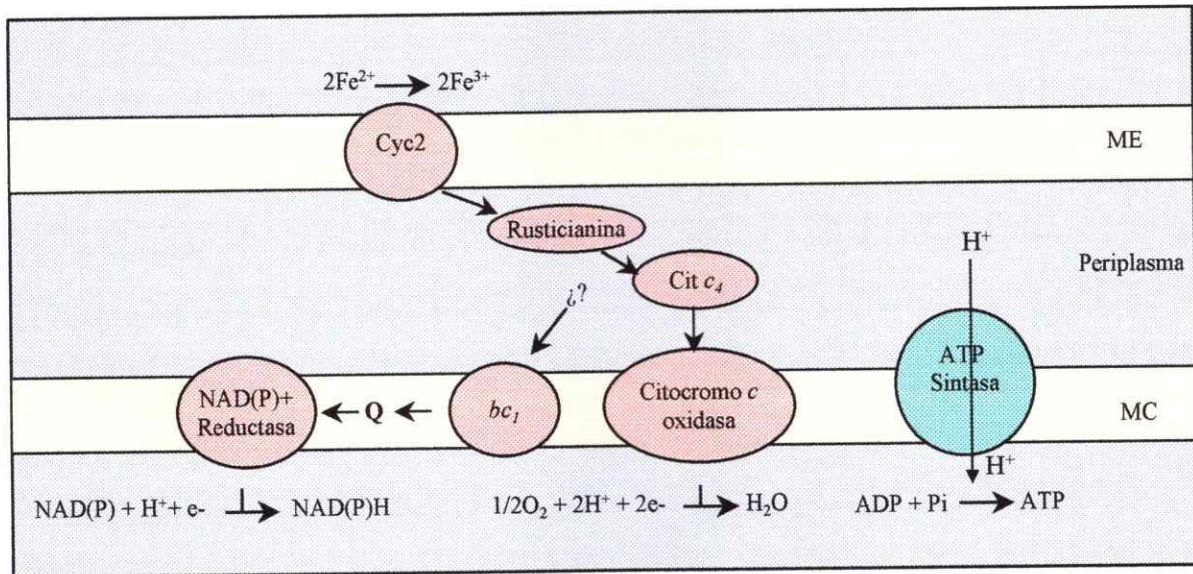
tipo-*c* que en conjunto pueden llegar a representar el 5-10% (por mg) de la proteína total de la célula (Ingledeew, 1982).

En *A. ferrooxidans* la generación de NAD(P)H es termodinámicamente desfavorable. La reducción de NAD(P)<sup>+</sup> no puede acoplarse directamente a la oxidación del Fe<sup>2+</sup>, debido a que el potencial de reducción del par Fe<sup>3+</sup>/Fe<sup>2+</sup> (+770 mV) es mayor que el potencial de reducción del par NAD(P)H/NAD(P)<sup>+</sup> (-320 mV). Los electrones que son transportados entre el Fe<sup>2+</sup> y el NAD(P)<sup>+</sup> viajan en contra del gradiente termodinámico requiriendo, por lo tanto, de un aporte externo de energía. Ingledeew (1982) denominó a esta cadena transportadora “*flujo invertido de electrones*” y postuló que la energía necesaria podría derivar del  $\Delta\mu_{H^+}$  mantenido por el transporte de electrones entre el Fe<sup>2+</sup> y el oxígeno.

Los mecanismos y componentes involucrados en la oxidación de Fe<sup>2+</sup> en *A. ferrooxidans* han sido sujeto de estudio por más de dos décadas. Al menos 5 modelos de oxidación del ion ferroso han sido sugeridos para esta bacteria (Appia-Ayme y cols., 1999; Bruschi y cols., 1996; Blake y cols., 1993; Yamanaka y cols., 1991; Ingledeew y cols., 1977). Esto hace difícil la compilación y el entendimiento de toda la información generada al respecto, no obstante es posible establecer algunos parámetros generales (Figura 1).

La cadena respiratoria establecida entre el Fe<sup>2+</sup> y el oxígeno involucraría a las proteínas redox codificadas por el “operón *rus*”: un citocromo *c* de alto peso molecular denominado Cyc2 (gen *cyc2*), la rusticianina (gen *rus*), un citocromo *c*<sub>4</sub> (gen *cyc1*) y las





**Figura 1. Modelo general de la oxidación de hierro por *A. ferrooxidans*.** Se indica el flujo de electrones desde el  $\text{Fe}^{2+}$  hacia el  $\text{O}_2$  o el  $\text{NAD(P)}^+$ .

cuatro subunidades de la citocromo *c* oxidasa (genes *cox1*, *cox2*, *cox3* y *cox4*) (Appia-Ayme y cols., 1999; 1998a).

Debido a la gran reactividad del ion ferroso y a la naturaleza altamente insoluble del ion férrico generado, se postula que la oxidación del  $\text{Fe}^{2+}$  ocurriría en el medio externo de la célula. Recientemente se ha sugerido que el citocromo *c* de alto peso molecular codificado por el gen *cyc2* estaría involucrado en la oxidación inicial. Esta hipótesis se basa en la localización de la proteína en la membrana externa de la célula (Yarzabal y cols., 2002a) y en la cotranscripción del gen *cyc2* con los otros componentes del operón *rus* (Appia-Ayme y cols., 1999; Appia-Ayme y cols., 1998a; 1998b).

Otro eslabón importante de la cadena oxidativa está constituido por la proteína rusticianina. Se trata de una proteína de 16,5 kDa cuyo centro redox está gobernado por un átomo de cobre (Casimiro y cols., 1995; Hunt y cols., 1994; Cobley y Haddock, 1975). Cuando *A. ferrooxidans* crece en presencia de ion ferroso, la rusticianina representa el 5% de la proteína total de la célula (Cox y Boxer, 1978; Cobley y Haddock, 1975). La proteína también se sintetiza cuando se utilizan compuestos de azufre reducido (Mjoli y Kulpa, 1988; Jedlicki, y cols., 1986) o  $\text{H}_2$  (Ohmura y cols., 2002a) como fuente de energía, aunque en este caso la expresión disminuye significativamente. *In vitro*, la rusticianina es reducida en presencia de ion ferroso, pero esta reducción ocurre a una tasa demasiado baja para dar cuenta de la oxidación total de  $\text{Fe}^{2+}$  en la célula (Blake y Shute, 1987). Por esta razón se cree que la proteína no sería el aceptor inicial en la célula, aunque ciertamente constituye un componente genuino de la vía de oxidación. Se ha demostrado que esta proteína forma un complejo de alta afinidad con un citocromo *c*

dihemínico ( $K_D$ :  $2,07 \times 10^{-7}M$ ) y en presencia de ion ferroso puede reducirlo casi completamente (Giudici-Orticoni y cols., 1999). Estas observaciones sugieren que ambos componentes interactúan *in vivo* formando parte de la vía oxidativa.

La transferencia final de electrones hacia el  $O_2$  ocurriría por acción de una citocromo *c* oxidasa  $aa_3$ . En *A. ferrooxidans* se ha identificado una oxidasa de este tipo cuya masa molecular es de 169 kDa (Kai y cols., 1992). La proteína puede oxidar *in vitro* a un ferrocitocromo *c* soluble y rusticianina reducida a pH 3,5-4,0. Las subunidades de la oxidasa  $aa_3$  se encuentran codificadas en el operón *rus* (Appia-Ayme y cols., 1999). El análisis de las secuencias aminoacídicas de cada subunidad mostró que presentan una gran conservación de residuos de importancia funcional involucrados con la unión de Cu, hemo *a*, hemo  $a_3$ , oxígeno y  $Mg^{2+}$  y con la interacción con un citocromo de tipo-*c* (Appia-Ayme y cols., 1999). La inmunodetección de la subunidad II de la oxidasa  $aa_3$  de *A. ferrooxidans* reveló que ésta se sintetiza mayoritariamente en la condición de  $Fe^{2+}$  respecto a  $S^0$  y está asociada a la membrana interna de la célula (Yarzabal, comunicación personal) sugiriendo que esta proteína desempeña un papel funcional bajo estas condiciones.

Según Ingledew (1982), la cadena transportadora de electrones establecida entre el  $Fe^{2+}$  y el  $NAD(P)^+$  involucraría al "pool" Q de membrana, a un complejo  $bc_1$  y a un sistema  $NAD(P)^+$  reductasa. Muchos de los aspectos de su hipótesis fueron recientemente demostrados. En *A. ferrooxidans* el complejo  $bc_1$  fue descrito por técnicas espectroscópicas y EPR (Elbehti y cols., 1999; Brugna y cols., 1999). Las primeras evidencias experimentales acerca de la función del complejo  $bc_1$  en el denominado

“*transporte invertido de electrones*” se dieron por el grupo de Danielle Lemesle-Meunier en Francia (Elbehti y cols., 2000). Los autores midieron espectrofotométricamente la oxidación de un ferrocitocromo *c* exógeno por esferoplastos de *A. ferrooxidans*. Sorprendentemente, la oxidación ocurrió en presencia de KCN, un potente inhibidor de la oxidasa terminal y por tanto de la cadena transportadora de electrones conducente a la reducción de O<sub>2</sub>. Bajo estas condiciones, la tasa de oxidación se afectó por inhibidores del complejo *bc<sub>1</sub>* y de complejos tipo NAD-1. El experimento llevó a los autores a concluir que cuando la oxidación del ferrocitocromo *c* ocurre en presencia de KCN, los electrones derivados se desvían a una ruta alternativa en la que participa el complejo *bc<sub>1</sub>* y un complejo tipo NADH-I (NADH deshidrogenasa tipo-I). Esto explicaría la sensibilidad a los diferentes inhibidores y sugiere la presencia de un transporte invertido de electrones conducentes a la reducción de NAD(P)<sup>+</sup> (Elbehti y cols., 2000).

El transporte invertido de electrones en *A. ferrooxidans* y otras bacterias quimiolitotróficas (Kiesow, 1967; Aleem y cols., 1966; Aleem y cols., 1963) ha sido explicado mediante la existencia de un ciclo-Q operando en sentido inverso. En este caso el complejo *bc<sub>1</sub>* utilizaría la energía liberada por la entrada de H<sup>+</sup> en favor del gradiente, para transportar electrones hacia el NAD(P)<sup>+</sup>, en contra del gradiente de potencial.

El paso controlado de electrones hacia el oxígeno o hacia el NADPH es de la mayor importancia para establecer el balance energético en la célula. Por esta razón, el paso de los electrones hacia una u otra vía debe ser detectado y controlado *in vivo*. En este contexto se postula que en *A. ferrooxidans* la regulación estaría determinada por la

razón ATP/ADP existente en la célula y por la fuerza protón motriz existente a través de la membrana citoplasmática (Elbehti y cols., 2000).

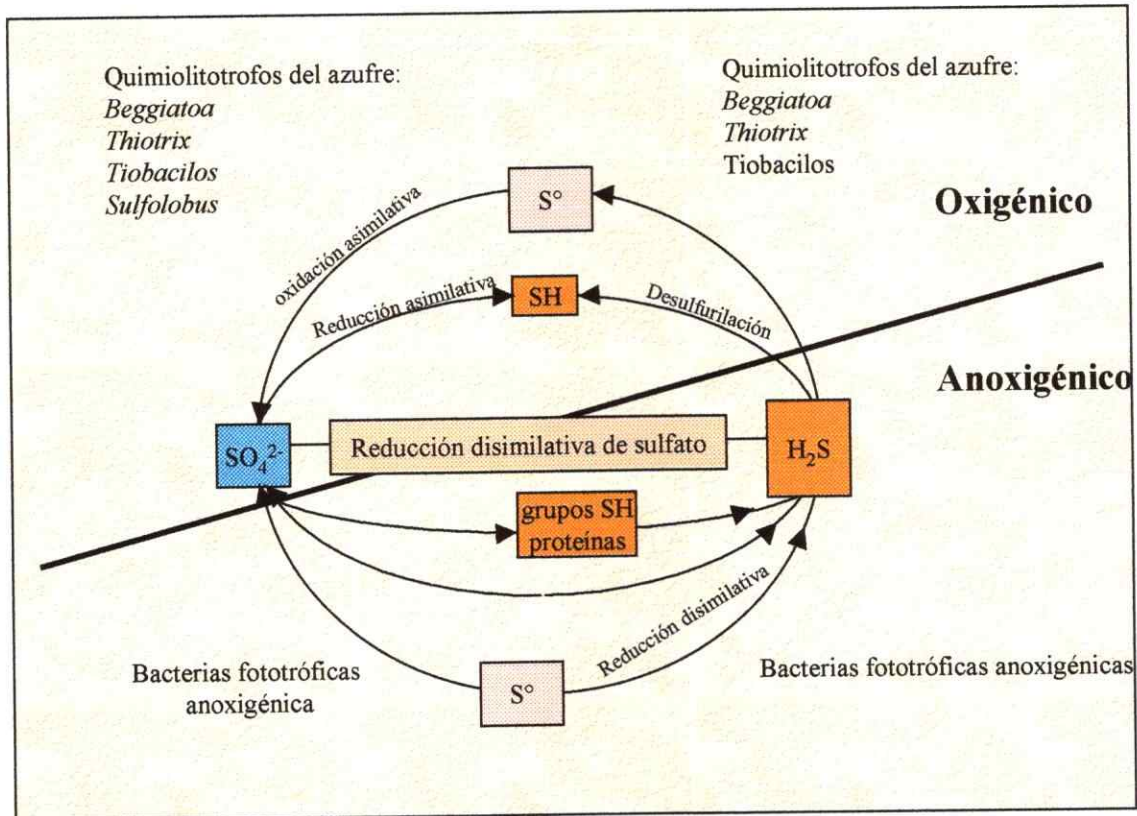
## 1. 2. La oxidación de compuestos de azufre reducido.

### 1. 2. 1. Papel de los microorganismos en las transformaciones de los compuestos azufrados.

Las transformaciones redox de los compuestos azufrados son complejas debido a que el azufre se puede encontrar en una amplia variedad de estados redox y además muchas transformaciones ocurren químicamente a tasas equivalentes a las biológicas. En la Figura 2 se presenta el ciclo biogeoquímico del azufre y se indica la participación de los microorganismos en las transformaciones de estos compuestos. Aunque los compuestos azufrados pueden encontrarse en un gran número de estados redox, solamente tres formas existen en cantidades importantes en la naturaleza: -2 (sulfuros: R-SH y HS<sup>-</sup>), 0 (azufre elemental S<sup>0</sup>) y +6 (sulfatos: SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). Gran parte del azufre se encuentra sobre la tierra en forma de rocas y minerales sulfatados y sulfurados, aunque el gran reservorio sobre la biosfera está constituido por los océanos.

La utilización de compuestos de azufre reducido como fuente de electrones constituye parte del metabolismo disimilativo de estos compuestos. Este tipo de transformaciones son llevadas a cabo por especies bacterianas del género *Acidithiobacillus* y *Thiomicrospira* y arqueas del género *Sulfolobus*. Un producto común de este metabolismo es el ácido sulfúrico, por esta razón, los microorganismos involucrados en la oxidación de compuestos azufrados son normalmente acidófilos





**Figura 2. Ciclo biogeoquímico del azufre.** Se indican los organismos que desarrollan cada una de las transformaciones indicadas. Tomado de Madigan y cols., 1997.

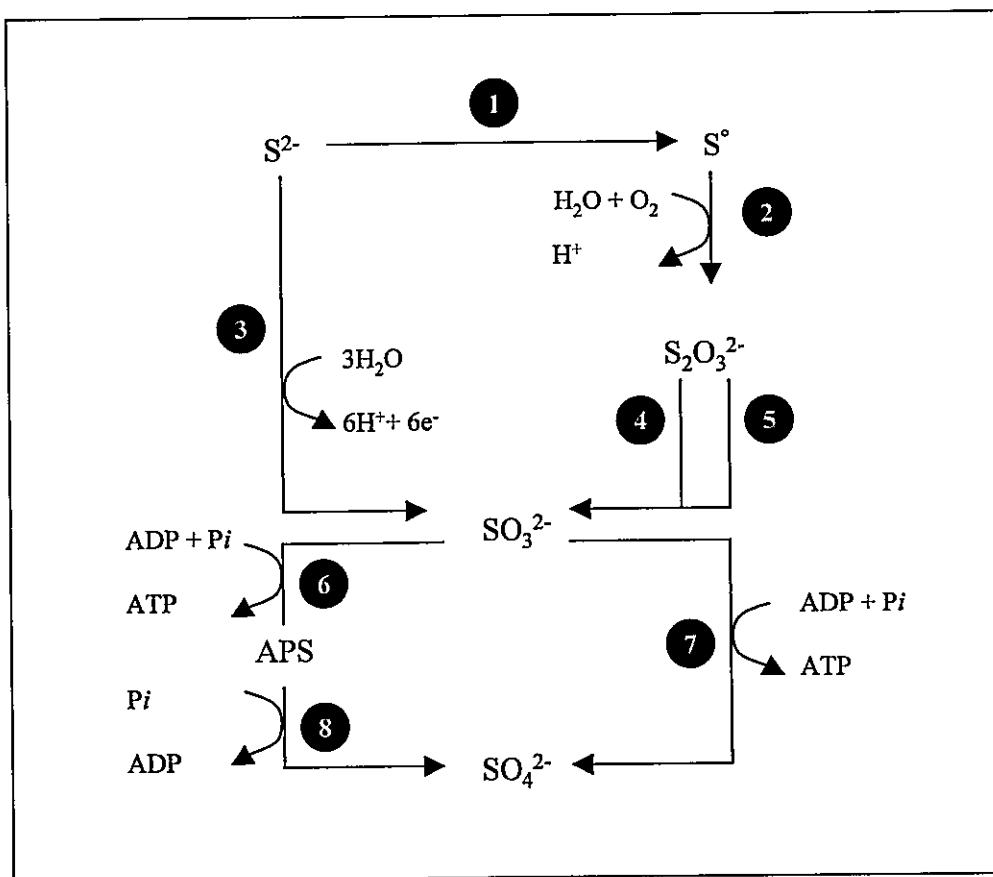
capaces de elevar la tasa de producción de ácido (>1.000.000 veces) desde minerales azufrados como piritita y pirrotita (Evangelou y Zhang, 1995).

Los organismos que poseen esta condición metabólica podrían tener aplicaciones en la solubilización de metales desde los minerales azufrados. No obstante, aún no ha sido posible la acumulación de la información necesaria para establecer un modelo general de oxidación debido a que no existe uniformidad en las vías empleadas por diferentes organismos (Kelly, 1982). Además la reactividad química de estos compuestos constituye un obstáculo adicional para realizar estudios fisiológicos en el área.

### **1. 2. 2. La oxidación de los compuestos de azufre reducido por *A. ferrooxidans*.**

Los compuestos de azufre que pueden ser oxidados por *A. ferrooxidans* incluyen azufre elemental ( $S^0$ ), sulfito ( $SO_3^{2-}$ ), tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ), sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) y politionatos ( $S_nO_6^{2-}$ ). La oxidación de estos compuestos ocurre a pH y temperatura óptimos de 3,2 y 30°C, respectivamente (Kelly y Harrison, 1989). La literatura actual hace referencia a dos vías diferentes de oxidación de estos compuestos. Kelly (1988) propone un modelo (Figura 3A) que implica la oxidación parcial de diferentes compuestos de azufre reducido hasta sulfito. Esta oxidación puede ocurrir en una o más etapas con la participación de una actividad sulfuro reductasa, azufre oxigenasa, sulfito reductasa, rodanasa y tiosulfato:cit c oxidoreductasa. La oxidación final del sulfito a sulfato puede ocurrir por tres sistemas enzimáticos distintos: adenilsulfato reductasa, sulfito oxidasa y ADP sulfurilasa. La gran mayoría de estas actividades se han detectado

A)



B)

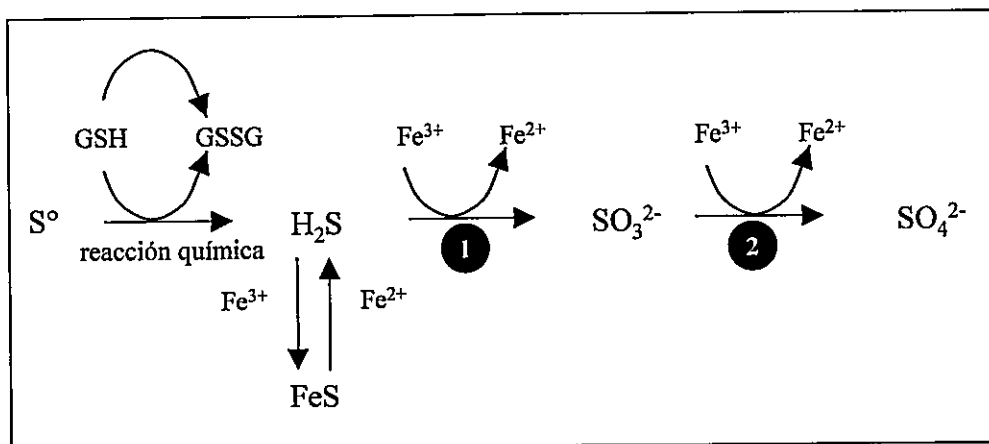


Figura 3. Modelos de la oxidación de compuestos de azufre reducido en *A. ferrooxidans*. A) Metabolismo de los compuestos de azufre reducido (Kelly, 1988). 1: Sulfuro reductasa, 2: Azufre oxigenasa, 3: Sulfito reductasa, 4: Rodanasa, 5: Tiosulfato citocromo *c* oxidoreductasa, 6: Adenil sulfato reductasa, 7: Sulfito oxidasa, 8: ADP sulfurilasa. B) Oxidación de azufre elemental por el sistema FIR (Sugio y cols., 1989). 1: SFORasa, 2: Sulfito oxidasa.



en *A. ferrooxidans* a excepción de la sulfito reductasa y la adenilsulfato reductasa (APS reductasa) (Silver y Lundgren 1978; Vestal y Lundgren, 1971; Tabita y cols., 1969).

La segunda vía de oxidación que se ha propuesto en *A. ferrooxidans* es el sistema FIR (ferric iron reducing system) (Sugio y cols., 1985). En este modelo (Figura 3B) la oxidación inicial de azufre elemental estaría acoplada a la reducción de ion férrico con la consiguiente generación de ion ferroso. El sistema también admite  $\text{Mo}^{6+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  como aceptores de electrones (Sugio y cols., 1988). En una primera etapa el azufre elemental se reduce a  $\text{H}_2\text{S}$  en presencia de glutatión reducido (GSH). Existen dos enzimas características en el sistema FIR: (1) la sulfuro:ión férrico oxidoreductasa (SFORasa) que cataliza la oxidación de sulfuro a sulfito y utiliza ion férrico como aceptor de electrones y (2) la sulfito oxidasa es una proteína heterodimérica de membrana que permite la oxidación de sulfito a sulfato. Esta reacción también acoplada a la reducción de ion férrico (Sugio y cols., 1992).

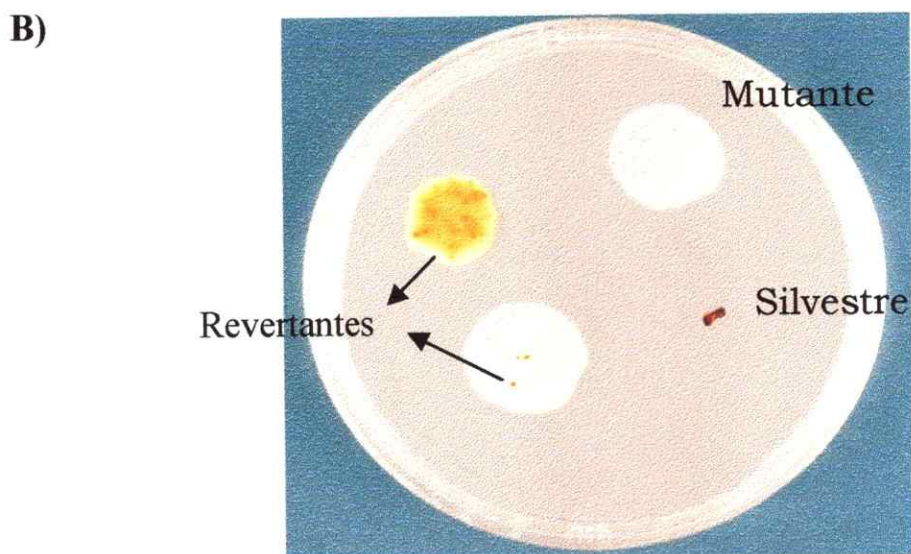
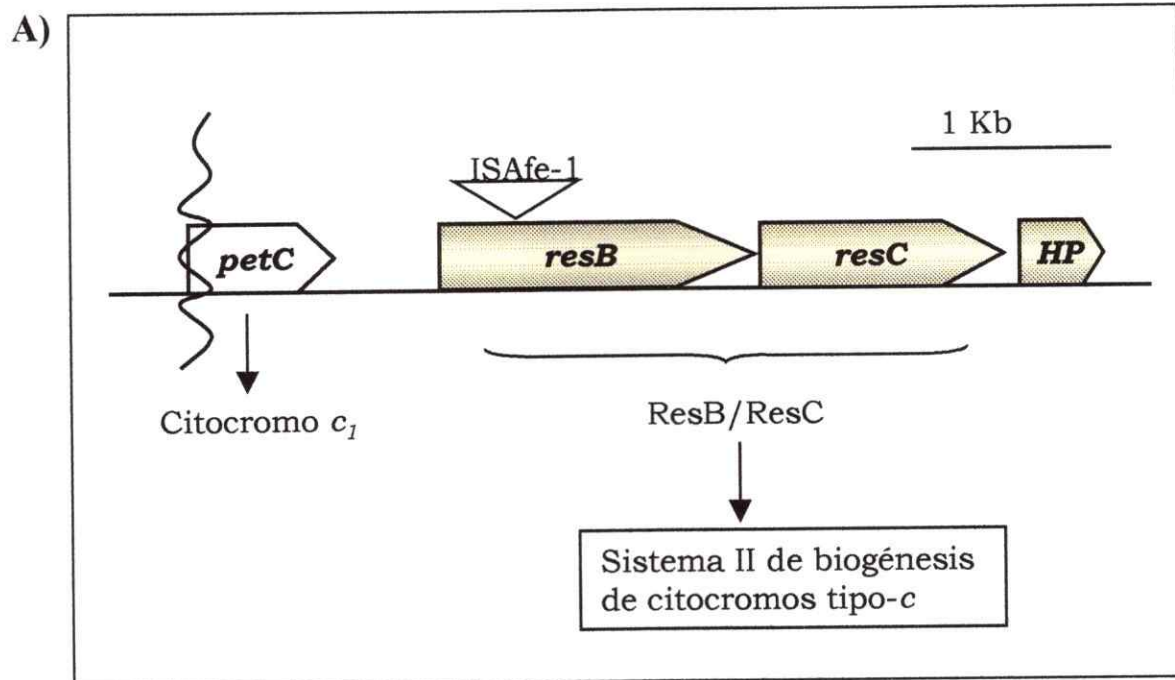
Corbett e Ingledew (1987) han propuesto que las vías de oxidación de hierro y de azufre son entidades separadas, aunque el ion férrico podría reemplazar al oxígeno bajo condiciones de anaerobiosis. Esta hipótesis concuerda con la capacidad recientemente descrita de *A. ferrooxidans* para crecer anaeróbicamente utilizando  $\text{Fe}^{3+}$  como aceptores de electrones (Ohmura y cols., 2002a; Ohmura y cols., 2002b ). La idea que la oxidación de ambos sustratos ocurre por vías independientes o parcialmente independientes se ve apoyada por la síntesis diferenciada de numerosos componentes redox bajo estas condiciones. Así por ejemplo, se han detectado diferencias en el contenido de citocromos tipo *c* (Yarzabal y cols., 2002b; Jerez y cols., 1995), citocromo *c* oxidasa (Mansch y Sand,

1992), una proteína tipo rodanasa (Ramírez y cols., 2002) y rusticinaina (Mansch y Sand, 1992) en células crecidas en hierro versus azufre elemental.

La información respecto a la composición de las cadenas transportadoras de electrones operantes durante la oxidación de compuestos de azufre reducido es escasa. Por esta razón se desconocen los mecanismos de conservación de la energía asociados a la oxidación de estos sustratos y no es posible predecir la existencia de diferencias con los mecanismos propuestos para la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$ .

## **2. Presentación del problema.**

La investigación propuesta en esta Tesis se basa en la caracterización de una mutante espontánea de *A. ferrooxidans* que había perdido su capacidad de oxidar hierro, pero continuaba oxidando compuestos de azufre reducido (Schrader y Holmes, 1988). Así, cuando se cultivaba en un medio sólido que contenía hierro y tiosulfato, las colonias eran blancas y crecían en forma diseminada, a diferencia de la cepa silvestre que crecía como pequeñas colonias de color rojizo. Posteriormente los estudios genéticos revelaron que esta mutante tenía una región del genoma interrumpida con una secuencia de inserción. La secuencia de inserción ISAfel interrumpía al gen *resB* que se localiza contiguo al gen *resC* y un ORF que codificaba a una proteína hipotética (Figura 4) (Cabrejos y cols., 1999; Holmes y cols., 1999). Los genes *resB* y *resC* codifican a las proteínas ResB y ResC, respectivamente, las cuales pertenecen a la familia de transportadores ABC involucrados en la biogénesis de los citocromos tipo-c en algunas bacterias (Kranz y cols., 1998). La proteína hipotética no mostró similitud significativa



**Figura 4. Genotipo y fenotipo de una mutante de *A. ferrooxidans*.** A) Interrupción del gen *resB* con la secuencia de inserción *ISAfe-1* en la cepa mutante. B) Comparación del fenotipo de la cepa mutante, de las revertantes y de la silvestre cuando crecían en un medio sólido que contenía ion ferroso y tiosulfato. (Schrader y Holmes, 1988; Cabrejos y cols., 1999).

con proteínas de función conocida, pero aparece débilmente relacionada con un transportador de tipo ABC eucarionte lo cual permite relacionar su posible papel funcional con las proteínas ResB y ResC. Adicionalmente, río arriba de *resB* se identificó un ORF incompleto cuyo producto tenía similitud con el extremo carboxilo terminal de un citocromo *c<sub>1</sub>*, que es un componente del complejo citocromo *bc<sub>1</sub>* descrito en la mitocondria y una amplia variedad de bacterias (Trumpower, 1990).

La información disponible nos llevó a postular que el fenotipo de la cepa mutante se debía a que la secuencia de inserción inactivaba al gen *resB*, de modo que la célula no era capaz de generar citocromos tipo-*c* maduros. Un candidato posible de maduración era el citocromo *c<sub>1</sub>* codificado en la región río arriba de *resB*. Esto se basa en que muchos genes que codifican para las proteínas de biogénesis de citocromos se encuentran próximos o constituyendo un mismo operón con los genes que codifican los citocromos blanco (Nakamura y cols., 1997; Grove y cols., 1996; Saiki y cols., 1992). Por otro lado, debido a que el citocromo *c<sub>1</sub>* forma parte del complejo *bc<sub>1</sub>* y debido a que la mutante no podía oxidar hierro, era factible presumir que el complejo *bc<sub>1</sub>* era un componente esencial para la oxidación de hierro, pero no de tiosulfato u otros compuestos de azufre reducido.

En la mutante descrita, la carencia de citocromos tipo-*c* y en particular del citocromo *c<sub>1</sub>* no fue demostrada experimentalmente. No obstante, ésta parece probable debido a que al realizar un análisis sobre la secuencia del genoma de *A. ferrooxidans* disponible en la base de datos no se encontró copias de los genes *resB* y *resC* y no se detectó genes que codificaran para otros sistemas análogos de biogénesis de citocromos tipo-*c* conocidos (Thöny-Meyer, 1997). Esta información generó una interrogante

inmediata relacionada con el papel de los citocromos tipo-*c* en el metabolismo oxidativo de los compuestos de azufre reducido en *A. ferrooxidans*. ¿Puede esta bacteria prescindir de los citocromos tipo-*c* para su crecimiento en tiosulfato?. La información existente en otros organismos que oxidan compuestos de azufre reducido revela que los citocromos tipo-*c* forman parte de las vías oxidativas descritas en otros organismos oxidantes de tiosulfato como *Rhodovulum sulfidophilum* (Bamford y cols., 2002; Appia-Ayme y cols., 2001). Además algunos estudios sobre los citocromos presentes en células de *A. ferrooxidans* crecidas en hierro y azufre elemental revelaron que en esta última condición se sintetizan algunos citocromos tipo-*c* que no están presente en la condición de hierro (Mansch y Sand, 1992; Yarzabal y cols., 2002b). En conjunto estos antecedentes sugerían que los citocromos tipo-*c* desempeñaban un papel funcional en la oxidación de azufre u otros compuestos de azufre reducido como tiosulfato. A pesar de estos antecedentes, el fenotipo de la mutante sugería que los citocromos tipo-*c* y en particular el citocromo *c<sub>1</sub>* no desempeñaban un papel funcional o no eran esenciales en la oxidación de estos compuestos, introduciendo un aspecto controversial que resultaba muy interesante de ser estudiado experimentalmente.

Al momento de comenzar esta Tesis la función del complejo *bc<sub>1</sub>* en el metabolismo oxidativo de *A. ferrooxidans* no había sido descrita. Sin embargo, en el año 2000 se comunicó la función del complejo en el metabolismo oxidativo del ion ferroso (Elbehti y cols., 2000). Debido a que aun permanecía desconocida la función del complejo *bc<sub>1</sub>* en la oxidación de compuestos de azufre reducido no era posible establecer el carácter esencial

o no esencial de este complejo en esta condición, resultando pertinente abordar su estudio en *A. ferrooxidans*.

### **3. Hipótesis.**

La información disponible permite plantear que el citocromo *c<sub>1</sub>* codificado por la región génica ubicada río arriba del gen *resB*, constituye parte de un complejo tipo *bc<sub>1</sub>* que es esencial para la oxidación del ion ferroso, pero no para la oxidación de compuestos de azufre reducido.

### **4. Objetivo General.**

El objetivo general de esta investigación fue caracterizar la región génica cercana al gen *resB* y estudiar la función de sus productos en el metabolismo oxidativo de  $\text{Fe}^{2+}$  y de compuestos de azufre reducido en *A. ferrooxidans*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### I MATERIALES

#### 1. Bacterias

La cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 19859 y ATCC 23270 se mantuvieron por cultivos sucesivos en medio 9K a 30°C con agitación constante. Se controló el crecimiento por recuento directo de las bacterias en una cámara Petroff-Hausser. Las bacterias se colectaron en la fase tardía del crecimiento exponencial mediante centrifugación a 12.000 x g por 20 min.

Las distintas cepas de *E. coli* se cultivaron en medio Luria Broth (LB) o en medio LB suplementado con antibiótico a 37°C con agitación hasta la concentración requerida. El crecimiento bacteriano se controló midiendo la turbidez en un espectrofómeto a 550-600 nm. Las bacterias se colectaron por centrifugación a 3000 x g durante 5 min.

La cepa *E. coli* JM109 [ F'TraD36lacI<sup>q</sup>(lacZ)M15proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup>/e14(McrA)(lac-proA)thigyrA96(NaI<sup>r</sup>)endA1hsdR17(rkmk<sup>+</sup>)relA1supE44recA ] se utilizó para la propagación de los plasmidios pUC19, pGEX2T, PGEMT y sus derivados recombinantes y para la sobreexpresión de genes. La cepa *E. coli* S17.1 (*recA pro hsdR* RP4-2 Tc::Mu Kan::Tn7) (Simon y cols., 1983) se utilizó en los experimentos de conjugación con *A. ferrooxidans*.

#### 2. Medios de cultivo

-Medio Luria Bertani (LB): Triptona 1% p/v, extracto de levadura 0,5% p/v, NaCl 1% p/v. Se esterilizó por autoclave por 20 min a 15 atm.

Para preparar los medios sólidos, al medio mínimo y LB se agregó agar a una concentración de 1,5% p/v. En algunos casos, los medios se suplementaron con el antibiótico a una concentración apropiada (ampicilina 100 µg/ml, kanamicina 10 µg/ml o espectinomicina 50 µg/ml). Para la selección por expresión del gen β-galactosidasa se suplementó con IPTG (Isopropil β-D-tiogalactopiranosido) 0,5 mM y X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indol β-D-tioglucopiranosido) 80 µg/ml.

**-Medio SOB:** Triptona 2% p/v, extracto de levadura 0,5% p/v, NaCl 10 mM y KCl 2,5 mM. Se ajustó a pH 7,0 con NaOH y se esterilizó por autoclave 20 min a 15 atm.

**-Medio SOC:** A 98 ml de medio SOB se agregó 1 ml de solución 2 M de Mg<sup>2+</sup> (1M en MgCl<sub>2</sub> y 1M en MgSO<sub>4</sub>) y 1 ml de glucosa 2 M resultando 20 mM en Mg<sup>2+</sup> y 20 mM en glucosa.

**-Medio 9K:** K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 3H<sub>2</sub>O 0,04 g/l, MgSO<sub>4</sub> 0,04 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 0,1 g/l y FeSO<sub>4</sub> x 7H<sub>2</sub>O 33,3 g/l. Se ajustó el pH 1,6 con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado y se esterilizó por autoclave durante 15 min a 15 atm. Para cultivar las bacterias en azufre elemental, se sustituyó el FeSO<sub>4</sub> por S<sup>o</sup> 5 g/l y se ajustó el pH a 3,5.

### 3. Vectores

**-pGEM-T:** (Promega Corp. USA) vector de 3820 pb se utilizó para el clonamiento directo de productos de PCR generados con *Taq* DNA polimerasa sin actividad editora.

**-pGEX-2T:** (Amershan Pharmacia Biotech) vector de 4900 pb que se utilizó para el clonamiento, sobreexpresión de los genes mutados y purificación de las proteínas



**pT7 Blue3-3:** (Novagen USA) vector de 3820 pb que se utilizó para el clonamiento de los fragmentos de "nested PCR" producidos con la enzima polimerizante "Elongase Mix" (Gibco-BRL). El sitio de clonamiento está flanqueado por dos sitios *EcoRI*, lo que facilitó el subclonamiento del fragmento clonado.

El plasmidio pUC18 *mob* (4,2 kb) contiene la región de movilización *mob* derivada del plasmidio RP4 (Simon y cols., 1983) y el plasmidio php45 $\Omega$ K (4,3 kb) contiene un cassette de resistencia a kanamicina (Fellay y cols., 1987). Ambos plasmidios recombinantes fueron gentilmente donados por La Dra. Violaine Bonnefoy (C. N. R. S., Marsella, Francia).

#### 4. Oligonucleótidos

Todos los oligonucleótidos (Tabla 2) utilizados en esta Tesis se obtuvieron del "Centro de Análisis y Síntesis de Biomoléculas" de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

#### 5. Reactivos

Los siguientes reactivos se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (USA): lisozima, BSA, ampicilina, TEMED, persulfato de amonio, bromuro de etidio, azul de Coomassie R250, DTT, 2-mercaptoetanol, ATP, antimicina, estigamtelina, mixotiazol, cianuro de potasio, azida de sodio, quinona-1, citocromo *c* de caballo, ascorbato, ditionito de sodio, borohidruro de potasio, hexacloro iridato,  $\beta$ -alanina. El SDS se obtuvo de United States Biochemicals Co. (USA) y el reactivo de Bradford de BioRad.

Tabla 2

## Listado de oligonucleótidos utilizados.

Nombre	5' → 3'
<b>A. Clonamiento de la región génica localizada río arriba del gen <i>resB</i></b>	
AP1	GTAAATACGACTCACTATAGGGC
AP2	ACTATAGGGCACGCGTGGT
GSP1	TCGGCATCAGCACTCATCATTATATC
GSP2	TAAATCATATCTCTTTACCGCGCAAC
GSP3	CAACAGCAATGATCCTGCATAGTATAG
GSP4	AGAAAAACCCGCTAATCAGCTGGAG
<b>B. Secuenciación de la región génica localizada río arriba de <i>resB</i>.</b>	
B.1	CCGGCATAACAACAGGTATG
B.2	ACCGTTCGGAAGCATGATG
B.3	AGGTGGGTTACATCTGGT
B.4	CAATACATAGCCGACAAAG
B.5	CAGGAACCTCTGGAACGATACA
B.6	ATTTGCGACACTATCTAACTT
B.7	CTGAATCAACAATTCGTCGT
B.8	CCCCTGACCAGCCAAATCT
B.9	AACACGACAGATACCATGG
B.10	CTAACTCGGGGGTGAAGAT
B.11	GTCTTAGAACCAATGATCCG
B.12	ACACCTTGGACTTACGCTTGC
B.13	AACCAGGTATGCAGTAAACGGTGC
B.14	TGGGTCTGCGACACTGCAA
B.15	GGCGACAGCTTTATACCTC
B.16	ATGGCGTGTCAATCAGTTAG
B.17	CGGTACGGTTGGGTCAAAG
B.18	CAACAGCAATGATCCTGCATAGTATAG
B.19	TAATACGACTCACTATAGGG
B.20	AAACGACGGCCAGTGAATTG
<b>C. Clonamiento de <i>petC::kan</i> y <i>resB::kan</i> en pUCmob</b>	
C.1	ATGAGCACGTACAGATATC
C.2	CCGGCATAACAACAGGTATG
C.3	ATGCGATTGGCGGTTAGTCTGC
C.4	GTTCAACCAATGTCCCTCGGC
C.5	GATGGCTGCGAATCGG
C.6	GCAGCTGTGCTCGACGTTG
<b>D. Secuenciación de clones <i>genX::kan</i>/pUCmob</b>	
pGEX2T-11	CTCCAAAATCGGATCTGGTTC
pGEX2T-21	TGCATGTGTCAGAGGTTTCA
pRabajoCitb2-3	ATGGCGTGTCAATCAGTTAG
pIntercit	CCGGCATAACAACAGGTATG
<b>E. Estudio de la cotranscripción</b>	
RT	AGAAAAACCCGCTAATCAGCTGGAG
GSP4	GACATATGGGCCGATAGC
E. RT1	CACAAAACACCAGCAGCAA
E. RT2	CCTCTATGGATGTGCTCTTT
E. RT3	AAGAGATAGGAGTGGGGGG
E. RT4	
PCR	
E. PCR1	CCTCTCAGACTTATATTGGTA
E. PCR2	AACACGACAGATACCATGG
E. PCR3	GTCTTAGAACCAATGATCCG
E. PCR4	ATTTGCGACACTATCTAACTT
E. PCR5	ACACCTTGGACTTACGCTTGC
E. PCR6	CAACAGCAATGATCCTGCATAGTATAG

---

Nombre

5' → 3'

---

E.PCR7	GGCGACAGCTTTATACCTC
E.PCR8	ACCGTTCGGAAGCATGATG
E.PCR9	GGCGACAGCTTTATACCTC
E.PCR10	CACCAACCAACCAGCAGCAA
E.PCR11	TCAGCGCAATACTGCAGC
E.PCR12	CCTCTATGGCTGTGCTCTTT
E.PCR13	CGTCGTCAGCAGTCAATAT
E.PCR14	AAGAGATAGGAGTGGGGG
<b>F. Extensión del partidior</b>	
F.1	AACACGACAGATACCATGG
F.2	CTATCGCGTTATCCTAAGC
<b>Clonamiento de genes en pGEX-2T</b>	
G.1	GGTCCAACCTTAGCTACACCA
G.2	GGCAAGCGCACCGAACAG
G.3	TTATTCATTAGCACCTCCGGGT
G.4	GCCAACAGTTACAGATTCCGG
G.5	TTCAATTGGAGCCAACGGCAG
G.6	GTCAACACAAGTGAGCTTTGG
G.7	GCGATTGGCGGTTAGTCTG
G.8	GTTACCCAATGTCCCTCGGC
G.9	CGCCGATATTCCGGTGAAG
G.10	AGGCCACTTCGTAACCTCC
<b>Secuenciación de clones <i>gst</i></b>	
H.1	CTCCAAAATCGGATCTGGTTC
<b>Detección de la presencia de <i>pet2</i></b>	
I.1	TGATGGGTGATTGCGGGT
I.2	AAGGCGAAAGCGCAGGCGAT
I.3	CAGACGAAACGCAAGACAGC
I.4	ATGAGCGCGGACACGCTGG
I.5	AGTATGTTGTGTTGGGCAGG
I.6	CGATGCCGTTTCACTTGGGTG
I.7	TATGCCCTTCTGCTCCGCC
I.8	CGGCAGACTTTTGAGCGGA
I.9	TTTATGCGCCATCTGGGTC
I.10	TAAACGCTATAACAATACCCG
<b>Detección de la expresión del <i>pet2</i></b>	
J.1	GACGGGCCACAATTATTGACA
J.2	GTCGTGTCGTTGCACGACG
J.3	ATGAGTGAGAACTGAAGGA
J.4	TAAACGCTATAACAATACCCG
<b>Detección de la presencia de los genes <i>cyd/cyo</i></b>	
K.1	AAGCTGGCGGCCATGGAAGC
K.2	CACACCTGGTTACCGTCCCA
K.3	GACCACGACATTCTTCATTCC
K.4	GGTGCATAACCGAACCAGCC
<b>Detección de la expresión de los genes <i>cyd/cyo</i></b>	
L.1	ATTCTGGTTCCTGATTCTGGG
L.2	AGCACGCCCGCAGAGAATCG
L.3	CTTGCTGGTCTCAGATTCC
L.5	GGTGCATAACCGAACCAGCC
<b>Detección del cassette <i>Kan</i></b>	
KMTN5	CGATGCGCTGCGAATCGG
M.2	GCAGCTGTGCTCGACGTTG
<b>Detección de los genes <i>rus</i></b>	
RusNM	GGCACGCTGGATTCCACATGGAAAGAGGCG
RCX	CCACTCGAGCCTTGACAATGATTTACCAAACATACC

---

Los oligonucleótidos directos son destacados en color rojo y los inversos en color azul.

