

UCH-FC  
Biotecnología  
V. 473  
C. 1

Universidad de Chile  
Facultad de Ciencias  
Carrera de Ingeniería en Biotecnología Molecular

“Metabolismo del fosfato y polifosfato en  
*Acidithiobacillus ferrooxidans*. Aislamiento del  
gen de la polifosfato quinasa e identificación  
mediante genética reversa y análisis *in silico* de  
un posible regulón Pho”

**Mario Andrés Vera Véliz**

Tesis entregada a la Universidad de Chile para optar al título profesional de  
Ingeniero en Biotecnología Molecular

**Director de Tesis**  
Dr. Carlos A. Jerez.

**Co-Director de Tesis**  
Dr. Nicolás Guiliani G.

Marzo 2002



## Agradecimientos

*Al finalizar mi tesis de pregrado deseo agradecer a las siguientes personas:*

*Al Dr. Carlos Jerez, por haberme recibido en su laboratorio y transmitirme el entusiasmo de hacer investigación.*

*Al Dr. Nicolás Guiliani, por su rigurosidad académica, amistad y el enorme tiempo dedicado a la supervisión y revisión de mi trabajo.*

*Al Sr. Juan Araos, por sus grandes anécdotas y su permanente dedicación a un gran número de actividades de nuestro laboratorio.*

*A mis compañeros de laboratorio Silvia Cardona, Sergio Alvarez, Pablo Ramírez, Francisco Chávez y Francisco Remonsellez, por sus valiosas discusiones, amistad y buenos momentos compartidos durante estos años.*

*Muy especialmente a Mario y Ximena, mis padres, a Ximena, mi hermana y a Yolanda, mi abuela. Sin ellos, nada de esto hubiese sido posible.*

*Agradezco también a mis profesores, amigos y compañeros de curso, por todos los buenos momentos vividos (sería injusto nombrarlos...faltaría espacio).*

*Y a una persona muy importante que ya no está conmigo, pero su recuerdo e influencia en mi vida estará para siempre, mi abuelo Pompeyo.*

<b>1.</b>	<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>SUMMARY</b> .....	<b>3</b>
<b>3.</b>	<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
3.1.	TRANSPORTE DE FOSFATO .....	5
3.1.1.	<i>Sistema Pit</i> .....	5
3.2.	EL REGULÓN PHO .....	6
3.3.	METABOLISMO DE LOS POLiP .....	9
3.3.1.	<i>Aspectos generales</i> .....	9
3.3.2.	<i>Funciones del poliP</i> .....	11
3.4.	APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS DEL METABOLISMO DE LOS POLiP .....	14
3.4.1.	<i>PoliP y descontaminación de aguas</i> .....	14
3.4.2.	<i>Descontaminación de iones de metales pesados</i> .....	15
3.5.	METABOLISMO DEL FOSFATO EN <i>ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS</i> .....	15
3.6.	HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	17
<b>4.</b>	<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>18</b>
4.1.	CEPAS Y CONDICIONES DE CULTIVO .....	18
4.2.	TÉCNICAS GENERALES DE BIOLOGÍA MOLECULAR .....	18
4.2.1.	<i>Extracción de ADN cromosómico</i> .....	18
4.2.2.	<i>Extracción de ADN plasmidial</i> .....	19
4.2.3.	<i>Digestiones de ADN con enzimas de restricción</i> .....	19
4.2.4.	<i>Electroforesis de ADN en geles de agarosa</i> .....	19
4.2.5.	<i>Purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa</i> .....	20
4.2.6.	<i>Clonamiento de productos de PCR</i> .....	20
4.2.7.	<i>Secuenciación de ADN</i> .....	21
4.3.	BÚSQUEDA DEL GEN <i>PPK</i> DE <i>AT. FERROOXIDANS</i> ATCC 19859 .....	23
4.3.1.	<i>Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)</i> .....	24
4.3.2.	<i>Condiciones de Reacciones de PCR</i> .....	25
4.4.	AISLAMIENTO DEL GEN <i>PPK</i> DE <i>AT. FERROOXIDANS</i> .....	29
4.4.1.	<i>Experimentos de Hibridación de ADN</i> .....	29
4.5.	CLONAMIENTO Y EXPRESIÓN EN <i>E. COLI</i> DEL GEN <i>PPK</i> DE <i>AT. FERROOXIDANS</i> .....	30

4.5.1. Preparación de muestras para electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS.....	31
4.6. ANÁLISIS <i>IN SILICO</i> DE SECUENCIAS Y COMPARACIÓN CON BASES DE DATOS. ....	32
4.6.1. Búsqueda un posible regulón <i>Pho</i> en <i>At. ferrooxidans</i> .....	33
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>34</b>
5.1. CLONAMIENTO DEL GEN <i>PPK</i> DE <i>AT. FERROOXIDANS</i> .....	34
5.1.1. Extracción de ADN cromosómico de <i>At. ferrooxidans</i> .....	34
5.1.2. Ensayos de DOP-PCR.....	35
5.1.3. Ensayos de CODEHOP-PCR.....	35
5.2. ANÁLISIS DE LA REGIÓN CROMOSOMAL QUE CONTIENE EL GEN <i>PPK</i> MEDIANTE HIBRIDACIÓN DE ADN.....	39
5.3. DETERMINACIÓN DE LA SECUENCIA DEL GEN <i>PPK</i> DE LA CEPA ATCC 19859 DE <i>AT. FERROOXIDANS</i> .....	40
5.3.1. Secuenciación del extremo 3' del gen <i>ppk</i> .....	40
5.3.2. Secuenciación del extremo 5' del gen <i>ppk</i> .....	40
5.3.3. Análisis del gen <i>ppk</i> .....	42
5.4. CLONAMIENTO Y EXPRESIÓN DEL GEN <i>PPK</i> DE <i>AT. FERROOXIDANS</i> EN <i>E. COLI</i> .....	43
5.5. BÚSQUEDA MEDIANTE GENÉTICA REVERSA DE GENES HOMÓLOGOS A LOS DEL REGULÓN <i>PHO</i> DE <i>E. COLI</i> EN LA CEPA ATCC 19859 DE <i>AT. FERROOXIDANS</i> .....	44
<b>6. DISCUSIÓN.....</b>	<b>51</b>
<b>7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>58</b>