El papel 3MM fue de Whatman y los filtros de nitrocelulosa BA85 de Schleicher and Shüell. Los compuestos radiactivos [ $\gamma$ <sup>32</sup>P]-ATP y [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]-dATP se obtuvieron de NEN Life Science Products Inc. La inmunodetección de proteínas se realizó con un kit de inmunodetección por quimioluminiscencia (Super Signal Chemiluminiscent Substrate Kit "Pierce").

Todas las endonucleasas de restricción utilizadas procedieron de Gibco BRL. La RNasaA fue de Boehringer Mannheim. Las enzimas T<sub>4</sub> DNA ligasa y polinucleótido quinasa se obtuvieron de New England Biolabs. La fosfatasa alcalina intestinal de ternera (CIAP), el fragmento Klenow de la DNA polimerasa, la *Taq* DNA polimerasa, Elongasa (mezcla de *Taq* DNA polimerasa y DNA polimerasa de *Pyrococcus sp.* GB-D) y los nucleótidos dATP, dCTP, dTTP y dGTP fueron de Gibco BRL.

Como marcadores del tamaño de DNA se utilizaron DNA del fago $\lambda$  digerido con HindIII, DNA del fago  $\phi$ X174 RF tratado con *Hae*III, 1 kb DNA ladder, 50 y 100 pb DNA ladder. Como marcador del tamaño del RNA se utilizó 0,24-9,5 kb RNA ladder, todos provenientes de Gibco BRL. También se utilizó el marcador de masa molecular de proteínas proveniente de BioRad Laboratories.

Todas las sales, ácidos, bases y compuestos orgánicos fueron de grado analítico y procedieron de Sigma Co., Merck, Fluka o JT Backer.

Los reactivos para medios de cultivo: triptona, extracto de levadura y agar, procedieron de Difco Laboratories.



## II MÉTODOS

### 1. Clonamiento de los genes *cycA1*, *sdrA1*, *petA1*, *petC1* y *resB* en el vector de expresión pGEX-2T.

#### 1.1 Preparación de ácidos nucleicos

##### 1.1.1 Preparación de DNA plasmidial en pequeña y mediana escala

Para la purificación del DNA plasmidial se utilizó el sistema Wizard DNA Purification Systems (Promega Corp). *E. coli* se cultivó con agitación toda la noche a 37°C y se colectaron las células por centrifugación a 12.000 x g por 10 min. Las bacterias se sometieron a lisis alcalina y el DNA plasmidial se purificó por cromatografía de intercambio iónico según la indicaciones del proveedor.

Las muestras de DNA se sometieron a electroforesis en geles de agarosa horizontales cuya concentración dependió del tamaño de los fragmentos de DNA a separar y se agregó bromuro de etidio 0,5 µg/ml. La electroforesis se realizó a 80 V por tiempos variables en tampón TAE (Tris-acetato 40 mM pH 8,3, EDTA 1 mM) y el DNA se visualizó en un transiluminador de radiación UV. Los geles se fotografiaron con una cámara digital (Kodak Digital Science) y la imagen se procesó en el computador.

##### 1.1.2 Preparación de DNA cromosómico de *A. ferrooxidans*.

Las bacterias se cultivaron en 2 l de medio 9K hasta alcanzar una densidad de 10<sup>8</sup> cel/ml. Las células se colectaron por centrifugación a 12.000 x g por 20 min a 4°C y se lavaron con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 10 mM y en TE pH 8,0. La extracción del DNA cromosomal se realizó según el método de Marmur (1961). Las bacterias se suspendieron en 15 ml de solución A (Tris-HCl 25 mM pH 8,0, glucosa 50 mM, EDTA 10 mM). Se agregó 5 ml de solución A

con lisozima 2 mg/ml y se incubó en hielo durante 60 min. Se agregó SDS 0,05% final y proteinasa K 50 µg/ml final, y se incubó durante 15 min a 37°C. Las proteínas se eliminaron por extracción con 1 volumen de una mezcla de fenol:cloroformo 1: 1 y luego con 1 volumen de cloroformo. Los ácidos nucleicos se precipitaron con etanol en presencia de acetato de sodio 0,3 M durante toda la noche a -20°C. El sedimento se lavó con etanol 70%, se secó y resuspendió en 10 ml de tampón TE [Tris-HCl 10 mM pH 8,0 y EDTA 1mM]. Se incubó durante 2 h a 37°C con 30 µg de RNasa A. Se realizó una extracción de proteínas con fenol-cloroformo y se precipitó con etanol durante la noche. La mezcla alcohólica se centrifugó durante 10 min a 12.000 x g y el DNA genómico se resuspendió en tampón TE hasta a concentración de 0,5 µg/µl.

### **1. 1. 3 Preparación de RNA total de *A. ferrooxidans***

El RNA total se preparó de acuerdo al procedimiento descrito por Hagen y Young (1978). Todas las soluciones y material de vidrio se trataron previamente con 0,1% de dietilpirocarbonato (DEPC) y se esterilizaron por autoclave durante 30 min. Las bacterias se crecieron en 2 l de medio 9K y se colectaron cuando el cultivo alcanzó una densidad aproximada de  $10^8$  cel/ml. Se lavaron con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y TE, manteniéndose siempre en hielo. Se resuspendieron en 5 ml de Tris-HCl 50 mM pH 6,8, EDTA 2 mM y SDS 1% y se lisaron por calentamiento a 97°C en baño maría. Se agregó acetato de sodio hasta 0,3 M pH 5,2 y se realizó un extracción de proteínas con fenol ácido (pH 4,5) agitando suavemente la mezcla durante 10 min. A la mezcla se adicionó cloroformo y se repitió el procedimiento de extracción. Se centrifugó a 12.000 x g a 4°C y la fase acuosa se trató con fenol: cloroformo por 10 min. Los ácidos nucleicos se precipitaron con etanol durante 2 h a

-20°C en presencia de acetato de sodio 0,3 M pH 5,2. La mezcla etanólica se centrifugó y el sedimento se resuspendió en 1 ml de Tris-HCl 10 mM pH 8,0, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, DNAsa libre de RNAsa 10 µg/ml y se incubó po 10 min a 37°C. Se agregó acetato de sodio 0,3 M final y las proteínas se extrajeron con fenol:cloroformo por 5 min. Se obtuvo la fase acuosa por centrifugación a 12.000 x g por 10 min y se agregó etanol absoluto y acetato de sodio para precipitar el RNA. El sedimento se secó a temperatura ambiente por 10 min y se resuspendió en H<sub>2</sub>O tratada con DEPC a una concentración de 1 µg/µl. Para almacenar el RNA por períodos prolongados el RNA éste se precipitó con etanol y se mantuvo a -80°C.

## **1.2 Precipitación de los ácidos nucleicos**

Los ácidos nucleicos fueron precipitados con 1 volumen de etanol absoluto y 0,1 volumen de acetato de sodio pH 4,8. La mezcla se incubó a -20°C durante 2 h y se centrifugó a 20.000 x g durante 10 min. El DNA o RNA precipitado fue lavado con etanol 70% para retirar el exceso de sales presente. Se dejó secar duras 15 min a temperatura ambiente y se solubilizó en tampón TE a la concentración deseada.

## **1.3 Digestión del DNA**

El DNA a una concentración de 0,1 µg/µl, se digirió con enzimas de restricción utilizando 5 unidades de enzima por µg de DNA en las condiciones de tiempo, temperatura y fuerza iónica recomendada por los proveedores. Las reacciones enzimáticas se detuvieron por calentamiento a 65-70°C o por extracción fenólica.

## **1.4 Desfosforilación del DNA.**

Al digerir el DNA con enzimas de restricción, se generaron extremos 5' fosfato que deben ser eliminados para aumentar la eficiencia de unión del inserto. Para desfosforilar

los vectores se utilizó fosfatasa alcalina intestinal de ternera (CIAP). Para ello el DNA se trató con 2 U de CIAP por pmol de extremo 5' fosfato en la solución amortiguadora (Tris-HCl 50mM pH 9,3, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, ZnCl<sub>2</sub> 0,1 mM y espermidina 1 mM) y se incubó a 37°C por 15 min. El procedimiento se repitió dos veces. Cuando la enzima de restricción utilizada generaba extremos romos o 5' recesivos, se incubó a 37°C por 15 min y luego a 56°C por 15 min. El procedimiento también fue realizado dos veces. La reacción se detuvo con 300 µl de una solución de Tris-HCl 10 mM pH 7,5, SDS 0,5%, EDTA 1 mM y NaCl 200 mM. Se realizó una extracción fenol cloroformo y el DNA se precipitó con etanol. Se resuspendió en un volumen apropiado de TE.

### **1.5 Purificación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa.**

Para purificar fragmentos derivados de reacciones de PCR o de digestiones con enzimas de restricción, se utilizó el kit Wizard PCR Preps DNA Purification Systems (Promega Corp). La muestra de DNA se sometió a electroforesis en un gel de agarosa de bajo punto de fusión. Se cortó el trozo de gel que contenía la banda de DNA a purificar y se fundió a 65°C en un tubo de 1,5 ml. Se agregó la resina y se purificó por cromatografía en mini-columnas como se especifica en el protocolo entregado por el proveedor y el DNA se eluyó con tampón TE pH 8,0.

### **1.6 Reacción de amplificación de DNA por PCR.**

#### **1.6.1 Reacción utilizando la enzima *Taq* DNA polimerasa.**

La reacción se realizó en la solución amortiguadora Tris-HCl 20 mM pH 8,4, KCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 0.67 mM, dNTPs 0.3 mM cada uno, 1 µM de oligonucleótidos y 0,04 U/µl de *Taq* DNA polimerasa. Se utilizó 1-100 ηg de DNA molde. La mezcla se cubrió



con aceite mineral para evitar la evaporación. La reacción de PCR consistió en una primera etapa desnaturalización 94°C por 5 min, seguida de 28-35 ciclos de:

- a) desnaturalización a 94°C durante 30 s,
- b) alineamiento del partidor durante 30 s a una temperatura de aproximadamente 5°C por debajo de la temperatura de “melting” de los partidores utilizados,
- c) extensión del fragmento por la *taq* DNA polimerasa a 72°C durante un tiempo aproximado de 1 min por 1 kb de DNA a sintetizar.

Finalmente se realizó una extensión a 72°C durante 10 min. El producto de amplificación se analizó por electroforesis en geles de agarosa.

### **1. 6. 2 Reacción utilizando la enzima Elongasa**

La reacción se realizó en una solución amortiguadora Tris 60 mM pH 9,1, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 18 mM, MgCl<sub>2</sub> 1,6 mM, dNTPs 1,25 mM cada uno, oligonucleótidos 5 μM cada uno y elongasa 0,02 U/μl. Se siguió el mismo procedimiento como en el punto 1. 6.1., pero la temperatura de extensión fue 68°C.

### **1. 6. 3 Diseño de los oligonucleótidos utilizados como partidores.**

Los oligonucleótidos utilizados en todas las reacciones de PCR, RT-PCR, secuenciación y extensión del partidor (Tabla 2) se diseñaron utilizando el programa OLIGOS. Este programa permitió analizar los oligonucleótidos diseñados, estableciendo si éstos formaban estructuras secundarias no deseadas o si podían generar dímeros.

## **1. 7 Cuantificación de ácidos nucleicos**

Para cuantificar ácidos nucleicos presentes en las diferentes muestras se utilizaron dos métodos.

A) Cuantificación por absorbancia: se midió la absorbancia a 260 nm y se calculó la concentración de ácidos nucleicos considerando que  $DO_{260}=1$  corresponde a 50  $\mu\text{g/ml}$  de DNA de doble hebra, 40  $\mu\text{g/ml}$  de DNA de 1 hebra o RNA (Sambrook y cols., 1989).

B) También se cuantificó ácidos nucleicos utilizando el marcador  $\lambda\text{HindIII}$  o  $\lambda\text{X174 RF/HaeIII}$ . Se realizaron diluciones de la muestra de DNA a cuantificar y se sometieron a electroforesis en un gel de agarosa junto a cantidades conocidas del marcador. Se comparó la intensidad de la banda del DNA con una de tamaño similar del marcador. Las muestras de DNA plasmidial fueron previamente linearizadas por digestión con una enzima de restricción.

## 1.8 Ligación de fragmentos de DNA en vectores

Para obtener los clones recombinantes se utilizó la enzima T4 DNA ligasa. El vector purificado, digerido con la enzima de restricción apropiada y desfosforilado se mezcló en una relación molar de 1:5 (vector : inserto) con el inserto en Tris-HCl 50 mM pH 7,5,  $\text{MgCl}_2$  10 mM, DTT 10 mM, ATP 1mM, BSA 25  $\mu\text{g/ml}$ ) y 6 U de T4 DNA ligasa. La reacción se incubó a 16°C durante toda la noche.

## 1.9 Transformación de *E. coli*

### 1.9.1 Preparación de células electrocompetentes

Células de *E. coli* cultivadas toda la noche a 37°C en medio LB se utilizaron para inocular 500 ml de LB al 1% v/v. Se cultivó a 37°C con agitación hasta alcanzar una  $DO_{500}$  de 0,8. El cultivo se centrifugó a 4.000 x g por 10 min a 4° C. Se eliminó el sobrenadante y las células se lavaron dos veces en 500 ml de agua destilada, estéril y fría, centrifugando

cada vez a 4.000 x g 10 min a 4° C. Las células se resuspendieron agregando 2 ml de glicerol 10% estéril, se alicuotaron y se conservaron a -80°C.

### **1. 9. 2 Electroporación**

Las electroporaciones se realizaron en un equipo Cell-Porator (Gibco BRL Life Technologies, INC). Las bacterias electrocompetentes (20-25 µl) se mezclaron con aproximadamente 1 ng de DNA y se depositaron entre los electrodos de la cubeta. Se aplicó un pulso de 2400 V y las muestras se transfirieron en forma estéril a un tubo de cultivo que contenía 1 ml de medio SOC. Las células se recuperaron incubando a 30-37°C por 1 h, según el caso. Luego 50-200 µl de células se depositaron en placas de agar LB más el antibiótico adecuado y se incubaron toda la noche a la temperatura deseada.

## **2. Secuenciación de DNA**

Los DNAs se secuenciaron como describe Sanger y cols. (1977) utilizando el método de secuenciación por PCR.

### **2. 1 Marcación radiactiva del oligonucleótido**

Se realizó la marcación radiactiva del oligonucleótido por incorporación de [<sup>32</sup>P] al extremo 5' de éste bajo las siguientes condiciones: Tris-HCl 60 mM pH 7,8, MgCl<sub>2</sub> 10 mM, KCl 200 mM, oligonucleótido 0,2 µM, [<sup>32</sup>P] ATP 0,4 µM y 0,2 U de T4 polinucleótido quinasa en un volumen final de 5 µl. La reacción se incubó a 37°C por 10 min y a 55°C por 5 min y se enfrió en hielo.

### **2. 2 Reacción de secuenciación**

Para la reacción de secuenciación se preparó una mezcla de prereacción que contenía Tris-HCl 30 mM pH 9,0, MgCl<sub>2</sub> 5 mM, KCl 30 mM, W-1 0,05 % p/v, 1 pmol de

oligonucleótido marcado radiactivamente (los 5  $\mu$ l de la reacción de marcación), 1,25 U de *Taq* DNA polimerasa y 300-700  $\eta$ g de DNA en un volumen final de 36  $\mu$ l. Se mezcló todo y se enfrió en hielo. Se prepararon cuatro reacciones de secuenciación A, C, G y T. Se colocaron 2  $\mu$ l de cada reactivo de terminación en cada tubo: dideoxiadenina en tubo A y así sucesivamente. Se agregó a cada uno de los tubos 8  $\mu$ l de mezcla de prereacción. Se mezcló, se enfrió en hielo y se cubrió con aceite mineral y se sometieron al siguiente programa de PCR: 1 ciclo de 3 min a 95°C, 30 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 55°C y 60 s a 70°C. Finalizado el programa se agregó a cada tubo 5  $\mu$ l de solución de detención, se calentaron a 90°C por 5 min y se cargaron 3-5  $\mu$ l de la fase acuosa en el gel de secuenciación preparado como describe Sambrook y cols. (1989).

La electroforesis se realizó a 1600 V por tiempos variables. Luego el gel fue adherido a papel filtro, secado aplicando calor (80°C) y vacío por una hora y expuesto ante una lámina autorradiográfica a temperatura ambiente y en oscuridad por 48-72 h. La lámina autorradiográfica se reveló en oscuridad y se analizó la secuencia.

La secuenciación de los fragmentos también se realizó en un secuenciador automático en el Centro de Análisis y Síntesis de Biomoléculas de la Universidad de Chile.

### **3. Reacción de RT-PCR**

#### **3.1 Tratamiento del RNA con DNAsa libre de RNAsa**

El RNA total extraído de *A. ferrooxidans* se trató con DNAsa libre de RNAsa para eliminar el DNA cromosómico bacteriano. 50  $\mu$ g de RNA total se incubaron con 68 U de DNAsa pancreática de bovino (DNAsa I) contenidos en 300  $\mu$ l de tampón a una concentración final de 5 mM  $MgCl_2$  y 0,1 M acetato de sodio pH 5,2. Se incubó a

temperatura ambiente durante 15 min y se continuó con una extracción con fenol cloroformo, la fase acuosa se precipitó con etanol a  $-20^{\circ}\text{C}$ . El RNA se resuspendió finalmente en  $\text{H}_2\text{O}$  tratada con DEPC a una concentración de  $1\ \mu\text{g}/\mu\text{l}$ .

### 3.2 Síntesis del cDNA

La preparación de RNA libre de DNA se calentó a  $85^{\circ}\text{C}$  por 5 min y se llevó a  $0^{\circ}\text{C}$  colocándola en hielo. La reacción de síntesis de cDNA se realizó en  $20\ \mu\text{l}$  de una solución que contenía  $1\ \mu\text{g}$  de RNA desnaturalizado,  $20\ \text{pmol}$  del oligonucleótido y  $0,5\ \text{mM}$  de cada dNTP. La mezcla se incubó durante 5 min a  $65^{\circ}\text{C}$ . Se agregó  $4\ \mu\text{l}$  de tampón de reacción 5X ( $250\ \text{mM}$  Tris-HCl pH 8,3,  $375\ \text{mM}$  KCl y  $15\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ) y  $2\ \mu\text{l}$  de  $0,1\ \text{M}$  DTT. El contenido del tubo se mezcló e incubó durante 2 min a  $42^{\circ}\text{C}$ . Finalmente se añadió  $1\ \mu\text{l}$  de transcriptasa reversa  $200\ \text{U}/\mu\text{l}$  y se incubó 50 min a  $42^{\circ}\text{C}$ . La reacción se inactivó calentando a  $70^{\circ}\text{C}$ . Este tipo de experimento se realizó para estudiar la expresión y la cotranscripción entre genes contiguos. Todos los oligonucleótidos utilizados con este fin están debidamente indicados en la Tabla 2.

### 3.3 Amplificación de cDNA por la reacción de amplificación en cadena (PCR)

La reacción de amplificación se realizó en un volumen de  $25\ \mu\text{l}$  siguiendo un protocolo similar al descrito en la sección 1. 6. 1., pero utilizando como templado  $2\ \mu\text{l}$  de la mezcla de la reacción de síntesis de cDNA.

## 4. Extensión del partidor

Para identificar el extremo 5' del mRNA del operón *pet 1* y del operón *res* se utilizó la metódica de extensión del partidor descrita en Sambrook y cols, (1989), con algunas modificaciones.  $100\ \mu\text{g}$  de RNA total de *A. ferrooxidans* y 3-5 pmoles de

oligonucleótido marcado con  $(^{32}\text{P})\text{PO}_4$  en el extremo 5' ( $10^6$  cpm), se precipitaron en etanol. La mezcla se resuspendió en 10  $\mu\text{l}$  de tampón Tris-HCl 50 mM pH 8,3,  $\text{MgCl}_2$  6 mM y KCl 100 mM. Se incubó a  $85^\circ\text{C}$  durante 10 min para desnaturalizar los ácidos nucleicos y 2 h a  $55^\circ\text{C}$  para permitir la hibridación del oligonucleótido al mRNA. La reacción de síntesis de cDNA se realizó incubando a  $37^\circ\text{C}$  por 1 h en 20  $\mu\text{l}$  de una solución que contenía Tris-HCl 50 mM pH 8,3,  $\text{MgCl}_2$  6 mM, KCl 100 mM, DTT 5 mM, cada uno de los dNTP a una concentración de 1 mM y transcriptasa reversa 1U/ $\mu\text{l}$ . La etapa de síntesis se repitió dos veces más para lo cual la mezcla se calentó por 5 min a  $90^\circ\text{C}$  y luego de enfriar se agregó transcriptasa reversa 1 U/ $\mu\text{l}$  y se incubó por 30 min a  $37^\circ\text{C}$ . Luego se agregó a la mezcla 20  $\mu\text{g}$  de RNasa A libre de DNasa, se incubó por 15 min a  $37^\circ\text{C}$ . Las proteínas fueron eliminadas por extracción con una mezcla de fenol:cloroformo. Los ácidos nucleicos se precipitaron con etanol en presencia de 5  $\mu\text{g}$  de glicógeno. Finalmente el cDNA se resuspendió en 6  $\mu\text{l}$  de tampón TE y 4  $\mu\text{l}$  de solución de carga para geles de poliacrilamida desnaturalisantes (formamida 80%, EDTA 10 mM pH 8,0, xilén cianol 1 mg/ml y azul de bromofenol 1 mg/ml). Las muestras se analizaron en un gel de poliacrilamida al 6% en presencia de urea 8 M.

## 5. Transferencia de DNAp por conjugación desde *E. coli* a *A. ferrooxidans*

### 5.1 Preparación de *E. coli*

La cepa de *E. coli* S17.1 (Simon y cols., 1983) que llevaba los plasmidios *petCl::kan/pUC19mob* o *resB::kan/pUC19mob* se creció en medio salino  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  85 mM, KCl 5 mM y  $\text{MgSO}_4$  15 mM pH 4,6) suplementado con extracto de levadura, 0,5% a  $37^\circ\text{C}$  durante toda la noche con agitación constante. Las células se inocularon 1/100 en

medio fresco hasta alcanzar una  $DO_{600} = 1,0$ . Las células se colectaron por centrifugación a  $2.500 \times g$  durante 5 min y se lavaron con medio salino. El precipitado bacteriano se resuspendió en el mismo medio a una concentración de  $10^9$  células/ml.

## 5.2 Preparación de *A. ferrooxidans*

*A. ferrooxidans* se creció en azufre elemental como se indicó en la sección I-1-2. Las células se colectaron en la fase exponencial tardía por centrifugación a  $10.000 \times g$  durante 20 min a temperatura ambiente. Las células precipitadas se lavaron sucesivamente con medio salino (sección 5.1) hasta eliminar todos los restos de azufre elemental. Las células se resuspendieron en la misma solución hasta una concentración de  $10^9$  células/ml.

## 5.3 Conjugación de *A. ferrooxidans* y *E. coli*

Las células donantes (*E. coli* S17.1) y receptoras (*A. ferrooxidans*) preparadas como se describe en las secciones 5.1 y 5.2 se mezclaron en una proporción de 1:2. 100  $\mu$ l de la suspensión bacteriana se depositaron en el medio de conjugación que contenía:  $(NH_4)_2SO_4$  170 mM, KCl 10 mM,  $MgSO_4$  15 mM, agar 1,25%, L-leucina 60 mM, ácido diaminopimélico 50 mM, tiosulfato de sodio 20 mM y extracto de levadura 0,125% y se incubó a  $30^\circ C$  durante 3 días.

## 5.4 Selección de recombinantes

Las células mantenidas en el medio de conjugación durante 3 días fueron suspendidas en 1 ml de medio salino y se realizaron diluciones seriadas de  $10^{-1}$  -  $10^{-4}$  células/ml. 100  $\mu$ l de cada dilución fueron sembrados por disseminación en medio sólido que contenía:  $(NH_4)_2SO_4$  170 mM, KCl 10 mM,  $MgSO_4$  15 mM, Agar 1,25%, L-leucina

60 mM, ácido diaminopimélico 50 mM, tiosulfato de sodio 20 mM, FeSO<sub>4</sub> 4 mM y kanamicina 200 µg/ml. Se incubó a 30°C durante 15 días.

## 6. Inmunodetección de las proteínas SdrA1, Rieske1 y Citocromo *c*<sub>1</sub> en *A. ferrooxidans*.

### 6.1 **Sobreexpresión de los genes por inducción con IPTG**

La cepa de *E. coli* JM109 transformada con el vector recombinante pGEX-2T que lleva los genes *sdrA1*, *petA1* o *petC1*, se cultivó toda la noche a 37°C en LB-ampicilina 100 µg/ml. El cultivo se utilizó para inocular 100 ml de medio LB-ampicilina al 5%. Se cultivaron a 37°C con agitación hasta alcanzar la fase logarítmica (DO<sub>600</sub>= 0,8-1,0). Se adicionó IPTG a una concentración final de 0,1 mM y se incubó a 30°C por 3 h. Se centrifugaron las células a 5.000 x g por 10 min a 4° C. Se lavaron al menos una vez con una solución de 50 mM Tris-HCl pH 8,0 fría y se guardaron a -20°C ó -80°C.

### 6.2 **Visualización de las proteínas sobreproducidas por SDS-PAGE.**

El extracto bacteriano se sometió a separación por electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS preparado como se describe en Sambrook y cols. (1989). Las muestras se prepararon en solución de carga Tris-HCl 50mM pH 6,8, SDS 2%, azul de bromo fenol 0,1%, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 5% v/v y se calentaron a 100°C durante 5 min para asegurar la completa desnaturalización de las proteínas. Posteriormente las muestras se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida en tampón Tris 25 mM pH 8,3, glicina 0,25 M, SDS 0,1% a 150 V durante 45 min. Los geles se lavaron durante 5 min en agua destilada y tñeron en solución de tinción durante 20 min (preparada por disolución de 0,2 g de azul brillante R250 (Sigma) en 30 ml de metanol proanálisis y la



posterior adición de 10 ml de ácido acético glacial y 60 ml de agua destilada). Finalmente se destañeron en metanol 20% y ácido acético glacial 5%. Las bandas sobre el gel que corresponden a las proteínas se visualizaron en un transiluminador.

### **6.3 Aislamiento de las proteínas sobreproducidas desde la fracción soluble e insoluble de la célula**

Las cepas de *E. coli* que sobreexpresaban los genes *cycA*, *sdrA* o *petC* se crecieron en 2 ml de medio a 37°C hasta una  $DO_{600} = 0,8$  y se indujo la sobreexpresión del gen respectivo con IPTG 1 mM por incubación a 30°C durante 3 h. Las células se colectaron por centrifugación a 3.000 x g durante 5 min y se lavaron con tampón HCl 50 mM pH 8,0. Las células se resuspendieron en 200 µl de tampón de lisis (Tris HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 2 mM pH 8,0, tritón X-100 0,1 %, β-mercaptoetanol 20 mM y PMSF 1mM] y se agregó lisozima a una concentración final de 0,1 mg/ml. Se mantuvo en hielo por 30-45 min y se procedió a romper las células por sonicación, dando 5 pulsos de 15 s a 50 Watt de potencia. El lisado celular obtenido se centrifugó a 20.000 x g por 10 min. Tanto el sobrenadante (fracción soluble) como el precipitado (cuerpos de inclusión) obtenidos en esta etapa se analizaron por SDS-PAGE (Sección 6.2.).

### **6.4 Obtención de proteínas de fusión y obtención de anticuerpos policlonales**

Se aislaron los cuerpos de inclusión desde cultivos de 100 ml de células que sobreexpresan los genes *cycA1*, *sdrA1* o *petC1*. Estos fueron suspendidos en tampón de carga Tris-HCl 50mM pH 6,8, SDS 2%, azul de bromo fenol 0,1%, glicerol 10%, 2-mercaptoetanol 5% v/v. El extracto de proteínas de los cuerpos de inclusión fue sometido una electroforesis en geles de poliacrilamida 12% en presencia de SDS preparado como

se describe en Sambrook y cols. (1989). La banda que correspondía a la proteína sobreproducida (>200 µg de proteína) se escindió del gel y lavó en tampón fosfato salino (NaCl 8 g/l, KCl 0,2 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1,44 g/l y KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,24 g/l, pH 7,4). El pedazo de poliacrilamida se mezcló y maceró con coadyuvante de Freund (Sigma) hasta generar una emulsión que se inyectó en conejos debidamente mantenidos en el vivero de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. La inyección de esta emulsión se repitió dos veces más cada 15 días.

Los anticuerpos se obtuvieron a partir del suero sanguíneo colectado a partir de 50 ml de sangre coagulada. El suero colectado se sometió a centrifugación a 500 x g por 5 min. El sobrenadante se recuperó y almacenó a -20°C. La reactividad de estos anticuerpos se analizó por "Western blotting" utilizando 1-100 ng de antígeno y comparando la reacción con el suero sanguíneo colectado de los conejos antes de la inyección con el antígeno.

#### **6.5 Obtención de membrana citoplasmática de *A. ferrooxidans***

Para obtener una preparación de membranas enriquecida en la membrana citoplasmática se utilizó el protocolo descrito por Misuno y Kageyama (1978). 100 mg de pellet bacteriano se suspendieron en 3 ml de sacarosa 20%. Se agregó secuencialmente los siguientes componentes: 1,5 ml de sacarosa 2 M, 1,7 ml de Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, 130 µl de EDTA 1%, 150 µl de lisozima 10 mg/ml y DNAsa a una concentración final de 10 µg/ml. Se incubó a 30°C durante 60 min con agitación ocasional. En esta etapa se generaron esferoplastos debido al desprendimiento de la membrana externa. Se centrifugó a 15.000 x g durante 15 min. Las células precipitadas se suspendieron en 5 ml de Tris-HCl

pH 8,0 y PMSF 1mM y rotas con prensa French. El lisado bacteriano se centrifugó a 15.000 x g durante 15 min y el sobredanante resultante se sometió a una ultracentrifugación an 45.000 rpm durante 1,5 h a 4°C (Ultracentrífuga Sorvall OTD-Combi, Rotor T-875). El precipitado que contenía las membranas citoplasmáticas se resuspendió en agua destilada y almacenado a -20°C.

#### **6. 6 Cuantificación de proteínas.**

La concentración de proteínas se determinó utilizando el protocolo de Bradford (1976) con algunas modificaciones. A 100 µl de una solución que contenía 0,5-10 µg de proteína se agregó 1 ml del reactivo de Bradford. La absorbancia se midió a una longitud de onda de 595 nm. La curva de calibración se realizó con seroalbúmina de bovino como patrón. La cuantificación de proteína totales de células enteras y membranas celulares se realizó de forma similar, pero se agregó una etapa inicial de solubilización de las proteínas que consistió en la adición de NaOH 0,4 M final e incubación a 100°C durante 10 min.

#### **6. 7 Inmunodetección de proteínas por Western Blotting.**

Se utilizó un sistema de quimioluminiscencia "Pierce" que consiste en la generación de luz como producto de una reacción química.

El extracto de proteínas de las bacterias se sometió a separación mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS preparado como se describe en Sambrook y cols. (1989). Las proteínas separadas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia se realizó en una solución de transferencia 10 % (ácido bórico 500 mM, NaOH 190 mM, pH. 9,0), etanol 20%, SDS 0,1% y se aplicó una corriente de 300 mA durante 1,5 h. La membrana se bloqueó con 0,1 ml/cm<sup>2</sup> de leche al

5% en TBS/T (Tris-HCl 20 mM pH 7,6, NaCl 137 mM,, Tween 20 0,1% v/v) incubando 1 h a temperatura ambiente. La membrana se lavó con TBS/T por 10 min dos veces. Se incubó con el anticuerpo purificado diluido 1/10.000 en TBS/T durante 1 h a temperatura ambiente con agitación suave. La membrana se lavó 4 veces durante 10 min en TBS/T. Posteriormente se incubó con el segundo anticuerpo de cabra anti IgG de conejo, conjugado con peroxidasa diluido 1/40.00 con TBS/T. El revelado se realizó mezclando iguales volúmenes de los sustratos como lo indica el proveedor y se incubó por 1 min a temperatura ambiente. La membrana se expuso a una película autorradiográfica.

## 7. Determinación de la función del complejo $bc_1$ en la oxidación de tiosulfato por *A. ferrooxidans*

### 7.1 Medición de la actividad respiratoria en *A. ferrooxidans*

La actividad respiratoria de células enteras y membranas de *A. ferrooxidans* se determinó polarográficamente midiendo el consumo de oxígeno con un electrodo de Clark (oxígrafo Gilson) a 25°C. Alícuotas de 10-20  $\mu$ l de una resuspensión bacteriana se inyectaron en la cámara del oxígrafo que contenía 1,8 ml tampón de  $\beta$ -alanina ( $\beta$ -alanina- $H_2SO_4$  20 mM, pH 3,5) o tampón fosfato ( $KH_2PO_4$  50mM pH 7,4). El consumo de oxígeno se midió en presencia de  $Fe^{2+}$  ( $FeSO_4$ , 3 mM), tiosulfato ( $NaS_2O_3$  3mM),  $DBH_2$  (decilquinol) 2 mM o ascorbato 50 mM como única fuente de electrones. Los ensayos se realizaron en ausencia o en presencia de inhibidores del complejo  $bc_1$  [antimicina A 9  $\mu$ M, estigmatelina 8  $\mu$ M, mixotiazol 35  $\mu$ M y HQNO (2-heptil-4-hidroquinolina *N*-óxido) 20  $\mu$ M] o de la citocromo *c* oxidasa terminal (KCN 0,5 - 5 mM,

$\text{NaN}_3$  1 mM). El  $\text{DBH}_2$  se preparó por reducción de DB (decilubiquinona, Sigma) con borohidruro de potasio según el protocolo descrito por Rieske (1967).

### 7.2 Medición de la actividad tiosulfato:quinona oxidoreductasa

La reducción de la quinona en presencia de tiosulfato como única fuente de electrones se evaluó espectrofotométricamente (espectrofotómetro Aminco DW 2A). Alicuotas de 20  $\mu\text{l}$  de células preparadas como se describirá en la sección 7.4 se resuspendieron en 1 ml de tampón  $\beta$ -alanina pH 3,5 en presencia de tiosulfato ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 3mM). La reacción se inició con la adición de quinona Q1 30  $\mu\text{M}$ . La reducción de la quinona se midió por seguimiento espectroscópico a 278 nm. A esta longitud de onda la quinona en su estado oxidado muestra un máximo de absorción. La cuantificación de la disminución de la quinona y del incremento transitorio de quinol (quinona reducida) se realizó como se describirá en la sección 7. 4, utilizando un coeficiente de extinción molar de  $12,25 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

### 7.3 Medición de la actividad citocromo *c* oxidasa en *A. ferrooxidans*

La tasa de oxidación de un ferrocitocromo *c* 50  $\mu\text{M}$  (citocromo *c* 100  $\mu\text{M}$  + ascorbato 50 mM) se determinó espectrofotométricamente a 550 nm menos 540 nm en tampón  $\beta$ -alanina pH 3,5 o tampón fosfato pH 7,4 (Sección 7. 1), en ausencia o en presencia de KCN 0,5 mM. La tasa de oxidación se determinó a partir de los cambios en los valores de absorbancia registrados en el tiempo. La cuantificación del contenido de citocromo *c* en estado reducido se realizó a través de la ley de Lambert-Beer utilizando un coeficiente de extinción molar de  $18 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

#### 7.4 Identificación y cuantificación de componentes redox en *A. ferrooxidans*

Las células de *A. ferrooxidans* se colectaron por centrifugación al final de la fase exponencial de crecimiento. El sedimento que contenía las bacterias precipitadas se lavó sucesivamente con una solución que contenía  $K_2HPO_4$  0,130 mM,  $MgSO_4$  0,8 mM,  $(NH_4)_2SO_4$  0,76 mM. Para las células crecidas en hierro, el pH de la solución se ajustó a 1,6 y para azufre a 3,5. Las células fueron resuspendidas en tampón  $\beta$ -alanina pH 3,5 (Sección 7. 1). La concentración de proteínas totales de la resuspensión celular se estimó como se describe en la sección 6. 6. Aliquotas de 20  $\mu$ l de un concentrado celular se resuspendieron en 1 ml de tampón  $\beta$ -alanina dentro de una cubeta de vidrio de 1 cm. La muestra contenida en la cubeta se congeló en nitrógeno líquido e inmediatamente se analizó en un espectrofotómetro Aminco DW 2000. Los espectros de absorción generados en cada caso (rango 300-600 nm) se analizaron para determinar los valores de absorbancia y longitud de onda de cada pico de absorbancia observado.

La cuantificación de las proteínas redox se realizó de acuerdo a la ley de Lambert-Beer que relaciona los valores absorbancia con los coeficientes de extinción molar de los componentes identificados. Se consideró la absorbancia de los picos  $\alpha$  de cada componente redox (citocromos *c*: 550 nm, citocromo *b*: 560 nm, citocromo *c* oxidasa *aa*<sub>3</sub>: 597 nm, quinol oxidasa *bd*: 630 nm). Los valores de la absorbancia se obtuvieron de la diferencia de absorbancia del espectro reducido (muestras en presencia de ditionito de sodio 5 mM) menos el espectro oxidado (muestras en presencia de hexafluoro iridato 5 mM). Los coeficientes de extinción molar utilizados fueron

citocromo *c* ( $18 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), citocromo *b* ( $24 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), citocromo *c* oxidasa ( $21 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ), citocromo *d* ( $24 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ) y quinona ( $\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ).

#### 8. Análisis de secuencias de aminoácidos y nucleótidos

Los análisis de las secuencias de aminoácidos y nucleótidos se realizaron utilizando programas disponibles en la Internet y las bases de datos de “The Institute of Genome Research” (TIGR) e “Integrated Genomics” que contienen la secuencia del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. La Tabla 3 presenta un listado de los programas y bases de datos utilizados y sus correspondientes direcciones electrónicas.



Tabla 3

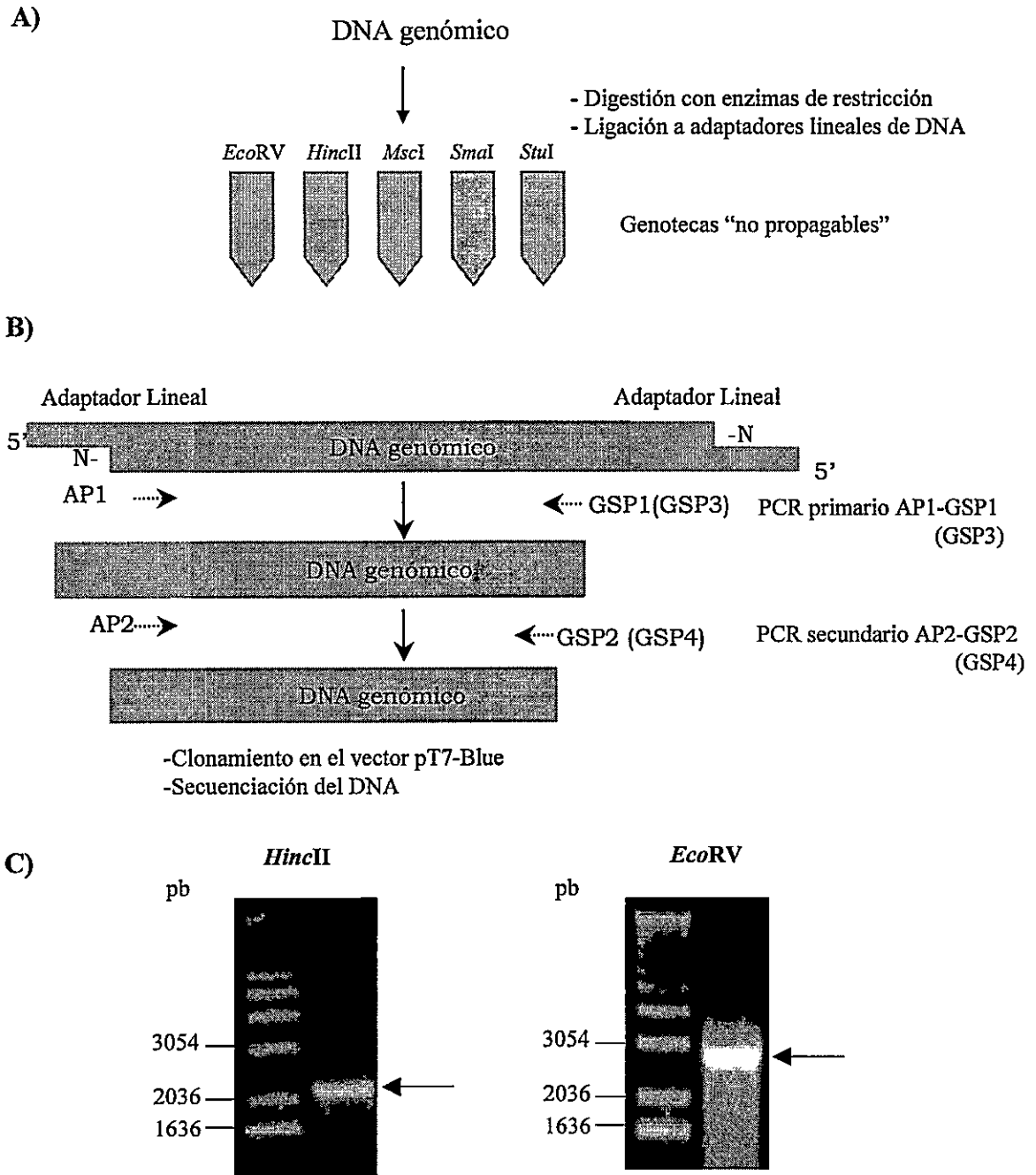
Programas y bases de datos disponibles en la internet utilizados para el análisis de las secuencias de aminoácidos y nucleótidos.		
Programa de Análisis	Dirección de Internet	Referencia Bibliográfica
Blastp	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/</a>	Altschul y cols., 1997
Blastn	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/</a>	
Blastx	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/</a>	
Blast two sequences	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/</a>	
BLOCKS	<a href="http://www.blocks.fhcrc.org/">http://www.blocks.fhcrc.org/</a>	Henikoff y cols., 1995
ClustalW	<a href="http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/">http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/</a>	Thompson y cols., 1994
Compute pl/MW tool	<a href="http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html">http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html</a>	Bjellqvist, 1993
mfold RNA secondary structure	<a href="http://www.bioinfo.math.rpi.edu/~mfold/rna/">http://www.bioinfo.math.rpi.edu/~mfold/rna/</a>	Mathews y cols., 1999
Prosite	<a href="http://www.expasy.ch/prosite/">http://www.expasy.ch/prosite/</a>	Falquet y cols., 2002; Bucher y Bairoch, 1994
PSORT	<a href="http://psort.nibb.ac.jp/">http://psort.nibb.ac.jp/</a>	Banai y cols., 2001
TMpred	<a href="http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html">http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html</a>	Höfmann y Stoffel (1993)
TIGR	<a href="http://www.tigr.org">http://www.tigr.org</a>	
WIT Integrated genomics	<a href="http://www.integratedgenomics.com">http://www.integratedgenomics.com</a>	



## RESULTADOS

### 1. Caracterización de la región génica y análisis de las proteínas codificadas.

1.1 **Clonamiento, secuenciación e identificación de marcos de lectura (ORF).** La correlación observada entre la interrupción del gen *resB* con la secuencia de inserción ISAFc-1 y el "phenotypic switching" (Cabrejos y cols., 1999), llevó a la necesidad de caracterizar más profundamente toda la región génica río arriba y río abajo de este gen. El DNA genómico de *A. ferrooxidans* se digirió con 5 enzimas de restricción (*EcoRV*, *HincII*, *MscI*, *SmaI* y *StuI*) que generaban fragmentos con extremos romos. Estos fragmentos se ligaron a adaptadores lineales que provenían de un sistema de clonamiento de Invitrogen (Genome Walker Kit). De esta manera se generaron cinco genotecas diferentes que sirvieron de molde para una reacción de "nested PCR" (Figura 5). Esta técnica consistió en la realización de una reacción de PCR utilizando un oligonucleótido que alineaba con el DNA del adaptador y otro que alineaba con el DNA de la secuencia conocida localizado río arriba de *resB*. El producto generado se utilizó nuevamente como molde en una segunda reacción de PCR utilizando pares de partidores localizados más internamente. En ambas reacciones de PCR se utilizaron oligonucleótidos de 26-27 pb (ver Tabla 2) y la reacción de extensión se realizó en 35 ciclos de desnaturalización, alineamiento de los oligonucleótidos y polimerización, utilizando una enzima polimerizante con actividad editora (ver Materiales y Métodos, Sección II-1. 6). Cuando se utilizó la genoteca *HincII* como plantilla en la reacción de "nested PCR", se obtuvo un



**Figura 5. Clonamiento de la región génica localizada río arriba del gen *resB*.** A) Construcción de genotecas no propagables. B) Obtención de fragmentos "por nested PCR" utilizando los oligonucleótidos indicados con la flecha segmentada. C) Análisis de los productos del "nested PCR" por electroforesis en geles de agarosa al 1%. La flecha señala los fragmentos obtenidos, los cuales se clonaron en pT7-Blue y se secuenciaron.

fragmento de aproximadamente 2,0 Kb (Figura 5C) que se clonó en el vector pT7-Blue 3-3 y posteriormente se secuenció. La información de la secuencia de DNA de este fragmento permitió diseñar nuevos oligonucleótidos para la realización de una nueva reacción de PCR, "nested PCR", lográndose amplificar una secuencia río arriba de la región conocida. Se obtuvo un fragmento de aproximadamente 3,0 kb con la genoteca *EcoRV* (Figura 5C), el cual se clonó y secuenció. Estos experimentos permitieron definir la secuencia de una porción de DNA de aproximadamente 5 kb río arriba de *resB*.

La secuencia de DNA de los fragmentos clonados se analizó con programas bioinformáticos (Tabla 3) estableciéndose la existencia de 5 ORFs localizados inmediatamente río arriba de *resB*. Los productos de estos ORFs mostraron similitud con un citocromo *c<sub>4</sub>*, una proteína de la familia SDR (short-chain dehydrogenase reductase) y las tres subunidades del complejo *bc<sub>1</sub>*: Rieske, citocromo *b* y citocromo *c<sub>1</sub>*. Las características de estas proteínas y sus secuencias de aminoácidos serán tratadas en profundidad en la próxima sección. En acuerdo a la nomenclatura usualmente utilizada en la literatura, estos genes se denominaron *cycA1*, *sdrA1*, *petA1*, *petB1* y *petC1*, respectivamente. La secuencia nucleotídica deducida de esta región se muestra en la Figura 6. En la región génica secuenciada el gen *cycA* se ubicaba entre las posiciones 446-1228, *sdrA1* entre 1221-2012, *petA1* entre 2112-2732, *petB1* entre 2760-3968 y *petC1* entre 3965-4693. Los genes *petC1* y *resB* quedaban separados por 619 pb. La secuencia total y la secuencia de cada ORF se encuentra disponible en el banco de genes NCBI (National Center for Biotechnology Information) con el código de acceso AF00296.

TAGGGCACGCGTGGTCGACGGCCCCGGGCTGGTATCGCAAATTTGTTCACTTTTTAATAATAACGACACGGT  
AAGTATATTCCTGAGCGCGTTTGGTCTTGTGGTAGCGATTGGTCGGGAAATGACGGGCTTGGTCGTGGGAT  
GGTGGTCTGATCACCATCCCTGCAGGGCCTTCTTGTCCGCTTCCAGGCAGGCTTTGATGTGCAGTTT  
GGGCAGTATCTTACAATCAAAGAGAGGGCTGACCATAATCAGTTTTTATAGTCATATATAGTCGTTATGT  
GGTTATAGATGAATTAGATGATAAGTATATGCTAACTGGGGTGAAGATAGATGGTCCAACCTTAGCTACA *cycA*  
CCAAAAATCCGGCAAGATGGTGGCCATGGTATCTGTCTGTTTTATTGGTATGGGTGCCATGCCTTTTGAC 783 pb  
ACAATTGCTTATGGAGCGGCAAGCGCACCCGAACAGCAAGATTGTTGCTGCCACCCTTCTTCGTCCGCGGC  
CGTTACGGCTCCAACGCAATCCGTGGCGAGTGCACAGAAAACGACGGATACCAATGCCGGGAGGCATCCGC  
AACCGGTAAGCACTACCTGTATGGCATGCCACGGAATGACTGGAATATCCCCGGTGGATCAATGTTTCCA  
GATTTGGCTGGTCAGTGGCTCCCTATCTGGTCAAACAGCTCAATAACTTTAGAAGTCATACCGCTGCGGA  
TCCCATTGGCAAAGGCTATTATGTGGGCATGGCCGCTCGCTGACGCCGGCACAGGTGCAACAGGTAGCAA  
ATTACTTCTTACCAGACTCCACCAGAAAGCAAAAATGGTAAACGC'AAACTAGCGGCAGAAGGAAAGAAG  
ATATATGAAGGTGGAATATCTAACCTTCATGTGCCTGCCTGTATGGCATGCCATGGCCCAACCGGTCTGGG  
TGACCCGCTTACTTTCCTCGCTTGGCAGGTCAACGACGAGCCTACGTAGAATTGCAGCTGCATTATTTCA  
AAAAAGTCTTAGAACCAATGATCCGTATGCCATAATGCCGTACGTGCCTCGCGGCTAACGGGGCCGCGAG  
ATTACCGAGTTAGCAACCTATGTACGCAGTTTACC GGAGTGTCAATGAATAATTACGTACCAGTTGAT *sdrA*  
GCTTGTGAACGGGCGTGAATCATTGTTACAGGAGCCGGAGAAGGGATTGGTCGTGTGCTGCCGTAGAA 792 pb  
TTTGCTCGTTTTGGGTGCTGAAGTAGTGTATTGGGCCGAACCTCAGCGGAAGCTAGAGGGTGTATACGACGA  
AATTGTTGATTAGGTTATAAAGAGCCGTTATACATCCCATGGATTGCTGACTGCCAAGGGGCGCGATT  
ATCAGGATTTTGCAGCGCCTGAAGGAGAGTTTAGGCCGTTGGATGGGATCCTGCACAACGCTGCGGAA  
CTCGATATATTGACACCGATCCAGTATTACGACGAGGAGTTGTGGGAAAGCGCGATGAAAGTGAACGTGAC  
CGCGCCATACTTATTGACACAAGCCTGTTTGCCTGTTGCTGGCATCCGAGGATGCCCTCCATTGTTTTCA  
TTACTGATGACTGCGCCCGTGGAGCAAAGGTTATTGGGGTGCCTATGCTGTAAGTAAAGCGGCAGTACAA  
CACCTTGGACTTACGCTTGAATTGAATTACAAAACACCAACGTTTCGCGTGAACGTGATAAATCCTGGGCC  
ATGCCGTACGGGAATGCGGGTGAAGACACATCCGGGAGCGTCAATAATGTCCGTTCCACCACCGATAGCGA  
TCATGCCCTTTATGAATATTTGTTAGGGCCCCGATAGCAAAAATACACGTGGGCAGATCATGAATGCCAGA  
GATTGGCTGGATGCGGAACACGATGATCGCCAGATAGTTGCTGTTCTTGAGCAATAATCGAACGAAGTTA  
GATAGTGTGCGAAATCCCAATACGGAATAAGGCAAACCTTCTGGTAGTTACGCTGTTTGTATCAGAGCACTA  
CGAGGTTATAGAAATGCCAACAGTTACAGATTCGGAACATGGCCACAAAATATTACACGCCGGCGATTT *petA*  
TTGGCGGGGCTACATCCGCAGTTGGCGCGTGGTGGCCGGAATGGTTGCGGTGCCGCTCGTCGATTCAAT 621 pb  
GGAGCCAACGGCAGCGGCCGAAGCAGCATCGTCAACCACCGTAGATCTGACGCCATTGAACCAGGTATGC  
AGGTAACGGTGGCGTGGCAGAAGAAACCGGTAATAATAATAAAATCGACCCCGGAAATGTTGGCTACATTA  
AAAGAAACGATGGCAAAGGGATTTTGAAGATCCGCTATGCAAAGTCCCGCAGCAGCCTCCATATGTAC  
AAACATGATCGTTCCAGATTCCTGAATGGTATGTCGGGATACGTATCTGTAATCATCTATGCTGTATTC  
CACATTATAGACCGAAGAAAGGAAGTGTGACCATTGGTGGCTTGGCGGATTTCACTGCCCGTGGCGTGGT  
TCAATGTACGATCTGTCTGCACGGGTGATACAGGGTTCCCCAGCCCCGCATAATATGGCGGTGCCGGAGTA  
TGAGCTCTCCACAGAGAAGATGAGTGCTACGATAACTCATATGTATCCCAAAGCTCACTTGTGTTGACAGA  
TTGATAAATGAGCAGTGGATCCGATGAGTAGATTTTCGGCATGGGTTAACAAGAGGCTCCCGGTAGATGAG *petB*  
ACCATAAGGGGAGCACATGACAGAATATTTTGCCCAAGAACTTCAATATTCTATACTATGCAGGATCATT 1209 pb  
GCTGTTGTTGATGATCGTGCTCCAGCTGATTAGCGGGTTTTTTCTGATGGCGCATTATGTTTCTACATCTC  
AAGATGCCTTTGCTTCAGTGAAGGCATCATGTACGACACAAAATGGGGCTGGTTGATACGCTATATGCAT  
GTTGATGGCGTATCTTTAATATTTATCTTACTCTATAACCATATGTTTCGCGGGCTACTGTATGGCTCGCA  
TCGTGCCCTTAGGGAGCTTGTGGGTTATCGGGTATGTTATTTATTTGTTAATGATGGCGGAAGCCTTTG  
TCGGCTATGTATTGCCATTTGGAAATTTATCTTATTGGGCTGGCGAGGTTATTACCTCCATCATGCACGCA  
CTGCCGGTGGTTGGGCCATCTTACTACCCTGACGCGCGGGCCCGGGATTGGGTCTGCGACACTGCA  
ACGCCCTTAGCGCTGCACGTGGTTCTGTTCTTCTTATTATTCTCGCAGCCATCGCGCTCCATATCGTAG  
CATTGCATCGGGTAGGTTCGAACAACCCGACGGTATTGACATCAAAAACACAAGGGCCCGGATGGAAAA  
CCGTTAGATGGTGTACCATTTACCCATATTATACCGTGAAAGACCTGTTGGTGTGGGGTTTGGCTGAC  
CATATTTGTTTCTGTTATATTTATGCTCCAACCATGCATGGGGTATTGATGGAACGTACGACGTTCCCTTG  
CCGCAAACCCGATGGTCAGTTTACCAGATGTAACCCACCTTGGTACCTATCGCCTTATTACGCAATGCTC  
CGTGGGTACCTAACAAGTATTACGGAATCGCAATAATGATTACATCCGTCTTGTGCGGTTGCTGTTGCC  
TTGGCTCGATCGTAACCCGGTTCGGTCCAGCAGATACCGTCCAGTGTACAGGATAATGCTTATTGTTGCGG  
GGGTTTCTTCATTATTTGGCATGGATTGGTCAGGAACCACCGTTGCCTAAATATTTCTTGATCGAGCGG  
GTGGCGACAGCTTTATACCTCGGGTTTACCTCTTGTGCTGCCGTTGTTAGCATGATAGAACCTACACGGCC



CGTACCGGAGAGGTTACAGGATGAGCACGTACAGATATCTATGGTTTTTGGTTGGTGTCCATGTTGATTCC *petC*  
CGGGATAGCATGGGGAGCGGAAAATACGGTACACTGGATGACGCCGATTATACGTTCAACCGGACCCTG 729 pb  
TAATAGCTGGAGCGGTTATTTTGCAGATCACTGTATGGCGTGCATTTCAGTTAGTTTCGTTGCGTTACGAG  
TACCTCCGTGCAGATCTTGGCATGACGAAAAAGAGGTGGAGAAGGACATCATGCTTCCGAACGGTGCGGC  
CTGGAAGGGACAAATAGTCTCCCAATGCCCTGACATGGCAGCCAAATGGTTAGGCAAGCCTCCTCCAA  
ACTTGAGTCATATGGACCGGTATCTTGGCTCAAATTTATTTATACGTACCTGCTGTCATTCTATTGGGAT  
CCTGCGCGACCATCAGGTTGGAATAATTATGTGTTCCCAATGGTTGCCATGCCAAATATATTGGCTCCATG  
GGGCGGTACGGTTGGGTCAAAGGGGCAAGTAATTTTTCCCGGAAGACTTTCTCCTGCCAAGTATCACCAA  
ATGTTGCAGATGTCGTGGCGTTCCTTCGGTACGCCTCGGATCCTTCGTATTTACAAGAATGGCTATCGGC  
CCATATGTCATTGGCATAATGGTACTATTACCATTCTTGCTTATTTTCTCAAGACAGCATATTGGATTGA  
TCTGAAGAAAAACGTAGTAATACCCATACAAAGGGCTAGTGGTTCCATACCTGTTGTATGCCGGCATGA  
AGATGGCCCGCTGACCAGCGCGTTTTTAGGGTCTGGCGGGTTTTTCGACATGAACGCGCGGTGTAGTT  
TGCCCCGGTGTGGGCTCGCTATGCTCCGTCGCCAACAACGTTGCGCGGTAAGAGATATGATTTATTAGTG  
GGTTGTAACATATTGATATAATGATGAGTGCTGATGCCGAtgtcgaggatgctgcgctctcgcgcaagcgg  
aacctccagcgtgcaggggtctcattccagggatcttcggggcggtccgggagatcgcgatgcagggct  
tgattccccatgcgatatggatcaagctaattataggttatgcttaggataacgcgatagtgcatg  
gtttgccccatgcatatcggtcttactttgtttgctgtgagggtgagtaacatgcaatgggttggttc  
cgggcataaacatgcattggtatcttattatagaactatttacaggtgtattaatagcctgccactaatca  
tgtagttatcagagggatcagatttggctaagcagatctcggagatgcaagttattcgagaacgcgctta  
gcataaattttttgggttccatgagattggcggttagtctgctggtattactggccatcgctctgttatt  
ggtagcttctcaaccaacaacaacctatgaggattacgttttaagtttggtcattctgggttgctgt  
ttttcgtgacgtcggtttgtacaatgtttaccggactaattggtagctggcgattgttggtttctcgtgc  
tgtctactagcagatgtttgatctgtaatacaccgcgatgctgagggaaatgcgcgagccggatttggcg  
ggtgggtctgggtacgatccgcgagggatggtgaataatacggaaatgttctcgcattagccatccagtc  
cgcaagtaacatggtggtagcgttatgcggggcggtgatatcgaccgaaactccacgaaagcaacgggtg  
gagtggttagttactggtcgtaaagggcgttataatcgactgggtatataactaacgcgatgcggcgatcata  
gtatttgtgcgccgcgctttataacgcgatattccggtgaagctggatatgctgaccggcgagtagc  
accggagaataaactttcatattccgctgtcggaggtcagcaaaaaggcttggtctcgcgataataatcctg  
cataccgtggcagcgttactgtaccgggaaggccagtcacgcgaagtcgctctatgagttggtggggaatggt  
tatctggtccaaccacttccggtccggatcatggtgaagcgggtttcatgctcgttactactctacgggcat  
gccaaggattttatttccaatatcgttctttacaataatgaaggcaaggtactgaaagaggctaatgtcc  
gagttaatcaccacttacctatcatggcgttcagatatttcaggcgagctttgtcgacgggggatccctt  
ctgaaaatgaaacgctacatggtcaatgatccgggtgcgggtgagtagcagcagcgcgctcgggca  
atcaataaaactcccggtagcactatgtaaaaataaaggattctcctgggataatgttgcctg  
cagacgcatagaaatcccggcggggcgcgcacacaacatcaacctcgggcccaggtttacatatatt  
gcgcaagtagcatcggcgtcagtgccgagttcaagacctatgtagccgatcacgagagatggacaatc  
ctatttgtgcaaggggttaggacagcgttcggtagctccataccaatatctttttatcccaacgggaccaa  
atggttccattggtttatttatgaaatacttatctgcgctgcaaaagcaggcgggcatgaaatagcgggtgag  
agcactaaacgttacgttttacatacatttaagggtggtgatcagcaaatatgcgccatctatgacgacgga  
agccgaggcactatattttcagtcgcgcatcagcgcgaatactgcagctcaaagcataaccagtaaccttcg  
tggttactcttaccggatttgatcaccgatgggcggtgggctggagggttacgaagtggcctgccactgtg  
gttattttatggggttgctgctgactggttcttggcatatttatactgttctatctgcccagcgcgggat  
gtcggttgccttgccgcgatcgaacgatggcacagaggttaataatcggtggcgcgagcagccgaaaccctg  
accgattcaccaaggagtttgaaggatttgttaccgctctcaagagtgcctgcaggggtcaggatgacag  
aaggagaataatgatggctagctcacaagcagatgagtcgctcgcgcttacgaaaatggaagccgagggac  
attgggtgaaccgatcagcaagcaggacctgctgtggttcgcggggcttacggttgctgctggtggtttg  
gtggacgtttttaacagccagttttgggtttggcaatatgtggttcttgcctacctggtatgtcacgttggt  
tgtagtcggtattcactggcgcgcttccaggtggcattcttaacgggtggtcagcgcgctcttctgggtg  
tttgggtgtatagcatcggccaaacacctgctaacgatgtcattttatggttacgtattacaaggctatgcc  
ggtgttatgtggatgatcggttttcttttggccgccaccagtgcttatattatctacctgtttaccctctc  
ggaaaaagtggggcgcttggaacggggctgacatgggtcgggtgttattatgggcttcacggccttggtg  
tccgttggcgcgaaacctatcgggcactcctgattggggacatgttccggtgaccaatctttgggaggtg  
atggtggtattttgcccagccactgcctcttttacctttattatgagtcgcgcttcaaatccagatcgtc  
aggggcttttgcgatgcccttggttgcggcggtgcaggggtccttatctggtgacctttgtccagcata

*resB*  
1776 pb

*resC*  
1191 pb



tggatcgtatagcaccgataattcctgcgctacaaagcttctggatgaaattgcacgtaccgatgatgttt  
 gtggcatatgccaaacttcaccatcgccagtctggttggctcgccttatcttctcggcgaccgctcgcgtag  
 aagtgggtggcggcggttctcgcgctcctcccagcgggaggttatggataacatgatgtccaagg  
 caattgccttgggatttctggtgtttacgatcgccactatcctcgggtgctgtatgggccccaaggcatgg  
 ggcggatttggctcgtgggatcccaaggagacgtggcacttatagtttgggtgaattatgccggatacct  
 tcatgcccgtacaagtaaaggatggcggggcaagcagatggcgtggtggtcctttatgagtctgtgggtt  
 tgacattctgcttctggcgtcaacctcttctatccgggttgacattcttacgggaagctctgaattgcca  
 ttagcgttaaggatatttctgctcggggcgacaaaagttggtggcggcggcaggtaatgaaggacggaacgc  
 atggaaatggaatttggcggcatggtggcgtccttctccttcggcgtatgataaaacatggatagat *hip2*  
gtcggtcattatcgggtattgcaggcgtgtgcatgagatatctgatgattgttgttacaaccctggatatgg 399 pb  
 aaaagagcacagccatagaggctgtttcaaccgggccaagcagccacggctgagtacgatgtagaagtt  
 attttgactggagaatctggggttattgcaacaacacatgcggtaaaaagcggcatcgatgaagaatatct  
 gcgtctactgtatgactctatgcatctgcaaaatcagccgggtgtgaaaattagatatttgcgaacgatcta  
 tagagtgggtgcagtttaataatgatgagcttatcccgagatagatgacgtcgtcagcagtcacaatatatt  
 atggagcggggccgaccagatacatatggttcttatttctga

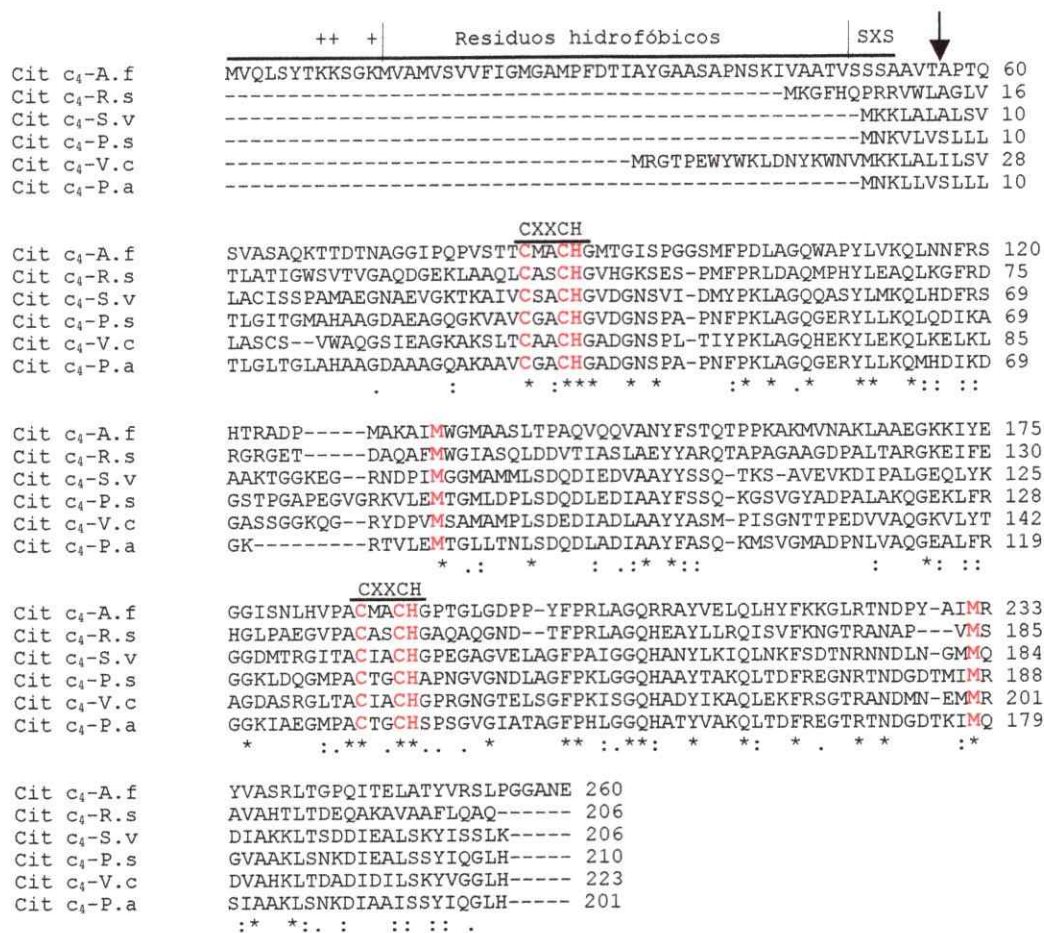
**Figura 6. Secuencia de DNA de la región génica estudiada.** Con letras rojas se señala los ORFs identificados y a la derecha de cada uno de ellos se indica el nombre asignado y el tamaño en pares de bases (pb). Los posibles codones iniciadores o terminadores de la traducción se encuentran subrayados. Las secuencias destacadas con un rectángulo representan posibles secuencias Shine-Dalgarno de unión al ribosoma. Las letras mayúsculas indican la secuencia deducida de los fragmentos clonados (4906 pb) y en letras minúsculas se indica la secuencia previamente conocida de los genes *resB*, *resC* e *hip2* de *A ferrooxidans*.

Todos los genes identificados codificarían para proteínas redox, que podrían estar vinculadas funcionalmente entre sí. Así por ejemplo, los productos de los genes *pet* son las subunidades del complejo citocromo *bc<sub>1</sub>*. Además la cercanía entre los cinco genes permite suponer que ellos se agrupan en una unidad única de transcripción. También debe destacarse la presencia de dos genes que codifican para citocromos tipo-*c*, los cuales podrían ser blancos de maduración de las proteínas Res B/C cuyos genes *resB/C* están localizados inmediatamente río abajo.

## **1.2 Análisis de las proteínas codificadas por los genes *cycA1*, *sdrA1* y *petABC1* del operón *pet1* de *A. ferrooxidans*.**

La obtención de la secuencia nucleotídica de la región génica (Figura 6) permitió realizar diferentes análisis para caracterizar las proteínas putativas codificadas por los genes del operón *pet1*. Las características generales de estas proteínas se detallan a continuación:

**1.2.1 El gen *cycA1*.** La proteína precursora codificada por el gen *cycA1* de *A. ferrooxidans* poseía 260 aminoácidos, una masa molecular deducida de 27,6 kDa y un 54% de similitud con un citocromo tipo-*c<sub>4</sub>* de *Ralstonia solanacearum*. El análisis de la estructura primaria de la proteína (Figura 7) reveló la presencia de dos secuencias CXXCH (84-88 y 186-190). En esta secuencia los residuos de cisteína se han involucrado en la unión covalente del grupo hemo *C* y los residuos de histidina en conjunto con las metioninas 132/232 se han sido implicado en la coordinación del átomo de Fe de este grupo químico (Thöny-Meyer, 1997).



**Figura 7. Alineamiento múltiple de la secuencia completa de aminoácidos del citocromo *c*<sub>4</sub> (CycA1) de *A. ferrooxidans* y otros *c*<sub>4</sub> bacterianos.** La línea superior destaca una secuencia señal putativa localizada en el extremo amino-terminal del citocromo *c*<sub>4</sub> de *A. ferrooxidans*. (+) residuos aminoácidos de carga positiva a pH 7,0. (SXS): secuencia para escisión de la secuencia señal. La flecha indica un lugar posible de corte. Los residuos conservados implicados en la unión de grupos hemo se destacan con color rojo. Los asteriscos representan aminoácidos idénticos y los puntos representan aminoácidos funcionalmente conservados. A.f: *A. ferrooxidans* (AAF76296). R.s: *Ralstonia solanacearum* (NP\_518318.1). S.v: *Shewanella violacea* (BAA89217.1). P.s: *Pseudomonas stutzeri* (Q52369). V.c: *Vibrio cholerae* (NP\_229771.1). P.a: *Pseudomonas aeruginosa* (NP\_254177).



Mediante un análisis con el programa PSORT (Banai y cols., 2001) se estableció que en el extremo amino terminal de la proteína se localizaba una secuencia señal putativa similar a la descrita en bacterias Gram negativas. Esta secuencia señal se caracteriza por una región con carga neta positiva en el extremo amino terminal, una región hidrofóbica y la presencia de la secuencia SXS que constituye una señal para la peptidasa que escinde la secuencia señal de las proteínas dependientes del sistema Sec (Fekkes y Driessen, 1999). La masa molecular y el pI calculado para la proteína madura son 21,9 kDa y 9,5, respectivamente. Este último valor es característico de otras proteínas básicas presentes en el periplasma de *A. ferrooxidans* como la rusticianina (pI<sub>teórico</sub>: 9,2). En conjunto, estos antecedentes sugerían que la proteína era exportada hacia el periplasma de *A. ferrooxidans* a través de la vía Sec.

**1.2.2 El gen *sdrA1*.** La secuencia de aa deducida del gen *sdrA1* poseía 263 aminoácidos, una masa molecular deducida de 28,9 kDa y era similar en un 56% a una proteína de *Vibrio cholerae* perteneciente a la familia SDR (short-chain dehydrogenase reductase). El análisis de la secuencia aminoacídica (Figura 8) reveló la presencia de la secuencia GXXXGXXG que en otras deshidrogenasas de estructura conocida formaba parte de una estructura  $\beta$ - $\alpha$ - $\beta$  implicada en la unión de la coenzima NAD(P) (Bränden, 1980). Todos los miembros pertenecientes a la familia SDR poseen residuos altamente conservados como Y166 y K170 cuya implicancia funcional no ha sido establecida, pero sugieren que los miembros de esta familia están relacionados funcionalmente (Jörnvall y cols., 1995).

```

                                GXXXGXXG
SDR-A.f      MNYPVPDGLLNGRVIVTGAGEGIGRCAAVEFARLGAEVVLLGRTQRKLEGVYDEIVDS 60
SDR-V.c      -MNYSVTDALKEKVIIVTGAGDGIGKQAAISFAAHGATVILLGRTVKKLEQTYDAIEAA 59
SDR-Y.p      -MHYQPKHDLNQRILVTGAGDGIGREAAALTYARFGARLILVGRTESKLLAVKKQIADA 59
SDR-S.e      -MHYQPKQDILLNQRILVTGASDGIGREAAALTYARYGATVILLGRNEEKLRRAVAQHIAD 59
SDR-E.c      -MHYQPKQDILLNDRILVTGASDGIGREAAALTYARYGATVILLGRNEEKLRQVASHINEE 59
SDR-P.a      MFQYSARPDLLKDRVILVTGAGRGIAAAAKTFAAHGATVLLLKGTTEEYLNEVYDAIEAA 60
              :*      .  * : : : * * * . * * * * * * * * * * * * * * * *

SDR-A.f      GYKEPVIHPMDLLTAKGRDYQDFAQRKESLGRDLGILHNAEELDILTPIQYYDEELWES 120
SDR-V.c      GYPTPAIVPLDMKGATKQNYLLDMVDTIEDQFGRLDGVLHNASLLGVLSFPDQIGEDSFDE 119
SDR-Y.p      GGLPALVLSLDDLHATAADCCQLADTVSAQVPRLDGVLHNAGLLGEVAPMSEQSIAVWQD 119
SDR-S.e      QHVQPWFTLDLLTCTAEECRQVADRIAAHYPRLDGVLHNAGLLGEIGPMSEQDPQIWQD 119
SDR-E.c      TGRQPQWFILDLLTCRSEDCQQLAQRIVNYPRLDGVLHNAGLLGDVCPMSEQNPQVWQD 119
SDR-P.a      GHPQAAAVIPFNLETAQPHQFEELAATLENEFGHIDGILLHNASILGPRSPMQQISGENFMR 120
              .      : : : .      :      : : .      :      :      : : * * * * * * * * * * * * * * * *

SDR-A.f      AMQVNVNTPYLLTQACLPLLLASEDASIVFITDDCAREAKYWGAYAVSKAAVQHLGLTL 180
SDR-V.c      VMQVNVNKAQFLMTQALLPLLHKSADARIVFTTSTVGHIGRAFWATYAISKFATEGMMQIL 179
SDR-Y.p      VMQVNVNATFMLTQALLPLLKSPSASLVFTSSSVGRQGRAGWGAYSVSKFATEGMMQVL 179
SDR-S.e      VMQVNVNATFMLTQALLPLLKSDAGSLVFTSSSVGRQGRANWGAYATSKFATEGMMQVL 179
SDR-E.c      VIQVNVNATFMLTQALLPLLKSDAGSLVFTSSSVGRQGRANWGAYAASKFATEGMMQVL 179
SDR-P.a      VMQVNVNAMFMLTTAMLPLMKLSSDASIIFTSSSVGRKGRAYWGAYSVSKFATEGLMQTL 180
              . : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

SDR-A.f      AIELQ-NTNVRVNVINPGPCRTGMVRVTHPGASIMSVPPPIAIMPLYEYLLGPDSKNTRG 239
SDR-V.c      ADELS-ESTIRVNAINPGGTRTAMRAKAYPAEDADKLKTPLDIMPLYLYLMAPEGREVHG 238
SDR-Y.p      AEEYK-QSNLRVNCINPGGTRTQMRATAFPDEDASKLKTPADIMPLYLYLMGDDSRRKTG 238
SDR-S.e      ADEYQ-NRSLRVNCINPGGTRTSMRASAFPTEDPQLKLKTPADIMPLYLWLMGDDSRRKTG 238
SDR-E.c      ADEYQ-QR-LRVNCINPGGTRTAMRASAFPTEDPQLKLKTPADIMPLYLWLMGDDSRRKTG 237
SDR-P.a      ADELDGTSAIRANSVNPGATRTSMRALAYPGENPLNNPTGEEIMPVYLYLMGPDSAGVNG 240
              * * .      : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

SDR-A.f      QIMNARDWLDAEHDDRQIVAVLEQ 263
SDR-V.c      QCIDAQPKK----- 247
SDR-Y.p      ISFDAQPGRKPGPAE----- 253
SDR-S.e      MTFDAQPGRKPGIAQ----- 253
SDR-E.c      MTFDAQPGRKPGISQ----- 252
SDR-P.a      QAFDAQ----- 246
              : : * :

```

**Figura 8. Alineamiento múltiple de la secuencia completa de aminoácidos de la proteína SDR de *A. ferrooxidans* y otras deshidrogenasas bacterianas.** La secuencia GXXXGXXG implicada en la unión de la coenzima  $\text{NAD(P)}^+$  y los residuos altamente conservados en la familia de proteínas SDR se destacan con color rojo. Los asteriscos representan aminoácidos idénticos y los puntos representan aminoácidos funcionalmente conservados. A.f.: *A. ferrooxidans* (AAF76297). V.c.: *V. cholerae* (NP\_230704.1). Y.p.: *Yersinia pestis* (NP\_405756.1). S.e.: *Salmonella enterica* (NP\_455780.1). E.c.: *E. coli* (NP\_287928.1). P.a.: *Pseudomonas aeruginosa* (NP\_251863.1).

Las proteínas de la familia SDR poseen una amplia diversidad de sustratos. La proteína SDR de *A. ferrooxidans* tuvo una alta similitud (50%) con la ribitol-5-P-deshidrogenasa de *Bruscella melitensis*, lo cual sugirió que el ribitol podría constituir un posible sustrato para esta proteína. Este hecho podría tener importantes implicancias en la generación de sustratos como NAD(P)H y ribulosa, los cuales son necesarios para la fijación de CO<sub>2</sub>. Este aspecto será analizado más detalladamente en la discusión de esta tesis.

**1. 2. 3 El gen *petA1*.** El producto del gen *petA1* es “altamente” similar con la proteína Rieske de *Allochromatium vinosum* (52%). La secuencia de aminoácidos de la proteína deducida de este gen poseía 206 residuos y una masa molecular teórica de 22,7 kDa (Figura 9). Además, presentaba los residuos de cisteína e histidina involucrados en la unión covalente del centro redox F<sub>2</sub>-S<sub>2</sub>. La secuencia que une el Fe-1 (CNHLCC: 131-136) se alejaba levemente del consenso establecido (C(TK)HLG(LIVST), pero los residuos funcionalmente claves se mantenían conservados (C131 y H 133). La secuencia que unía al Fe-2 (CPCHGS: 157-162) estaba conservada respecto a la secuencia consenso (CPCHX(GSA), siendo los residuos funcionalmente claves: C157 y H160. También estaban presentes las cisteínas (C136 y C159) que participaban en el establecimiento de un enlace disulfuro esencial para mantener la estructura y la función de la proteína (Iwata y cols., 1996).

Los programas de análisis utilizados mostraron que la proteína Rieske de *A. ferrooxidans* no poseía una secuencia señal típica de exportación o de anclaje a la membrana citoplasmática, sin embargo, sí poseía una  $\alpha$ -hélice hidrofóbica en el extremo

```

Rieske-A.f      ----MPTVTDSEHGHNITRRRFLAAATSAVGAVVAGMVAVPLVDSLEPTAAEAASS-T 55
Rieske-A.v      MLASAGGYWPMSAQGVNKMRRRVLVAATS VVGAVGAGYALVPPFVASMNPSARARAAGAPV 60
Rieske-N.m      -----MDNQEIINNGRRRFLTLATCGAGGVAALGVATPFVASFPPSEKAKAAGAAV 50
Rieske-P.a      -----MSNDGVNAGRRRFLVAATS VVGAAGAVGAAVPPFVGSWFFSAKAKAAGAPV 50
Rieske-V.c      -----MSNAPLNQGRRRFLTATTAVVGGGLGAVAVAVPFVFKSWNPSAKAKAAGAPV 50
Rieske-A.t      ----MSEHVTNHDASGEPTRRDFLYLVTGMAGAVGAAAVAWPFIDQMRPDASTLALAS-I 55
                :  ** .* .* .* * . * : . * : * :
                :

Rieske-A.f      TVDLTPIEPGMQVTVPWQKKPVIIINRTPPEMLATLKETMAKGILKDP LCKVP----QQP 110
Rieske-A.v      EADISKLEPGALLRVKWRGMPVWVHRSSSEMLAALSSNDPK--LVDPTSEVP----QQP 113
Rieske-N.m      EVDVSKIEAGQLLTAEWQGKPIWVLNRTDQQLKDLKGLNGE--LTDPNSDAE----QQP 103
Rieske-P.a      QVNVGKIDPGQQIIAEWRGKPVFIVHRTKEMLDALPSLEGQ--LADPDSKAS----EQP 103
Rieske-V.c      EVEISKLEEGQMRVVEWRGKPVWVVRSSQAVVEGLKSHENQ--LRDPNSDEL----QQP 103
Rieske-A.t      EVDVTAVEPGMSLTVKWRGKPIFIRNRTAKEIDEANAVALG-DLKDPPVARNANIAPDAQA 114
                .: : * : . * : * : . * : : . * * * . *
                :

Rieske-A.f      PYCTNMYRSRVPEWYVGIRICTHLGCIPHYRPKKG--SVAPWWLGGFHCCPCHGSMYDLSA 168
Rieske-A.v      DYCKNPTRSIKPEYLVAIGICTHLGCSPTYRPEFGPDDLGSWKGGFHCCPCHGSFRDLAA 173
Rieske-N.m      EYAKNETRSIKPNILVAIGICTHLGCSPTFRPDIAPADLGADWKGGFFCCPCHGSKFDLAG 163
Rieske-P.a      EYVDPKLRSIKPELAVIVGICTHLGCSPTFRPEVAPADLGPDWKGGYFCCPCHGSHYDLAG 163
Rieske-V.c      NYAQNPYRSIKPEYFLAVIGICTHLGCSPTYLPDSFSEQV-QGVKSGFFCCPCHGSKFDMAG 162
Rieske-A.t      TDIDRSAGQGKENIWMIGSCTHLGCVPLGQ-----AGDFGGWFCCPCHGSHYDTAG 165
                . : : : * . * * * * . . . . * : . * * * * * : * :
                :

Rieske-A.f      RVIQGS PAPHNMAVPEYELSTEKMSATITHMYPKAHLC 206
Rieske-A.v      RVFKNPAPTNLVIPKHVYLNDTTILIGEDR-GSA--- 207
Rieske-N.m      RVYKGV PAPTNLVVPYKYLSDTTILVGED----- 193
Rieske-P.a      RVYKQPAPLNLPIPPYTFDADDVITIGVDQEKA---- 197
Rieske-V.c      RVFQAVPAPLNLVIPPHMYLSDRIVIGLDETGEA--- 197
Rieske-A.t      RIRKG-PAPQNLAIPTFAFTSDTVIKIG----- 192
                * : : * * * * : * * . : : : : : : : : : :
                :

```

**Figura 9. Alineamiento múltiple de la secuencia completa de aminoácidos de la proteína Rieske de *A. ferrooxidans* y otras proteínas Rieske bacterianas.** Los residuos conservados implicados en la unión de centro redox  $Fe_2-S_2$  y en la mantención de la estructura y la función de la proteína se destacan con color rojo. Los asteriscos representan aminoácidos idénticos y los puntos representan aminoácidos funcionalmente conservados. A.f: *A. ferrooxidans* (AAF76298). A.v: *Allochromatioum vinosum* (031214). N.m: *Neisseria meningitidis* (NP\_275043.1). P.a: *P. aeruginosa* (NP\_253121.1). V.c: *V. cholerae* (NP\_230224.1). A.t: *Agrobacterium tumefaciens* (NP\_532912.1).

amino terminal (aa: 19-40) que podría constituir una región de anclaje a la membrana de modo que la porción restante, que contenía al centro redox, quedaría expuesta hacia el periplasma bacteriano. Un esquema similar ha sido descrito para la proteína Rieske de levaduras y bovinos. En bovinos esta proteína se traduce con una secuencia señal de 78 residuos, la cual se escinde para generar una proteína madura de 196 residuos aminoacídicos (Berry y cols., 2000). La idea de la posible ubicación de la proteína Rieske de *A. ferrooxidans* en el periplasma, estuvo también apoyada por su elevado valor de pI (8,9).