**Indice de Figuras**

<b>Figura 1</b>	Esquema de las vías de entrada del fosfato en <i>E. coli</i> .....	7
<b>Figura 2</b>	Polifosfato inorgánico.....	9
<b>Figura 3</b>	Análisis de la preparación de ADN cromosómico de <i>At. ferrooxidans</i> .....	34
<b>Figura 4</b>	Bloques conservados de secuencia aminoacídica de PPKs utilizados en el diseño de partidores CODEHOP-PCR.....	36
<b>Figura 5</b>	Esquema del gen <i>ppk</i> de <i>At. ferrooxidans</i> y representación de las combinaciones posibles con los partidores CODEHOP diseñados.....	37
<b>Figura 6</b>	Separación de los fragmentos amplificados por CODEHOP-PCR.....	37
<b>Figura 7</b>	Alineamiento múltiple de secuencias internas de PPKs.....	38
<b>Figura 8</b>	Análisis de la organización física de la región que contiene el gen <i>ppk</i> en <i>At. ferrooxidans</i> .....	39
<b>Figura 9</b>	Esquema de la técnica de PCR inversa.....	41
<b>Figura 10</b>	Aislamiento y purificación del fragmento de 3.8 Kb por PCR inversa.....	41
<b>Figura 11</b>	Secuencia del gen <i>ppk</i> de <i>At. ferrooxidans</i> .....	42
<b>Figura 12</b>	Sobreexpresión del gen <i>ppk</i> de <i>At. ferrooxidans</i> en <i>E. coli</i> .....	44
<b>Figura 13</b>	Electroforesis bidimensional de tipo NEPHGE de las proteínas totales de <i>At. ferrooxidans</i> .....	45
<b>Figura 14</b>	Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las proteínas PstS maduras.....	46
<b>Figura 15</b>	Análisis comparativo de las estructuras de las proteínas PstS y PstS1 de <i>At. ferrooxidans</i> .....	47
<b>Figura 16</b>	Representación estructural del sitio de unión del fosfato de la proteína PstS1 de <i>At. ferrooxidans</i> .....	48
<b>Figura 17</b>	Organización de los marcos de lectura abiertos de <i>At. ferrooxidans</i> que corresponderían a los posibles genes homólogos a los genes del regulon Pho de <i>E. coli</i> .....	49

## **Indice de Tablas**

<b>Tabla 1</b>	Bacterias en las cuales se encuentra el gen <i>ppk</i> .....	10
<b>Tabla 2</b>	Partidores utilizados.....	26
<b>Tabla 3</b>	Comparación de algunas de las proteínas presentes en el regulón Pho de <i>E. coli</i> con sus posibles homólogos de <i>At. ferrooxidans</i> .....	50

**Lista de Abreviaturas**

<b>Amp</b>	ampicilina
<b>APS</b>	persulfato de amonio
<b>CODEHOP-PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa con partidores consenso degenerados
<b>DMSO</b>	dimetil sulfóxido
<b>DO</b>	densidad optica
<b>DOP-PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa con partidores degenerados
<b>dATP</b>	2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato
<b>dCTP</b>	2'-deoxicitidina 5'-trifosfato
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	agua bidestilada
<b>dGTP</b>	2'-deoxiguanosina 5'-trifosfato
<b>Ci</b>	Curie
<b>dTTP</b>	2' deoxitimidina 5'- trifosfato
<b>EDTA</b>	acido etilendiaminotetraacético
<b>IPTG</b>	isopropil tio-β-D-galactósido
<b>LB</b>	medio de cultivo Luria-Bertani
<b>LB XIA</b>	medio de cultivo LB suplementado con X-Gal, IPTG y Ampicilina
<b>MPM</b>	marcador de estandares de peso molecular
<b>ORF</b>	marco abierto de lectura
<b>PAGE</b>	electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>Pb</b>	pares de bases
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>PPK</b>	polifosfato quinasa
<b>PPX</b>	polifosfato exopolifosfatasa
<b>poliP</b>	polifosfato inorgánico
<b>SDS</b>	dodecil sulfato de sodio
<b>SSC</b>	solución amortiguadora citrato trisódico
<b>TAE</b>	solución amortiguadora tris-acetato EDTA
<b>TBE</b>	solución amortiguadora tris-borato EDTA
<b>TEMED</b>	N, N, N', N' tetrametilendiamina
<b>Tris</b>	tris-(hidroximetil)-aminoetano
<b>UV</b>	luz ultravioleta
<b>X-Gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D galactósido.

## 1. Resumen

*Acidithiobacillus ferrooxidans* (ex *Thiobacillus ferrooxidans*), es uno de los principales microorganismos presentes en los consorcios microbianos que participan en biohidrometalurgia. Estos procesos están naturalmente sujetos a cambios en las condiciones ambientales, tales como temperatura, pH, variación en la cantidad de nutrientes y presencia de metales tóxicos. Es de gran interés entender los mecanismos moleculares que utilizan estos microorganismos para responder y adaptarse a estos cambios. Uno de los nutrientes limitantes para *At. ferrooxidans* puede ser el fosfato, debido a que precipita con iones de metales. Esta carencia de fosfato puede entonces afectar directamente las faenas de biolixiviación. Nuestro laboratorio ha iniciado el estudio del metabolismo del fosfato en *At. ferrooxidans* dada la posible importancia que este pueda tener en la alta resistencia de este organismo a la presencia de metales pesados presentes en su ambiente.

En bacterias como *Escherichia coli* existe un sistema genético de captación de fosfato conocido como el regulón Pho. Este consiste en un grupo de genes cuya expresión se induce en carencia de fosfato y que codifican para proteínas involucradas en la captación y transporte intracelular de este ion.

Muchas bacterias acumulan fosfato en la forma de polifosfatos inorgánicos (poliP). Estos son polímeros lineales de cientos de residuos de ortofosfato unidos por enlaces fosfoanhidridos de alta energía. Tienen diversas funciones, dentro de las cuales destacan servir como fuente de energía y reserva de fosfato, participar en posibles mecanismos de tolerancia a iones de metales pesados y modular ciertas respuestas de estrés y adaptaciones de fase estacionaria. En *E. coli*, la principal enzima involucrada en la síntesis de poliP es la polifosfato quinasa (PPK), un



homotetrámero de subunidades de 80 KDa, que cataliza la transferencia reversible del grupo fosforilo  $\gamma$  del ATP al polifosfato.

En esta memoria planteamos como hipótesis la existencia de un regulón Pho en *At. ferrooxidans* cuyos componentes serían inducidos por la carencia de fosfato en el medio. Estudiamos el gen *ppk* de *At. ferrooxidans* ATCC 19859 mediante genética reversa. Utilizando un alineamiento de secuencias aminoacídicas de PPKs se diseñaron partidores consenso-degenerados (CODEHOP-PCR), que permitieron aislar y secuenciar un fragmento interno del gen *ppk*. Posteriormente, utilizando los datos del proyecto de secuenciación del genoma de la cepa ATCC 23270 de *At. ferrooxidans*, se completó la secuencia del gen, el cual se sobreexpresó en *E. coli*. El gen *ppk* de *At. ferrooxidans* tiene 2106 pares de bases y codifica para una proteína de 79 kDa que presenta un 34% de identidad con la PPK de *E. coli*.

Mediante electroforesis bidimensional identificamos algunas de las proteínas de *At. ferrooxidans* que cambian sus niveles de expresión en carencia de fosfato. Por comparación de secuencias aminoacídicas una de ellas mostró identidad con la proteína PstS de *E. coli*, la cual es parte del regulón Pho. Utilizando la base de datos de secuencias genómicas de *At. ferrooxidans* 23270 para encontrar posibles genes homólogos a componentes del regulón Pho de *E. coli*, se encontraron posibles genes homólogos a los genes del sistema de dos componentes *phoB/phoR*, el operón *pst*, y los genes *ppk* y *ppx*. La organización física de estos genes y su grado de conservación con los genes equivalentes de *E. coli* permite afirmar que *At. ferrooxidans* posee un sistema homólogo al regulón Pho de *E. coli*. Podemos especular que el metabolismo de los poliP podría regularse de una manera diferente en este microorganismo acidófilo.

## 2. Summary

*Acidithiobacillus ferrooxidans* (former *Thiobacillus ferrooxidans*) is one of the main acidophilic chemolithotrophic bacteria involved in biohydrometallurgy. These biomining processes are subjected to varying environmental conditions, such as changes in temperature, pH, lack of nutrients or presence of toxic metals. It is of a special interest to understand the molecular mechanisms by which these microorganisms respond and adapt to their environment. Phosphate can become a limitant nutrient for this microorganism due to its intrinsic ability to form precipitates with metal ions. This lack of phosphate can directly affect the bioleaching operations. Due to the possible relationship between phosphate and heavy metal resistance our laboratory has initiated the study of phosphate and polyphosphate metabolism in *At. ferrooxidans*.

*Escherichia coli* and other bacteria possess a genmetic system to scavenge phosphate, known as the Pho regulon. It consist of a number of genes whose expression is induced by phosphate starvation. Their gene products are involved in phosphorous scavengning and transport of phosphate into the citoplasm.

Many bacteria accumulates phosphate in the form of inorganic polyphosphates (polyP). These are linear polymers of many tens or hundred of ortophosphate residues linked by phosphoanhydride bonds. PoliP has a great number of functions, such as energy source and phosphate reservoir, participation on tolerance to toxic metals and as modulator of the stationary phase responses to environmental changes and stress adaptation. Polyphosphate Kinase (PPK) is the main enzyme involved in polyP synthesis. This enzyme is a homotetramer of 80 kDa subunits that catalizes the reversible transfer of the  $\gamma$ -phosphoryl group from ATP to polyP.

In this thesis we have postulated the existence in *At. ferrooxidans* of a Pho regulon whose genes would be induced by the lack of phosphate in the medium. We studied the *ppk* gene from *At. ferrooxidans* by reverse genetics. Based on the known PPKs we designed consensus-degenerate primers to isolate an internal fragment of the *ppk* gene by means of CODEHOP-PCR. Later, we used the available incomplete genomic sequence of *At. ferrooxidans* for the isolation of the complete *ppk* gene. The gene was cloned, sequenced and overexpressed in *E. coli*. The *At. ferrooxidans ppk* gene contains 2106 base pairs and codifies for a protein of 79 kDa which shares 34% of identity with the *E. coli* PPK.

By means of two dimensional polyacrilamide gel electrophoresis we found several proteins that change their expression levels in phosphate limiting conditions. By comparing the amino acid sequences we found an *At. ferrooxidans* protein sharing identity with the PstS protein which is part of the Pho regulon from *E. coli*. By using the incomplete *At. ferrooxidans* ATCC 23270 genome sequence database we found putative homolog genes to *phoB/phoR* two component system, the *pst* operon and the *ppk* and *ppx* genes, involved in polyphosphate synthesis. Based on the physical organization of these genes and their degree of conservation we can strongly suggest that *At. ferrooxidans* possesses a Pho regulon system homolog to the *E. coli* Pho regulon. And we can speculate that polyP metabolism could be regulated in a different way in this acidophilic microorganism.

### 3. Introducción

El fosfato es un compuesto esencial para todas las células ya que forma parte de los ácidos nucleicos y de los fosfolípidos, actúa como fuente de energía y es transferido a las proteínas para modificar su función.

Bajo condiciones naturales, el fosfato disponible para un microorganismo depende de la cantidad que exista en el medio ambiente así como de su solubilidad, la que es dictada por el pH del medio, la presencia de metales pesados y otros factores (Wanner, 1996). *Escherichia coli* utiliza 3 clases de compuestos como fuentes primarias de fósforo: i) fosfatos inorgánicos, ii) organofosfatos y (iii) fosfonatos. Los fosfatos inorgánicos existen en 3 formas: ortofosfato (Pi), pirofosfato (PPi) y polifosfatos (poliP, también llamados volutina) (Wanner, 1996).

#### 3.1. Transporte de Fosfato

##### 3.1.1. Sistema Pit

En *E. coli*, cuando existe un exceso extracelular de fósforo, ya sea como Pi o como compuestos fosforilados, estos ingresan al periplasma a través de porinas generales de membrana externa, tales como OmpC y OmpF. Los compuestos fosforilados generan Pi mediante su hidrólisis realizada por la fosfatasa alcalina y el fosfato total del periplasma ingresa al citoplasma a través del sistema de transporte de fosfato inorgánico Pit (phosphate inorganic transporter), que se encuentra en la membrana citoplasmática. El sistema Pit consta de 2 proteínas, codificadas por los genes *pitA* y *pitB*, cuya expresión es constitutiva. Tiene alta velocidad de transporte y baja afinidad por el fosfato, con una Km para el fosfato de 38.2  $\mu\text{M}$  y una velocidad máxima de 55 nmoles de Pi ingresado por min por mg de proteína (Van Veen, 1997).