**1.2.4 El gen *petB1*.** La proteína codificada por el gen *petB1* se relacionó con el citocromo tipo-*b* del complejo *bc<sub>1</sub>*. El mayor "score" se obtuvo con un citocromo *b* de *Pseudomonas aeruginosa* (62% de similitud). El citocromo *b* de *A. ferrooxidans* poseía los residuos de histidina involucrados en la unión del grupo hemo B<sub>H</sub> (H101/203) y B<sub>L</sub> (H87/188), de alto y de bajo potencial electroquímico, respectivamente. Además, se encontraron las secuencias del tipo (D/E/N/Q)XXXG(F/Y/W/M/Q)X(L/I/V/M/F)RXXH) y PXW que eran altamente conservadas en los citocromos tipo-*b* y que eran definidas como una señal característica de este tipo de proteínas (Prosite PS00192) (Figura 10). La secuencia PXW se localizaba normalmente entre las hélices V y VI de otros citocromos *b* conocidos, pero en el cit *b* de *A. ferrooxidans* estaba localizada entre las hélices VI-VII putativas.

El polipéptido generado (402 aa) poseía 9  $\alpha$ -hélices hidrofóbicas que eran comunes a una inmensa variedad de citocromos tipo-*b* bacterianos y que estaban relacionadas con la integración de la proteína en la membrana citoplasmática (Crofts y





Berry, 1998; Xia y cols., 1997). Los dos centros redox estarían unidos a histidinas localizadas en las  $\alpha$ -hélices II y V y quedarían inmersos en la membrana.

El complejo *bc<sub>L</sub>* de cianobacterias, plastidios y bacterias fotosintéticas posee una cuarta subunidad (SUIV) que no posee centro redox y que está involucrada en la unión de la quinona (Yu y cols., 1999). La SUIV es codificada por el gen *pet D* (*fbcQ*) y en bacterias fotótrofas este gen se transcribe independientemente del operón *pet*, sin embargo, en bacterias quimiótrofas se encuentra normalmente fusionado a *petB* (Berry y Trumpower, 1985) o *petC* (Yu y cols., 1995) o a ambos (Thöny-Meyer y cols., 1991).

Con el objeto de definir la presencia o ausencia del gen *petD* y su contexto genético en *A. ferrooxidans* se procedió a analizar las secuencias de las SUIV de diferentes organismos con el programa "Blocks" (Henikoff y cols., 1995). Se analizó 13 secuencias completas disponibles en las bases de datos, provenientes de los siguientes organismos: *Rhodobacter sphaeroides* (AAA26107.1), *Triticum aestivum* (CAA38552), *Atropa belladonna* (NP\_783262.1), *Cuscuta reflexa* (CAD28794.1), *Synechocystis sp* (CAA41412.1), *Synechococcus elongatus* (CAB46750.1) *Psilotum nudum* (BAB84247.1), *Spinacia oleracea* (NP\_054965.1), *Nostoc sp.* (CAC39603.1); *Chlamydomonas reinhardtii* (CAA51424.1) y *Marchantia polymorpha* (NP\_039318.1).

Esto permitió generar una proteína de consenso (SUIV-C) que se utilizó para realizar una búsqueda con el programa Blastp (Altschul y cols., 1997) en la base de datos TIGR de *A. ferrooxidans*. La búsqueda no generó secuencias similares, sugiriendo que en *A. ferrooxidans* *petD* no existe como un gen independiente. Para definir si *petD* se encontraba fusionado a los genes *petB* y/o *petC*, se realizó un alineamiento, utilizando el

programa Clustal W (Thompson y cols., 1994), de la secuencia SUIV-C con el citocromo *b* y *c<sub>1</sub>* de *A. ferrooxidans*. El alineamiento de mayor significación se obtuvo entre SUIV-C y el extremo C-terminal del citocromo *b* (Figura 11). Además un análisis en el programa "Blast 2 sequences" reveló que la porción en que ambas proteínas son más parecidas (aprox. 85 residuos) tiene un 50% de similitud. Estos resultados sugirieron que en *A. ferrooxidans* el gen *petD* estaba fusionado al extremo C-terminal de *petB*. El alineamiento mostró que ambas secuencias compartían el "motif" PXW, que según Prosite (PS00192) era característico y altamente conservado en los citocromos tipo-*b*. En una inspección realizada sobre la secuencia de las 13 SUIV utilizadas en este análisis hemos determinado que esta secuencia también está conservada en la proteína SUIV. La secuencia PXW ha sido involucrada en la unión de la quinona al sitio Q<sub>o</sub>, lo cual está relacionado con la función de ambas proteínas.

**1. 2. 5 El gen *petC1*.** El polipéptido codificado por el gen *petC1* presentó un 52% de similitud al citocromo *c<sub>1</sub>* de *V. cholerae*. La secuencia de 242 aminoácidos poseía una masa molecular deducida de 27,6 kDa (Figura 12) y en ella fue posible detectar los residuos implicados en la unión covalente del hemo *c* (C52 y C55). También se conservaban los residuos implicados en la coordinación del átomo de hierro (H56 y M152).

El citocromo *c<sub>1</sub>* de *A. ferrooxidans* poseía 2  $\alpha$ -hélices hidrofóbicas localizadas en los extremos N-terminal (aa 4-23) y C-terminal (aa 217-235). En los citocromos *c<sub>1</sub>* de otros organismos la  $\alpha$ -hélice N-terminal constituye una señal de anclaje a la membrana citoplasmática, la cual es escindida una vez que ha culminado la inserción de la  $\alpha$ -hélice



```

                PXW
SUIV-C  ADFFATPLEILPEWYFYPVFQILRTVPNKLLGVLLMASVPAGLLTVPFLENVNKFQNPFR 60
Cit b   ANPMVSLPDVTPPWYLSPPYAMLRAVPNKYYGIAIMITSVLLPLLLLPWLDNRNPVRSSRYR 60
        *:*:.:  :: * **: * : ;**:* ** * : * : * : * : * :.  .. :*

SUIV-C  RPVATTVFLVG---TVVALWLGIGATLP-----IDKSLTLGLE 95
Cit b   -PVYRIMLIVAGVSFIILAWIGQEPPLPKYFLIERVATALYLGFY 104
        **  :*: .  :: *:*  ..**  :  .:* **::

```

Figura 11. Alineamiento parcial de los aminoácidos de una secuencia consenso de la subunidad IV (SUIV-C) y el citocromo *b* de *A. ferrooxidans*. La SUIV-C alinea con el extremo C terminal del citocromo *b*. PXW: secuencia conservada.

```

                                         CX
Cit c1-A.f      -----MSTYRYLWFLLVSMILPGIAWGAENTVHWMTPHYTFNRTTVIAGARYFADHCM 53
Cit c1-V.c      -----MKKWIVVLFALMLPSLAMAAGAN-VHLDKANNDLTDQASLQNGAKLFMNYCF 50
Cit c1-X.f      MADWGRLLRCLCWLCLLFPVCLMSAAQAVDGVPLEHAGNDVSDRMSLQRGVQLYMNYCV 60
Cit c1-R.s      -----MKKLLAIFALAGFMIAAPVFANEGGVRDPAPNQSEDLQALQAGAKLFVNYCL 53
Cit c1-P.a      -----MKKQFAALILA-VLPVLFPAAGGGHPQLDHVDIDLTDKAAAMDGARTFANYCM 52
Cit c1-A.v      -----MRKLLIATFL-LLAPTALLASGGGHEHLESANIDLDRDQASLQRGAKYFMNYCT 51
                                         : . : : * . : : : *
XCH
Cit c1-A.f      ACHSVSSLRYEYLRADLGMTKKEVEKDIMLPNGAAWKQIVSPMPDMAAKWLGKFPPNL 113
Cit c1-V.c      GCHSTQYQRYERVANDLGIPADLMKENLIFDPETKIGQLMENAIPDKSAAKWFGAFPPDL 110
Cit c1-X.f      GCHSLKYLRYSRIAADLGLSEVQVMSTLNVT-GAKFGDTIMTAMPVDTSEQWFGKIPPPDL 119
Cit c1-R.s      NCHGASAMRYNRLR-DIGLSEEQIQQNLLFT-SDKVGDTMRIAMDREDAKWFGAVPPDL 111
Cit c1-P.a      GCHSAKFQRYERVATDLGIPADLMMEKLVFT-GAKIGDHMDIGMKPADAKTWFGAAPPDL 111
Cit c1-A.v      GCHSLQYMYRNRLAKDLGIDEIALRQNLLFG-DAKPGDLITKAMTDDDDLKWFGVVPPDL 110
      * . . * . : * . * : : . : : : : * . * . * . *
Cit c1-A.f      SHMDRYLGSKFIYTYLLSFYWDPARPSGWNNYVFPMVAMPNILAPWGGTVGSKG----- 167
Cit c1-V.c      TLVARVRGTDWLYTYLRSFYTDPSRPFGVNNIVFPSVGMPHVLEELQG-TPEP-IFETKV 168
Cit c1-X.f      SLVARVRGSDWIYTYLRSFYVDSRPLGWNNRLFVNVSMPNPLSHLQG-VQRAEYGGASQ 178
Cit c1-R.s      SVIARARGSDWLYTYLRTFYRDTRPTGWNNLVFDKVGMPHVLWELQG-QREPKYEEVKS 170
Cit c1-P.a      TLVARVRGTDWLYSYLRSFYEDPKRPWGVNNIVFPNVGMPNVLAPLQG-RQVIGCKQVQV 170
Cit c1-A.v      TLVTRWRSPDWVYTYLKSFYLDTRPYGVNNVLFPLVGMPHVLGDLQG-RQEAVMEPSHE 169
      : : * . . . : : * . * . * . * . * . * . * . * . * . *
Cit c1-A.f      -----QVIFPGRLSPAKYHQNVADVVAFLRYASDPSYFTR 202
Cit c1-V.c      VD-----GNEVQHVVG---VKSRGNGELSEGEYNQAVRDLVNFLEYSGEPMKLR 215
Cit c1-X.f      AG-----ADRLVTGLV---LVQPGQNPAEFDRTLRDIVNFLQYAAEPAALQR 223
Cit c1-R.s      EH-----GGELEHKLVG---FEQVTPGKLNTVEYDQAVADIVTYLDWMAEPAGKLR 218
Cit c1-P.a      VEDGKKQFDPLTGTPLTHEACDQLTVVPKTGELNEAQFDEKVKNLVTFLAYSANPNKLAS 230
Cit c1-A.v      PG-----GEPTIKGVK---LVEEGLSPQEYDTMVRDITNFLTYAGEPFQLER 214
      * . : : . : : . : : . : : * . : : *
MAIGPYVIGIMVLFILAYFLKTAYWIDLKKKRSNTHTGK 242
Cit c1-A.f      MAIGPYVIGIMVLFILAYFLKTAYWIDLKKKRSNTHTGK 242
Cit c1-V.c      QNLGWWTMGFLVIFTIVVVALKKEYWRDVH----- 245
Cit c1-X.f      HSLRVVLLFLVLLTFLVSLLKKAYWEDVH----- 253
Cit c1-R.s      KRLGVVLLFIGVFFVLAWRLNAAYWKDIK----- 248
Cit c1-P.a      ERIGTYVLLYLAFFFVFAYLLKREYWKDVH----- 260
Cit c1-A.v      ERIGRYVLLFLGFLFILAYLLKKAYWKDVH----- 244
      : : . : : . . . * : * * * : :

```

**Figura 12. Alineamiento múltiple de la secuencia completa de aminoácidos del citocromo  $c_1$  de *A. ferrooxidans* y otros citocromos  $c_1$  bacterianos.** En color rojo se destaca los residuos conservados implicados en la unión del grupo hemo y en la coordinación del átomo de Fe del grupo hemo. Los asteriscos representan aminoácidos idénticos y los puntos representan aminoácidos funcionalmente conservados. A.f: *A. ferrooxidans* (AAF76296). V.c: *V. cholerae* (NP\_230226). *Xylella fastidiosa* (NP\_779960). R.s: *R. solanacearum* (NP\_521048). P.a: *P. aeruginosa* (NP\_253119). *Allochrocatium vinosum* (AAB86975).

C-terminal y la adición del grupo hemo (Nicholson y cols., 1989). La asociación del citocromo *c<sub>1</sub>* con la membrana citoplasmática quedó sugerida también por un análisis realizado en el programa PSORT (Henikoff y cols., 1995) que evaluó la localización de proteínas en los diferentes compartimentos celulares.

Según estos resultados, el citocromo *c<sub>1</sub>* estaría anclado a la membrana por su extremo C-terminal y el grupo hemo estaría unido a la porción hidrofílica de la proteína que se contacta con el periplasma bacteriano. De esta manera, el grupo hemo *C* quedaría en condiciones de interactuar con el centro redox de la proteína Rieske también expuesto hacia el periplasma y con el centro redox de un citocromo tipo-*c* periplasmático.

Los resultados sugerían que los productos de los genes *petABC1* de *A. ferrooxidans* descritos anteriormente codificaban para el complejo citocromo *bc<sub>1</sub>*, ya que se encontró similitud significativa con cada una de las subunidades del complejo, se detectó una alta conservación de los aminoácidos comprometidos funcionalmente y las predicciones de su localización y topología en la membrana concordaron con su papel funcional y con lo descrito en otros organismos.

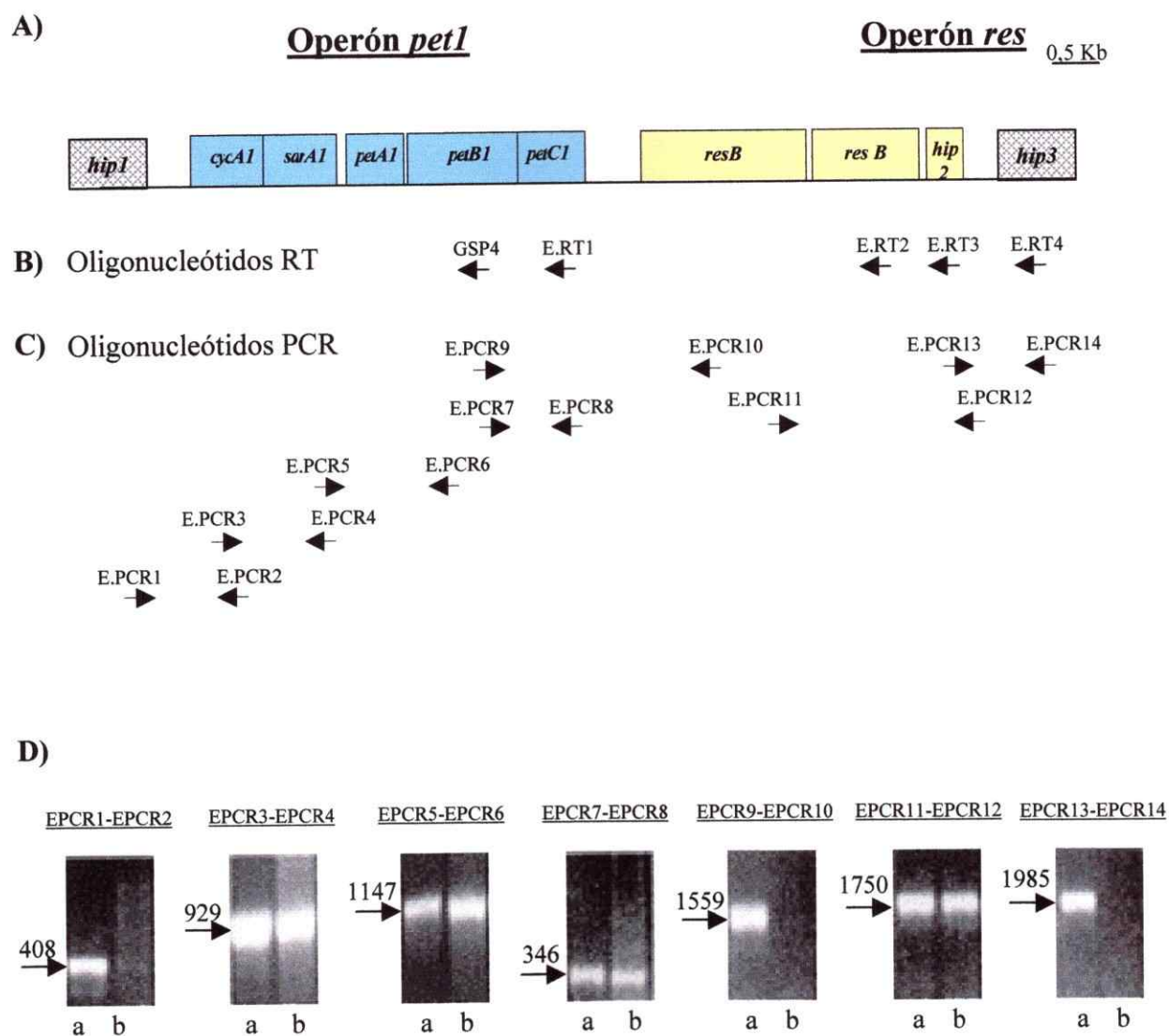
**1.3 Estudio de cotranscripción entre genes contiguos.** Con el objeto de definir las unidades de transcripción presentes en la región génica estudiada se llevaron a cabo diferentes reacciones de RT-PCR utilizando como molde RNA total aislado de *A. ferrooxidans* crecido en  $Fe^{2+}$ . Para las reacciones de la transcriptasa reversa se utilizaron partidores específicos para cada gen y para las reacciones de PCR se utilizaron pares de partidores específicos para genes contiguos (Tabla 2). El análisis incluyó las regiones génicas localizadas río arriba de *cycA* (un ORF denominado *hip1*) y río abajo de *hip2* (un

ORF denominado *hip3*) cuyas secuencias se obtuvieron de la base de datos TIGR (Figura 13).

Cuando se utilizaron los oligonucleótidos GSP4, E.RT1, E.RT2, E.RT3 y E.RT4 (Tabla 2 y Figura 13B) en la reacción de transcripción reversa, se detectaron productos RT-PCR de tamaño esperado entre los genes *cycA*, *sdrA*, *petA*, *petB* y *petC* y entre los genes *resB*, *resC* e *hyp 2* (Figura 13D). Por el contrario, no se detectó producto entre *petC-resB*, *hyp1-cycA* e *hyp2-hip3*. En todos los casos se realizaron controles que incluyeron: A) control positivo: PCR sobre DNA genómico y B) diferentes controles negativos: i) PCR usando como molde RNA, ii) RT-PCR usando como molde RNA digerido con RNasa pancreática y iii) reacción de RT-PCR sin partidor para la transcriptasa reversa. Este último control se hizo necesario debido a que durante el curso de los experimentos se detectó un fenómeno de "self priming" que consistía en la obtención de fragmentos de PCR sin la adición de partidores RT (Guacucano y cols., 2000).

Estos resultados permitieron concluir que los genes estudiados se organizaban en dos unidades de transcripción a las cuales hemos denominado operón *pet1* (*cycA1*, *sdrA1* y *petABC1*) y operón *res* (*resB*, *resC* e *hyp2*).

Estos experimentos se repitieron utilizando como plantilla el RNA total extraído de *A. ferrooxidans* crecido en S°, obteniéndose resultados idénticos a los anteriormente descritos (datos no mostrados). De esta manera se comprobó que ambos operones se expresaban durante el crecimiento de la bacteria en Fe<sup>2+</sup> y S°.



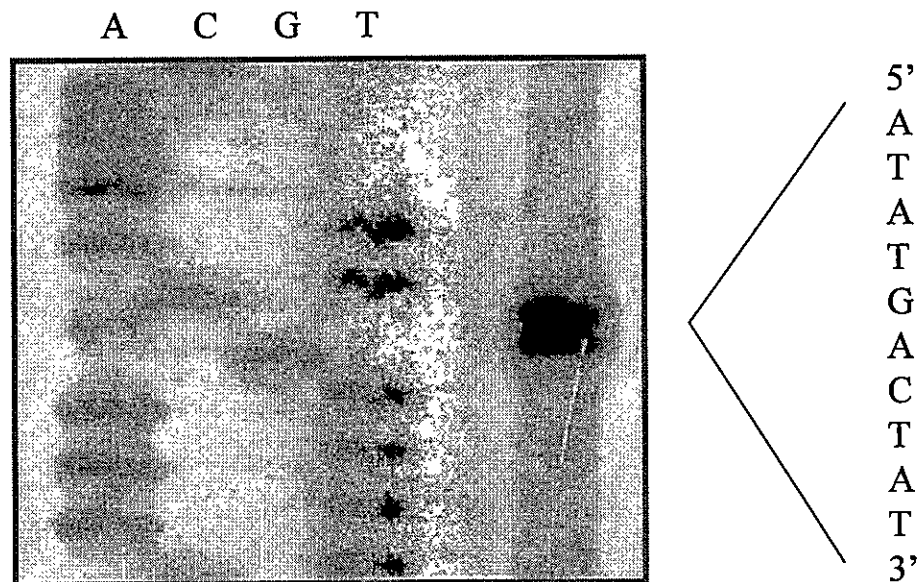
**Figura 13.** La región génica estudiada contiene dos operones: el operón *pet1* y el operón *res*. La cotranscripción entre genes contiguos se evaluó con experimentos de RT-PCR. **A)** Composición de la región génica. La secuencia de los ORFs *hip1* e *hip3* se obtuvo de las bases de datos TIGR. **B)** y **C)** Oligonucleótidos utilizados como partidores en las reacciones de RT y de PCR, respectivamente (Materiales y Métodos, Tabla 2). **D)** Análisis de los productos de PCR por electroforesis en geles de agarosa al 1%. **a)** PCR sobre DNA genómico y **b)** PCR sobre cDNA. La flecha señala el tamaño (pb) de los fragmentos obtenidos.

**1.4 Determinación de los sitios de inicio de la transcripción de los operones *pet 1* y *res*.** Para determinar el sitio de inicio de la transcripción de los operones *pet1* y *res* se realizaron ensayos de "extensión del partidor" (ver Materiales y Métodos, Sección II-4) utilizando como molde RNA total aislado de células crecidas en  $Fe^{2+}$  y los partidores F.1 y F.2, cuya localización y secuencia se describen en Materiales y Métodos (Tabla 2).

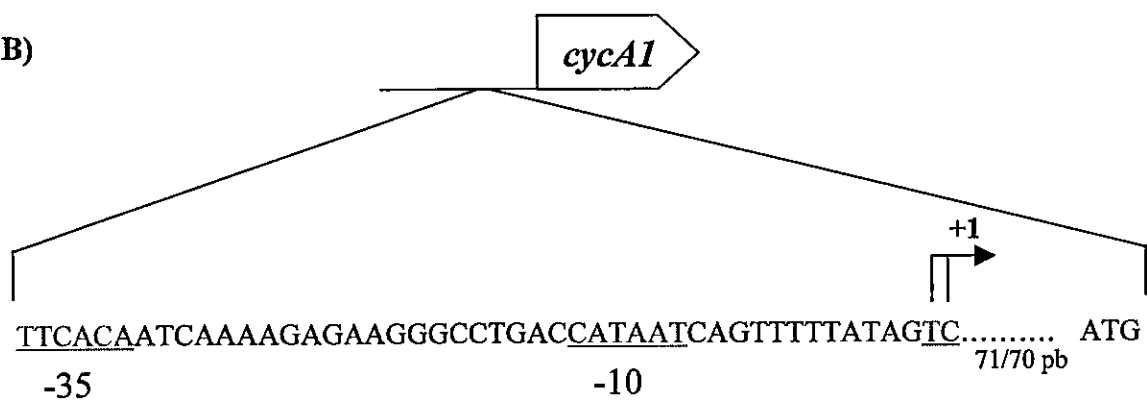
Para ambos operones se detectó dos posibles sitios de inicio de la transcripción. En el operón *pet1* estos sitios se localizaron 71/72 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción de *cycA* (Figura 14) y corresponden a los residuos pirimidínicos TC. En el operón *res* los sitios de inicio de la transcripción se localizaron 439/440 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción de *resB* (Figura 15) y corresponden a los residuos purínicos AA. Mediante inspección visual y comparación con las secuencias consenso de *E. coli* se pudo establecer la presencia de posibles secuencias -10 y -35 de unión del factor sigma 70 de la RNA polimerasa. La distancia que separa las secuencias -10 y -35 es de 21 pb para el operón *pet1* y 17 pb para el operón *res*. En general, estas características se ajustan a las descritas para un promotor típico bacteriano, no obstante, el promotor establecido para el operón *pet1* es irregular en dos aspectos: 1) la distancia de 21 pb entre las secuencias -10 y -35 es excesiva ya que ésta fluctúa normalmente entre 16-19 pb. 2) la presencia de pirimidinas en los sitios de inicio de la transcripción es poco frecuente ya que más del 90% de los promotores bacterianos conocidos comienzan la transcripción en una purina (Harley y Reynolds, 1987).

Pese a las características parcialmente atípicas del promotor del operón *pet1*, la correcta predicción de los promotores de los operones *pet1* y *res* encuentra su sustento

A)



B)



**Figura 14. Determinación del sitio de inicio de la transcripción del operón *pet1*.** A) Reacción de extensión del partidor utilizando RNA total aislado de *A. ferrooxidans* crecido en  $\text{Fe}^{2+}$  y un oligonucleótido reverso (F.1) que alineaba en *cycA1*. Los productos de la reacción se separaron por electroforesis en un gel de poliacrilamida al 6% junto a una reacción de secuenciación de la misma región génica realizada sobre DNA genómico utilizando el mismo oligonucleótido como partidor. Los gels se expusieron sobre una placa autoradiográfica. B) Localización del sitio de inicio de la transcripción (+1) respecto del posible codón de inicio de la traducción (ATG) del gen *cycA1*. El subrayado destaca los posibles sitios -10 y -35.



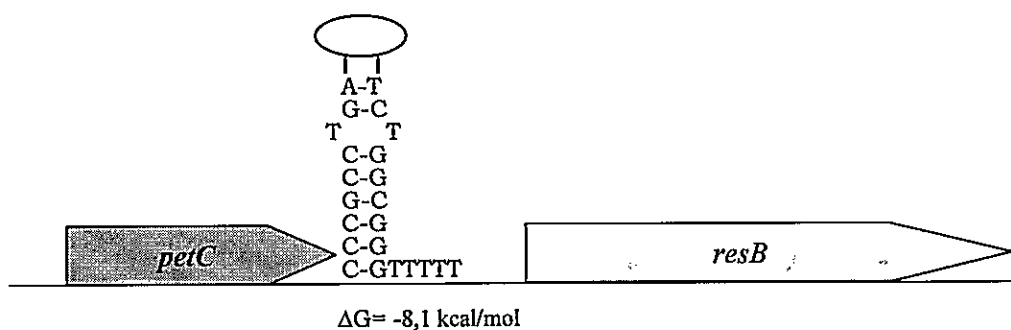


fundamentalmente en los datos experimentales obtenidos de los ensayos de extensión del partidor y en la identificación de las cajas -10 y -35.

**1.5 Identificación de posibles terminadores de la transcripción para los operones *pet1* y *res*.** La secuencia de DNA se analizó con el objeto de detectar la presencia de estructuras secundarias que puedan constituir posibles terminadores intrínsecos de la transcripción. Utilizando el programa "mfold RNA Secondary Structure" (Mathews y cols., 1999) que analiza la formación de estructuras secundarias en los mRNAs, se logró detectar la presencia de una estructura tipo horquilla energéticamente estable ( $\Delta G$ : -8,1 kcal/mol) localizada 38 pb río abajo del gen *petC1*, que consistía de un tallo rico en GC seguido de cinco residuos uracilo (Figura 16A). Esta organización es muy típica de los terminadores de la transcripción no dependientes del factor *rho*. Adicionalmente, esta estructura se detectó río abajo de otros 10 operones *pet* bacterianos analizados (Figura 16B), lo cual apoyó un posible papel funcional *in vivo*. La presencia de este tipo de estructuras río abajo del operón *res* no fue evidente, lo que sugirió una posible terminación de la transcripción *rho*-dependiente para este operón.

**1.6 Identificación de posibles sitios de unión al ribosoma en los genes del operón *pet1* y *res*.** La identificación de sitios de unión al ribosoma se realizó por inspección visual de la secuencia de DNA de cada gen y comparando ésta con las secuencias Shine-Dalgarno definidas en otras bacterias (Lehninger y cols., 1993). La Tabla 4 y la Figura 6 muestra las secuencias que han sido sugeridas como posibles sitios de unión al ribosoma para los genes que se indican del operón *pet1* (*cycA1*, *sdrA1*, *petA1*, *petB1*, *petC1*) y *res* (*resB*). Los genes *resB* y *hip2* no contienen secuencias Shine-Dalgarno típicas.

A)



B)

Microorganismo	Posibles terminadores de la transcripción independientes de <i>rho</i> (secuencia de DNA 5'-3')
<i>P. aeruginosa</i>	20- GCGCGGCCCTACGGGGCGCGCGTCTTTT-50
<i>N. meningitidis</i>	12- AAAAGGGCAAATCCTTTAGGGTTTGCCCTTTTTCATTTT-51
<i>R. galegae</i>	27- GGCGGCTTCGGCCGCTTTT-47
<i>A. vinosum</i>	13- GCGCGGTCTAGGACTAGACCGCCGCTTT-41
<i>P. denitrificans</i>	4- CCCGGTCTGATCCTGAAACGCCTCCGGGGCGCGTTTT-42
<i>B. stearothermophilus</i>	29- GCTGACTCGCGTTAGTCAGCTTTT-55
<i>R. rubrum</i>	32- CGGCCGCGCCCCACCGGCGCGCTTTT-63
<i>R. capsulatus</i>	24- CGCGCCCCACGGGGCGCGTTTGGCTTTT-54
<i>R. sphaeroides</i>	23- AAACGCGCCCCACGGGGCGCGTTTGGCTTTT-53
<i>A. ferrooxidans</i>	38- CCCGCTGACCAGCGCGTTTGTAGGGTCTGGCGGTTT

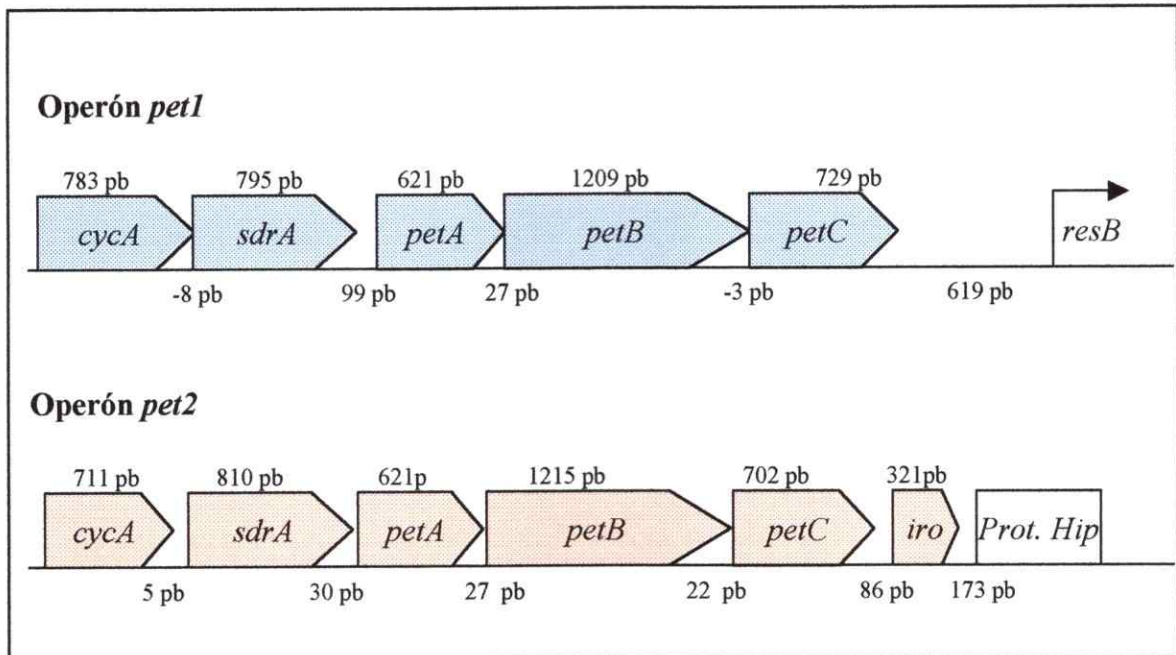
**Figura 16. Localización y secuencia de un posible terminador de la transcripción independiente de *rho*.** A) Terminador de la transcripción independiente del factor *rho* para el operón *pet1*. B) Secuencia de DNA de posibles terminadores independientes de *rho* encontrados para el operón *pet* de diferentes bacterias. Los números señalan la localización de las secuencias respecto al posible codón de término de la traducción del gen *petC*.

Tabla 4

Secuencias Shine-Dalgarno putativas identificadas para algunos genes de los operones <i>petI</i> y <i>res</i> .		
Gen	Secuencia	Distancia al ATG
<i>cycA1</i>	GGGGG	9
<i>sdrA1</i>	GGAGG	5
<i>petA1</i>	CGAGG	8
<i>petB1</i>	TGAGG	10
<i>petC1</i>	AGAGG	8
<i>resC</i>	GAAGG	6

Distancia al ATG: considera el número de pares de bases existente entre la secuencia Shine-Dalgarno y el codón de inicio de la traducción de cada gen.

**1.7 Determinación del número de copias del operón *pet1* y *res* en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270.** El número de copias de los operones *pet1* y *res* se evaluó mediante una búsqueda realizada con el programa Blastp (Tabla3) en la base de datos TIGR existente para la cepa de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (> 95% de la secuencia del genoma). Las secuencias aminoacídicas de las proteínas codificadas en el operón *pet1* y *res* se ingresaron como sondas para identificar secuencias aminoacídicas similares y las respectivas secuencias nucleotídicas que las codifican. Las secuencias aminoacídicas y nucleotídicas encontradas para cada proteína se analizaron para definir el tamaño y localización de los ORFs codificantes (Programa "DNA Strider"), el contexto genéticos de cada ORF identificado y la identidad de las proteínas (por similitud con las secuencias presentes en la base de datos del NCBI) Este análisis reveló que en la cepa 23270 existían al menos dos copias del operón *pet* y sólo una del operón *res*. Una de las copias de *pet*, *pet1*, tenía una composición y organización similar a la que hemos descrito para el operón *pet1* de la cepa ATCC 19859. La segunda copia, *pet2*, poseía una composición y organización muy parecida, pero no idéntica a *pet1* y se ubicaba en un contexto genético claramente distinto. El operón *pet2* (Figura 17) poseía los genes *cycA2*, *sdrA2*, *petABC2* y un gen de 321 pb cuyo producto tenía 56% de similitud con la proteína hipip (high-redox potential iron-sulfur protein) codificada por el gen *iro* (Kusano y cols., 1992a). Este gen parecía ser un componente del operón *pet2* debido que se ubicaba a sólo 86 pb de *petC2*. Las proteínas codificadas en los operones *pet1* y *pet2* de la cepa ATCC 23270 poseían una alta similitud entre ellas (citocromo *c<sub>4</sub>*: 62%. SDR: 63%. Rieske: 72%. citocromo *b*: 72%. y citocromo *c<sub>1</sub>*: 70%). El alineamiento de las secuencias



**Figura 17. Composición y organización de los operones *pet 1* y *pet2* en *A. ferrooxidans* ATCC 23270.** Los números superiores indican el tamaño de los genes y los inferiores indican la separación entre ellos (en pb). (-) Sobreposición de los genes.

de aminoácidos (Figuras 18-22) reveló que el citocromo *c<sub>4</sub>*, la proteína SDR, la proteína Rieske, el citocromo *b* y el citocromo *c<sub>1</sub>*, codificados por el operón *pet2*, poseían también una estricta conservación de los residuos funcionalmente importantes. Por su parte, la proteína hipip conservaba los residuos de cisteína (C83, C86, C95 y C108) que han sido involucrados en la unión del centro 4[Fe-S] (Kusano y cols., 1992a). Esto sugería que estas proteínas desarrollaban un papel funcional en *A. ferrooxidans*.

Para definir si esta organización genética existía también en la cepa ATCC 19859, se realizaron reacciones de PCR usando como molde el DNA obtenido de la cepa 19859 y como control el de la cepa 23270 y se diseñaron partidores específicos (I.1-I.10, ver Tabla 2 y Figura 23A) en aquellas regiones que diferían completamente en su secuencia entre ambos operones.

Se obtuvo productos de PCR del tamaño esperado tanto en la cepa control como en la cepa estudiada (Figura 23B). Con el fin de estar seguros que no existía reacción cruzada con el operón *pet1* se realizaron reacciones de PCR que utilizaron como molde el DNA del operón *pet1* clonado en un vector plasmidial y pares de oligonucleótidos para cada uno de los genes de *pet*. En cada uno de los casos no se obtuvo producto de amplificación (datos no mostrados). Los resultados indicaron que la cepa ATCC 19859 también poseía el operón *pet2* y que sus genes estaban organizados de manera similar a lo encontrado en la cepa ATCC 23270. Por este motivo y con el objetivo de precisar la nomenclatura utilizada, los denominamos operón *pet1* y *pet2*, respectivamente, y los genes codificados se denominaron con el número respectivo, por ejemplo: *petC1* y *petC2* (gen que codificaba para el citocromo *c<sub>1</sub>* del operón *pet1* y *pet2*, respectivamente).



GXXXGXXG

SDR-1 --MNNYVPV--DGLLNGRVIVTGAGEGIGRCAAVEFARLGAEVVLLGRTQRKLEGVYDE 56  
SDR-2 MTENDYTKAKGDGILDGKTIIVTGAGDGI GRAVAIEYAHQGATVVLLGKTKRNLEGVYDE 60  
\*:\* . \*::\*:\*. :\*:\*\*\*\*\*:\*\*\*\*\*.\*:\*:\*: \*\* \*\*\*\*\*:\*:\*:\*\*\*\*\*

SDR-1 IVDSGYKEPVIHPMDLLTAKGRDYQDFAQRLKESLGRDLGILHNAEELDILTPIQYYDEE 116  
SDR-2 ITDYGAEPAIIVVDLADPASDAFKTIGAAISSEFTQLNGIVHNAELGMLTPLENYEGA 120  
\*.\* \*\* \*\*\_\* :\*\* . . :: :. :...: :\*:\*\*:\*\*\*\*\*.:\*\*:: \*

SDR-1 LWESAMKVNVTAPYLLTQACLPLLLASEDASIVFITDDCAREAKGYWGAYAVSKAAVQHL 176  
SDR-2 LWDHVFQVNVKSPLLVTQQCLPLLKEAPYASIIFTTDESGVKPKGYWGAYGVSKAAILHM 180  
\*\*: .:\*\*\*:.\* \*:\* \*\* \*\*\*\*\* : \*\*:\* \* \*:. . :\*\*\*\*\*.\*\*\*\*\*: \*

SDR-1 GLTLAIELQNTNVRVNVINPGPCRTGMRVRTHPGASIMSVPPPIAIMPLYEYLLGPD SKN 236  
SDR-2 ARNWAIEYANTPIRVNIVDPGPCRTGLRLLTHPGMPMKRYTPPEAITSIYTLMDCDVLG 240  
. \*\*\* \*\* :\*\*\*: :\*\*\*\*\*:\*: \*\*\*\*\* .: .\*\* \*\* :.\* \*:. \* .

SDR-1 TRGQIMNARDWLDAEHDDRQIVAVLEQ-- 263  
SDR-2 HNGELFYAQNFINPDLDDRTEKDLATSTV 269  
.\*::: \*:::..: \*\*\* : .