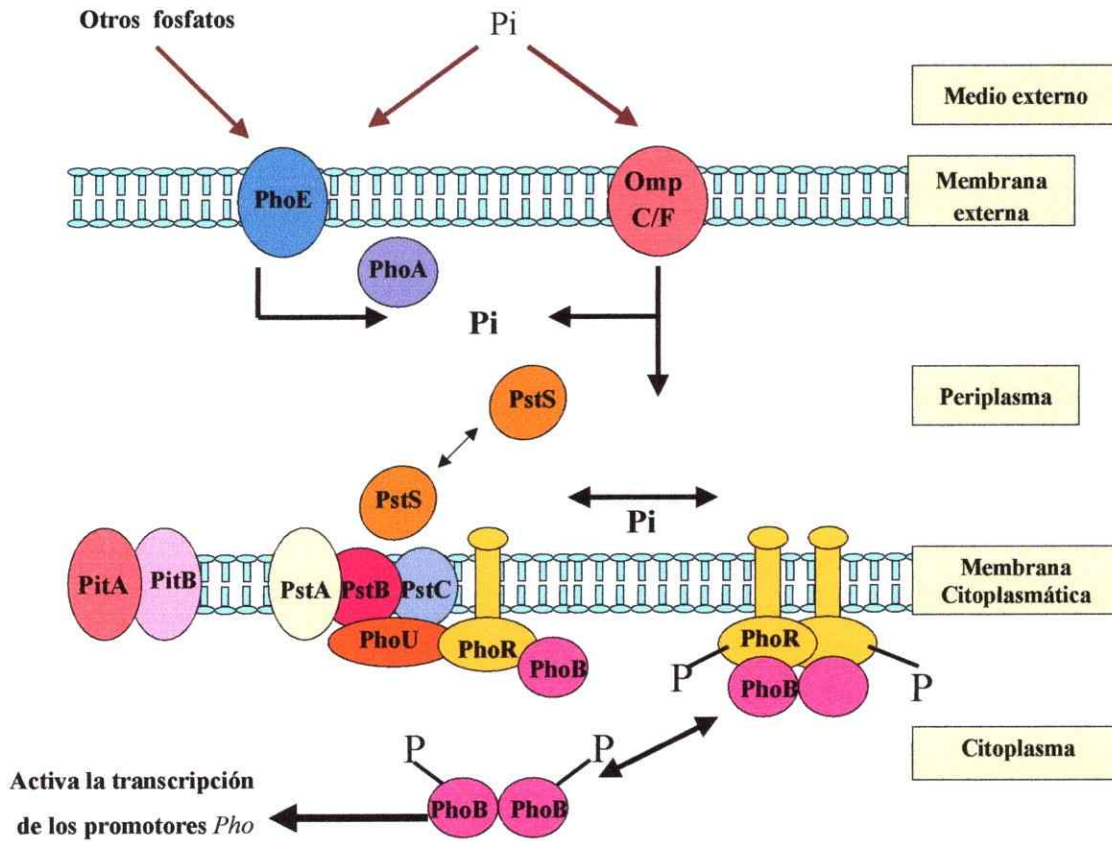
### 3.2. El regulón Pho

Frente a la carencia de fósforo ciertos microorganismos, dentro de los cuales se incluye *E. coli*, han desarrollado sistemas genéticos que permiten captar trazas de Pi desde el medio. En *E. coli* existe un sistema conocido como el regulón Pho. Todos los genes de un regulón están sujetos a un control molecular común y coordinado. El regulón Pho es un conjunto de genes que aumenta su expresión más de cien veces en carencia de fosfato (concentración menor de 4  $\mu\text{M}$  de Pi), mientras que se inhibe cuando hay un exceso de este compuesto (Wanner, 1996).

En *E. coli* se han descrito 38 genes que forman parte del regulón Pho. Se encuentran organizados en ocho unidades transcripcionales, dentro de las cuales se destacan el gen *phoE*, codificante para una porina de membrana externa (PhoE), que permite el ingreso de compuestos fosforilados al periplasma; el gen *phoA*, que codifica para una fosfatasa alcalina (PhoA) no específica que se ubica en el periplasma, el operón *pstSCAB-phoU*, que codifica para el sistema de transporte específico para fosfato Pst (phosphate specific transport) (Fig. 1) y una proteína auxiliar, llamada PhoU, y el operón formado por *phoB/phoR*, (sistema de dos componentes donde PhoR es el sensor y PhoB el regulador de respuesta). Además existen dos operones *phn*, relacionados con el metabolismo de fosfonatos y el operón *ugp*, relacionado con el metabolismo de glicerol fosfato además de una unidad transcripcional que codifica para una proteína que une ATP (Wanner, 1996). Se ha postulado también que el operón formado por los genes *ppk* y *ppx* responsables principales del metabolismo de poliP, formarían parte del regulón Pho (Rao y col., 1998).

Los genes del regulón Pho se caracterizan por la presencia en su región promotora de un elemento de control llamado caja *pho*, la cual corresponde a una secuencia consenso de 18 nucleótidos (5'- CTGTCATA(A/T)A(T/A)CTGTCA(C/T)-3'), ubicada diez nucleótidos río

arriba de cada posible región -10 de los distintos promotores de estos operones. La caja *pho* es el sitio de unión del activador transcripcional PhoB en su estado fosforilado (Wanner, 1996).



**Figura 1.** Esquema de las vías de entrada del fosfato en *E. coli*. Para captar fosfato del medio esta bacteria utiliza las porinas de membrana externa PhoE (específica para aniones) y las porinas generales OmpC y OmpF. En el periplasma, la fosfatasa alcalina (PhoA) degrada compuestos fosforilados captados del medio y genera Pi. El Pi se une a PstS, que lo conduce al sistema de transporte Pst, ubicado en la membrana citoplasmática y formado por las proteínas PstA, PstB y PstC, más una proteína auxiliar llamada PhoU, que es un regulador negativo cuya función aún no está completamente establecida. El sistema Pst transfiere la señal al sensor PhoR. Este se autofosforila y transfiere su grupo fosfato al regulador PhoB, el cual se activa y regula a nivel transcripcional, aumentando la expresión del conjunto de genes descritos como regulón Pho. Se muestra el sistema Pit, que corresponde a un sistema de transporte de fosfato de expresión constitutiva (Wanner, 1996).

La activación del regulón Pho es inducida por la carencia de fosfato. Se postula que el sistema Pst, en conjunto con la proteína PhoU regulan la actividad de fosforilación de la proteína PhoR, que es el sensor. PhoR fosforilado adquiere actividad PhoB quinasa, fosforilando a PhoB, el que en esta condición activa la transcripción de los genes del regulón Pho (Fig 1). En presencia de un exceso de fosfato, PhoR facilita la desfosforilación de PhoB fosforilado y se detiene la transcripción de estos genes (Wanner, 1996).

La porina de membrana externa, codificada por el gen *phoE*, es importante en la difusión de aniones a través de la membrana externa. Estos aniones incluyen Pi, organofosfatos, poliP, ácidos teicoicos, ácidos nucleicos y otros. Muchos de los compuestos organofosforilados no pueden atravesar la membrana citoplasmática, por lo que son hidrolizados en el periplasma por fosfatasas, dentro de las cuales se encuentra una fosfatasa alcalina no específica codificada por el gen *phoA*. En condiciones de carencia de fosfato, el Pi presente en el periplasma es incorporado al citoplasma principalmente por el sistema Pst (Van Veen, 1997).

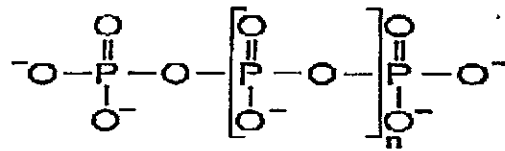
Pst es un sistema de alta afinidad por fosfato y baja velocidad de incorporación de este anión, con una Km de 0.4  $\mu$ M y una velocidad máxima de 15.9 nmoles de Pi por min por mg de proteína. Pertenece a la superfamilia de los transportadores ABC (Van Veen, 1997). Consta de las proteínas PstA y PstC; proteínas integrales de membrana que forman parte del canal; PstB que es la ATPasa (a veces también llamada permeasa) y PstS (también llamada PhoS), que es la proteína periplásmica de unión a Pi (Fig. 1). En *E. coli*, los genes de este sistema se encuentran formando parte de un operón junto con el gen *phoU*, que codifica para una proteína auxiliar. La expresión basal de este operón es necesaria para la regulación del regulón Pho. La proteína PstS se ha cristalizado y su estructura ha sido resuelta a 1.7 Å mediante difracción de rayos X (Luecke y Quioco, 1990).

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

### 3.3. Metabolismo de los poliP

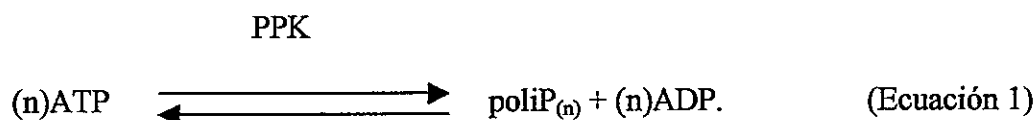
#### 3.3.1. Aspectos generales

Los poliP inorgánicos son polímeros lineales de residuos de ortofosfato unidos por enlaces fosfoanhídridos de alta energía (Fig. 2). Pueden ser obtenidos *in vitro* a altas temperaturas a partir de Pi. Se encuentran en todos los seres vivos y se ha postulado que son una de las macromoléculas más antiguas e importantes en la evolución prebiótica (Wächterhäuser, 1992).



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

En *E. coli* la polifosfato quinasa o polifosfato ADP fosfotransferasa (PPK) es la principal enzima responsable de la síntesis de poliP a partir de ATP. Cataliza la transferencia reversible del grupo fosforilo  $\gamma$  del ATP al poliP (Ecuación 1) (Ahn y Kornberg, 1990). La PPK es un homotetrámero de subunidades de 80 kDa codificadas por el gen *ppk* (Akiyama y col., 1992).



No obstante, la presencia de poliP de cadena corta en un mutante *ppk* de *E. coli* sugiere que en este microorganismo existirían otras enzimas involucradas en la síntesis de poliP (Kornberg y



col., 1999). La PPK de *E. coli* presenta otras actividades enzimáticas, tales como nucleósido difosfato quinasa, en la cual cataliza la reacción de fosforilación de GDP y otros nucleósidos difosfato para formar nucleósidos trifosfato (Kuroda y Kornberg, 1997). También genera guanosinas tetrafosfato, a partir de pirofosfato y GDP (Kornberg y col., 1999). El gen *ppk* ha sido descrito en otras bacterias (Tabla 1).

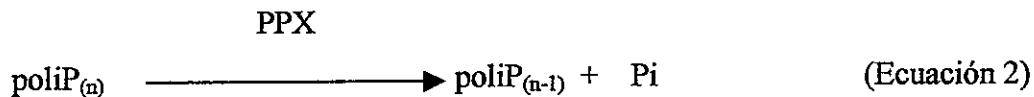
**Tabla 1.** Bacterias en las cuales se encuentra el gen *ppk*.

<b>Organismo</b>	<b>Nº de acceso <sup>a</sup></b>
<i>E. coli</i>	gi 147310 gb L03719.1
<i>Klebsiella aerogenes</i>	gi 391737 dbj D14445.1
<i>Neisseria meningitidis</i>	gi 7379120 emb AL162753.2
<i>Acinetobacter sp., ADP1</i>	gi 2462044 Z46863.1
<i>Acinetobacter baumannii 252</i>	gi 4731291 gb AF116175.1 AF116175
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	gi 2463578 dbj AB007598.1
<i>Vibrio cholerae</i>	gi 3452464 gb AF083928.1
<i>Streptomyces griseus</i>	gi 12054826 AJ243674.3
<i>Streptomyces coelicolor</i>	gi 21218582 ref NC_003888.
<i>Mycobacterium marinum</i>	gi 9255846 gb AF271348.1
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	gi 11139539 gb AF271097.1
<i>Dictyostelium discoideum</i>	gi 5823451 gb AF176830.1 AF176830
<i>Clorobium tepidum</i>	gi 3089165 gb AF060078.1
<i>Helicobacter pylori</i>	gi 15611071 ref NC_000921.1
<i>Salmonella typhimurium</i>	gi 3550416 gb AF085682.1
<i>Synechocystis sp.</i>	gi 14595185 dbj D64005.2 SYCSLRG
<i>Mycobacterium leprae</i>	gi 13093428 emb AL583923.1
<i>Deinococcus radiodurans</i>	gi 15805042 ref NC_001263.1 [15805042]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	gi 3261671 emb Z83018.1
<i>Bacillus halodurans</i>	gi 10173727 dbj AP001511.1 AP001511
<i>Xylella fastidiosa</i>	gi 15839180 NP_299868.1
<i>Campylobacter coli</i>	gi 2239078 emb Y07620.1 CCPPK[2239078]
<i>Acidithiobacillus ferrooxidans<sup>b</sup></i>	gi 15209404 emb AJ315948.1 AFE315948

<sup>a</sup>, gi corresponde al número de acceso de los genes *ppk* en bases de datos Genbank.

<sup>b</sup>, Gen *ppk* estudiado en esta tesis.

La principal enzima responsable de la degradación de poliP en *E. coli* es la exopolifosfatasa (PPX). Es un homodímero de subunidades de 58 kDa, codificado por el gen *ppx* (Akiyama y col., 1993).