**Figura 19.** Alineamiento de las secuencias completas de aminoácidos de las proteínas SDR codificadas por los genes *sdrA1* (SDR-1) y *sdrA2* (SDR-2) de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. La secuencia GXXXGXXG implicada en la unión de la coenzima NAD(P)<sup>+</sup> y los residuos altamente conservados en la familia de proteínas SDR se destacan con color rojo. Los asteriscos representan aminoácidos idénticos y los puntos representan aminoácidos funcionalmente conservados.



```

Rieske-1      MTTVTDSEHGHNITRRRFLAAATSAVGAVVAGMVAVPLVDSLEPTAAAEASSTTVDLT 60
Rieske-2      MSDETQDSKHAPNVTRRRFLTALVTVSGAAVAGTIAIPMVKSLDPTAAAAALATTIDLS 60
               *: *:..: *:*****:* .. **.* ** :*:*:*.**:* ** * :*:*:*:
               :

Rieske-1      PIEPGMQVTVPWQKKPVIIINRTPEMLATLKETMAKGIKLDPLCKVPQQPPYCTNMYRSR 120
Rieske-2      PIEPGMQMVALWQEKPVIVNRTPEMLATLDEAEQKGIKDPNCNVPQQPPYCKNKYRSR 120
               *****:.. **:****:*****.*: ***** *:*****.* ****
               :

Rieske-1      VPEWYVGIRICNHLCCIPHYRPKKGSVAPWWLGGFHCPCHGSMYDLSARVIQGSPAPHNM 180
Rieske-2      VPEWYVGIKICNHLCCIPHYRPKKASVAPWWLGGFHCPCHGSMYDLSARVIKGSAPAPHNM 180
               *****:*****.******.******:*****
               :

Rieske-1      AVPEYELSTEKMSATITHMYPKAHLC 206
Rieske-2      AVPEYDIDVAKKTVVVTKMYPLAHL 206
               *****:.. * :..:*** ****
               :

```

**Figura 20. Alineamiento de las secuencias completas de aminoácidos de las proteínas Rieske codificadas por los genes *petA1* (Rieske-1) y *petA2* (Rieske-2) de *A. ferrooxidans* ATCC 23270.** Los residuos conservados implicados en la unión de centro redox Fe<sub>2</sub>-S<sub>2</sub> y en el mantenimiento de la estructura y la función de la proteína se destacan con color rojo. Los asteriscos representan aminoácidos idénticos y los puntos representan aminoácidos funcionalmente conservados.

```

Cit b-1    MSRFSAWVNKRLPVDETIREHMTEYFAPRNFNIIYYAGSLLLLMIVLQLISGFFLMAHYV 60
Cit b-2    MS-FKEWFVKRSPLPEMWREHMAEYYAPKNFNIFYAGSLLLLMVVLQFLSGFLVLAHYI 59
          ** * . * . ** * : * ****:*.**:***:*****:*****:***:*.**:***:*.**:***:
          DXXXGwxRXXH
Cit b-1    PTSQDAFASVQGIMYDTKWGWLIRYMHVDGVSLIFILLYTHMFRGLLYGSHRAPRELWVW 120
Cit b-2    PTAKGAYDSVYGIMYDVHYGWLmqymHVDGVSLIFVLLYVHMARGMLYGSHRSRELWVI 119
          **:.*: * ****.:.**:***:*****:***.* **:*****:*****:
          IGYVIYLLMAEAFVGYVLPFGNLSYWAGEVITSIMHALPVVGPSTTLTRGGPGIGSAT 180
Cit b-2    IGYTTYLAFMAEAFVGYVLPYSNLSYWAGTVITSLKSIPIFIGGWVTVLRGGPGMSGDT 179
          ***. ** :*****.*****:***** ***** :*:*:* * :***.*****:.. *
          LQRFLALHVVLFLLIILAAIALHIVALHRVGSNNPDGIDIKKHKGPDGKPLDGVFPHPY 240
Cit b-2    LDRFMALHVTLVFLVIVGLIVFHILYLHKVGSNNPDGIEIKANKGPDGHPVDGIPHPY 239
          *:*:*:*:*.*.**:*. * :*:*: * :*****:*** :*****:*.**:*****
          PXW
Cit b-1    TVKDLFGVGVWLTIFVSVIFYAPTMHGVMERTTFLAANPMVSLPDVTPPWYLSFPYAML 300
Cit b-2    SVKDLFGVGVWLIIFGAIIFYAPTFFHHIFLERTMSTPANPLKSLPDVTPPWYLSFPYAML 299
          :*****.**** ** :*****:* :*:* * .***: *****:*****:***
          RAVPNKYGYIAIMITSVLLPLLLPWLDRNPVRSSRYRPVYRIMLIVAGVSFIILAWIGQE 360
Cit b-2    RSIPNKTAGILLMVFAVLVFPVLPWLDRNPVKSTRYRPVTRILLIIFFINFFVLAYLGEQ 359
          *:*:* * * :* :*:*:*:*****:*.***** **:*: :*:*:*:*:*:
          PPLPKYFLIERVATALYLGFYLLLPFVSMIEPTRPVPERVTVG--- 402
Cit b-2    PPLPKYFFAERLGAFIYVAFFLLLPFVSKFEPTRTPPARVRFHAF 404
          *****: **:.: :*:*:*:***** :****. * **

```

**Figura 21.** Alineamiento de las secuencias completas de aminoácidos de los citocromos *b* codificados por los genes *petB1* (Cit b-1) y *petB2* (Cit b-2) de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Se destacan los residuos conservados, implicados en la unión de grupos hemo B<sub>H</sub> y B<sub>L</sub>. También se muestran algunas secuencias altamente conservadas en los citocromo tipo-*b* (DXXXGwxRXXH y PXW). Los asteriscos representan aminoácidos idénticos y los puntos representan aminoácidos funcionalmente conservados.

```

                                CXXCH
Cit c1-1  MSTYRYLWFLLVSM LIPGI AWG--AENTVHWMTPHYTFNRRTVIAGARYFADH CMACHSV 58
Cit c1-2  MKKY-VVWAGMALGLFAGSASGAFADDGPQLLTPHYTYNAKTIISGARLFATNCMACHSI 59
          *..*  :*  :.  *:. * * * *::  : :*****:* .*:*:*** ** :*****:

Cit c1-1  SSLRYEYL RADLGMTKKEVEKDIMLPNGAAWKGQIVSPMPDMAAKWLGKPPPNLSHMDR 118
Cit c1-2  KFMRYEFLTHDLGMSRADVQKQVMLPTGSFAFKDNMISAMPTQMAHKWFGLPPDLSQMVR 119
          . :***:*  *****: :*:*:***.*:*:*:::*.*.*:* ** * * **:* ** *

Cit c1-1  YLGSKFIYTYLLSFYWDPARPSGWNNYVFPVMAMPNILAPWGGTVGSKGQVIFPGR LSPA 178 p
Cit c1-2  YKGQDWIYTYLLSFYQDPKRPSGWNNHVFPNVAMPDVLAPYGGIVNEQGKLLRAGDESPQ 179
          * * ..:***** ** *****:* ** * **:* ** * ..:*:: . * **

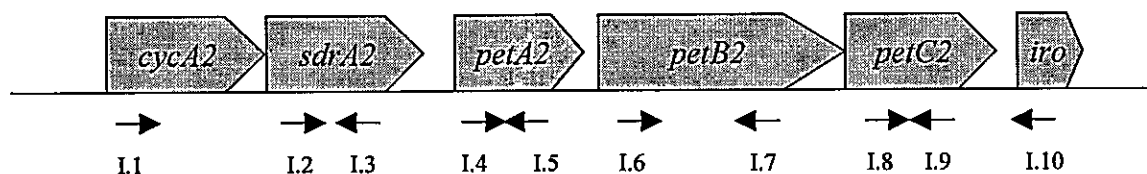
Cit c1-1  KYHQNVADVVAFLRYASDPSYFTRMAIGPYVIGIMVLFILAYFLKTAYWIDLK KRSNT238
Cit c1-2  KFKEQVTDIVAF LRFVSDPSVVRHDDGPWVLGLLAFFTIAAYFLKKEYWKGVK-----233
          *:::~*~*~*~*~*~*~*~*~* . * **:*~*~*~*~*~*~*~*~*~* . ** .:*

Cit c1-1  HTKG 242
Cit c1-2  ----

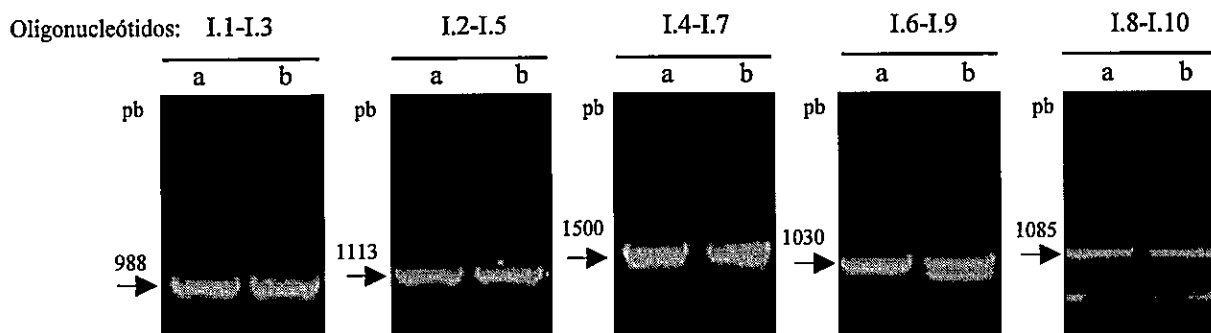
```

**Figura 22.** Alineamiento de las secuencias completas de aminoácidos de los citocromos  $c_1$  codificados por los genes *petC1* (Cit  $c_1$ -1) y *petC2* (Cit  $c_1$ -2) de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. En color rojo se destaca los residuos conservados implicados en la unión del grupo hemo y en la coordinación del átomo de Fe del grupo hemo. Los asteriscos representan aminoácidos idénticos y los puntos representan aminoácidos funcionalmente conservados.

A)



B)



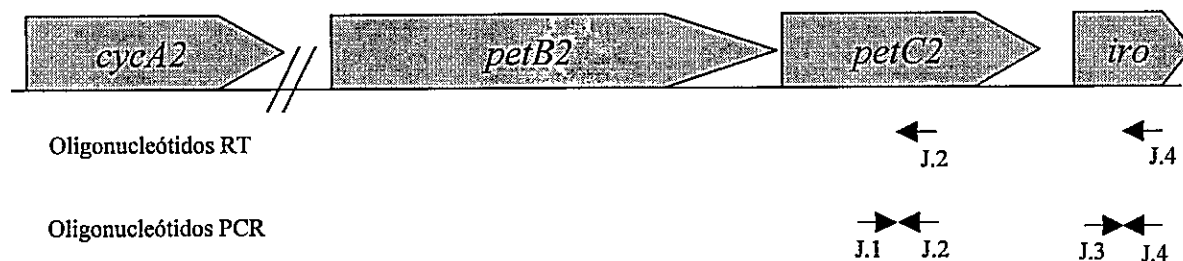
**Figura 23. Composición y organización del operón *pet2* en *A. ferrooxidans* ATCC 19859. A) Disposición de los genes del operón *pet2* en la cepa ATCC 23270. Se muestra la localización de los oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR para detectar los genes en la cepa ATCC 19859. B) Las reacciones de PCR se analizaron en geles de agarosa 0,8%. La flecha destaca las bandas del tamaño esperado. (a) PCR sobre la cepa ATCC 23270 (b) PCR de la cepa ATCC 19859.**

**1.8 Estudio de la expresión del operón *pet2*.** La expresión del operón *pet2* se estudió en la cepa ATCC 19859 crecida en  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{S}^{\circ}$ . Utilizando la técnica de RT-PCR se estudió la expresión del gen *iro* y *petC2*. Los partidores utilizados en las reacciones de RT y de PCR se diseñaron a partir de aquellas secuencias que estaban presentes sólo en *pet2*. Los resultados obtenidos mostraron que los genes *iro* y *petC2* se expresaban cuando la bacteria crecía oxidando  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{S}^{\circ}$  (Figura 24). Esta metodología permitió estudiar también si existía cotranscripción entre *iro* y *petC2*. Para ello se realizó una reacción de RT utilizando el partidador J.4 y una reacción de PCR utilizando los partidores J.4 y J.1 (Figura 24, Tabla 2). La reacción generó un fragmento de tamaño esperado (datos no mostrados) sugiriendo que el gen *iro* era una parte constituyente del operón *pet2*.

## **2. Detección de las proteínas codificadas en los operones *pet1* y *res*.**

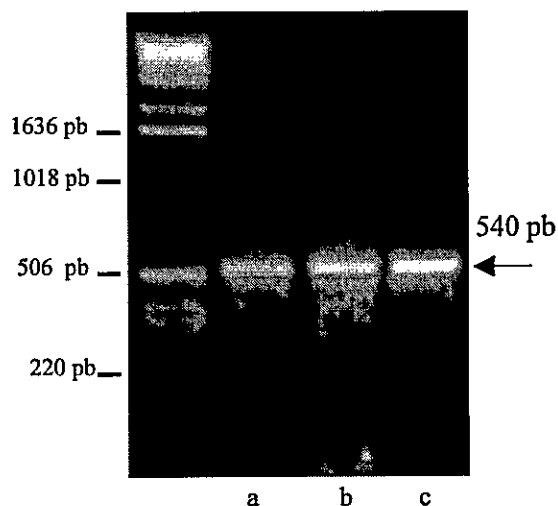
**2.1 Clonamiento y sobreexpresión de los genes.** Con el fin de obtener anticuerpos para las proteínas codificadas en el operón *pet1* se clonó y sobreexpresó los genes, de modo que, las proteínas respectivas pudiesen ser purificadas y utilizadas en la generación de anticuerpos específicos. El DNA total o parcial de los genes *cycA1*, *srdA1*, *petA1*, *petC1* y *resB* se obtuvo por PCR utilizando DNA genómico de *A. ferrooxidans* y partidores específicos. Los genes se clonaron en fase con el gen *gst* del plasmidio pGEX-2T, por lo tanto al introducirlo en *E. coli* e inducir su expresión se obtuvo una proteína de fusión entre GST y la proteína correspondiente (Figura 25). Los genes *petB1* y *resC* no se incluyeron en estos clonamientos ya que el alto contenido de  $\alpha$ -hélices de

A)



B)

Oligonucleótidos: J.1-J.2



C)

Oligonucleótidos: J.3-J.4

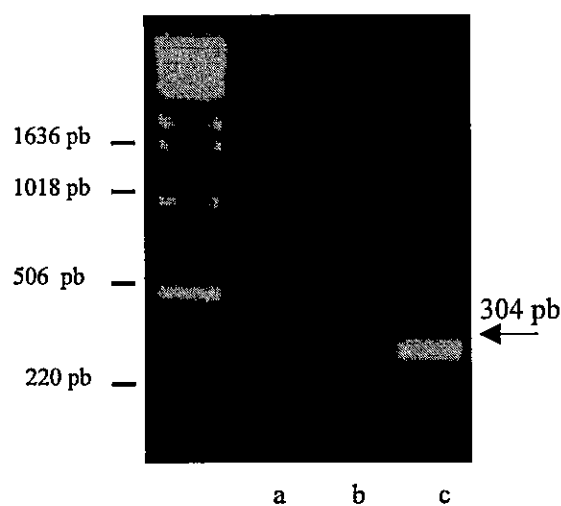
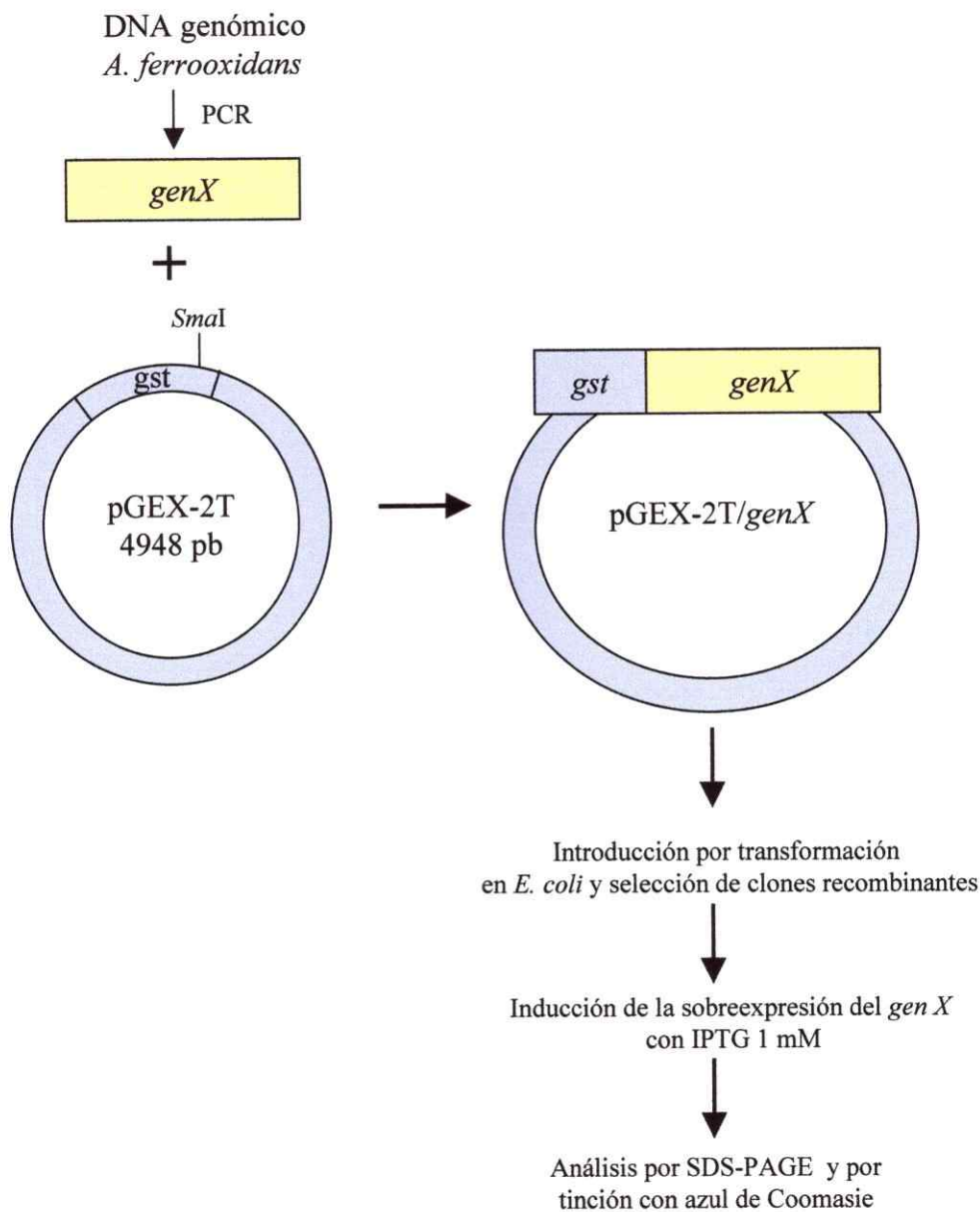


Figura 24. Determinación de la expresión del operón *pet2* de *A. ferrooxidans*. RNA total de células crecidas en Fe<sup>2+</sup> o S<sup>0</sup> se extrajo para detectar el mRNA derivado del operón *pet2* mediante RT-PCR. A) Localización de los oligonucleótidos específicos de las reacciones de RT y PCR. Los productos de las reacciones de RT-PCR de los genes *petC2* (B) e *iro* (C) se analizaron por una electroforesis en geles de agarosa al 1%. a) PCR sobre cDNA-Fe<sup>2+</sup>. b) PCR sobre cDNA-S<sup>0</sup> y c) PCR sobre DNA genómico.



**Figura 25.** Estrategia de clonamiento y sobreexpresión de los genes de los operones *pet1* y *res* de *A. ferrooxidans* en el vector de expresión pGEX-2T. Se clonó los genes *cycA1*, *sdrA1*, *petA1*, *petC1* y *resB* (gen X). En la reacción de PCR se utilizaron oligonucleótidos específicos.

transmembrana en el citocromo *b* y ResC hacía muy difícil la sobreexpresión de ellos en *E. coli*.

Los genes *cycA1* y *sdrA1* se clonaron y sobreexpresaron íntegramente. La sobreexpresión de *petA1* y *petC1* sólo se obtuvo al clonar el gen sin la secuencia señal putativa del extremo amino terminal y en el caso de *resB* sólo fue posible al clonar el DNA que codifica para un fragmento periplasmático putativo de la proteína (Figura 26). Estos resultados se debieron probablemente a que las proteínas de membrana logran insertarse en ella resultando tóxicas para *E. coli*.

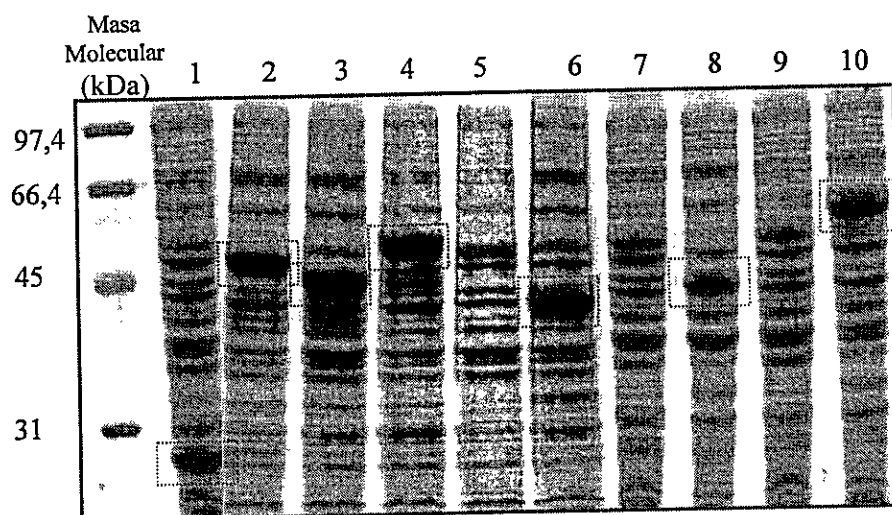
El clonamiento correcto de los genes se verificó por secuenciación y esto se correlacionó con la obtención de proteínas de fusión del tamaño esperado. En el caso del control de células transformadas con el vector pGEX-2T sin inserto, se observó una proteína de 27 kDa que correspondía a la GST (Figura 26).

## 2.2 Inmunodetección de las proteínas de *A. ferrooxidans* crecido en Fe<sup>2+</sup> o en S<sup>o</sup>.

Las proteínas y polipéptidos sobreexpresados en *E. coli* se utilizaron para la generación de anticuerpos policlonales de conejo. Los sueros colectados se utilizaron en un ensayo de "Western blotting" utilizando reactivos quimioluminiscentes. Todos ellos reaccionaban con sus antígenos específicos cuando eran diluidos hasta 10.000 veces y detectaban hasta 1-2 ng de la proteína blanco presente en un extracto de *E. coli*.

Posteriormente los anticuerpos se utilizaron para inmunodetectar las proteínas blanco en *A. ferrooxidans* crecido en Fe<sup>2+</sup> o en S<sup>o</sup>. Se analizó muestras provenientes de una fracción de células enteras, una fracción de membranas enriquecida con membrana citoplasmática y una fracción soluble libre de membranas. Se obtuvo resultados





**Figura 26. Sobreexpresión de algunos genes del los operones *pet1* y *res* de *A. ferrooxidans* en *E. coli* JM109.** Los genes *cycA1*, *sdrA1*, *petA1*, *petC1* y *resB* se clonaron en la misma fase de lectura que el gen *gst* del vector plasmidial pGEX-2T. Los plasmidios fueron se introdujeron en *E. coli* y se indujo la expresión de las proteínas de fusión con 1 mM de IPTG por 3 horas a 30°C. Los extractos de proteínas totales de *E. coli* se analizaron por SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 15% y tinción con azul de Coomasie. (1) *gst/pGEX-2T*. (2) *cycA-gst/pGEX-2T*. (3) *cycA1SSS-gst/pGEX-2T*. (4) *sdrA1-gst/pGEX-2T*. (5) *petA1-gst/pGEX-2T*. (6) *petA1SSS-gst/pGEX-2T*. (7) *petC1-gst/pGEX-2T*. (8) *petC1SSS-gst/pGEX-2T*. (9) *resB-gst/pGEX-2T*. (10) *resBfp-gst/pGEX-2T*. SSS: Sin secuencia señal. fp: Fragmento periplasmático. Los recuadros punteados destacan las proteínas de fusión sintetizadas por *E. coli*.

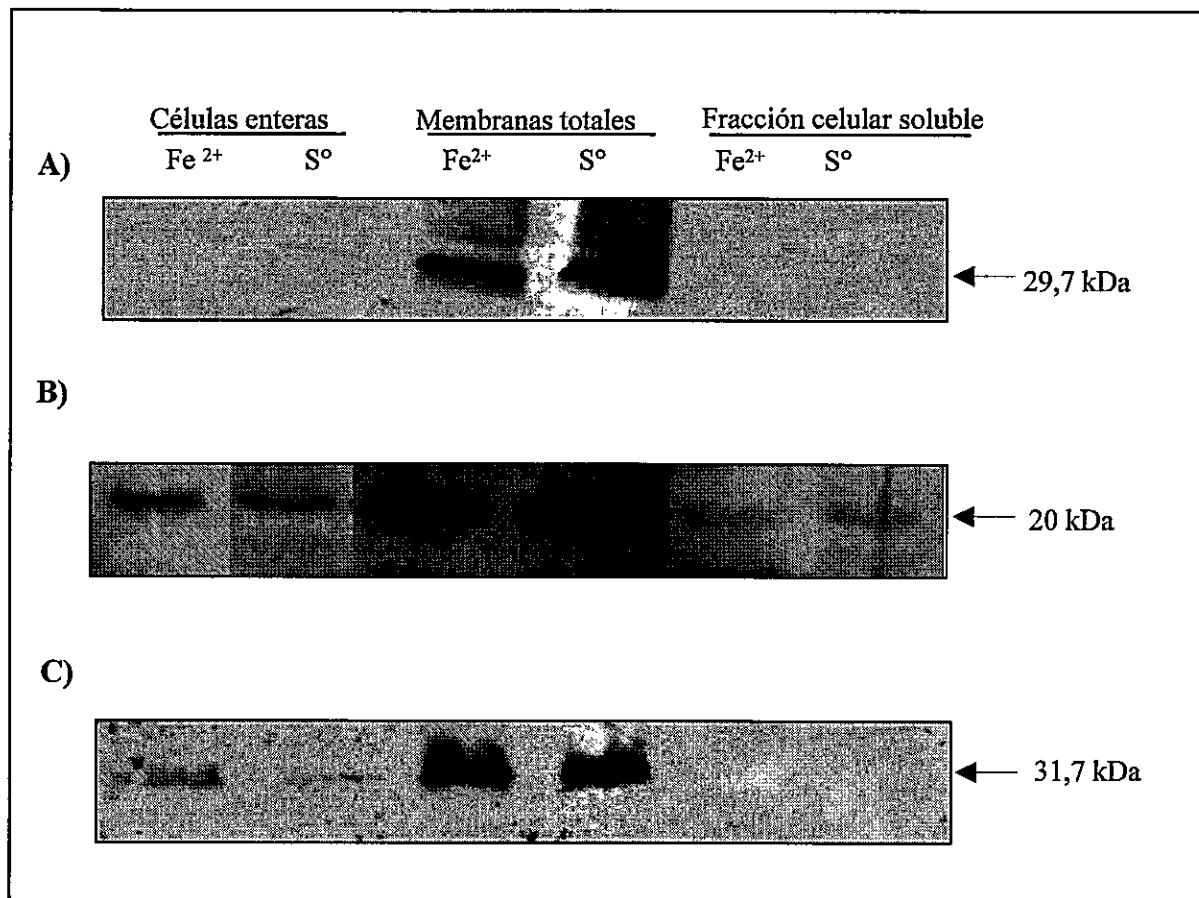
concluyentes para las proteínas SDR, Rieske y citocromo  $c_1$  (Figura 27). Los resultados mostraron que los niveles de estas proteínas no diferían en las células crecidas en  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{S}^\circ$ . Por otra parte, las proteínas aparecían principalmente asociadas a la fracción membranosa de la célula, lo cual confirmó las predicciones de localización realizadas para las proteínas Rieske y el citocromo  $c_1$  mediante programas de análisis que identifican la presencia de una secuencia señal y/o una  $\alpha$ -hélices hidrofóbica en el extremo amino terminal de la proteína.

La presencia de dos copias del operón *pet* en el genoma de *A. ferrooxidans* impidió dilucidar si las proteínas identificadas con los anticuerpos específicos derivan de uno de los operones o de ambos. Este aspecto será analizado más detalladamente en la Discusión de esta tesis.

### 3. Estudio de la función de las proteínas ResB y del complejo $bc_1$ .

#### 3.1 Estudio de la función de las proteínas ResB y citocromo $c_1$ : la estrategia genética.

Los antecedentes previos a esta tesis mostraban que una mutante en *resB* sólo podía utilizar compuestos de azufre reducido como sustrato y no  $\text{Fe}^{2+}$ . Dada la función de ResB en la biogénesis de citocromo tipo-*c*, era plausible suponer que esta mutante carecía de este tipo de citocromos en un estado funcional y esto definía su incapacidad para oxidar  $\text{Fe}^{2+}$ . También era posible especular que estos citocromos tipo-*c* resultaban ser componentes esenciales en la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$ , pero no en la oxidación de compuestos de azufre reducido. Los citocromos tipo-*c* que estaban codificados en el



**Figuar 27. Inmunodetección de las proteínas SDR, Rieske y citocromo  $c_1$  de *A. ferrooxidans*.** Las proteínas provenientes de extractos de celulares de *A. ferrooxidans* crecido en Fe<sup>2+</sup> o S<sup>o</sup> se separaron por SDS-PAGE y transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La inmunodetección se realizó sobre la membrana con reactivos quimioluminiscentes y visualizada por exposición a una placa autoradiográfica. Se analizó muestras de 6  $\mu$ g de proteína total. Se utilizó anticuerpos policlonales dirigidos contra A) SDR, B) Rieske, y C) citocromo  $c_1$ . Se indica la masa molecular aparente calculada para cada proteína.

operón *petI* resultaron ser componentes interesantes para ser estudiados ya que podrían ser blancos de maduración de las proteínas Res. Además, el entendimiento de su función podría dar luces acerca de la función de las otras proteínas codificadas en el operón.

Una técnica muy utilizada actualmente para determinar la funcionalidad de una proteína es obtener un mutante “kock out” para el gen que la codifica. Como se ha mencionado anteriormente, los estudios genéticos en *A. ferrooxidans* se han obstaculizado por la dificultad de introducir DNAs homólogos o heterólogos en la bacteria. Durante el curso de esta investigación se publicó un artículo que describía la obtención de mutantes *recA* en *A. ferrooxidans* mediante la técnica de “mtagénesis por intercambio de mrcadores” (Liu y cols., 2000). La técnica consiste, básicamente, en la introducción por conjugación de un plásmido recombinante desde *E. coli*, el cual lleva el gen de *A. ferrooxidans* que se desea mutar interrumpido por un cassette genético que confiere resistencia a kanamicina. Este plasmidio es incapaz de replicarse en el citoplasma de *A. ferrooxidans*. Se espera que ocurra un evento de recombinación entre el gen mutado introducido por conjugación y el gen silvestre de la bacteria. Las células recombinantes que adquieren el gen mutado se seleccionan por crecimiento en medio sólido en presencia de kanamicina.

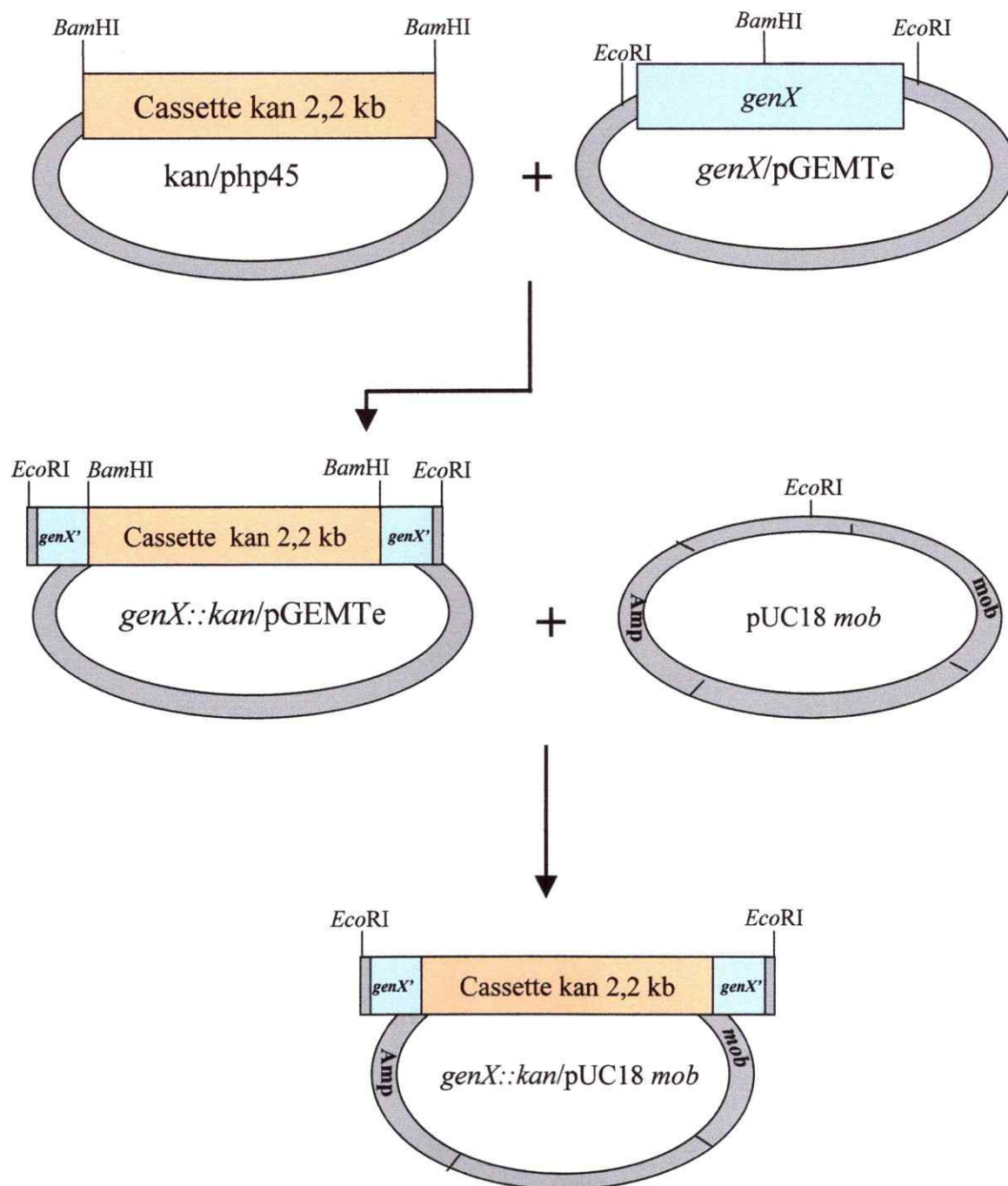
Siguiendo esta metódica descrita, se intentó mutar los genes *petC1* y *resB* para así determinar su función *in vivo* y establecer si el efecto fenotípico de estas mutaciones emulaba al efecto provocado por la secuencia de inserción ISAfe-1 en el mutante espontáneo inicialmente descrito. A continuación se expondrán algunos de los pasos experimentales claves realizados en esta estrategia.

### 3.1.1 Obtención de mutantes “knock out” de los genes *petC1* y *resB* de *A. ferrooxidans* ATCC19859.

i) **Clonamiento de los genes *petC1* y *resB* interrumpidos con un cassette genético de resistencia a kanamicina.** Las construcciones genéticas “*petC1::kan-mob*” y “*resB::kan-mob*” realizadas para los genes *petC1* y *resB* se presentan en la Figura 28. En ellas el gen que se deseaba mutar se interrumpió por un “cassette genético” de 2,2 kb que confería resistencia a kanamicina. El plasmidio que contenía esta construcción llevaba también el fragmento *mob* de 1,6 Kb (derivado del plasmidio RP4) necesario para su conjugación entre *E. coli* y *A. ferrooxidans*. Cada construcción se verificó por PCR y por secuenciación de las regiones de intersección: plasmidio-gen, gen-cassette kan, cassette kan- gen y gen-plasmidio (datos no mostrados).

ii) **Transferencia conjugativa de *petC1::kan-mob* y *resB::kan-mob* desde *E. coli* a *A. ferrooxidans* y selección de clones resistentes a kanamicina.** La cepa de *E. coli* S17-1 se transformó con los plasmidios “*petC1::kan/pUC18mob*” y “*res::kan/pUC18mob*”. La posterior conjugación desde *E. coli* hacia *A. ferrooxidans* se realizó según la metodología descrita por Liu y cols. (2000).

Los clones recombinantes se seleccionaron por resistencia a kanamicina en medio sólido con  $\text{Fe}^{2+}$  y tiosulfato. Se realizó un total de cuatro experimentos de conjugación que permitieron obtener 20 clones resistentes. Los clones crecían como pequeñas colonias de color blanco y de forma estrellada. Para verificar que ellos fueran *A. ferrooxidans*, se determinó la presencia del gen *rus* (que codifica para rusticinina) mediante una reacción de PCR utilizando los oligonucleótidos RusNM y RusCX y



**Figura 28.** Estrategia desarrollada para clonar los genes *petC1* y *resB* interrumpidos con un cassette genético de resistencia a kanamicina. Un fragmento BamHI de 2,2 kb que contenía el cassette de resistencia a kanamicina (kan) se liberó desde el vector php45-Km y ligó a un sitio BamHI del gen *resB* o *petC1* (gen X) clonado en el vector plasmidial pGEMT-easy. El fragmento que contenía el gen *resB* o *petC1* interrumpido con el cassette kan (*resB*::kan y *petC1*::Kan) se liberó desde el plasmidio hospedero mediante digestión con *EcoRI* y posteriormente se ligó al plasmidio pUC18 *mob* (Liu y cols., 2000).

células en suspensión como templado. En todos los casos se obtuvo un producto del tamaño esperado que establecía que los clones seleccionados correspondían a *A. ferrooxidans* (datos no mostrados). Adicionalmente se procedió a determinar la presencia del cassette *kan* mediante PCR con partidores específicos. En ningún caso se detectó el producto esperado, hecho coincidente con la pérdida de la resistencia observada cuando los clones eran subcultivados en una placa que contenía kanamicina.

Los experimentos culminaron sin éxito en la obtención de los mutantes buscados tomándose la decisión de no continuar estos experimentos.

### **3.2 Estudio de la función del complejo *bc<sub>1</sub>* en *A. ferrooxidans*: la estrategia biofísica.**

En los resultados expuestos anteriormente hemos establecido que el operón *petI* es expresado tanto en  $\text{Fe}^{2+}$  como en  $\text{S}^{\circ}$ . Además, las proteínas SDR, Rieske y citocromo *c<sub>1</sub>* son detectadas en *A. ferrooxidans* durante el crecimiento en  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{S}^{\circ}$ . Esto sugirió que las proteínas estudiadas desempeñan un papel funcional durante la oxidación de estos sustratos y posiblemente de otros compuestos de azufre reducido. No obstante, debido a la imposibilidad de obtener información acerca de la función de estas proteínas utilizando herramientas genéticas debimos acercarnos al entendimiento de su función a través de estrategias experimentales alternativas. Aprovechando las propiedades redox de estas proteínas, nos planteamos el estudio de su funcionalidad usando herramientas espectrofotométricas. El complejo *bc<sub>1</sub>* fue el modelo utilizado ya que existía una gran variedad de inhibidores específicos que bloqueaban el paso de electrones en diferentes puntos de este complejo redox.

Como se ha mencionado, durante el transcurso de esta investigación salieron a la luz las primeras evidencias que involucraban al complejo  $bc_1$  en las vías de oxidación de  $Fe^{2+}$ . Se estableció que la oxidación de  $Fe^{2+}$  procede por una vía bifurcada que lleva los electrones desde el  $Fe^{2+}$  hacia el  $O_2$  o hacia el  $NAD(P)^+$  según sean los requerimientos de la célula respecto de ATP o  $NAD(P)H$ . En la oxidación de  $Fe^{2+}$  el complejo  $bc_1$  estaría involucrado en la transferencia de electrones hacia el  $NAD(P)^+$  y no hacia el  $O_2$  (Figura 1) (Elbehti y cols., 2000).

Considerando estos antecedentes, resultaba muy interesante evaluar la función del complejo  $bc_1$  en la cepa en estudio. En primer lugar, se evaluó la participación del complejo en la oxidación de  $Fe^{2+}$  de modo de comparar nuestros resultados con los descritos anteriormente por Elbehti y cols. (2000). Además se pretendió hacer extensiva esta investigación a la oxidación de compuestos de azufre reducido. El azufre elemental facilitaba la obtención de alta masa celular, pero debido a su carácter insoluble, no era adecuado como un sustrato de rápida oxidación. Por otro lado, el tiosulfato es soluble y adecuado para ser administrado como fuente electrones, pero no permitía un alto rendimiento de masa celular. Por este motivo los experimentos que a continuación se describirán se realizaron creciendo las células en  $S^0$ , pero administrando tiosulfato como fuente de electrones.

### 3. 2. 1 Función del complejo $bc_1$ en la oxidación de $Fe^{2+}$ .

*i) Efecto de inhibidores del complejo  $bc_1$  sobre el consumo de  $O_2$  de *A. ferrooxidans* en presencia de  $Fe^{2+}$ .* Como se ha discutido, cuando *A. ferrooxidans* oxida  $Fe^{2+}$  el complejo  $bc_1$  estaría involucrado en la transferencia de electrones hacia el



NAD(P)<sup>+</sup> y no hacia el O<sub>2</sub> (Figura 1) (Elbehti y cols., 2000). Según este modelo, los inhibidores del complejo *bc<sub>1</sub>* no tendrían efecto inmediato sobre la actividad respiratoria. Con el objeto de someter a prueba este modelo en la cepa estudiada, hemos analizado el efecto de diferentes inhibidores del complejo *bc<sub>1</sub>* sobre el consumo de O<sub>2</sub> en células de *A. ferrooxidans* que han crecido en presencia Fe<sup>2+</sup> o S<sup>0</sup> y que utilizan Fe<sup>2+</sup> como única fuente de electrones. En éste y en todos los ensayos posteriores el consumo de oxígeno se midió simultáneamente con la adición del inhibidor y se expresó como nmoles de O<sub>2</sub> consumido/min/mg de proteína.

Las células crecidas en Fe<sup>2+</sup> mostraron una actividad respiratoria mayor (700 nmoles de O<sub>2</sub>/min/mg de proteína) que las células crecidas en S<sup>0</sup> (150 nmoles de O<sub>2</sub>/min/mg de prot.) (Tabla 5). En ambos casos se observó 100% de inhibición con 0,5 mM de KCN, sugiriendo la participación de una oxidasa terminal *aa<sub>3</sub>*. En concordancia con el modelo sugerido por Elbehti y cols. (2000), los inhibidores del complejo *bc<sub>1</sub>* como antimicina A, mixotiazol y estigmatelina no tuvieron efecto sobre la actividad respiratoria en presencia de Fe<sup>2+</sup> en células crecidas en Fe<sup>2+</sup> o azufre elemental. Estos resultados sugirieron que en ambos casos la oxidación de Fe<sup>2+</sup> procede por una vía en la que no participa el complejo *bc<sub>1</sub>*.