En *E. coli* (Akiyama y col., 1993) y *V. cholerae* (Ogawa y col., 2000) se ha observado que los genes *ppk* y *ppx* se encuentran formando parte de un operón, mientras que en *P. aeruginosa* se encuentran juntos pero organizados en forma convergente (Zago y col., 1999). En *E. coli* se ha postulado que el operón formado por los genes *ppk* y *ppx*, formaría parte del regulón Pho (Wanner, 1996; Rao y col., 1998; Nemesyanova, 2000).

### 3.3.2. Funciones del poliP

Se ha postulado que el poliP actúa como sustituyente del ATP en reacciones de proteínas quinasas (Kornberg y col., 1999). También es una reserva de Pi, debido a que el poliP puede ser convertido a Pi por la acción de polifosfatasas como la PPX, lo que asegura una mantención de niveles estables de este ión (Kornberg y col., 1999); su alta densidad de cargas negativas y la flexibilidad de su enlace lo convierte en un buen quelante de iones metálicos tales como  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ , lo que sugiere su posible participación en mecanismos celulares de desintoxicación (Keasling 1997). También colabora en la mantención del pH intracelular al presentar acción tampón contra el álcali (Kornberg y col., 1999). Existen otras funciones del poliP como por ejemplo participar en la regulación de la expresión de ciertos genes tales como *rpoS*, factor sigma de fase estacionaria (Shiba y col., 1997) y de los genes SOS, sistema global de respuesta ante distintos tipos de estrés (Tsutsumi y col., 2000). Se ha observado una asociación funcional de la RNA polimerasa de *E. coli* con poliP (Kusano e Ishihama, 1997). Otra función consiste en la formación de complejos junto con poli-β-hidroxibutirato y  $\text{Ca}^{2+}$ . Se ha demostrado *in vitro* que estos complejos forman canales de calcio no proteicos que son activados por voltaje

(Das y col., 1997). Se piensa que *in vivo* estos canales controlarían la entrada de calcio para mantener la homeostasis y evitar posibles respuestas fisiológicas derivadas del aumento de la concentración citoplasmática de este ion. Se ha propuesto que estos complejos estarían involucrados en el transporte de ADN a la célula (Reusch, 2000). Recientemente se ha demostrado que la proteasa Lon de *E. coli* forma un complejo con poliP. Este complejo es responsable de la degradación de proteínas ribosomales en respuesta a la carencia de aminoácidos (Kuroda y col., 2001).

Se ha demostrado que la mutación del gen *ppk* de microorganismos patógenos tales como *P. aeruginosa* afecta su motilidad flagelar, la que es dependiente de la expresión de *rpoS* (Raschid y col., 2000). Los mutantes *ppk* de *N. gonorrhoeae* y *N. meningitidis* crecen menos vigorosamente que las células normales y muestran una mayor sensibilidad al suero humano (Tinsley y Gotschlich, 1995). Uno de los mecanismos propuestos para explicar lo anterior consiste en que la PPK puede estar involucrada en la regulación del nivel de nucleósidos trifosfato y desoxinucleósidos trifosfato debido a su capacidad de regenerar nucleótidos trifosfato. (Kuroda y Kornberg, 1997). Otras evidencias apuntan a que la PPK puede influenciar la estabilidad de los ARNm debido a que forma parte del degradosoma de *E. coli*, complejo de varias proteínas que está relacionado con la degradación de ARNm, en el cual su función consistiría en mantener un microambiente apropiado removiendo el poliP inhibitorio además de los nucleósidos difosfato, debido a que mediante su actividad reversa permite la regeneración de ATP (Blum y col., 1997).

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

*E. coli* acumula poliP al inicio de la fase exponencial de crecimiento y en la fase estacionaria. Cuando un cultivo pasa a la fase exponencial de la curva de crecimiento, el nivel intracelular de poliP cae entre 5 a 10 veces. La dinámica de acumulación y utilización del poliP muestra sin duda que las principales funciones del poliP deben ser como fuente de energía y reserva de Pi. La asociación de la acumulación de poliP con la limitación de algunos nutrientes e incluso con condiciones de estrés, que son acompañadas de cambios bruscos en condiciones ambientales, sugiere que probablemente el poliP sea un enlace entre estas situaciones y los sistemas globales de respuesta. Productos relacionados con el poliP, como las guanosinas tetra y pentafosfato pueden proveer estas funciones. Se ha demostrado que bajo ciertas condiciones de estrés, las guanosinas tetrafosfato pueden inhibir la degradación hidrolítica de poliP debido a que actúan como inhibidores de la *ppx*, sin afectar la función de la PPK en *E. coli* (Kornberg y col., 1999).

El poliP se ha encontrado en un amplio rango de organismos pertenecientes a los 3 dominios de los seres vivos, lo que ha permitido sugerir un importante rol evolutivo. El estudio de reacciones bioquímicas “fósiles” ha mostrado que las glucoquinasas de ciertas bacterias tienen mayor actividad al utilizar poliP como sustrato en vez de ATP. En otros procariontes filogenéticamente más “nuevos”, la actividad de estas enzimas es más alta con ATP, mientras que las de eucariontes inferiores utilizan solamente ATP (Kulaev y col., 2000). Se ha postulado que el rol energético de los poliP ha ido decreciendo a lo largo de la evolución y las funciones regulatorias aparecerían como predominantes en eucariontes (Kulaev y Kulakovskaya, 2000). Cabe mencionar la importancia de los estudios del metabolismo de los poliP en miembros del dominio *Archaea*. A la fecha, se ha descrito la presencia de una actividad PPK asociada a glicógeno en el crenarqueote *Sulfolobus acidocaldarius* (Skorko y col., 1989). Sin embargo, los

resultados obtenidos en nuestro laboratorio han mostrado que si bien la actividad existe, esta no se encuentra asociada a glicógeno (Cardona y col., 2001).