### 3. 2. 2 Función del complejo *bc<sub>1</sub>* en la oxidación de tiosulfato.

Los resultados de la inmunodetección de las proteínas codificadas en el operón *pet* (*pet1* y/o *pet2*) permitieron establecer que el complejo *bc<sub>1</sub>* estaba presente durante la oxidación de azufre elemental y probablemente durante la oxidación de otros compuestos de azufre reducido como tiosulfato. Este planteamiento se basa en que el

Tabla 5

Efecto de los inhibidores del complejo <i>bc<sub>1</sub></i> sobre la actividad respiratoria de <i>A. ferrooxidans</i> en presencia de $Fe^{2+}$ .							
Sustrato presente en el crecimiento celular	Consumo de oxígeno (nmoles de $O_2$ /min/mg proteína total)						
	(--)	Ant.	Mix.	Estig.	HQNO	Azida de sodio	KCN 0,5 mM
<b>Azufre</b>	150 (0%)	150 (0%)	ND	150 (0%)	100 (33%)	0 (100%)	0 (100%)
<b>Hierro</b>	700 (0%)	700 (0%)	700 (0%)	700 (0%)	308 (56%)	0 (100%)	0 (100%)

Se midió el consumo de oxígeno en presencia de  $Fe^{2+}$  como única fuente de electrones. Las células crecidas en  $Fe^{2+}$  o  $S^0$ , se colectaron y resuspendieron en tampón  $\beta$ -alanina pH 3,5. Las muestras se inyectaron en el oxígrafo y se agregó  $Fe_2(SO_4)_3$  3 mM. Se midió el consumo de oxígeno/min/mg. de proteína, en ausencia (--) o en presencia de inhibidores de complejo *bc<sub>1</sub>* (Ant: antimicina A 9  $\mu$ M, Estig: estigmatelina 8  $\mu$ M y Mix: mixotiazol 35  $\mu$ M) y citocromo *c* oxidasa (azida de sodio 1 mM y KCN 0,5 y 5 mM). Símbolos: ( ) % de inhibición. ND: No determinado

tiosulfato es un producto generado por la oxidación química del azufre elemental (Shihari y cols., 1993), de modo que las células que oxidan  $S^0$  también podrían utilizar tiosulfato como sustrato de oxidación.

La función del complejo en estas condiciones era desconocida, por ello se postuló un modelo de la cadena transportadora de electrones (Figura 29), en el cual la función del complejo  $bc_1$  es similar a lo descrito en la mitocondria y en bacterias como *P. denitrificans* y *R. capsulatus* (Richardson, 2000). La participación del complejo  $bc_1$  y la presencia de algunas de las actividades redox derivadas de esta cadena hipotética se evaluaron utilizando herramientas biofísicas como espectrofotometría y polarografía combinadas con el uso de inhibidores específicos. A continuación se expondrán los criterios que nos llevaron a evaluar una determinada actividad redox y los resultados obtenidos en esta evaluación.

**i) Efecto de inhibidores del complejo  $bc_1$  sobre el consumo de  $O_2$  de *A. ferrooxidans* en presencia de tiosulfato.** Inicialmente nos interesó determinar si la actividad tiosulfato oxidasa descrita previamente para *A. ferrooxidans* podía ser medida mediante polarografía, es decir, si al administrarse el tiosulfato como única fuente de electrones era posible medir el consumo de oxígeno en un resuspensión de células y así establecer la existencia de un flujo de electrones entre este sustrato y el  $O_2$ , tal como ha sido planteado en el modelo inicial (Figura 29). Además la determinación de la participación del complejo  $bc_1$  implicaba medir el efecto de inhibidores específicos de este complejo sobre el consumo de  $O_2$  celular.

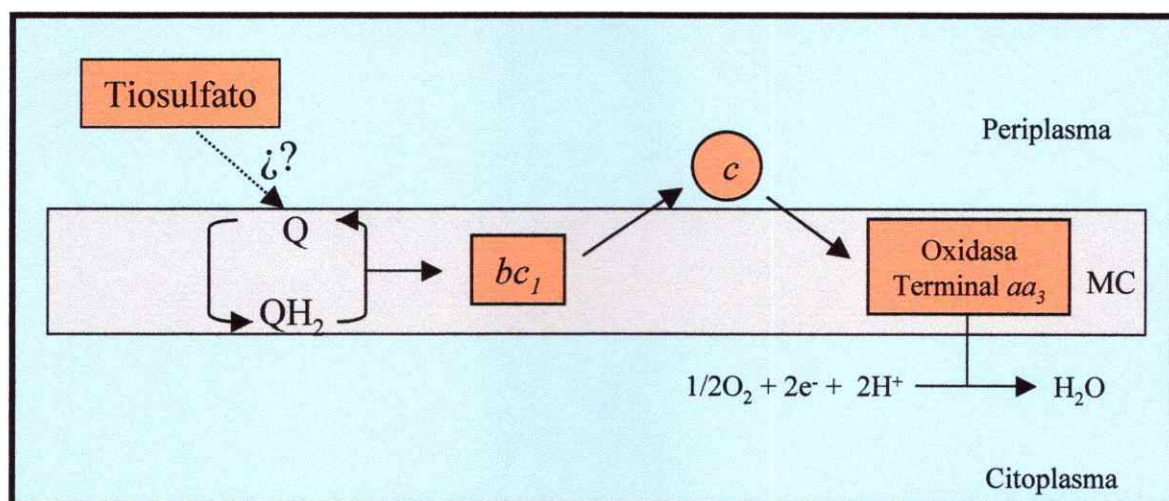


Figura 29. Modelo inicial de la función del complejo  $bc_1$  en la oxidación de tiosulfato en *A. ferrooxidans*. Q/ $QH_2$  representan el "pool" de quinona y quinol de la membrana citoplasmática. La flecha segmentada representa un posible componente redox con actividad tiosulfato quinona oxidoreductasa.

Células de *A. ferrooxidans* crecidas en  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{S}^{\circ}$ , se resuspendieron en tampón  $\beta$ -alanina (pH 3,5) e inyectaron en la cámara del polarógrafo. Inmediatamente se procedió a adicionar tiosulfato de sodio 3 mM final y a medir el consumo de oxígeno en el tiempo (nmoles  $\text{O}_2$  /min / mg de proteína) (Tabla 6). Las células crecidas en  $\text{S}^{\circ}$  poseían una actividad respiratoria 8 veces superior (720 nmoles de  $\text{O}_2$ /min/mg de prot.) a la que poseían las células crecidas en  $\text{Fe}^{2+}$  (90 nmoles de  $\text{O}_2$ /min/mg prot.). Con el objeto de estudiar la participación del complejo *bc<sub>1</sub>* en la transferencia de electrones entre el tiosulfato y el  $\text{O}_2$ , se procedió a medir el consumo de oxígeno en presencia de los inhibidores estigmatelina 8  $\mu\text{M}$ , mixotiazol 35  $\mu\text{M}$  y antimicina A 9  $\mu\text{M}$  (Elbehti y cols., 2000, Elbehti y cols., 1999). En las células crecidas en  $\text{S}^{\circ}$  se obtuvo niveles de inhibición de 55, 63 y 38%, respectivamente. No obstante, no se detectó efecto sobre la actividad respiratoria de las células crecidas en  $\text{Fe}^{2+}$ . Un inhibidor inespecífico como HQNO (20  $\mu\text{M}$ ) generó una inhibición de 90% en las células crecidas en azufre, pero sólo 42% en células crecidas en hierro.

Estos resultados sugirieron, en primer lugar, que las células crecidas en azufre poseían una mayor capacidad de oxidar el tiosulfato que las células crecidas en  $\text{Fe}^{2+}$ . El efecto de los inhibidores del complejo *bc<sub>1</sub>* sugería que la oxidación del tiosulfato en las células crecidas en azufre involucraba a un complejo tipo-*bc<sub>1</sub>*, pero no en las células crecidas en  $\text{Fe}^{2+}$ . La función del complejo *bc<sub>1</sub>* en la oxidación de tiosulfato podría, sin embargo, tener un carácter no esencial. Por otra parte, debido a que el complejo *bc<sub>1</sub>* era sintetizado en las células crecidas en  $\text{Fe}^{2+}$ , era posible especular que éste no podía participar en flujo directo de electrones entre el tiosulfato y el oxígeno, pero sí en el flujo

Tabla 6

Efecto de los inhibidores del complejo <i>bc<sub>1</sub></i> sobre la actividad respiratoria de <i>A. ferrooxidans</i> en presencia de tiosulfato.								
Sustrato presente en el crecimiento celular	Consumo de oxígeno (nmoles de O <sub>2</sub> / min/mg de proteína total)							
	Ant.	Mix.	Estig.	HQNO	Azida de Sodio	KCN 0,5 mM	KCN 5 mM	
Hierro	90	~90 (0%)	90 (0%)	~90 (0%)	52 (42%)	72 (70%)	90 (0%)	18 (80%)
Azufre	720	446 (38%)	266 (63%)	308 (55%)	72 (90%)	ND	720 (0%)	72 (90%)

Se midió el consumo de oxígeno en presencia de tiosulfato como única fuente de electrones. Las células crecidas en Fe<sup>2+</sup> o S<sup>0</sup>, fueron colectadas y resuspendidas en tampón β-alanina pH 3,5. Las muestras se inyectaron en el oxígrafo y se agregó tiosulfato de sodio 3 mM. Se midió el consumo de oxígeno/min/mg. de proteína en ausencia (---) o en presencia de inhibidores de complejo *bc<sub>1</sub>* (Ant: antimicina 9 μM, Mix: mixotiazol 35 μM, Estig: estigmatelina 8 μM y HQNO 20 μM) y de la citocromo *c* oxidasa (azida de sodio 1 M y KCN 0,5 mM y 5 mM). Símbolos: () : % de inhibición. ND: No determinado.

reverso de electrones entre el  $\text{Fe}^{2+}$  y el  $\text{NAD(P)}^+$ . Este aspecto será detalladamente analizado en la discusión de esta Tesis. Por otra parte, la actividad respiratoria en presencia de tiosulfato de ambos tipos de células poseía un alto grado de insensibilidad a 0,5 mM de KCN, lo cual era característico de las oxidasas diferentes a la citocromo *c* oxidasa, como por ejemplo, la quinol oxidasa *bd* (Green y Gennis, 1983, Kauffman y van Gelder, 1973).

Otro hecho interesante fue que durante la oxidación de tiosulfato los inhibidores del complejo *bc<sub>1</sub>* no produjeron una inhibición completa ni muy alta de la actividad respiratoria sugiriendo la existencia de vías alternativas en las que no estaría involucrado el complejo *bc<sub>1</sub>*, por las cuales los electrones derivados del tiosulfato podrían fluir hacia el  $\text{O}_2$ . En otros organismos que utilizan la vía del *bc<sub>1</sub>* es común encontrar vías alternativas que bifurcan al nivel de la coenzima Q. Esto implica necesariamente la coexistencia de otros sistemas quinol oxidantes como los complejos *bd* (Kranz y Gennis, 1985; Rice y Hempfling, 1978), *bo<sub>3</sub>* (Kita y cols., 1984), *ba<sub>3</sub>* (Richter y cols., 1994) o *bb<sub>3</sub>* (Azarkina y cols., 1999).

**ii) Actividad tiosulfato:quinona oxidoreductasa.** En *E. coli* y otros organismos la oxidación de un sustrato inicial como NADH, hidrógeno, succinato o lactato, ocurre acoplada a la reducción química de la quinona (Unden y Bongaerts, 1997). El quinol generado en esta reacción constituye un sustrato para las quinol oxidasas celulares como el complejo *bc<sub>1</sub>*. Por esta razón hemos propuesto que en *A. ferrooxidans* la oxidación de tiosulfato podría estar acoplada a la reducción de quinona con la participación de una actividad tiosulfato:quinona oxidoreductasa (Figura 29).

Para evaluar este aspecto del modelo se procedió a resuspender las células crecidas en  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{S}^{\circ}$  en tampón  $\beta$ -alanina pH 3,5 y a administrar tiosulfato 3 mM y quinona exógena 30  $\mu\text{M}$  (Q1). Simultáneamente se evaluó el contenido de quinona (estado oxidado) mediante seguimiento espectroscópico a 278 nm. La disminución transitoria en la concentración de quinona fue considerada como un indicador positivo para la actividad analizada.

En este estudio se detectó una disminución transitoria de los valores de absorbancia a 278 nm, lo cual representó una disminución de la quinona. La disminución observada se atribuyó a la presencia de una actividad tiosulfato:quinona oxidoreductasa equivalente a 425 nmoles de quinona  $\text{Q}_1$  reducida/min/mg de proteína en células crecidas en  $\text{S}^{\circ}$  y 18 nmoles de quinona  $\text{Q}_1$  reducida/min/mg de proteína en células crecidas en  $\text{Fe}^{2+}$ . Estos resultados establecieron que las células de *A. ferrooxidans* crecidas en  $\text{S}^{\circ}$  poseían una actividad tiosulfato:quinona oxidoreductasa que era 26 veces superior a la que poseían las células crecidas en  $\text{Fe}^{2+}$ , lo cual sugirió que era funcionalmente relevante durante la oxidación de tiosulfato.

**iii) Actividad Quinol oxidasa.** En la sección anterior se ha mencionado que cuando el complejo  $bc_1$  participa en un flujo directo de electrones, funciona como quinol oxidasa. Por esta razón, estuvimos interesados en evaluar la presencia de una actividad quinol oxidasa en *A. ferrooxidans* crecido en  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{S}^{\circ}$ . Para ello, se administró un análogo de quinol ( $\text{DBH}_2$ ) como única fuente de electrones y se midió el consumo de  $\text{O}_2$  en células crecidas en una condición u otra.



La actividad no se detectó en células enteras a pH 3,5 o 7,4. Esta última condición se probó resuspendiendo las células en tampón fosfato con el objetivo de descartar el efecto del pH ácido sobre la funcionalidad de los componentes celulares involucrados. La actividad se detectó finalmente a en una resuspensión de membranas totales de *A. ferrooxidans* a pH 3,5 sugiriendo que en las células intactas, el análogo de quinol no pudo establecer contacto con el sistema proteico involucrado en su oxidación. Las membranas de células crecidas en azufre poseían una actividad 2 veces superior (135 nmoles de  $O_2$ /min/mg de proteína) a la detectada en las membranas de células crecidas en  $Fe^{2+}$  (57,6 nmoles de  $O_2$ /min/mg prot.) (Tabla 7). La actividad de las membranas derivadas de células crecidas en  $S^0$  se inhibió fuertemente por antimicina A (70%) y mixotiazol (55%). Estos compuestos también tuvieron un efecto inhibitor sobre la actividad respiratoria de las membranas derivadas de células crecidas en  $Fe^{2+}$  de 37% y 15%, respectivamente. El HQNO inhibió 96% y 75% en azufre o  $Fe^{2+}$ , respectivamente. En ambos casos el consumo de oxígeno se inhibió en un 100% por azida de sodio 1 mM. La inhibición por KCN mostró un patrón diferenciado en  $S^0$  o  $Fe^{2+}$  ya que 1 mM de KCN inhibía el 50% de la actividad en hierro, pero no afectaba la actividad en  $S^0$ , sugiriendo que en ambos casos la oxidación de tiosulfato involucraba la participación de los compuestos redox total o parcialmente diferentes.

Debe destacarse nuevamente que durante la oxidación del análogo de quinol la inhibición observada con los inhibidores del complejo *bc<sub>1</sub>* no fue total sugiriéndose nuevamente la presencia de caminos alternativos para el transporte de electrones hacia el oxígeno. Ante la posibilidad de que existiera un flujo directo de electrones entre el

Tabla 7

Efecto de los inhibidores del complejo <i>bc<sub>1</sub></i> sobre la actividad respiratoria de <i>A. ferrooxidans</i> en presencia de DBH <sub>2</sub>							
Sustrato presente en el crecimiento celular	Consumo de oxígeno (nmoles de O <sub>2</sub> /min/mg de proteína total)						
	---	Ant.	Mix	HQNO	KCN 1 mM	KCN 5 mM	Azida de Sodio
Hierro	57,6	36,4 (37%)	49 (15%)	14,4 (75%)	29 (50%)	ND	0 (100%)
Azufre	135	40,5 (70%)	61 (55%)	5,4 (96%)	135 (0%)	35 (74%)	0 (100%)

Se midió el consumo de oxígeno de una preparación de membranas totales en presencia de DBH<sub>2</sub> como única fuente de electrones. Las membranas celulares preparadas a partir de células crecidas en hierro o azufre elemental se resuspendieron en tampón β-alanina pH 3,5. Las muestras se inyectaron en el oxígrafo y se agregó DBH<sub>2</sub> 2mM. Se midió el consumo de oxígeno/min/mg de proteína de la muestra en ausencia (---) o en presencia de diferentes inhibidores del complejo *bc<sub>1</sub>* (Ant: antimicina A 9 μM y Mix: mixotiazol 35 μM y HQNO: 20 μM) y de la citocromo *c* oxidasa terminal (KCN 1 mM y 5 mM y azida de sodio 1 mM). ( ): % de inhibición. ND: No determinado.

quinol y un citocromo *c* soluble, sin la participación del complejo *bc<sub>1</sub>*, se evaluó la presencia de un actividad quinol:citocromo *c* oxidoreductasa. Tanto el análogo de quinol (DBH<sub>2</sub>), como un ferricitocromo *c* exógeno, se agregaron a un resuspensión de células o membranas celulares y se monitoreó la reducción del citocromo *c* mediante seguimiento espectrofotométrico a 550/540 nm. La actividad no se detectó a pH 3,5 ni 7,4 en células (o membranas) crecidas en Fe<sup>2+</sup> o S<sup>o</sup> (resultados no mostrados).

**iv) Actividad citocromo *c* oxidasa.** Tal como se muestra en el modelo de la Figura 29, es común que en un flujo directo de electrones el complejo *bc<sub>1</sub>* ceda sus electrones a un citocromo *c* (Trumpower, 1990). Posteriormente, los electrones pasan al O<sub>2</sub> a través de una citocromo *c* oxidasa hemo-Cu como *aa<sub>3</sub>*. De esta manera, la participación del complejo *bc<sub>1</sub>* en una cadena transportadora de electrones debiera involucrar la oxidoreducción de un citocromo tipo-*c*. Por esta razón, evaluamos la actividad citocromo *c* oxidasa en células de *A. ferrooxidans* crecidas en Fe<sup>2+</sup> o S<sup>o</sup> mediante dos estrategias experimentales diferentes.

En primer lugar, se procedió a medir la oxidación de un ferrocitocromo *c* exógeno administrado a las células resuspendidas en tampón β-alanina, pH 3,5. La oxidación del ferrocitocromo *c* se evaluó por seguimiento espectroscópico a 540/550 nm. Se detectó una disminución en la absorbancia que permitió calcular la actividad citocromo *c* oxidasa. En estas condiciones *A. ferrooxidans* mostró una actividad citocromo *c* oxidasa de 45 nmoles de citocromo *c* oxidado/min/mg de proteína en células crecidas en hierro y 9 nmoles de citocromo *c* oxidado/min/mg de proteína en células crecidas en S<sup>o</sup> (Tabla 8A). En ambos casos, la actividad se detectó sólo a pH 3,5 y

Tabla 8

Determinación de una actividad citocromo <i>c</i> oxidasa en células de <i>A. ferrooxidans</i> y medición de la actividad respiratoria en presencia de ascorbato.		
Sustrato presente en el crecimiento celular	A) Actividad cit <i>c</i> oxidasa (nmoles cit <i>c</i> ox / min / mg proteína)	B) Actividad Respiratoria con ascorbato (nmoles de O <sub>2</sub> / min / mg de proteína)
	---	KCN 0,5 mM
Hierro	45	32      0
Azufre	9	13      0

Las células crecidas en Fe<sup>2+</sup> o S<sup>0</sup> se colectaron y resuspendieron en tampón β-alanina pH 3,5 o tampón fosfato pH 7,4. A) Se agregó ferrocitocromo *c* exógeno 50 μM (ferricitocromo *c* 100 μM + ascorbato 50 mM) y se evaluó la oxidación en el tiempo mediante seguimiento espectroscópico a 540/550 nm. B) Se agregó ascorbato 50 mM como única fuente de electrones y se midió el consumo de oxígeno/min/mg de proteína en ausencia (---) o en presencia de de KCN 0,5 mM.

estuvo completamente ausente a pH 7,4. La mayor actividad citocromo *c* oxidasa detectada en hierro se correlaciona con el mayor contenido de citocromo tipo-*c* (Yarzabal y cols., 2002b) y de la citocromo *c* oxidasa *aa*<sub>3</sub> (Yarzabal, comunicación personal) comunicado para *A. ferrooxidans* en estas condiciones.

En segundo lugar, se procedió a medir el consumo de O<sub>2</sub> de *A. ferrooxidans* crecido en Fe<sup>2+</sup> o S<sup>0</sup> en presencia de ascorbato como única fuente de electrones. Debido a los potenciales redox del ascorbato (+0.08 V) y de los citocromos *c* solubles (+0.2-+0.6 V) normalmente se asume que el ascorbato cede sus electrones a los citocromos tipo-*c*. Por lo tanto, la detección de consumo de O<sub>2</sub> en presencia de ascorbato como única fuente de electrones debía involucrar la participación de citocromos tipo-*c* y de una citocromo *c* oxidasa.

Se detectó que las células crecidas en Fe<sup>2+</sup> presentaban una actividad respiratoria de 32 nmoles de O<sub>2</sub>/min/mg de proteína, 2,4 veces superior a la observada en las células crecidas en S<sup>0</sup> (13 nmoles O<sub>2</sub>/min/mg de proteína) (Tabla 8B). Estos valores se correlacionaban con los resultados anteriormente expuestos y nuevamente sugerían la presencia y la participación de un citocromo tipo-*c* en las vías de oxidación del Fe<sup>2+</sup> y del S<sup>0</sup>, siendo más importante esta participación en las células crecidas en Fe<sup>2+</sup>.

Todos los resultados expuestos en las secciones precedentes apoyaban la idea que el complejo *bc*<sub>1</sub> participaba en el flujo directo de electrones entre el tiosulfato y el O<sub>2</sub>, lo cual constituyó un aporte real al entendimiento del metabolismo oxidativo de esta bacteria y genera interrogantes acerca de los mecanismos de conservación de la energía existentes durante la oxidación de hierro y tiosulfato. Este y los posibles elementos que

determinan la función diferenciada del complejo  $bc_1$  en la oxidación de  $Fe^{2+}$  y tiosulfato serán analizados en la Discusión.

Además los resultados permiten especular acerca de la existencia de vías alternativas independientes del complejo  $bc_1$  que también están participando en este flujo de electrones entre el tiosulfato y el  $O_2$ . Esto trae consigo un panorama más complejo que involucra la coexistencia de múltiples vías transportadoras las cuales probablemente confieren una ventaja adaptativa para este microorganismo. Este punto será también discutido más adelante (sección 3 de la Discusión).

#### 4. Identificación de posibles quinol oxidasas alternativas al complejo $bc_1$ en *A. ferrooxidans*.

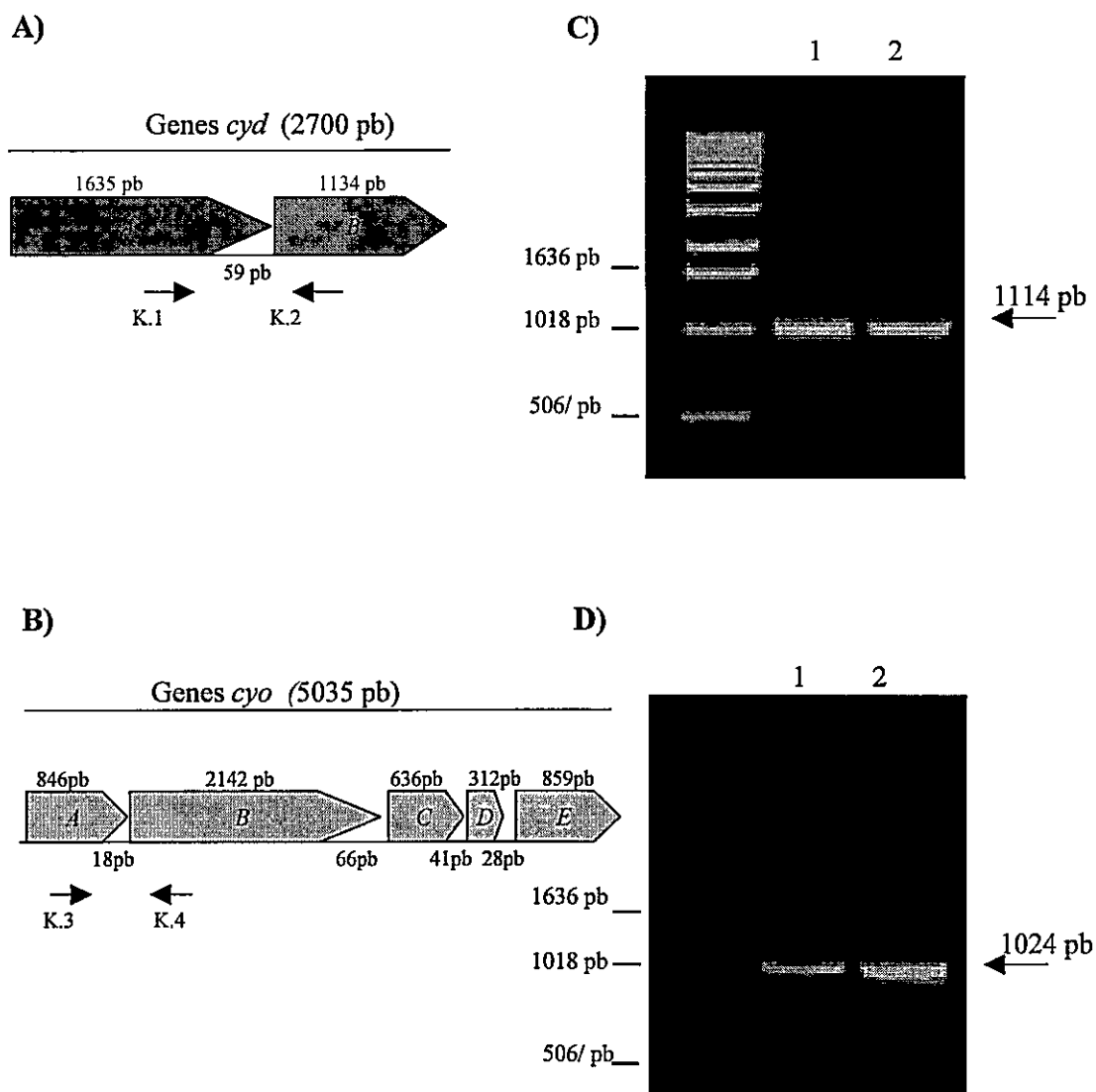
En la literatura se establece que las vías alternativas para el transporte de electrones son elementos comunes en todas las bacterias (Poole y Cook, 2000, Trumppower, 1990) y en algunos protozoos (Moreno-Sánchez y cols., 2000) que utilizan el complejo  $bc_1$  en sus cadenas respiratorias. Adicionalmente estas vías alternativas bifurcan generalmente al nivel de la coenzima Q y están constituidas por diferentes quinol oxidasas. Por esta razón estuvimos interesados en detectar la existencia de quinol oxidasas diferentes al complejo  $bc_1$  en *A. ferrooxidans*.

**4.1 Detección de quinol oxidasas.** Para determinar si algunas de las quinol oxidasas descritas en otros organismos se encuentra presente en *A. ferrooxidans*, se realizó una primera inspección en la secuencia de DNA genómico disponible en la base de datos de TIGR. Las secuencias de las proteínas que constituían los complejos quinol oxidasas más comunes ( $bd$ ,  $bo_3$ ,  $ba_3$  y  $bb_3$ ) en los diferentes organismos se obtuvieron desde las bases

datos y en cada caso se alinearon mediante el programa BLOCKS para generar una proteína de consenso que se utilizó como sonda por el programa Blastp para inspeccionar la secuencia de DNA de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, disponible en la base de datos TIGR.

Esta herramienta bioinformática permitió establecer la presencia de los genes *cydAB* y *cyoABCDE* que codifican para las quinol oxidasas *bd* (Kranz y Gennis, 1983) y *bo<sub>3</sub>* (Chepuri y cols., 1990), respectivamente, en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Los genes *cydAB* codificaban para las dos subunidades del complejo *bd*. Los genes *cyoABCDE* codificaban para las cuatro subunidades del complejo *bo<sub>3</sub>* y para una farnesil transferasa involucrada en la síntesis del grupo hemo O a partir del hemo A (Saiki y cols., 1992). El análisis mostró que los genes *cydAB* tenían un tamaño de 1635pb y 1134 pb, respectivamente y se encontraban separados por sólo 59 pb. Los genes *cyoABCDE* tenían tamaños de 846, 2.142, 636, 312 y 858 pb, respectivamente y se encontraban separados por secuencia de 18, 66, 41 y 28 pb (Figura 30). Estos datos permitieron establecer que los genes *cyd* y *cyo* se organizaban en operones similares a los descritos en *E. coli*.

Adicionalmente, una publicación reciente describía la purificación de un complejo proteico con actividad quinol oxidasa en *A. ferrooxidans* NASF-1 (Kamimura y cols., 2001). Se trataba de un heterodímero cuyas subunidades tenían masas moleculares aparentes de 50,1 y 32,6 kDa y sus características espectroscópicas revelaban la presencia de un pico de absorbancia máximo a 630 nm que era típico del citocromo *d* que constituía el complejo *bd* (Kita y cols., 1984, Poole y cols., 1983). La



**Figura 30.** Detección de los genes *cyd* y *cyo* en *A. ferrooxidans*. (A) y (B) Organización de los genes *cydAB* y *cyoABCDE* en la cepa ATCC 23270 y localización de los oligonucleótidos utilizados en la reacción de PCR (Materiales y Métodos, Tabla2). (C) y (D) Análisis de los productos de PCR correspondientes a los genes *cydAB* y *cyoAB* por electroforesis en geles de agarosa al 0,8%. 1) PCR con DNA genómico de la cepa ATCC 19859. (2) PCR con DNA genómico de la cepa ATCC 23270. La flecha indica el tamaño de la banda obtenida.



masa molecular deducida de las secuencias proteicas codificadas por los genes *cydAB* antes descritos era de 60,8 y 41,5 kDa, respectivamente. Pese a las claras diferencias en los valores de masa molecular de las subunidades de ambas quinol oxidasas, es muy probable que la quinol oxidasa descrita por Kamimura y cols. (2001) sea codificada por los mismos genes *cydAB* encontrados en las bases de datos de la cepa ATCC 23270.

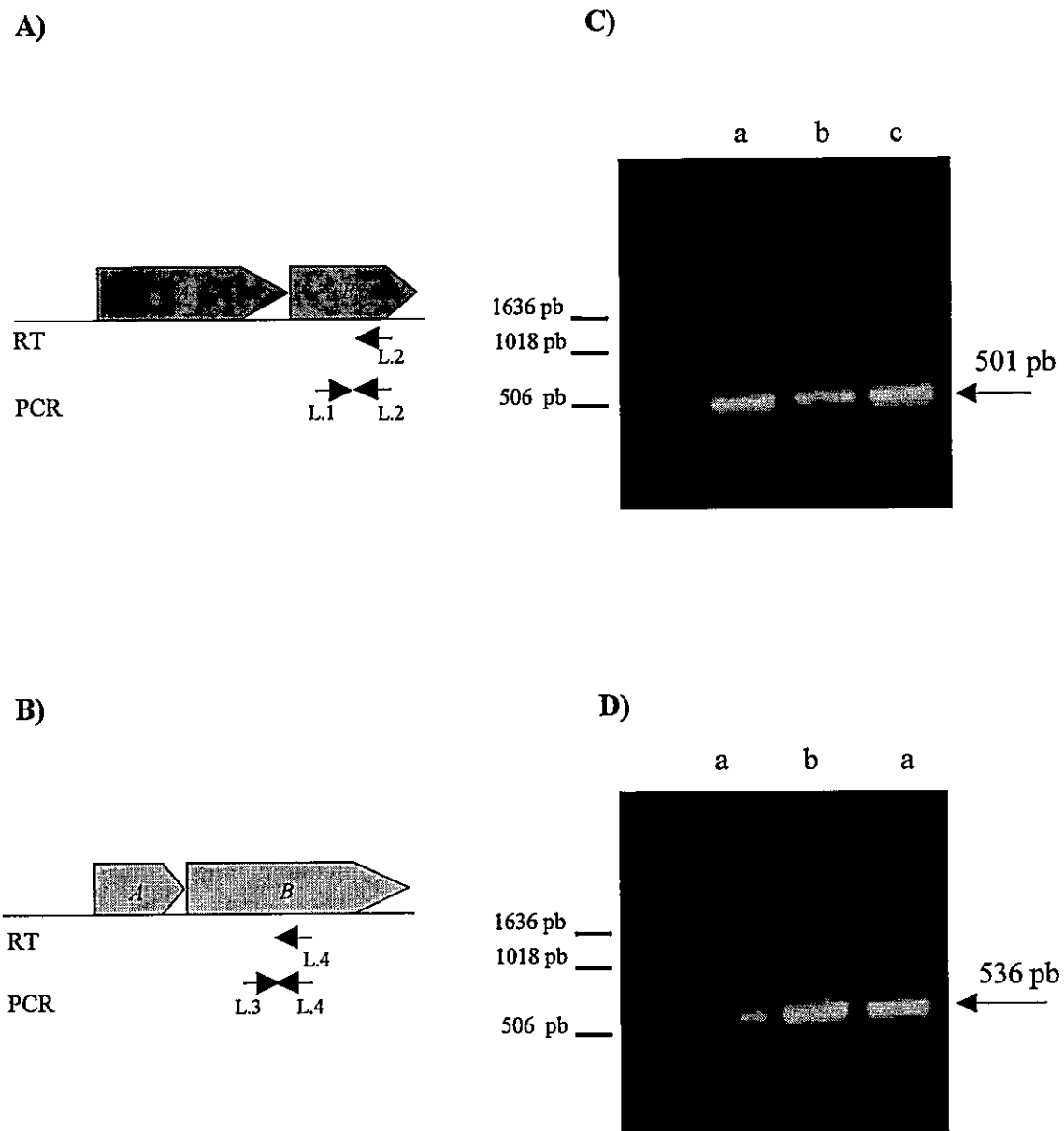
Los resultados del análisis bioinformático predecían la existencia de los genes que codifican para las quinol oxidasas *bd* y *bo<sub>3</sub>*. Para comprobar experimentalmente estos resultados se procedió a la detección de los genes mediante PCR utilizando partidores específicos (Tabla 2) y el DNA genómico obtenido de *A. ferrooxidans* ATCC 19859. Considerando que las secuencias obtenidas en las bases de datos corresponden a una cepa diferente a la estudiada, los partidores se diseñaron en aquellas regiones más conservadas de los genes *cydAB* y *cyoAB*. El DNA genómico de la cepa secuenciada (ATCC23270) se utilizó como control positivo. La reacción de PCR generó fragmentos de tamaño esperado al amplificar los genes *cydAB* y *cyoAB* (Figura 30), lo cual permitió establecer que estos genes se encontraban presentes en el genoma de la cepa estudiada.

## **4. 2 Estudio de la expresión de los genes *cyd* y *cyo*.**

**4. 2. 1. Detección de mRNAs específicos.** La expresión de los genes *cydB* y *cyoB* se estudió mediante la técnica de RT-PCR. Las reacciones de RT y PCR se realizaron utilizando partidores específicos para los genes *cydB* y *cyoB* (Tabla 2). Los experimentos se realizaron extrayendo RNA total de bacterias crecidas en presencia de Fe<sup>2+</sup> o S<sup>o</sup> y llevando a cabo un conjunto de controles similares a los descritos en la sección 1. 3 de Resultados.

La reacción de RT-PCR efectuada en las condiciones anteriormente descritas permitió la obtención de bandas de tamaño esperado para los genes *cydB* y *cyoB* en *A. ferrooxidans* crecido en  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{S}^{\circ}$  (Figura 31C, D). Estos resultados mostraron que los genes se expresaban bajo las condiciones de crecimiento estudiadas. Nuevamente debe destacarse que la metodología empleada no permite realizar estimaciones cuantitativas respecto a los niveles de expresión en cada condición de crecimiento ni entre los genes estudiados.

**4.2.2. Detección de los complejos *bd* y *bo<sub>3</sub>* mediante espectrofotometría.** Una aproximación alternativa para estudiar la expresión de las quinol oxidasas alternativas fue la detección espectrofotométrica de ellas en la cepa estudiada. El análisis espectrofotométrico se realizó con células crecidas en  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{S}^{\circ}$  resuspendidas en tampón  $\beta$ -alanina pH 3,5 y en presencia de un agente reductor (ditionito de sodio 5 mM). En estas condiciones se detectó un pico de absorbancia a 630 nm que correspondía al citocromo tipo-*d* del complejo *bd* (Kamimura y cols., 2001). Los niveles de absorbancia en esta longitud de onda permitieron calcular la concentración relativa de este citocromo en la muestra analizada. Al comparar los contenidos de este citocromo en células crecidas en presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  con aquellas crecidas en presencia de  $\text{S}^{\circ}$ , se pudo establecer que éste alcanza un valor casi dos veces superior en la condición de  $\text{S}^{\circ}$  (0,19 nmoles/mg de proteína) respecto a la condición de  $\text{Fe}^{2+}$  (0,12 nmoles /mg de proteína) (Tabla 9). Este resultado no está registrado en la literatura y podría ser de gran relevancia en la interpretación del papel funcional de este complejo citocromo. Se intentó detectar el complejo *bo<sub>3</sub>* en presencia de diferentes compuestos que puedan actuar como agentes



**Figura 31. Detección de la expresión de los genes *cyd* y *cyo* en *A. ferrooxidans*.** La expresión de los genes fue determinada mediante RT-PCR. **(A)** y **(B)** Localización de los oligonucleótidos utilizados en las reacciones RT y PCR para *cydB* y *cyoB*, respectivamente. **(C)** y **(D)** Análisis de los productos de RT-PCR de los genes *cydB* y *cyoB* por electroforesis en geles de agarosa al 1%. **(a)** cDNA-Fe<sup>2+</sup> **(b)** cDNA-S<sup>0</sup> y **(c)** DNA genómico. La flecha indica el tamaño de la banda obtenida.

Tabla 9

Contenido de proteínas redox en <i>A. ferrooxidans</i> (nmoles proteína/mg de prot. total)			
Citocromos	Hierro	Azufre	Razón Azufre/Hierro
<i>d</i> ( <i>bd</i> )	0.12	0.24	2
<i>a</i> ( <i>aa<sub>3</sub></i> )	0.98	0.057	0.58
<i>c</i>	1.96	0.60	0.31
<i>b</i>	0.35	0.25	0.71

Las células se crecieron en  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{S}^{\circ}$ , se colectaron, se resuspendieron en tampón  $\beta$ -alanina pH 3,5 y se congelaron en  $\text{N}_2$  líquido. Las proteínas redox se identificaron espectrofotométricamente en células enteras y cuantificaron como se indica en la sección II.6.6 de Materiales y Métodos.

reductores incluidos ditionito de sodio, sulfato ferroso y tiosulfato de sodio ya que sus picos de absorbancia máxima se intensifican en estado reducido. Además se utilizó CO para impedir la entrega de electrones al oxígeno ambiental y facilitar la detección espectroscópica del complejo redox. Pese a esto, no se detectó los picos de absorbancia característicos del complejo  $bo_3$ . Estos resultados sugerían que la quinol oxidasa  $bo_3$  no era sintetizada en *A. ferrooxidans* bajo las condiciones estudiadas o estaba presente en concentraciones muy bajas para ser detectadas por espectrofotometría. Esta última alternativa es coherente con la detección de la expresión de los genes *cyo* al nivel del mRNA.

Utilizando la misma estrategia de cuantificación del citocromo *bd*, se determinó los niveles de otros componentes redox de la célula como citocromos tipo-*c*, citocromos tipo-*b* y citocromo oxidasa  $aa_3$  (Tabla 9). Tal como ha sido previamente publicado, las células crecidas en  $Fe^{2+}$  presentaban un mayor contenido de citocromo tipo-*c* (Mansh y Sand, 1992) y  $aa_3$  (Yarzabal y cols., comunicación personal). Los citocromos tipo-*b* presentaban una menor concentración en hierro que en azufre (Mansh y Sand, 1992). Estos datos avalaban las estimaciones realizadas para el citocromo *d* del complejo *bd*.

En resumen, los experimentos anteriormente expuestos han permitido determinar la expresión de los genes *cydB* y *cyoB* durante la oxidación de  $Fe^{2+}$  y  $S^0$ . Además se ha detectado espectrofotométricamente la quinol oxidasa *bd* y se ha determinado un mayor contenido de ésta durante el crecimiento en  $S^0$  respecto a  $Fe^{2+}$ . Estos antecedentes sugieren la participación activa de estos complejo redox en el metabolismo oxidativo de *A. ferrooxidans*. Es razonable pensar que las quinol oxidasas *bd* y/o  $bo_3$  podrían servir

como una vía alternativa para los electrones que se desplazan entre el tiosulfato y el  $O_2$ . Bajo estas condiciones el complejo *bc<sub>1</sub>* no sería un componente esencial para la supervivencia de la bacteria creciendo en  $S^0$ , apoyando la hipótesis sugerida por el fenotipo de la mutante espontánea inicialmente descrita, en la cual los citocromos tipo-c son componentes esenciales sólo en la oxidación de  $Fe^{2+}$ , pero no de compuestos de azufre reducido.

## DISCUSIÓN

Esta investigación se ha basado fundamentalmente en la descripción de una mutante espontánea de *A. ferrooxidans*, la cual había perdido su capacidad de oxidar  $\text{Fe}^{2+}$ , pero no tiosulfato. El fenotipo observado para esta mutante se correlacionaba con una mutación en el gen *resB*, provocada por la interrupción con la secuencia de inserción ISAfe1 (Cabrejos y cols., 1999). En otros organismos el gen *resB* codifica para la proteína ResB, la cual forma parte del sistema de maduración de citocromos de tipo-*c*. Además, río arriba del gen *resB* se identificó parte de un gen cuyo producto era similar a un citocromo *c<sub>1</sub>*, se postuló que el fenotipo mutante se debía a la ausencia de citocromos de tipo *c* maduros, los cuales parecían ser componentes esenciales para la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$ , pero no de tiosulfato. Además, el citocromo *c<sub>1</sub>* podría ser una parte constituyente del complejo *bc<sub>1</sub>*, el cual también podría ser esencial para la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$ , pero no de tiosulfato.

Los resultados expuestos en la sección anterior apoyan la hipótesis establecida respecto a la función del complejo *bc<sub>1</sub>* y el carácter no esencial de éste en la oxidación de compuestos de azufre reducido. A continuación se discutirá en detalle los aspectos más relevantes que derivan de los resultados obtenidos en este trabajo.

## **1. Caracterización de la región génica que contiene los operones *pet1* y *res* y estudio de las proteínas codificadas.**

El operón *pet* resulta particularmente interesante pues los genes que lo constituyen codifican para proteínas redox posiblemente involucradas en una vía oxidativa común. Este tipo de organización ya ha sido sugerido para otros operones redox descritos en *A. ferrooxidans* como por ejemplo el operón *rus*, cuyos productos han sido postulados como los constituyentes destinados a mantener el flujo directo de electrones entre el  $\text{Fe}^{2+}$  y el  $\text{O}_2$  (Appia-Ayme y cols., 1999).

Los análisis de la cotranscripción entre genes contiguos, la determinación de los sitios de inicio de la transcripción de los operones *pet1* y *res*, la identificación de secuencias Shine-Dalgarno putativas para muchos de los genes de los operones *pet1* y *res* y la identificación de un terminador independiente del factor *rho* para el operón *pet1*, permitieron caracterizar detalladamente la organización de los operones *pet1* y *res* (Levicán y col., 200). La identificación del sitio +1 uno de inicio de la transcripción de cada operón, permitió definir las secuencias -10 y -35 putativas, para la unión de la RNA polimerasa. Estas secuencias, se mantienen relativamente bien conservadas respecto al consenso en *E. coli*: -10: TATAAT y -35: TTGACA. En *A. ferrooxidans* existen muy poca información respecto a la estructura y organización de los promotores, no obstante, los promotores experimentalmente probados han mostrado tener secuencias -10 y -35 funcionales en *E. coli* (Kawaguchi y cols., 1997; Inoue y cols., 1990). La reciente publicación de casi la totalidad de la secuencia del genoma de *A. ferrooxidans* podría facilitar la identificación de sitios de unión de la RNA polimerasa en los promotores reconocidos por los diferentes factores sigma (Selkov y cols, 2000).



Las secuencias Shine-Dalgarno putativas establecidas para los genes codificados en el operón *pet1* y *res* son similares a las secuencias putativas descritas para otros genes de *A. ferrooxidans*. Estas secuencias se encuentran disponibles en las bases de datos, pero no han sido probadas experimentalmente. En general, se puede establecer que la secuencia GGAG, se mantiene muy conservada en los todos los sitios de unión al ribosoma descritos para esta bacteria en este trabajo y en las bases de datos. Esta secuencia se mantiene conservada respecto a la secuencia descrita para *E. coli* (AGGAGG).

El análisis del operón *pet1* revela la presencia de un terminador del tipo *rho* independiente, cuya relevancia funcional queda apoyada por su composición (estructura tipo horquilla rica en GC seguida de una secuencia poli U), estabilidad energética y por la presencia de otros terminadores con características similares en otros operones *pet* bacterianos analizados. La presencia de un terminador intrínseco sugiere un control transcripcional de la expresión de la proteínas codificadas en el operón *pet1*. Por otra parte, es sabido que el control de los niveles de complejo *bc<sub>1</sub>* presentes en la célula también obedece a una regulación postraducciona relacionado con el ensamblaje del complejo en la membrana citoplasmática. Un modelo probable de maduración del complejo *bc<sub>1</sub>* plantea que el citocromo *c<sub>1</sub>* se inserta primero en la membrana para facilitar el ensamblaje de los otros componentes (Thöny-Meyer, 1997). En primer lugar, el citocromo *c<sub>1</sub>* se asocia con el citocromo *b* para formar un complejo estable que permite la asociación de la proteína Rieske. Si el complejo no logra ensamblarse adecuadamente, sus componentes serían rápidamente degradados en el interior de la célula. Se ha determinado que mutaciones del citocromo *c<sub>1</sub>* llevan a la degradación del citocromo *b* y de la proteína Rieske (Gerhus y cols., 1990).

Las secuencias de las proteínas codificadas en estos genes mostraron tener una alta similitud con proteínas conocidas en otros organismos. Todas aquellas codificadas en el operón *pet1* son proteínas redox que poseen una alta conservación de aminoácidos funcionalmente relevantes como aquellos involucrados en la unión de sus centros redox.

El citocromo *c<sub>4</sub>* codificado en el operón *pet1* es una proteína dihemínica cuyos sitios de unión al grupo hemo son fácilmente identificables en su secuencia, al igual que en otros citocromos *c<sub>4</sub>* conocidos (Meyer, T. E., 1996). La secuencia de su extremo N-terminal es 100% idéntica a una secuencia de 50 aminoácidos del extremo N-terminal de un citocromo *c<sub>4</sub>* previamente purificado y caracterizado por Guidici-Orticoni y cols. (2000). El primer aminoácido del citocromo *c<sub>4</sub>* microsecuenciado corresponde al residuo número 36 del citocromo *c<sub>4</sub>* codificado por *cycA*, sugiriendo nuevamente que este citocromo posee una secuencia señal que es procesada por una peptidasa y posteriormente es liberado hacia el periplasma.

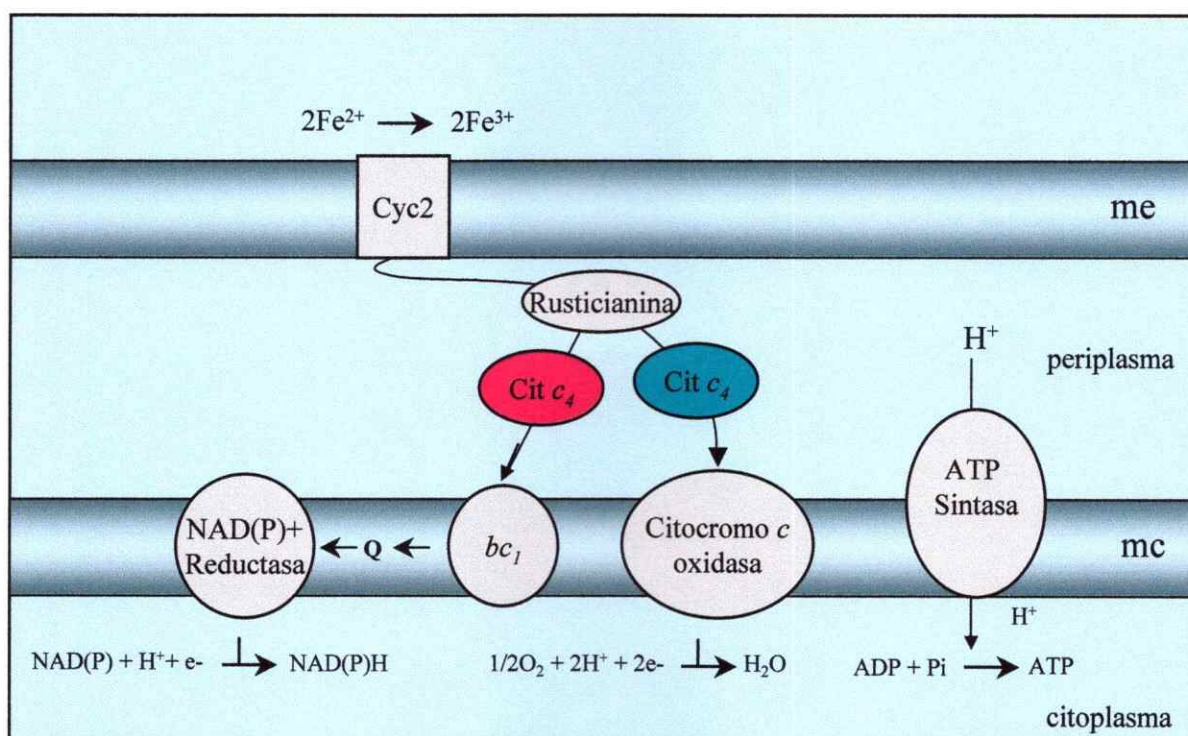
El citocromo *c<sub>4</sub>* purificado posee una masa molecular aparente de 26,6 kDa, un pI de 8,0, una localización periplasmática y lleva unidos dos grupos hemo. Este citocromo *c<sub>4</sub>* fue completamente reducido por  $\text{Fe}^{2+}$ . En este caso la tasa de oxidación del  $\text{Fe}^{2+}$  fue similar a la observada en los cultivos mantenidos en condiciones de laboratorio (Guidici-Orticoni y cols., 2000). Los investigadores también estudiaron la conducta redox de un citocromo *c<sub>4</sub>* de 21 kDa, previamente descrito, pero no detectaron una reducción significativa de este citocromo en ausencia de rusticianina (Cavazza y cols., 1996). Por este motivo propusieron que el citocromo *c<sub>4</sub>* de 26,6 kDa sería el aceptor inicial en la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$ . No obstante, debido a que el gen que codifica para este citocromo *cycA* se cotranscribe con los genes de otras proteínas redox como el complejo *bc<sub>1</sub>*, nosotros proponemos que durante la

oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  este citocromo  $c_4$  estaría involucrado en el flujo invertido de electrones entre el  $\text{Fe}^{2+}$  y el  $\text{NAD(P)}^+$  y su función podría estar relacionada con la transferencia de electrones entre la rusticianina y el complejo  $bc_1$ . Según este modelo, la proteína rusticianina sería el nodo de bifurcación del flujo directo de electrones hacia el  $\text{O}_2$  e invertido hacia el  $\text{NAD(P)}^+$ .

La capacidad de la rusticianina para interactuar con un citocromo  $c_4$  fue descrita previamente (Giudici-Orticoni y cols., 1999). Los investigadores describieron la formación de un complejo con un citocromo  $c_4$  de 21 kDa y postularon que ésta interacción representaría un segmento genuino de la cadena transportadora de electrones desde el  $\text{Fe}^{2+}$  hacia el  $\text{O}_2$ . Basándonos en este antecedente y dada la co-localización y la similitud existente entre los citocromos de 21 y 26,6 kDa (57%) es posible postular que el citocromo  $c_4$  de 26,6 kDa también interacciona con la rusticianina desviando los electrones hacia el  $\text{NAD(P)}^+$ . La afinidad diferencial de la rusticianina por estos citocromos podría constituir una parte del mecanismo de regulación del flujo de electrones hacia el  $\text{NAD(P)}^+$  o hacia el  $\text{O}_2$ , según sean los requerimientos de la célula (Figura 32).

La proteína SDR codificada por gen *sdrA* presenta conservación de residuos de importancia funcional y ciertas características de las ribitol/glucosa reductasas. Las ribitol deshidrogenasas generan  $\text{NAD(P)H}$  desde  $\text{NAD(P)}^+$  mediante la oxidación de ribitol a ribulosa. El  $\text{NAD(P)H}$  y la ribulosa generados en esta reacción podrían ingresar al ciclo de Calvin. Esto sugiere un modelo en que la activación de *sdrA* podría ayudar a estimular el ciclo de Calvin que utiliza el  $\text{NAD(P)H}$  generado en el flujo invertido de electrones.

Adicionalmente, la proteína SDR apareció asociada fundamentalmente a la fracción membranosa de la célula, lo cual no se correlaciona con las predicciones hechas mediante



**Figura 32. Modelo propuesto para la función del citocromo  $c_4$  codificado en el operón *pet1* en la oxidación de hierro en *A. ferrooxidans*.** Se indica el flujo de electrones desde el  $\text{Fe}^{2+}$  hacia el  $\text{O}_2$  o el  $\text{NAD(P)}^+$ . El color rojo destaca al citocromo  $c_4$  de 26,6 kDa codificado en el operón *pet1* y el color verde destaca al citocromo  $c_4$  de 21 kDa codificado en el operón *rus*.

análisis computacional debido a que no se detectó una secuencia señal típica y la probabilidad de formar  $\alpha$ -hélices hidrofóbicas es baja para esta proteína. Es probable que la proteína no esté anclada a la membrana, sino que se asocie a ella superficialmente con una alta afinidad al igual que otras proteínas redox solubles como el citocromo  $c_2$  de la mitocondria y algunas bacterias fotosintéticas (Daldal y cols., 2001).

La identificación de los genes *petABC1* que codifican para las subunidades del complejo *bc<sub>1</sub>* concuerda con la caracterización previa de un complejo *bc<sub>1</sub>* en *A. ferrooxidans*. Ingledew y Cobley (1980) propusieron su participación en la vía oxidativa de  $\text{Fe}^{2+}$  cuando detectaron un citocromo  $c_1$  en las preparaciones de membrana de *A. ferrooxidans* mediante espectrofotometría. Posteriormente el complejo ha sido caracterizado más ampliamente respecto de sus propiedades y funciones mediante parámetros espectrofotométricos y potenciométricos en conjunto con métodos polarográficos y el uso de inhibidores específicos (Brugna y cols., 1999; Elbehti y cols., 1999; Elbehti y cols., 2000). El complejo *bc<sub>1</sub>* participa en el flujo invertido de electrones entre el  $\text{Fe}^{2+}$  y el  $\text{NAD(P)}^+$ . No obstante, todas las consideraciones hechas respecto de sus propiedades y funciones están referidas a la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$ . Previo a este trabajo, se desconocía absolutamente la función del complejo y de las otras proteínas codificadas en el operón *pet* en la oxidación de compuestos de azufre reducido por *A. ferrooxidans*.

El papel funcional del complejo *bc<sub>1</sub>* en la oxidación de compuestos de azufre reducido fue sugerido por la detección de las proteínas codificadas en los operones *pet1* y/o *pet2* en extractos de células de *A. ferrooxidans*. La inmunodetección reveló la presencia de las proteínas SDR, citocromo  $c_1$  y Rieske en *A. ferrooxidans* crecido en  $\text{Fe}^{2+}$  y en  $\text{S}^0$ , sin que sea posible detectar diferencias en las concentraciones relativas de estas proteínas en la

célula. Estos resultados concordaban con la tesis de que el complejo *bc<sub>1</sub>* y posiblemente las otras proteínas codificadas en el operón *pet1* y *pet2* desempeñarían también una función en la oxidación de compuestos de azufre reducido.

Adicionalmente la inmunodetección de las proteínas revela que éstas están en concentraciones relativamente similares en la condición de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{S}^{\circ}$ . Este resultado fue inesperado debido a que los genes que codifican para las proteínas redox en otros sistemas, están generalmente sujetas a una regulación estricta que está relacionada con la disponibilidad de nutrientes y con la ausencia o presencia de diferentes dadores y/o aceptores de electrones. En *E. coli*, por ejemplo, se han identificado 15 diferentes deshidrogenasas primarias y 10 oxidasas terminales, las cuales constituyen vías metabólicas alternativas que facilitan la adaptación de los sistemas respiratorios a los requerimientos específicos. En esta bacteria la regulación de la expresión de estos componentes está dirigida por varios sistemas reguladores que incluyen NarXQ, NarLP, ArcAB y Fnr (Unden y Bongaerts, 1997).

En *A. ferrooxidans* la síntesis diferencial de componentes redox es claramente ejemplificada con la proteína rusticianina la cual es principalmente detectada durante el crecimiento en  $\text{Fe}^{2+}$  (Mjoli y Kulpa, 1988; Jedlicki y cols., 1986) llegando a constituir hasta el 5% de la proteína total (Cobley y Haddock, 1975; Cox y Boxer, 1978). La proteína es detectada en menor cantidad durante el crecimiento en  $\text{S}^{\circ}$  y  $\text{H}_2$ , aunque en este último caso no posee un centro redox, lo cual sugiere la existencia de un mecanismo adicional de regulación postraduccional (Ohmura y cols., 2002a). También se ha comunicado la síntesis diferencial de algunos citocromos tipo-c (Yarzabal y cols., 2002b). Cuando *A. ferrooxidans* crece oxidando  $\text{Fe}^{2+}$  o  $\text{S}^{\circ}$  al menos ocho citocromo tipo-c putativos son detectados en geles

de poliacrilamida. En general, los niveles de estos citocromos son inferiores en células crecidas en S°. Uno de ellos es específico para la condición de S°, mientras que tres de ellos son específicos para la condición de Fe<sup>2+</sup>. Recientemente se ha descrito y caracterizado un citocromo tipo-*c* que es sintetizado bajo condiciones de anaerobiosis cuando la bacteria oxida H<sub>2</sub> y reduce Fe<sup>3+</sup> (Ohmura y cols., 2002a). Estos antecedentes sugieren que en *A. ferrooxidans* la síntesis de proteínas redox es modulada por el donante y/o aceptor de electrones presente en el medio de crecimiento.

La similitud en los patrones de síntesis de las proteínas estudiadas en las condiciones de Fe<sup>2+</sup> y S° puede ser explicada por la existencia de dos copias del operón *pet*. La expresión de estos operones ha sido estudiada en nuestro laboratorio y también por el grupo de la Dra. Bonnefoy (C. N. R. S, Marsella, Francia). En experimentos iniciales realizados por nuestro grupo de investigación sobre la expresión de los operones *pet1* y *pet2* a nivel de mRNA se ha encontrado que *pet1* se expresa mayoritariamente en Fe<sup>2+</sup> y *pet2* en S°. Estas diferencias en los niveles de expresión de estos operones pueden ser de amplia relevancia funcional para la bacteria, punto que será discutido en profundidad más adelante.

La acumulación de información de secuencias de genomas en las bases de datos ha dejado en evidencia que la duplicación de genes parece ser un fenómeno generalizado en los genomas bacterianos (Lynch, 2002). En este trabajo hemos identificado dos copias del operón *pet* en *A. ferrooxidans* 19859 y 23270. Nosotros postulamos dos hipótesis posibles para explicar la redundancia de estos genes en este microorganismo: 1) la duplicación de genes puede estar relacionada a la dosis genética necesaria para alcanzar las concentraciones requeridas del componente redox. Así por ejemplo, en *Shewanella sp.* se han identificado cuatro copias de un gen que codifica un citocromo tipo-*c* que se expresa en

conjunto para aumentar la dotación de estos citocromos durante la reducción de  $\text{Fe}^{3+}$  (Dobbin y cols., 1999) En *A. ferrooxidans* se han identificado 11 genes que codifican para citocromos tipo-*c* en el genoma de la cepa ATCC 23270 (Yarzabal y cols., 2000b). Además se ha observado que la utilización de  $\text{Fe}^{2+}$  como sustrato de crecimiento por diferentes cepas conduce a la síntesis de niveles elevados de citocromos tipo-*c*, lo cual puede ser el resultado de la expresión simultánea de diferentes genes en la célula (Yarzabal y cols., 2002b). 2) de forma alternativa, las diferentes copias de los genes estudiados podrían expresarse diferencialmente para originar proteínas que estarían involucradas en diferentes vías redox bajo distintas condiciones de crecimiento de la bacteria. Esta hipótesis se basa en la expresión diferencial a nivel del mRNA observada para los operones *pet1* y *pet2* en la condición de  $\text{Fe}^{2+}$  y de  $\text{S}^{\circ}$  y en las diferencias en los contextos genéticos de los genes duplicados.

## **2. Estudio de la función del complejo *bc<sub>1</sub>* en la oxidación de compuestos de azufre reducido.**

### **2.1. La estrategia genética.**

Nuestra hipótesis planteaba que las proteínas Res codificadas en el operón *res* estarían involucradas en la biogénesis del citocromo *c<sub>1</sub>* (del complejo *bc<sub>1</sub>*) y el citocromo *c<sub>4</sub>* codificados en el operón *pet1*. Debido a que la mutante inicialmente descrito fue perdido no estaba disponible para ser analizado. Por esto nos planteamos la posibilidad de generar mutantes para los genes *resB* y/o *petC1* mediante una estrategia genética recientemente descrita. Esta estrategia, conocida como "mutagénesis por intercambio de marcadores", fue exitosamente utilizada para mutar el gen *recA* de *A. ferrooxidans* ATCC 33220 (Liu y cols.,



2000). No obstante, siguiendo la misma estrategia metodológica, no fue posible obtener mutantes para los genes deseados.

De igual forma, no ha sido posible obtener mutantes para los genes *resB* y *resC* de *Synechocystis sp.* y *B. subtilis* mediante mutagénesis por transposición (Le Brun y cols., 2000). Por esta razón, se ha planteado que estos genes son esenciales para el crecimiento y la supervivencia de estos organismos. No obstante, la descripción de la mutante *resB::ISAfe1* de *A. ferrooxidans* deja dudas acerca de este planteamiento. Además de la mutante de *A. ferrooxidans* descrita por nuestro grupo de investigación, se han descrito otras mutantes para los genes de biogénesis de citocromos de tipo *c* en otros organismos. En *Chlamydomonas reinhardtii* se identificó una mutante para el gen *ccsA* (Tichy y Vermaas, 1999). En este caso la mutación llevó a la ausencia de la proteína CcsA (homólogo de la proteína ResC), lo cual se correlacionó con la carencia absoluta de los citocromos tipo-*c* en este organismo. Además, se han descrito mutantes que tienen afectados procesos metabólicos tales como la resistencia al cobre (Yang y cols., 1996), producción de pioverdina, oxidación de  $Mn^{2+}$  ( Caspi y cols., 1998), isomerización de ácidos grasos no saturados (Holtwick y cols., 1999) y oxidación de gluconato (Pujol y Kado, 2000). Todos éstos carecen de citocromos tipo-*c* debido a mutaciones en genes involucrados en su maduración. Estos ejemplos sugieren que, al menos, en estos organismos los genes de biogénesis de citocromos de tipo-*c*, no son esenciales para el crecimiento.

Adicionalmente, algunos organismos pueden llevar a cabo determinadas funciones metabólicas sin la participación de citocromos de tipo *c*. *E. coli* (Simon, 2002) y *P. denitrificans* (Carr y Ferguson, 1990) precinden de los citocromo tipo-*c* durante el crecimiento anaerobio utilizando nitrato como aceptor de electrones. Es factible que *A.*

*ferrooxidans* también pueda prescindir de los citocromos tipo-*c* para la oxidación de tiosulfato. Se ha establecido que los citocromos tipo-*c* están implicados en las vías de oxidación de compuestos de azufre reducido de un grupo numeroso de bacterias tales como *Shewanella putrefaciens* (Pealing y cols., 1992), *Chlorobium limicola* (Klarskov y cols., 1998) y *Rhodovulum sulfidophilum* (Appia-Ayme y cols., 2001). No obstante, en *A. ferrooxidans*, la existencia de un sistema quinol oxidasa como *bd* y/o *bo<sub>3</sub>* permitiría prescindir de los citocromo tipo-*c* como el citocromo *c<sub>1</sub>* y *c<sub>4</sub>* codificados en el operón *pet1*.

A la fecha, la técnica de “mutagénesis por intercambio de marcadores” descrita por Liu y cols. (2000) no ha podido ser reproducida exitosamente, lo cual puede deberse a una variedad de factores que afectan la eficiencia de la técnica. La falta de éxito en la generación de mutantes en los genes *resB* y *petc1* en *A. ferrooxidans* pudo deberse al estado fisiológico de las cepa dadora y receptora, el cual pudo haber ejercido un efecto sobre la eficiencia de la conjugación. Factores tales como el pH ( $\cong 5,0$ ) del medio de conjugación pueden tener un efecto significativo. Adicionalmente, se ha propuesto la existencia de un mecanismo de restricción modificación (Kusano y cols., 1992b), que podría conducir a la eliminación del plasmidio introducido por conjugación desde *E. coli*. Sin duda que, el control adecuado de éstos y otros factores ayudará al desarrollo de esta técnica o de otras estrategias genéticas, facilitando los estudios futuros en este microorganismo y permitiendo establecer la función de proteínas, cuyo papel fisiológico aun no ha sido determinado.

## 2. 2. La estrategia biofísica

La participación y función del complejo *bc<sub>1</sub>* en la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  fue propuesta inicialmente por Ingledew (1982), pero debieron transcurrir casi 20 años hasta que aparecieron las primeras evidencias experimentales acerca de su participación en el flujo

invertido de electrones existente entre el  $\text{Fe}^{2+}$  y el  $\text{NAD(P)}^+$  (Elbehti y cols., 2000). No obstante, la función del complejo  $bc_1$  resultaba completamente desconocida en la oxidación de otros sustratos como por ejemplo, compuestos de azufre reducido. Aquí se ha abordado parcialmente esta problemática analizando la función durante la oxidación de tiosulfato. Se planteó un modelo coherente con la participación del complejo en el flujo directo de electrones entre el tiosulfato y el oxígeno. En el modelo de oxidación del tiosulfato que hemos propuesto, la función del complejo  $bc_1$  es similar a la descrita en la mitocondria y en bacterias como *P. denitrificans*, *R. capsulatus* y *C. limicola* (Trumpower, 1990; Richardson, 2000; Otten y cols., 2001). Muchas de las funciones redox asociadas directa o indirectamente a la función del complejo  $bc_1$  han sido detectadas en *A. ferrooxidans* crecido en  $\text{Fe}^{2+}$  y en  $\text{S}^0$ , aunque están mayoritariamente activadas en esta última condición. En esta investigación fuimos capaces de identificar la presencia de una actividad tiosulfato:quinona reductasa, quinol oxidasa y citocromo *c* oxidasa. La participación del complejo  $bc_1$  queda evidenciada más fehacientemente al utilizar inhibidores específicos del complejo  $bc_1$ , como estigmatelina, mixotiazol y antimicina. Estos compuestos tienen un efecto inhibitor significativo sobre las actividades respiratorias de células que han sido crecidas en azufre elemental y que utilizan tiosulfato o un análogo de quinol como única fuente de electrones, lo cual está sugiriendo que el complejo  $bc_1$  participa en la cadena transportadora de electrones entre el tiosulfato y el  $\text{O}_2$ .

Por el contrario, los inhibidores no ejercen efecto sobre la actividad respiratoria de células crecidas en presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  y que utilizan tiosulfato como única fuente de electrones. Esta observación constituye un aspecto muy interesante de analizar, pues nos sugiere que la oxidación de tiosulfato en *A. ferrooxidans* crecido en  $\text{Fe}^{2+}$  procede a través

de una vía que no involucra al complejo  $bc_1$  y por lo tanto, es diferente a la vía que funciona en aquellas células crecidas en azufre elemental. Nosotros sabemos que este complejo está presente en *A. ferrooxidans* durante la oxidación de  $Fe^{2+}$ , pero bajo estas condiciones de crecimiento, el complejo sólo funciona en el flujo invertido de electrones y no en el flujo directo. Esta última vía podría no constituirse debido a la ausencia de otros componentes esenciales para el normal funcionamiento de ella, como por ejemplo el sistema tiosulfato:quinona oxidoreductasa, cuya actividad ha sido detectada en este trabajo como mayoritariamente superior en aquellas células crecidas en  $S^0$  respecto a  $Fe^{2+}$ . Otro factor relevante en esta diferenciación funcional del complejo  $bc_1$  podría radicar en la existencia de dos tipos de complejo  $bc_1$ , los cuales derivarían de los operones *pet1* y *pet2*, respectivamente. Algunos elementos intrínsecos a cada complejo podrían afectar su capacidad de interaccionar con los diferentes componentes de las vías invertida o directa lo cual permitiría regular el funcionamiento de ellos en cada una de éstas. Un ejemplo es las pequeñas diferencias en los valores de pI de las proteínas que componen estos complejos, como el citocromo  $c_1$  que posee valores de pI de 9,63 y 9,08, según corresponda al operón *pet1* o *pet2*, respectivamente. Sin duda que la total comprensión de esta problemática requerirá de un abordaje experimental que deberá estar relacionado con la identificación de las proteínas redox que constituyen estas vías y con el estudio de su capacidad para interaccionar entre sí.

La detección de todas las actividades antes descritas es coherente con la participación del complejo  $bc_1$  en el flujo directo de electrones entre el tiosulfato y el  $O_2$ . La función de este complejo en el flujo invertido de electrones durante la oxidación de  $S^0$  o tiosulfato no fue evaluada, sin embargo, ésta parece improbable debido a que los

potenciales redox de estos compuestos ( $E^\circ_{\text{S}_2\text{O}_3} = -0,402 \text{ V}$ ;  $E^\circ_{\text{S}^\circ} = -0,270 \text{ V}$ ) permitirían acoplar su oxidación a la reducción directa de  $\text{NAD(P)}^+$  ( $E^\circ = -0,320 \text{ V}$ ) sin necesidad de mantener un flujo invertido de electrones.

Una actividad tiosulfato oxidasa en *A. ferrooxidans* fue inicialmente caracterizada por Silver y Lundgren (1968), pero no existía información acerca la cadena transportadora de electrones involucrada en la oxidación de este sustrato, lo cual resulta fundamental para comprender los mecanismos de conservación de la energía en relación a la teoría quimiosmótica. Los resultados obtenidos dan cuenta de la función del complejo  $bc_1$  en el flujo directo de electrones entre el tiosulfato y el oxígeno. Dada la función conocida del complejo  $bc_1$  en la translocación de protones a través de la membrana utilizando la energía liberada en el transporte de electrones es posible presumir que durante la oxidación de tiosulfato la cadena respiratoria operante está involucrada en la translocación de protones desde citoplasma hacia el periplasma y por lo tanto en la generación activa de un gradiente de protones a través de la membrana tal como ocurre en la bacterias neutrófilas y en la mitocondria (Trumpower y Gennis, 1994). Esta observación constituiría una diferencia sustancial con el modelo propuesto durante la oxidación de hierro.

Por otra parte, la información obtenida pone de manifiesto la existencia de una actividad tiosulfato:quinona reductasa que no había sido descrita previamente para esta bacteria. Esta actividad mostró ser 26 veces superior en las células crecidas en azufre elemental respecto a las células crecidas en  $\text{Fe}^{2+}$ , por lo cual se asumió que esta actividad tenía un papel relevante en la oxidación de tiosulfato, no obstante, la actividad respiratoria medida en presencia de un análogo de quinol, el  $\text{DBH}_2$ , mostró ser sólo 2 veces superior en  $\text{S}^\circ$  que en  $\text{Fe}^{2+}$ . Esta diferencia podría deberse a que la actividad respiratoria en presencia de

DBH<sub>2</sub> fue medida en membranas celulares, debido a que no pudo ser detectada en las células enteras. La actividad quinol oxidasa responsable de la oxidación del DBH<sub>2</sub>, pudo haberse afectado durante el proceso de obtención de las membranas celulares. También debe tenerse presente que el análogo de quinol utilizado difiere del quinol endógeno presente en *A. ferrooxidans* (quinol-8) (Short y cols., 1969).

Los ensayos realizados para determinar la función del complejo *bc<sub>1</sub>* en la oxidación del tiosulfato fueron realizados con células o membranas celulares derivadas de células crecidas en S°. Esta diferencia puede no tener mucha relevancia si se considera que el tiosulfato es un producto generado de la oxidación de S° realizada por bacterias como *A. ferrooxidans* (Shihari y cols., 1993) y *A. thiooxidans* (Suzuki, 1965). Se ha postulado que el tiosulfato podría constituir un dador de electrones para aquellas células que permanecen en estado planctónico durante el crecimiento de *A. ferrooxidans* en S°. De esta manera las células crecidas en S° poseerían la capacidad metabólica para oxidar el tiosulfato. Estas observaciones validan las conclusiones derivadas de esta investigación, permitiendo extrapolar los resultados obtenidos hacia el sistema *in vivo*.

Los resultados obtenidos respecto a la función del complejo *bc<sub>1</sub>* en la oxidación del tiosulfato dejan dos aspectos importantes de discutir:

A) ¿Qué factores determinan que el complejo *bc<sub>1</sub>* funcione diferencialmente en la condición de Fe<sup>2+</sup> y de S°?

Este punto fue analizado previamente en esta discusión, no obstante, restan algunos aspectos importantes de mencionar.

*A. ferrooxidans* es el único organismo conocido que contiene dos complejos *bc<sub>1</sub>* clásicos, es decir, que tienen sus citocromos *c<sub>1</sub>* conservados. Las subunidades proteicas que

constituyen estos complejo son sintetizadas en niveles equivalentes en ambas condiciones de crecimiento. No obstante, al estudiar la expresión al nivel del mRNA se observa que existen diferencias en bacterias crecidas en  $\text{Fe}^{2+}$  con aquellas crecidas en  $\text{S}^{\circ}$ . Esto sugiere que existiría una diferenciación funcional de ambos complejos y de los productos de los operones *pet1* y *pet2*, de modo que el complejo *bc<sub>1</sub>* derivado de *pet1* funcionaría fundamentalmente en la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  y el complejo *bc<sub>1</sub>* derivado de *pet2* funcionaría en la oxidación de  $\text{S}^{\circ}$  y otros compuestos de azufre reducido. La proteína Rieske, el citocromo de *b* y el citocromo *c<sub>1</sub>* codificados en ambos operones conservan estrictamente los residuos involucrados en la función redox, es probable que ambos complejos se desempeñen de manera similar en su función oxidoreductora. No obstante, debemos recordar que las proteínas codificadas en los operones *pet1* y *pet2* tienen porcentajes de similitud de aproximadamente 60-70%. Las diferencias existentes en las secuencias aminoacídicas podrían ser relevantes en su capacidad de interactuar con los diferentes componentes de las vías transportadoras de electrones inversa y directa, regulándose su función en cada una de ellas.

La función probable del complejo *bc<sub>1</sub>* derivado del operón *pet2* en la oxidación de compuestos de azufre reducido, encuentra su principal obstáculo en los antecedentes descritos para la proteína hipip. Como lo hemos descrito, el operón *pet2* codifica para una proteína altamente similar a la proteína hipip de una cepa privada de *A. ferrooxidans*. Esta proteína ha sido involucrada en la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$ , postulándose como el sistema  $\text{Fe}^{2+}$  oxidasa de la célula (Fry y cols., 1986; Yamanaka y cols., 1991; Guidici-Orticoni y cols., 2000). Si la proteína hipip es codificada por el gen *iro2* del operón *pet2*, entonces su

relevancia funcional en la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  sería extrapolable al complejo *bc<sub>1</sub>* codificado en este operón, lo cual está en evidente contradicción con nuestra hipótesis.

No obstante, la postulación de la proteína hipip como aceptor inicial de electrones del  $\text{Fe}^{2+}$  es inconsistente con las siguientes observaciones: **a)** La proteína hipip ha sido detectada y estudiada principalmente en bacterias fotosintéticas, donde transfiere electrones desde el complejo *bc<sub>1</sub>* hacia el centro de reacción fotosintético (Menin y cols., 1998) o hacia una oxidasa terminal (Bonora y cols., 1999; Pereira y cols., 1999). **b)** Esta proteína no ha sido detectada en algunas cepas (TF-3 y F424) de *A. ferrooxidans*. **c)** Se ha sugerido que la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$ , podría ocurrir en el medio externo de la célula (Yarzabal y cols., 2002a), no obstante, la proteína hipip es una proteína soluble del periplasma bacteriano (Cavazza y cols., 1995). **d)** El operón *pet2* se expresa mayoritariamente durante el crecimiento en  $\text{S}^{\circ}$  respecto a  $\text{Fe}^{2+}$ . En conjunto, estos antecedentes sugieren que durante la oxidación de  $\text{S}^{\circ}$  la proteína podría funcionar como un transportador intermedio con carácter no esencial y no constituiría parte del sistema  $\text{Fe}^{2+}$  oxidasa de *A. ferrooxidans*. Es probable que durante la oxidación de  $\text{S}^{\circ}$  o tiosulfato la proteína hipip funcione asociada al complejo *bc<sub>1</sub>* en el flujo directo de electrones hacia el  $\text{O}_2$ .

Este análisis permite postular que los productos codificados en el operón *pet2* pueden ser de mayor relevancia funcional que los productos codificados en el operón *pet1* en la oxidación de tiosulfato. Por su parte, este último podría ser más relevante en hierro. Como ya se ha mencionado, esto es coherente con los patrones de expresión de estos operones en ambas condiciones de crecimiento.

**B)** La función diferenciada del complejo *bc<sub>1</sub>* en la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  y tiosulfato se contradice con el modelo de oxidación de tiosulfato propuesto por Kurosawa (1994), quien



ha sugerido que la oxidación de este sustrato procede a través del sistema FIR descrito previamente por Sugio (Sugio y cols., 1985; Sugio y cols., 1988; Sugio y cols., 1992). En este sistema la oxidación de  $S^{\circ}$  y sus subproductos ocurre acoplada a la reducción de ion férrico. El ion ferroso generado puede ser posteriormente oxidado por las vía general de oxidación de  $Fe^{2+}$ . De esta manera se espera que la síntesis de proteínas redox en la condición de  $Fe^{2+}$  y  $S^{\circ}$  sea equivalente, observándose diferencias sólo al nivel del sistema FIR. La evidente contradicción existente entre nuestros resultados y el modelo descrito por Sugio no constituye un hecho aislado, ya que existe una serie de observaciones descritas en la literatura que no pueden ser explicadas a través de este modelo, así por ejemplo: a) se ha demostrado que la transferencia de electrones entre el  $S^{\circ}$  y el ion férrico involucra la participación de componentes citoplasmáticos, lo cual no concuerda con la existencia de un sistema periplasmático propuesto por Sugio. b) Cuando *A. ferrooxidans* es crecido en un quimiostato bajo condiciones limitadas de tetrionato (un intermediario de la oxidación de  $S^{\circ}$  y tiosulfato), la vía de oxidación de  $Fe^{2+}$  está completamente reprimida, c) el  $Fe^{3+}$  no estimula la oxidación aerobia de  $S^{\circ}$  (Corbett e Ingledew, 1987) y d) es sabido que la producción bacteriana (expresada como g de biomasa por mol de electrones) es mayor en  $S^{\circ}$  que en  $Fe^{2+}$ , sin embargo, si la oxidación de azufre y otros compuestos de azufre reducido está acoplada a la reducción de ion férrico se espera que la producción de biomasa sea menor en  $S^{\circ}$  que en  $Fe^{2+}$ .

### **3. Vías quinol oxidasa alternativas al complejo $bc_1$ .**

Los estudios realizados con inhibidores específicos del complejo  $bc_1$  mostraron que estos compuestos inhibían la actividad respiratoria de la bacteria en presencia de tiosulfato

o de un análogo de quinol, no obstante, en todos los casos esta inhibición no fue total ni alcanzó valores muy elevados, lo cual sugirió la existencia de un flujo de electrones entre el tiosulfato y el  $O_2$  que es independiente del complejo  $bc_1$ . La identificación de los genes que codifican para dos quinol oxidasa terminales permitió plantear la hipótesis de que el flujo de electrones independiente de  $bc_1$  puede estar determinado por las quinol oxidasas  $bd$  y/o  $bo_3$ . Los análisis de la expresión de los genes  $cyd$  y  $cyo$  revelaron que ellos se expresan en la célula en la condición de  $Fe^{2+}$  y de  $S^\circ$ , además la quinol oxidasa  $bd$  es detectada por espectrofotometría. En conjunto, estos antecedentes permiten plantear la existencia de cadenas transportadoras de electrones ramificadas durante la oxidación de tiosulfato (Figura 33).

La presencia de los genes que codifican a las quinol oxidasa  $bd$  y  $bo_3$  y la citocromo  $c$  oxidasa  $aa_3$  en *A. ferrooxidans* pone de manifiesto la presencia de cadenas transportadoras de electrones ramificadas. Este hecho puede conferir a la bacteria ventajas adaptativas en el ambiente natural, ya que le permite adecuarse a la presencia de diferentes donadores ( $Fe^{2+}$ ,  $S^\circ$ ,  $H_2$  y formiato) y aceptores de electrones ( $O_2$ ,  $S^\circ$  y  $Fe^{3+}$ ). Además, la afinidad diferencial de las oxidasas terminales por el  $O_2$ , facilita la supervivencia y el crecimiento en ambientes con alta fluctuación en los niveles del  $O_2$ . Finalmente la ramificación de las cadenas al nivel de la coenzima Q le concede una ventaja adicional, que es eludir el efecto de los inhibidores naturales del complejo  $bc_1$ . En general la utilización del complejo  $bc_1$  puede resultar ventajosa debido a que es altamente eficaz en la conservación de la energía. No obstante, este complejo es blanco de diferentes inhibidores presentes en el medio ambiente, lo cual ha llevado a muchos organismos que utilizan el complejo  $bc_1$  como bacterias (Trumpower,

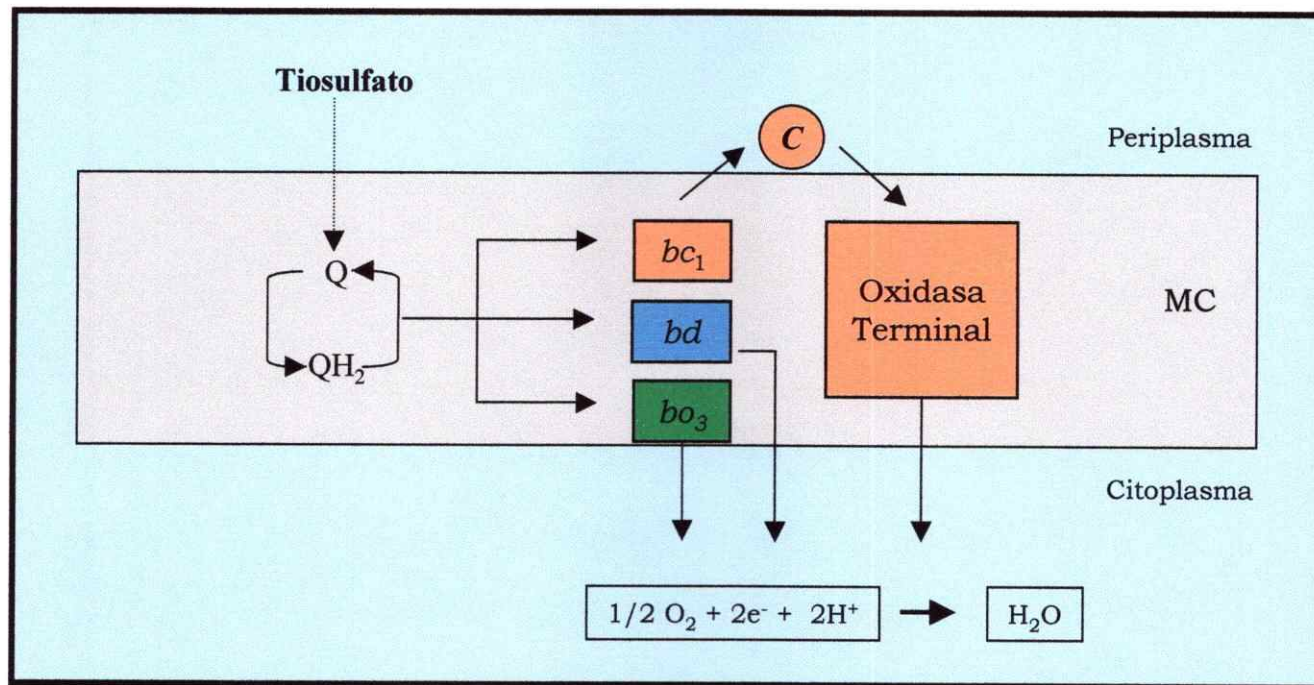


Figura 33. Modelo final propuesto para la cadena transportadora de electrones involucrada en la oxidación del tiosulfato en *A. ferrooxidans*. La flecha segmentada indica la existencia uno o más componentes redox con actividad tiosulfato quinona oxidoreductasa.

1990 ), protozoos (Moreno-Sánchez y cols., 2000) y plantas (Affourtit y cols., 2002) a desarrollar vías alternativas que le permiten eludir el efecto de estos inhibidores.