### **3.4. Aplicaciones Biotecnológicas del Metabolismo de los poliP**

#### *3.4.1. PoliP y descontaminación de aguas*

La contaminación por fosfato en las aguas debida a descargas de procesos industriales, y residuos de actividades humanas es un problema global. En los ecosistemas acuáticos uno de los nutrientes limitantes es el Pi, que al aumentar debido a la contaminación, provoca el crecimiento de enormes cantidades de biomasa, especialmente algas, que terminan por agotar el oxígeno presente en las aguas y causan la llamada eutroficación de lagos (Oriens, 1986). La necesidad de remover el fosfato de las aguas contaminadas ha derivado en el desarrollo de distintos procesos de tipo químico y biológico. El principio de los procesos biológicos de remoción de fosfato, llamados EBPR “Enhanced Biological Phosphorous Removal”, consta de 2 grandes etapas, una fase aerobia y otra anaerobia. En la fase anaerobia, los microorganismos se encuentran en un ambiente rico en fuentes de carbono, pero pobre en aceptores de electrones, por lo tanto el poliP presente es degradado a Pi (Bond y col., 1999), con lo que se incrementa el gradiente de protones a través de la membrana. Las fuentes de carbono son tomadas y guardadas como polímeros de poli-hidroxialcanoatos (PHA). En la fase aeróbica siguiente, el sistema se hace rico en aceptores de electrones pero pobre en fuentes de carbono, lo cual provoca la degradación de los PHA y la síntesis de poliP a expensas del ATP generado en el proceso anterior. Como en esta fase se consume más Pi del que es secretado en la fase anaerobia, el resultado neto consiste en la remoción de Pi de las aguas contaminadas (Keasling y col., 2000). Existen varios intentos por mejorar este proceso. Estos implican, por una parte, la selección natural de bacterias

acumuladoras de poliP tales como *Acinetobacter* sp., *Micrococcus phosphovorans*, *Lamprospira* spp. y *Rhodocyclus* spp. (Mino, 2000), y por otra parte la manipulación genética de estas bacterias (Kornberg y col., 1999).

#### 3.4.2. Descontaminación de iones de metales pesados

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

#### 3.5. Metabolismo del fosfato en *Acidithiobacillus ferrooxidans*.

*At. ferrooxidans* es una bacteria mesofílica, Gram-negativa, quimiolitotrófica, acidofílica, capaz de fijar CO<sub>2</sub>. Algunas cepas son capaces de fijar N<sub>2</sub>. Obtiene su energía por la oxidación del ion ferroso y formas reducidas de azufre, utilizando como aceptor final de electrones el oxígeno. Sus características metabólicas la hacen apropiada para su uso en procesos biohidrometalúrgicos, donde su principal función es convertir los sulfuros insolubles de metales como Cobre, Zinc o Níquel a sulfatos solubles, lixiviando los metales, que pueden ser

recuperados posteriormente. Es uno de los microorganismos presentes en los consorcios microbianos encontrados en procesos biohidrometalúrgicos (Rawlings y Kusano, 1994).

Una de las características de *At. ferrooxidans* es presentar crecimiento en altas concentraciones de iones metálicos. Por ejemplo, es capaz de crecer en medios que contienen 160 g/l de  $\text{Fe}^{2+}$  (Rawlings y Kusano, 1994). Las altas concentraciones de metales en el ambiente donde se desarrolla *At. ferrooxidans* hacen posible pensar que la biodisponibilidad de fosfato se vea afectada debido a la formación de precipitados, por ejemplo, con ion férrico. Como consecuencia de esto puede observarse una menor eficiencia en las faenas de biolixiviación debido a que la velocidad de crecimiento celular y la oxidación de sales ferrosas disminuyen (Tuovinen, 1990).

En nuestro laboratorio se ha estudiado la respuesta de *At. ferrooxidans* a la carencia de fosfato. Se ha demostrado que al cultivar *At. ferrooxidans* en un medio sin fosfato por 2 generaciones, por un lado, se reduce el crecimiento celular y el metabolismo endógeno, mientras que, por otro lado, aumentan los niveles de expresión de 25 proteínas, que podrían formar parte de un sistema de captación de fosfato similar al de bacterias heterotróficas (Seeger y Jerez, 1993). La menor disminución del crecimiento en el primer traspaso desde un medio con fosfato hacia otro sin fosfato podría ocurrir porque *At. ferrooxidans* estaría aprovechando reservas de fosfato (Seeger y Jerez, 1993).

Estudios de microscopía electrónica de transmisión muestran que *At. ferrooxidans* acumula gránulos densos a los electrones cuando crece en un medio con fosfato. Estos desaparecen en los siguientes trasposos a medios sin fosfato. Estudios de análisis de dispersión de la fluorescencia de rayos X (EDAX, "Energy Dispersive Analysis of X-ray fluorescence"), indican que estos gránulos densos a los electrones están constituidos por fósforo y oxígeno, lo que sugiere que se trata de poliP (Alvarez y col., 2001).

---

Previamente en nuestro laboratorio se han microsecuenciado algunas de las 25 proteínas inducidas en carencia de fosfato. La secuencia N-terminal de una de ellas presenta similitud con la secuencia N-terminal de la proteína PstS de *E. coli* (Jerez, datos no publicados).

### **3.6. Hipótesis de trabajo**

La presencia de poliP en *At. ferrooxidans* y su comportamiento frente a la carencia de fosfato nos llevan a postular la presencia de un gen *ppk* y un regulón Pho.

#### **Objetivos**

Los objetivos de esta memoria de título son el aislamiento y caracterización del gen *ppk* de *At. ferrooxidans* y la búsqueda de un posible sistema homólogo al regulón Pho de *E. coli*. mediante análisis bioinformático y genética reversa.



## 4. Materiales y Métodos

### 4.1. Cepas y condiciones de Cultivo

Se trabajó con las cepas de *At. ferrooxidans* ATCC 19859 y ATCC 23270. Estas se cultivaron a 30°C en un medio ajustado a pH 1.5 que contenía: 33,3 g/l de  $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,4 g/l de  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 0,1 g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , y 0,04 g/l de  $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$ .

Las cepas de *E. coli* utilizadas fueron JM109 (Promega<sup>®</sup>) y BL21(DE3) (Novagen<sup>®</sup>). Se crecieron en medio LB (Sambrook y col., 1989). Cuando fue requerido, los cultivos se suplementaron con Ampicilina (LB-Amp) a una concentración final de 100 mg/l a partir de una solución stock de concentración 10 g/l.

Para la preparación de placas de medio sólido, al medio LB se le adicionó agar (Difco<sup>®</sup>) a una concentración final de 1.5 % (p/v). Las placas LB-XIA se suplementaron con las siguientes concentraciones finales de X-Gal 50 mg/ml, IPTG 200 mM y Ampicilina 100 mg/l.

### 4.2. Técnicas generales de Biología Molecular

#### 4.2.1. Extracción de ADN cromosómico

Tanto para *E. coli* como para *At. ferrooxidans* se utilizó el protocolo para bacterias Gram-negativas del Kit Wizard de purificación de ADN genómico (Promega<sup>®</sup>). El paso de preparación de las células ha sido modificado y adaptado para *At. ferrooxidans* de la siguiente manera: 85 ml de cultivo de *At. ferrooxidans* se centrifugaron a 8.832 g durante 10 min. El pellet obtenido se resuspendió en 1 ml de solución de  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , 0.0177 M, pH 1.75. Este paso tiene por objetivo limpiar las células y eliminar el exceso de  $\text{Fe}^{3+}$  que presenta el cultivo. Posteriormente el protocolo se utilizó sin modificación.