La existencia de redes metabólicas complejas queda también en evidencia al examinar las bases de datos existentes para *A. ferrooxidans*, ya que éstas muestran la presencia de genes que codifican para una variedad de sistemas deshidrogenasa como SQR (Sufuro:quinona reductasa), NADH deshidrogenasa tipo-I (NADH-I), NAD deshidrogenasa tipo-II (NADH-II) e hidrógeno:quinona reductasa. Considerando los aspectos antes discutidos, es probable que en *A. ferrooxidans* la existencia de las oxidasas terminales  $aa_3$ ,  $bd$  y  $bo_3$  y de los diferentes sistemas deshidrogenasa está contribuyendo significativamente a la adecuación y mantenimiento del metabolismo energético en diferentes condiciones del ambiente y requerimientos energéticos de la célula. El planteamiento de un modelo con estas características trae consigo un panorama complejo y difícil de esclarecer, el cual sumado a la imposibilidad de manipular genéticamente esta bacteria permite explicar el escaso progreso realizado en el entendimiento del metabolismo de *A. ferrooxidans*.

Además, la existencia de vías transportadoras de electrones independientes del complejo  $bc_1$  apoya modelo el "phenotypic switching" (Schrader y Holmes, 1988), en el cual la inserción reversible de ISAFel en  $resB$  genera un fenotipo mutante en que las células son incapaces de utilizar el  $Fe^{2+}$  como fuente de energía, pero pueden crecer en presencia de compuestos de azufre reducido. La idea original fue que la inactivación de  $resB$  por ISAFel impedía la generación de un sistema funcional para la maduración de citocromos tipo- $c$ , como el citocromo  $c_4$  y  $c_1$  codificados en el operón  $pet$ . Adicionalmente se postuló que estos citocromos eran componentes esenciales para la oxidación de  $Fe^{2+}$ , pero no de compuestos de azufre reducido. La presencia de vías independientes del complejo  $bc_1$  como

las vías constituidas por los complejos *bd* y *bo<sub>3</sub>*, hacen que la bacteria pueda prescindir de los citocromos tipo-*c* y del complejo *bc<sub>1</sub>* para su crecimiento en tiosulfato. No obstante, este razonamiento no es válido durante la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$ , ya que en este caso el complejo *bc<sub>1</sub>* es el responsable de mantener el flujo invertido de electrones. Se ha postulado que esta función involucra un ciclo Q operando en sentido inverso, el cual no puede ser ejecutado por otros constituyentes redox conocidos. De esta manera el complejo *bc<sub>1</sub>* sería un componente imprescindible para el crecimiento de la bacteria en presencia de  $\text{Fe}^{2+}$ .

Finalmente, se debe destacar que los resultados obtenidos en esta tesis constituyen un aporte real al entendimiento del metabolismo oxidativo de *A. ferrooxidans*. Este trabajo se ha realizado utilizando diferentes aproximaciones experimentales, las cuales nos han permitido postular un modelo para la oxidación de tiosulfato en este microorganismo (Figura 33).

## CONCLUSIONES

### 1. La caracterización de la región génica estudiada y el análisis de las proteínas codificadas permiten concluir lo siguiente:

- Los genes identificados se agrupan en dos operones: el operón *pet1* y el operón *res*.
- El operón *pet1* de *A. ferrooxidans* posee cinco genes (*cycA1*, *sdrA1*, *petA1*, *petB1*, *petC1*), que codifican para un citocromo *c<sub>4</sub>*, la proteína SDR, y las tres subunidades del complejo *bc<sub>1</sub>* (Rieske, citocromo *b* y citocromo *c<sub>1</sub>*).
- El operón *res* posee tres genes (*resB*, *resC* e *hip2*), que codifican para las proteínas ResB, ResC y una proteína hipotética, respectivamente
- Los sitios de inicio de transcripción de los operones *pet1* y *res* se localizan 71/72 y 439/440 pb ría arriba del codón de inicio de traducción, respectivamente.
- El operón *pet1* posee un posible terminador intrínseco de la transcripción.
- En *A. ferrooxidans ATCC19859* existe una copia no idéntica del operón *pet1* que hemos denominado operón *pet2* y que está constituida por seis genes (*cycA2*, *sdrA2*, *petA2*, *petB2*, *petC2* e *iro*) que codifican para un citocromo *c<sub>4</sub>*, la proteína SDR, las tres subunidades del complejo *bc<sub>1</sub>* (Rieske, citocromo *b* y citocromo *c<sub>1</sub>*) y la proteína hipip.
- Las proteínas codificadas en los operones *pet1* y/o *pet2* son funcionales en *A. ferrooxidans*, debido a las siguientes observaciones:
  - Todas las proteínas codificadas en el operón *pet1* y *pet2*, muestran una estricta conservación de residuos de importancia funcional.

- Todas las proteínas codificadas en el operón *pet1* pueden ser sobreproducidas en *E. coli*.
- Ambos operones se expresan a nivel del mRNA en *A. ferrooxidans* crecido en  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{S}^{\circ}$ .
- Las proteínas de los operones *pet1* y/o *pet2* se detectan en *A. ferrooxidans* crecido en  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{S}^{\circ}$  y están asociadas a la fracción membranosa de la célula.

## 2. Los estudios biofísicos realizados sugieren que:

- Durante la oxidación de tiosulfato, el complejo *bc<sub>1</sub>* de *A. ferrooxidans* funciona en el transporte directo de electrones hacia el oxígeno.
- El complejo *bc<sub>1</sub>* tiene una función diferente durante la oxidación de  $\text{Fe}^{2+}$  y tiosulfato, lo cual podría estar determinado por la existencia de dos complejos *bc<sub>1</sub>* codificados en el operón *pet1* y *pet2*, respectivamente.
- Durante la oxidación de tiosulfato existen vías quinol oxidadas alternativas al complejo *bc<sub>1</sub>*. Es probable que estas vías estén constituidas por las quinol oxidasas *bd* y *bo<sub>3</sub>* debido a que *A. ferrooxidans* posee los genes *cydAB* y *cyoABCDE* que las codifican. Ambas quinol oxidasas se expresan a nivel del mRNA durante el crecimiento de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{S}^{\circ}$ . Además la quinol oxidasa *bd* se detectó espectrofotométricamente y mostró ser dos veces superior en células crecidas  $\text{S}^{\circ}$  que en  $\text{Fe}^{2+}$ .
- Finalmente, los resultados obtenidos en esta tesis están en perfecta correlación con la hipótesis planteada inicialmente, en la cual se establece que en *A. ferrooxidans* la función del complejo *bc<sub>1</sub>* tiene un carácter no esencial para la oxidación de tiosulfato. En

el modelo propuesto (Figura 33), la inhibición o inactivación de complejo  $bc_1$  no impediría el transporte de electrones hacia el oxígeno, debido a que éstos podrían ser desviados hacia rutas alternativas constituidas por los complejos  $bd$  y/o  $bo_3$ .



## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Affourtit, C., Albury, M. S., Crichton, P. G. y Moore, A. L. 2002. Exploring the molecular nature of alternative oxidase regulation and catalysis. *FEBS Lett.* **510**: 121-126.
2. Aleem, M. L. H. 1966. Generation of reducing power in chemosynthesis. II. Energy linked reduction of piridine nucleotides in chemoautotroph *Nitrosomonas europaea*. *Biochim. Biophys. Acta.* **113**: 216-224.
3. Aleem, M. L. H., Leem, H. y Nicholas D. J. D. 1963. ATP dependent reduction of  $\text{NAD}^+$  by ferrocyclochrome *c* in chemoautotrophic bacteria. *Nature* **200**: 759-761.
4. Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W. y Lipman, D. J. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402.
5. Anbar, A. D. y Knoll, A. H. 2002. Protozoic ocean chemistry and evolution: a bioinorganic bridge?. *Science* **297**: 1137-1142.
6. Appia-Ayme, C., Little, P. J., Matsumoto, Y., Leech, A. P. y Berks, B. C. 2001. Cytochrome complex essential for photosynthetic oxidation of both thiosulfate and sulfide in *Rhodovulum sulfidophilum*. *J. Bacteriol.* **183**: 6107-6118.
7. Appia-Ayme, C., Guigliani, N., Ratouchniak, J. y Bonnefoy, V. 1999. Characterization of the operon encoding two *c*-type, and *aa*-type cytochrome oxidase, and rusticyanin in *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4781-4787.
8. Appia-Ayme, C., Guigliani, N. y Bonnefoy, V. 1998a. Characterisation of the genes encoding a cytochrome oxidase from *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020 strain. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**: 171-177.
9. Appia-Ayme, C., Bengrine, A., Cavazza, C., Giudici-Orticoni, M., Bruschie, M., Chippaux, M. y Bonnefoy, V. 1998b. Characterisation and expression of the co-transcribed *cyc1* and *cyc2* genes encoding the cytochrome *c1* (*c552*) and high-molecular-mass cytochrome *c* from *Thiobacillus ferrooxidans* ATCC 33020. *FEMS Microbiol. Lett.* **167**: 171-177.
10. Azarkina, N., Siletsky, S., Borisov, V., von Wachenfeldt, C., Hedertedt, L. y Konstatinov, A. A. 1999. A cytochrome *bb'*-type quinol oxidase in *Bacillus subtilis* strain 168. *J. Biol. Chem.* **274**: 32810-32817.
11. Bamford, V. A., Bruno, S., Rasmussen, T., Appia-Ayme, C., Cheesman M. R., Berks, B. C. y Hemmings, A. M. 2002. Structural basis for the oxidation of thiosulfate by a sulfur cycle enzyme. *EMBO J.* **21**: 5599-55610.
12. Bannai, H., Tamada, Y., Maruyama, O., Nakai, K. y Miyano, S. 2001. Views: Fundamental Building Blocks in the Process of Knowledge Discovery, In Proceedings of the 14th International FLAIRS Conference, 233-238, AAAI Press.
13. Berry, E. A., Guergova-Kuras, M., Huang, L. y Crofts, A. R. 2000. Structure

- and function of cytochrome *bc* complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **69**:1005-1075.
14. **Berry E. A. y Trumppower, B. L.** 1985. Isolation of ubiquinol oxidation of *Paracoccus dinitrificans* and resolution into cytochrome *bc<sub>1</sub>* and cytochrome *c-aa<sub>3</sub>* complexes. *J. Biol. Chem.* **260**: 2458-2467.
  15. **Bjellqvist, B., Hughes, G. J., Pasquali, Ch., Paquet, N., Ravier, F., Sanchez, J., Frutiger, S. y Hochstrasser, D. F.** 1993. The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences. *Electrophoresis* **14**: 1023-1031.
  16. **Blake, R. C., Shute, H. E. A., Greenwood, M. M., Spencer, G. H. e Ingledew, W. J.** 1993. Enzymes of aerobic respiration on iron. *FEMS Microbiol. Rev.* **11**: 9-18.
  17. **Blake, R. C. y Shute, E.** 1987. Respiratory enzymes of *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Biol. Chem.* **262**: 14983-14989.
  18. **Bonora, P., Principi, I. I., Monti, B., Ciurli, S., Zannoni, D. y Hochkoepler, A.** 1999. On the role of high-potential iron-sulfur proteins and cytochromes in the respiratory chain of two facultative phototrophs. *Biochim. Biophys. Acta* **1410**: 51-60.
  19. **Bourret, R. B. y Stock, A. M.** 2002. Molecular information processing: lessons from bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **277**: 9625-9628.
  20. **Bradford, M. M.** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
  21. **Bränden, C. I.** 1980. Relation between structure and function of  $\alpha/\beta$ -protein. *Q. Rev. Biophys.* **13**: 317-338.
  22. **Brown, L. D. y Rawlings, D. E.** 1993. A comparison of structure of the H<sup>+</sup>-translocating ATP synthase from *Thiobacillus ferrooxidans* with those of other organisms. pp: 519-528. *In* Torma, A. E., Apel, M. L. y Brierley, C. L. (ed). *Biohydrometallurgical technologies*, vol 2. TMS Press, Warrendale. Pa.
  23. **Brugna, M., Nitschke, W., Asso, M., Guigliarelli, B., Lemesle-Meunier, D. y Schmidt, C.** 1999. Redox components of cytochrome *bc*-type enzymes in acidophilic prokaryotes. II. The Rieske protein of phylogenetically distant acidophilic organisms. *J. Biol. Chem.* **274**: 16766-16772.
  24. **Bryner, L. C., Beck, J. V., Davies, D. B. y Wilson, G.** 1954. Microorganisms in leaching sulfide minerals. *Ind. Eng. Chem.* **46**: 2587-2592.
  25. **Bucher, P. y Bairoch, A.** 1994. A generalized profile syntax for biomolecule sequence motifs and its function in automatic sequence interpretation. *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* **2**: 53-61.
  26. **Cabrejos, M. E., Zhao H., Guacucano, M., Bueno, S., Levicán, G., García, E., Jedlicki, E. y Holmes, D. S.** 1999. IST1 Insertional inactivation of the *resB* gene: implications for phenotypic switching in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **175**: 223-229.
  27. **Carr, G. J. y Ferguson, S. J.** 1990. Nitric oxide formed by nitrite reductase of *denitrificans* is sufficiently stable to inhibit cytochrome oxidase activity and is

- reduced by its reductase under aerobic conditions. *Biochim. Biophys. Acta* **1017**: 57-62.
28. Casimiro, D. R., Toy-Palmer, A., Blake, R. y Dyson, J. 1995. Gene synthesis, high-level expression, and mutagenesis of *Thiobacillus ferrooxidans*. Rusticyanin: His 85 is a ligand to the blue copper center. *Biochemistry* **34**: 6640-6648.
  29. Caspi, R., Tebo, B. M. y Haygood, M. G. 1998. *c*-type cytochromes and manganese oxidation in *Pseudomonas putida* MnB1. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3549-3555.
  30. Cavazza, C., Giudici-Ortoni, M., Nitschke, W., Appia, C., Bonnefoy, V. y Bruschi, M. 1996. Characterisation of a soluble cytochrome *c*<sub>4</sub> isolated from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Eur. J. Biochem.* **242**: 308-314.
  31. Cavazza, C., Guigliarelli, B., Bertrand, P. y Bruschi, M. 1995. Biochemical and EPR characterization of a high potential iron-sulfur protein in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **130**: 193-200.
  32. Chepuri, V. L., Lemieux, J., Au, D. C-T. y Gennis, R. B. 1990. The sequence of the *cyo* operon indicates substantial structural similarities between the cytochrome *o* ubiquinol oxidase of *Escherichia coli* and the *aa*<sub>3</sub>-type family of the cytochrome *c* oxidase. *J. Biol. Chem.* **265**: 11185-11192.
  33. Clark, W. M. 1960. In Ingledew, W. J. 1982. *Thiobacillus ferrooxidans*. The bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph. *Biochim. Biophys. Acta* **683**: 89-117.
  34. Cobley, J. G. y Haddock, B. A. 1975. The respiration chain of *Thiobacillus ferrooxidans*: The reduction of cytochrome by Fe<sup>2+</sup> and the preliminary characterization of rusticyanin a novel "blue" copper protein. *FEBS Lett.* **60**: 29-33.
  35. Colmer, A. R. y Hinckler, M. E. 1947. The role of microorganisms in acid mine drainage: a preliminary report. *Science* **106**: 253-256.
  36. Corbett, C. e Ingledew, W. J. 1987. Is Fe<sup>3+/2+</sup> cycling an intermediate in sulfur oxidation by Fe<sup>2+</sup>-grown *Thiobacillus ferrooxidans*?. *FEMS Microbiol. Lett.* **41**: 1-6.
  37. Cox, J. C. y Boxer, D. H. 1978. The purification and some properties of rusticyanin, a blue copper protein involved in iron(II) oxidation from *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochem. J.* **174**: 497-502.
  38. Crofts, A. R. y Berry E. A. 1998. Structure and function of the cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex of mitochondria and photosynthetic bacteria. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**: 501-509.
  39. Daldal, F., Mandaci, S., Winterstein C., Myllykallio, H., Duyck, K. y Zannoni, D. 2001. Mobile cytochrome *c*<sub>2</sub> and membrane-anchored cytochrome *c* are both efficient electron donors to the *cbb*<sub>3</sub>- and *aa*<sub>3</sub>-type cytochrome *c* oxidase during respiratory growth of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **183**: 2013-2024.
  40. Davidson, A. L. 2002. Mechanism of coupling of transport to hydrolysis in bacterial ATP-binding cassette transporters. *J. Bacteriol.* **184**: 1225-1233.
  41. Dobbin, P. S., Butt, J. N., Powell, A. K., Reid, G. A. y Richardon, D. J. 1999.

- Characterization of a flavocytochrome that is induced during the anaerobic respiration of Fe(III) by *Shewanella frigidimarina* NCIMB 400. *Biochem. J.* **342**: 439-448.
42. Drobner, E., Huber, H. y Stetter, K. O. 1990. *Thiobacillus ferrooxidans* a facultative hydrogen oxidizer. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2922-2923.
  43. Elbehti, A., Brausseau, G. y Lemesle-Meunier, D. 2000. First evidence for existence of an uphill electron transfer through the *bc<sub>1</sub>* and NADH1 complexes of the acidophilic obligate chemolithotrophic ferrous ion-oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **182**: 3602-3606.
  44. Elbehti, A., Nitschke, W., Tron, P., Michel, C. y Lemesle-Meunier, D. 1999. Redox components of cytochrome *bc*-type enzymes in acidophilic prokaryotes. I. Characterisation of the cytochrome *bc<sub>1</sub>*-type complex of the acidophilic ferrous iron-oxidising bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Biol. Chem.* **274**: 16760-16765.
  45. Evangelou, V. P. y Zhang, Y. L. 1995. A Review: Pyrite Oxidation Mechanisms and Acid Mine Drainage Prevention, *Critical Reviews in Environmental Science and Technology.* **25**: 141-199.
  46. Falquet, L., Pagni, M., Bucher, P., Hulo, N., Sigrist, C. J, Hofmann, K. y Bairoch, A. 2002. *The PROSITE database, its status in 2002.* *Nucleic Acids Res.* **30**: 235-238.
  47. Fekkes, P. y Driessen, A. J. M. 1999. Protein targeting to the bacterial cytoplasmic membrane. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **63**: 161-173.
  48. Fellay, R., Frey, J. y Krisch, H. 1987. Interposon mutagenesis of soil and water bacteria: a family of DNA fragments designed for *in vitro* insertional mutagenesis of Gram-negative bacteria. *Gene* **52**: 147-154.
  49. Fisher, J., Quentmeier, A., Kotska, R., Kraft, R. y Friedrich, C. G. 1996. Purification and characterization of the hydrogenase of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Arch. Microbiol.* **165**: 289-296.
  50. Fry, I. V., Lazaroff, N. y Packer, L. 1986. Sulfate-dependent iron oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans*: characterization of a new EPR detectable electron transfer component on the reducing side of rusticyanin. *Arch. Biochem. Biophys.* **246**: 650-654.
  51. Gaballa, A., Koedam, N. y Cornelis, P. 1996. A cytochrome *c* biogenesis gene involved in pyoverdine production in *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400. *Mol. Microbiol.* **21**: 777-785.
  52. Gale, N. L. y Beck, J. V. 1967. Evidence for the Calvin cycle and hexose monophosphate pathway in *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **91**: 1052-1059.
  53. Gennis, R. B. y Stewart, V. 1996. "Respiration". In: *Escherichia coli* and *Salmonella*. Neidhardt Ed. ASM Press. Washington DC. pp:
  54. Gerhus, E., Steinrucke, P. y Ludwig, B. 1990. *Paracoccus denitrificans* citocrome *c<sub>1</sub>* gene replacemente mutant. *J. Bacteriol.* **172**: 2392-2400.
  55. Giudici-Ortoni, M. T., Leroy, G., Nitschke, W., y Bruschi, M. 2000. Characterization of a new dihemic c<sub>(4)</sub>-type cytochrome isolated from *Thiobacillus*

- ferrooxidans*. *Biochemistry* **39**: 7205-7211.
56. Giudici-Ortoni, M., Guerlesquin, F., Bruschi, M. y Nitschke, W. 1999. Interaction-induced redox switch in the electron transfer complex rusticianin cytochrome *c<sub>4</sub>*. *J. Biol. Chem.* **274**: 30365-30369.
  57. Green, G. N. y Gennis, R. B. 1983. Isolation and characterization of an *Escherichia coli* mutant lacking cytochrome *d* terminal oxidase. *J. Bacteriol.* **154**: 1269-1275.
  58. Grove, J., Busby, S. y Cole, J. 1996. The role of the genes *nrfEFG* and *ccmFH* in cytochrome *c* biosynthesis in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genetic* **252**: 332-341.
  59. Guacucano, M., Levicán, G. Holmes, D. S. y Jedlicki, E. 2000. An RT-PCR artefact in the characterization of bacterial operons. *Electronic J. Biotechnol.* **3**: 1-4.
  60. Hagen, F. S. y Young, E. 1978. Effect of RNase III on the efficiency on translation of bacteriophage T7 lysozyme mRNA. *J. Virol.* **26**: 793-804.
  61. Harahuc, L., Lizama, H. M. y Suzuki, I. 2000. Selective inhibition of the oxidation of ferrous iron or sulfur in *Thiobacillus ferrooxidans*. *App. Environ. Microbiol.* **66**: 1031-1037.
  62. Harley, C. B. y Reynolds, R. P. 1987. Analysis of *E. coli* promoter sequences. *Nucleic Acids. Res.* **15**: 2343-2361.
  63. Harrison A. P. 1982. Genomic and physiological diversity amongst strains of *Thiobacillus ferrooxidans*, and genomic comparison with *Thiobacillus thiooxidans*. *Arch. Microbiol.* **131**: 68-76.
  64. Henikoff, S., Henikoff, J. G., Alford, W. J. y Pietrokovski, S. 1995. Automated construction and graphical presentation of protein blocks from aligned sequences. *Gene-COMBIS. Gene* **163**: 17-26.
  65. Hofmann, K. y Stoffel, W. 1993. TMbase-A database of membrane spanning proteins segments. *Biol. Chem.* **374**: 166-169.
  66. Holmes, D. S., Jedlicki, E., Cabrejos, M. E., Bueno, S., Guacucano, M., Inostroza, C., Levicán, G., Varela, P. y García, E. 1999. The use of insertion sequences to analyse gene function in *Thiobacillus ferrooxidans*: a case study involving cytochrome *c*-type biogenesis proteins in iron oxidation. pag: 139-147. *In. Amils, R. y Ballester, A. (Ed.). Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21 st century.* Elsevier Ed. Madrid. España.
  67. Holtwick, R., Keweloh, H. y Meinhardt, F. 1999. cis/trans isomerase of unsaturated fatty acids of *Pseudomonas putida* P8: evidence for a heme protein of the cytochrome *c* type. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2644-2649.
  68. Hunt, A. H., Toy-Palmer, A., Assa-Munt, N., Cavanagh, J., Blake, R. C. y Dyson, H. J. 1994. Nuclear magnetic resonance <sup>15</sup>N and <sup>1</sup>H resonance assignments and global fold of rusticyanin. Insights into the ligation and acid stability of the blue copper site. *J. Mol Biol.* **244**: 370-384.
  69. Ingledew, W. J. 1982. *Thiobacillus ferrooxidans*. The bioenergetics of an acidophilic chemolithotroph. *Biochim. Biophys. Acta* **683**: 89-117.
  70. Ingledew, W. J. y Cobbley, J. G. 1980. A potentiometric and kinetic study on the

- respiratory chain of ferrous-iron-grown *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biochim. Biophys. Acta* **590**: 141-158.
71. Ingledeu, W. J., Cox, J. P. y Halling, P. J. 1977. A proposed mechanism for energy conservation during Fe<sub>2+</sub> oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* chemiosmotic coupling to net H<sup>+</sup> influx. *FEMS Lett.* **2**: 193-197.
  72. Inoue C., Sugawara, K. y Kusano T. 1990. *Thiobacillus ferrooxidans mer* operon: sequence analysis of the promoter and adjacent genes. *Gene* **96**: 115-120.
  73. Iwata, S., Saynovits, M., Link, T. A. y Michel, H. 1996. Structure of a water soluble fragment of the "Rieske" iron-sulfur protein of the bovine heart mitochondrial cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex determined by MAD phasing at 1,5 Å resolution. *Structure* **4**: 567-579.
  74. Jedlicki, E., Reyes, R., Jordana, X., Mercereau-Puijalón, O. y Allende, J. E. 1986. Rusticianin: initial studies on the regulation of its synthesis and gene isolation. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **8**: 342-350.
  75. Jerez, C. A., Varela, P., Osorio, G., Seeger, M., Amaro, A. M. y Toledo, H. 1995. Differential gene expression of *Thiobacillus ferrooxidans* under different environmental conditions. p. 111-121. In Holmes, D. S. y Smith, R. W. (ed.). *Mineral Bioprocessing II*.
  76. Jörnvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzáles-Duarte, R., Jeffery, J y Ghosh, D. 1995. Short-Chain deshydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* **34**: 6003-6013.
  77. Kai, M., Yano, T., Tamegai, H., Fukumori, Y. y Yamanaka, T. 1992. *Thiobacillus ferrooxidans* cytochrome *c* oxidase: purification and molecular and enzymatic features. *J. Biochem.* **112**: 816-821.
  78. Kamimura, K., Fujii, S. y Sugio, T. 2001. Purification and some properties of ubiquinol oxidase from obligately chemolithotrophic iron-oxidizing bacterium *Thiobacillus ferrooxidans* NASF-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**: 63-71.
  79. Karavaiko, G. I., Turova, T. P., Kondrat'eva, T. F., Lysenko, A. M., Kolganova, T. V., Ageeva, S. N., Muntyan, L. N., Pivovarova, T. A. 2003. Phylogenetic heterogeneity of the species *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 113-119.
  80. Kauffman, H. F. y van Gelder, B. F. 1973. The respiratory chain of *Azotobacter vinelandii*. II. The effect of cyanide on cytochrome *d*. *Biochim. Biophys. Acta.* **314**: 276-283.
  81. Kawaguchi, H., Inagaki, K. y Tanaka, H. 1997. Regulatory region of expression of *Thiobacillus ferrooxidans leuB* gene in *Escherichia coli*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**: 2119-2121.
  82. Kelly, D. P. y Wood, A. P. 2000. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. Nov., *Halothiobacillus* gen. Nov. and *Thermithiobacillus* gen. Nov. *Int. J. Syst. Evolution. Microbiol.* **50**: 511-516.
  83. Kelly, D. P. y Harrison, A. P. 1989. Genus *Thiobacillus*. In Bergey's Manual of Systematic bacteriology. Vol 3: 1842-1858. (Ed) Staley, M. P., Brenner, D. J.,

- Pfenning, N. y Holt, J. G. Baltimore: Williams y Wilkins.
84. Kelly, D. P. 1988. Evolution of the understanding of the microbiology and biochemistry of the mineral leaching habitats, p: 3-14. In Norris, P. R. y Kelly, D. P. (ed) Biohydrometallurgy. Science and Technology Lett. Kew. UK.
  85. Kelly, D. P. 1982. Biochemistry of the chemolithotrophic oxidation of inorganic sulfur. Phil. Trans. R. Soc. Lond. **298**: 499-528.
  86. Kiesov, L. 1967. Energy-linked reaction in chemoautotrophic organisms. Curr. Top. Bioenerg. **2**: 195-233.
  87. Kita, K., Konishi, K. y Anraku, Y. 1984. terminal oxidases of *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. II. Purification and properties of cytochrome *b<sub>555-d</sub>* complex from cells grown with limited oxygen and evidences of branched electron-carrying systems. J. Biol. Chem. **259**: 3375-3381.
  88. Klarskov, K., Verte, F., Van Driessche, G., Meyer, T. E, Cusanovich, M. A. y Van Beeumen J. 1998. The primary structure of soluble cytochrome *c-551* from the phototrophic green sulfur bacterium *Chlorobium limicola*, strain Tassajara, reveals a novel *c*-type cytochrome. Biochemistry **37**: 10555-10562.
  89. Kranz, R., Lill, R., Goldman, B., Bonnard, G. y Merchant, S. 1998. Molecular mechanisms of cytochrome *c* biogenesis: three distinct systems. Mol. Microbiol. **29**: 383-396.
  90. Kranz, R. G y Gennis, R. B. 1985. Immunological investigation of the distribution of cytochrome related to the two terminal oxidases of *Escherichia coli* in other gram-negative bacteria. J. Bacteriol. **161**: 709-713.
  91. Kranz, R. G. y Gennis, R. B. 1983. Immunological characterization of the cytochrome *o* terminal oxidase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **258**: 10614-10621.
  92. Kurosawa, H., Maeda, K., Yamamoto, E., Nakamura, K. y Amano, Y. 1994. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* utilized thiosulfate trough the oxidation route with iron recycling. J. Gen. Microbiol. **40**: 491-498.
  93. Kusano, T., Takeshima, T., Sugawara, K., Inoue, C., Shiraton. I., Yano, T., Fukumori, Y. y Yamanaka, T. 1992a. Molecular cloning of the encoding *Thiobacillus ferrooxidans* fe(II) oxidasa. Highly homology of the gene product with HiPIP. J. Biol. Chem. **267**: 11242- 11247
  94. Kusano, T., Sugawara, K., Inoue, C., Takeshima, T., Numata, M. y Shiratori, T. 1992b. Electrotransformation of *Thiobacillus ferrooxidans* with plasmids containing a *mer* determinant. J. Bacteriol. **174**: 6617-6623.
  95. Le Brun , N. E., Bengtsson, J. y Hederstedt, L. 2000. Genes required for cytochrome *c* synthesis in *Bacillus subtilis*. Mol. Microbiol. **36**: 638-650.
  96. Lehninger, A. L., Nelson, D. L. y Cox, M. M. 1993. Principles of biochemistry. Whort Publishers. U. S. A. pp: 892-940.
  97. Levicán, G., Brucella, P., Guacucano, M., Inostroza, C., Bonnefoy, V., Holmes, D. S. y Jedlicki, E. 2002. Characterization of the *petI* and *res* operon of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol. **184**: 1498-1501.
  98. Liu, Z., Guiliani, N., Appia-Ayme, C., Borne, F., Ratouchniak, J. y Bonnefoy,

- V. 2000. Construction and characterization of a *recA* mutant of *Thiobacillus ferrooxidans* by marker exchange mutagenesis. *J. Bacteriol.* **182**: 2269-2276.
99. Lynch M. 2002. Genomics. Gene duplication and evolution. *Science*. **297**: 945-7.
100. Mackintosh, M. E. 1978. Nitrogen fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Gen. Microbiol.* **105**: 215-218.
101. Madigan, T. M., Martinko, J. M. y Parker, J. 1997. Brock: Biology of Microorganisms. Prentice Hall. USA. pp: 473-605.
102. Mansch, R. y Sand, W. 1992. Acid-stable cytochrome in ferrous ion oxidizing cell-free preparations from *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **92**: 83-88.
103. Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.* **336**: 70-78.
104. Mathews, D. H., Sabina, J., Zuker, M. y Turner, D. H. 1999. Expanded Sequence Dependence of Thermodynamic Parameters Improves Prediction of RNA Secondary Structure. *J. Mol. Biol.* **288**: 911-940.
105. Menin, L., Gaillard, J., Shoepf, P., Nitschke, W. y Verméglio, A. 1998. Role of HIPIP as electron donor to the RC-bound cytochrome in photosynthetic purple bacteria. *Photosynthesis Res.* **55**: 343-348.
106. Meyer, T. E. Evolution and classification of *c*-type cytochromes. In Scott, R. A. y Maut, A. G. *Cytochrome c: a multidisciplinary approach*. 1996.
107. Mizuno, T. y Kageyama, M. 1978. Separation and characterization of the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biochem (Tokio)* **84**: 179-191.
108. Mjoli, N. y Kulpa, C. F. 1988. Identification of an unique outer membrane protein required for iron oxidation in *Thiobacillus ferrooxidans*, p: 89-103. In Norris, P. R. y Kelly, D. P. (ed), *Biohidrometallurgy Proceeding of the International Symposium Warwick 1988*. Science Technol. Lett. Anthony Rowe Ltd., Kew, Gran Bretaña.
109. Moreno-Sánchez, R., Covián, R., Jasso-Chávez, R., Rodríguez-Enríquez, S., Pacheco-Moisés, F. y Torres-Márquez, M. E. 2000. Oxidative phosphorylation by an alternative respiratory pathway in mitochondria from *Euglena*. *Biochim. Biophys. Acta* **1457**: 200-210.
110. Nakamura, H., Saiki, K., Mogi, T. y Anraku, Y. 1997. Assignment and functional roles of the *cyoABCDE* gene products required for the *Escherichia coli bo3*-type quinol oxidase. *J. Biochem (Tokio)* **122**: 415-441.
111. Nicholson, D. W., Stuart, R. A. y Neupert, W. 1989. Biogenesis of cytochrome *c*<sub>1</sub>. Role of cytochrome *c*<sub>1</sub> heme lyase and of the two proteolytic processing steps during import into mitochondria. *J. Biol. Chem.* **264**: 10156-10168.
112. Ohmura, N., Sasaki, K., Matsumoto, N. y Saiki, H. 2002a. Anaerobic respiration using Fe<sup>3+</sup>, S<sup>0</sup>, and H<sub>2</sub> in the chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **184**: 2081-2087.
113. Ohmura, N., Matsumoto, N., Sasaki, K. y Saiki H. 2002b. Electrochemical regeneration of Fe(III) to support growth on anaerobic iron respiration. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 405-407.
114. Otten, M. F., Stork, D. M., Reijnders, W. N., Westerhoff, H. V. y Van



- Spanning, R. J. 2001. Regulation of expression of terminal oxidases in *Paracoccus denitrificans*. *Eur. J. Biochem.* **268**: 2486-2497.
115. Pealing, S. L., Black, A. C., Manson, F. D., Ward, F. B., Chapman, S. K. y Reid, G. A. 1992. Sequence of the gene encoding flavocytochrome c from *Shewanella putrefaciens*: a tetraheme flavoenzyme that is a soluble fumarate reductase related to the membrane-bound enzymes from other bacteria. *Biochemistry* **31**: 12132-12140.
116. Pereira, M. M., Carita, J. N. y Teixeira, M. 1999. Membrane-bound electron transfer chain of the thermohalophilic bacterium *Rhodothermus marinus*: characterization of the iron-sulfur centers from the hydrogenases and investigation of the high-potential iron-sulfur protein function by *in vitro* reconstitution of the respiratory chain. *Biochemistry* **38**: 1276-1283.
117. Poole, R. K. y Cook, G. M. 2000. Redundancy of aerobic respiratory chains in bacteria? Routes, reasons and regulation. *Adv. Microb. Physiol.* **43**: 165-224.
118. Poole, R. K., Salmon, I. y Chance, B. 1983. The reaction with oxygen of cytochrome oxidase (cytochrome *d*) in *Escherichia coli* K12: optical studies of intermediate species and cytochrome *b* oxidation at sub-zero temperatures. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1345-1355.
119. Pronk, J. T., Meijer, M., Hazeu, W., van Dijken, J. P., Bos, P. y Knenen, J. G. 1991. Growth of *Thiobacillus ferrooxidans* on formic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2057-2062.
120. Pujol, C. J. y Kado, C. I. 2000. Genetic and biochemical characterization of the pathway in *Pantoea citrea* leading to pink disease of pineapple. *J. Bacteriol.* **182**: 2230-2237.
121. Ramírez, P., Toledo, H., Guilliani, N. y Jerez, C. 2002. An exported rhodanese-like protein is induced during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in metal sulfides and different sulfur compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 1837-1845.
122. Rice C. W. y Hempfling, W. P. 1978. Oxygen-limited continuous culture and respiratory energy conservation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **134**: 115-124.
123. Rieske, J. S. 1967. Preparation and properties of reduced coenzyme Q-cytochrome *c* reductase. *Methods Enzymol.* **10**: 239-245.
124. Richardson, D. J. 2000. Bacterial respiration: a flexible process for a changing environment. *Microbiology* **146**: 551-571.
125. Richter, O. M., Tao, J. S., Turba, A. y Ludwig, B. 1994. A cytochrome *ba<sub>3</sub>* functions as a quinol oxidase in *Paracoccus denitrificans*. Purification, cloning, and sequence comparison. *J. Biol. Chem.* **269**: 23079-2386.
126. Saiki, K., Mogi, T. y Anraku, Y. 1992. Hemo O biosynthesis in *Escherichia coli*: *cyoE* gene in the cytochrome *bo* operon encode a protoheme IX farnesyltransferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**: 1491-1497.
127. Sambrook, J., Fritsch, E. F. y Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. Col Spring Harbor Laboratory Pres. USA.
128. Sanger, F., Nicklen, S. y Coulson, A. R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology.* **24**: 104-108.

129. Schrader, J. A. y Holmes, D. S. 1988. Phenotypic switching of *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol. 170: 3915-3923.
130. Selkov, E., Overbeek, R., Kogan, Y., Chu, L., Vonstein, V., Holmes, D., Silver, S. y Fonstein, M. 2000. Functional analysis of gapped microbial genomes: principles with examples from *Thiobacillus ferrooxidans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 3509-3514.
131. Shihari, S., Bhavaraju, R., Modak, M., Kumar, R. y Gandhi, K. S. 1993. Disolution of sulfur particles by *Thiobacillus ferrooxidans*: substrate for unattached cells. Biotechnol. Bioenerg. 41: 612-616.
132. Short, S. A., White, D. C. y Aleem, M. I. 1969 Phospholipid metabolism in *Ferrobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol. 99: 142-150.
133. Silver, M. y Lundgren, D. J. 1968. The thiosulfate-oxidizing enzyme of *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). Can. J. Biochem. 46: 1215-1220.
134. Simon J. 2002. Enzymology and bioenergetics of respiratory nitrite ammonification. FEMS Microbiol. Rev. 26: 285-309.
135. Simon, R., Preifer, U. y Pühler, A. 1983. A broad host range mobilization system for *in vivo* genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram negative bacteria. Biotechnology. 1: 784-791.
136. Sugio, T., Hirose, T., Ye, L. Z. y Tano, T. 1992. Purification and some properties of sulfite ferric ion oxidoreductase from *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol. 174: 4189-92.
137. Sugio, T., Katagiri, T., Inagaki, K. y Tano, T. 1989. Actual substrate for elemental sulfur oxidation by sulfur ferric ion oxidoreductase purified from *Thiobacillus ferrooxidans*. Biochim. Biophys. Acta. 973: 250-256.
138. Sugio, T., Tsujita, Y., Katagiri, T., Inagaki, K. y Tano, T. 1988. Reduction of  $\text{Mo}^{6+}$  with elemental sulfur by *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol. 170: 5956-5959.
139. Sugio, T., Domatsu, C., Munakata, O., Tano, T e Imai, K. 1985. Role of a ferric iron-reducing system ion sulfur oxidation of *Thiobacillus ferrooxidans*. Appl. Environ. Microbiol. 49: 1401-1406.
140. Suzuki, I. 1965. Oxidation of elemental sulfur by an enzyme system of *Thiobacillus thiooxidans*. Biochim. Biophys. Acta 104: 359-371.
141. Tabita, R., Silver, M. y Lundgren, D. G. 1969. The rhodanase enzyme of *Ferrobacillus ferrooxidans*. Can. J. Biochem. 47: 1141-1145.
142. Thompson, J. D., Higgins D. G. y Gibson T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680.
143. Thöny-Meyer, L. 1997. Biogenesis of respiratory cytochromes in bacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 337-376.
144. Thöny-Meyer, L., James, P. y Hennecke, H. 1991. From one gene to two proteins: the biogenesis of cytochrome *b* and *c<sub>1</sub>* in *Bradyrhizobium japonicum*.

- Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **88**: 5001-5005.
145. Tichy, M. y Vermaas, W. 1999. Accumulation of pre-apocytochrome f in a *Synechocystis* sp. PCC 6803 mutant impaired in cytochrome *c* maturation. *J. Biol. Chem.* **274**: 32396-32401.
  146. Trumpower, B. L. y Gennis, R. B. 1994. Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation. *Ann. Rev. Biochem.* **63**: 675-716.
  147. Trumpower, B. L. 1990. Cytochrome *bc<sub>1</sub>* complexes of microorganisms. *Microbiol. Rev.* **54**: 101-129.
  148. Unden, G. y Bongaerts, J. 1997. Alternative respiratory pathways of *Escherichia coli*: energetics and transcriptional regulation in response to electron acceptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1320**: 217-134.
  149. Valkova-Valchanova, M. B. y Chan, S. H. P. 1994. Purification and characterization of two new *c*-type cytochrome involved in Fe<sup>2+</sup> oxidation from *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **121**: 61-70.
  150. Vestal, J. R. y Lundgren, D. G. 1971. The sulfite oxidase of *Thiobacillus ferrooxidans* (*Ferrobacillus ferrooxidans*). *Can. J. Biochem.* **49**: 1125-1130.
  151. Walker, J. C. y Brimblecombe, P. 1985. Iron and sulfur in the pre-biologic ocean. *Precambrian Res.* **28**: 205-222.
  152. Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* **51**: 221-271.
  153. Xia, D., Yu, C. A., Kim, H., Xia, J. Z., Kachurin, A. M., Zhang, L., Yu, L y Deisenhofer, J. 1997. Crystal structure of the cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex from bovine heart mitochondria. *Science* **277**: 60-66.
  154. Yamanaka, T., Kukumori, Y., Yano, T., Kai, M. y Sato, A. 1991. Enzymatic mechanisms in the dehydrogenation of ferrous ions by *Thiobacillus ferrooxidans*. *In*
  155. Yamanaka, T. y Kukumori, Y. 1995. Molecular aspects of the electron transfer system which participates in oxidation of ferrous ion by *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Rev.* **17**: 401-413.
  156. Yang, C-H., Azad, H. R. y Cooksey, D. A. 1996. A cromosomal locus required for copper resistance, competitive fitness and cytochrome *c* biogenesis in *Pseudomonas fluorescens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 7315-7320.
  157. Yarzabal, A., Brasseur, G., Ratouchniak, J., Lund, K., Lemesle-Meunier, D., DeMoss, J. A. y Bonnefoy, V. 2002a. The high-molecular weight cytochrome *c* Cyc2 of *Acidithiobacillus ferrooxidans* is an outer membrane protein. *J. Bacteriol.* **184**: 313-317.
  158. Yarzabal, A., Brasseur, G. y Bonnefoy, V. 2002b. Cytochromes *c* of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **209**: 189-195.
  159. Yu, J., Tso, S. C., Shenoy, S. K., Quinn, B. N. y Xia, D. 1999. The role of the supernumerary subunit of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome *bc<sub>1</sub>* complex. *J. Bioenerg. Biomembr.* **31**: 251-257.
  160. Yu, J., Hederstedt, L. y Piggot, P. J. 1995. The cytochrome *bc* complex

(menaquinone: cytochrome *c* reductase) in *Bacillus subtilis* has a nontraditional subunit organization. *J. Bacteriol.* **177**: 6751-6760.