#### *4.2.2. Extracción de ADN plasmidial*

##### Minipreps

Se utilizó el Kit Wizard Plus Minipreps DNA purification system (Promega®). Se utilizaron cultivos crecidos en 5 ml de medio LB-Amp. Se siguió el protocolo recomendado por el proveedor cambiando el primer paso. Este cambio consistió en utilizar 4.5 ml de cultivo en 3 pasos sucesivos de centrifugación de 1.5 ml del cultivo cada vez a 10.000 g por 2 min. Es necesario hacer este paso para obtener mayor cantidad de células debido a que se utiliza un cultivo inoculado a partir de un cultivo de noche y crecido solo por 5 a 6 horas. El resto del protocolo se llevó a cabo sin cambios.

##### Maxipreps

Se utilizó el kit Wizard® Maxipreps DNA purification system (Promega®), con cultivos de 100 o 200 ml de medio LB-Amp. Se siguió el protocolo recomendado por el proveedor.

#### *4.2.3. Digestiones de ADN con enzimas de restricción*

Las digestiones de ADN cromosomal o plasmidial se realizaron de acuerdo a lo indicado por los proveedores de cada enzima. En el caso de las reacciones de desfosforilación, se utilizó fosfatasa alcalina (CIP) (New England Biolabs®).

#### *4.2.4. Electroforesis de ADN en geles de agarosa*

Para visualizar el ADN plasmidial o cromosomal, ya sea íntegro o digerido con enzimas de restricción, se utilizaron geles de agarosa. Los geles se prepararon en tampón TAE 0.5X, con una concentración de 1 % de agarosa ultrapura (Gibco-BRL® o Winkler®). Para los experimentos de hibridación de ADN, los geles se prepararon al 0.9 % en tampón TAE 0.5X. Las muestras de ADN se mezclaron con solución de carga (0.25 % de Azul de Bromofenol, 40 % de Sacarosa).

Para los experimentos de hibridación de ADN la electroforesis se efectuó a 20 V para separar los fragmentos de ADN cromosómico con mayor resolución. Cuando se trataba de fragmentos que posteriormente iban a ser purificados, las corridas se realizaron a 50 V. El colorante de la solución de carga, al llegar a la parte inferior del gel indica el final de la electroforesis.

Como marcadores de estándares de peso molecular se utilizaron 1kb DNA Ladder y 1kb plus DNA ladder (Gibco BRL<sup>®</sup>), 1kb Ladder (Promega<sup>®</sup>) y ADN del fago  $\lambda$  digerido con la enzima *Hind* III y marcado con Digoxigenina (Roche<sup>®</sup>).

La tinción se realizó durante 10 min en una solución de TAE 0.5X con bromuro de etidio a una concentración de 0.5  $\mu\text{g/ml}$ . Las bandas se visualizaron por la fluorescencia emitida al irradiar con luz ultravioleta de 320 nm.

#### 4.2.5. Purificación de fragmentos de ADN desde geles de agarosa

Se utilizó el Kit Wizard PCR preps (Promega<sup>®</sup>), sin modificaciones hasta el paso final, en el cual en vez de 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  precalentada a 65°C, se agregaron 55  $\mu\text{l}$  para compensar la pérdida de 5  $\mu\text{l}$  de volumen en la columna.

#### 4.2.6. Clonamiento de productos de PCR

Para el clonamiento de fragmentos amplificados por PCR, DOP-PCR y CODEHOP-PCR, se utilizaron como vectores los plasmidios pGEM-T y pGEM-T Easy (Promega<sup>®</sup>). Estos vectores son específicamente diseñados para el clonamiento de productos de PCR ya que poseen nucleótidos de timina en sus extremos 5', los cuales se complementan con los nucleótidos de adenina del extremo 3' del amplificado agregados por error de ciertas ADN polimerasas, como la *Taq* ADN polimerasa.

Para las reacciones de ligación, se siguieron las instrucciones sugeridas por los proveedores, utilizando 1  $\mu$ l de T4 ADN ligasa (3 U/ $\mu$ l) (Promega<sup>®</sup>), 1  $\mu$ l de tampón para ligasa 10X, 1  $\mu$ l de plasmidio (10 ng) y 7  $\mu$ l de inserto (10-50 ng). Esta reacción se incubó por toda la noche a 10°C o por 1 h a 25°C. Un volumen de 5  $\mu$ l de la reacción de ligación se utilizó para transformar 50  $\mu$ l de células competentes de la cepa de *E. coli* JM109 (Promega<sup>®</sup>), siguiendo el protocolo descrito por los proveedores. Al finalizar la transformación, a los tubos se les adicionó 950  $\mu$ l de medio LB y se incubaron a 37°C con agitación durante 1 h. Luego se plaquearon 200  $\mu$ l de esta incubación en placas LB-XIA. Se centrifugó el resto por 5 min a 8832 x g para, después, eliminar parte del sobrenadante y plaquear el pellet resuspendido en 200  $\mu$ l del sobrenadante. Las placas se incubaron a 37°C hasta el día siguiente.

Las colonias celestes o blancas que se obtuvieron, se analizaron mediante PCR en colonias con los partidores sp6 y T7, que flanquean el sitio de clonamiento del vector.

#### 4.2.7. Secuenciación de ADN

La secuenciación de fragmentos de ADN se realizó utilizando el kit dsDNA cycle sequencing system (Gibco BRL<sup>®</sup>).

El gel de secuenciación se armó entre 2 vidrios. Para sellar la parte inferior se preparó una solución que contenía 5 ml de Gel-Mix<sup>®</sup> 6 (Gibco BRL<sup>®</sup>), 62,5  $\mu$ l de APS 10 % y 25  $\mu$ l de TEMED. La solución se deposita sobre un soporte de papel y goma e inmediatamente se colocan los vidrios encima de esta última. Entonces, la solución sube por entre los vidrios por capilaridad y cuando polimeriza, sella la parte inferior de la cámara. Para hacer el gel de secuenciación se tomaron 33 ml de Gel-Mix<sup>®</sup> 6 (Acrilamida al 5,7 % p/v, Bisacrilamida 0,3 % p/v, Urea 42 % p/v y H<sub>2</sub>O 51 % p/v, TEMED 3 mM en TBE 100 mM). A los 33 ml de Gel-Mix 6 se le agregó 198  $\mu$ l de APS al 10 %.

El kit dsDNA Cycle Sequencing System (Gibco BRL<sup>®</sup>), se basa en el método de terminación con didesoxinucleótidos descrito por Sanger en 1977. Se hace una síntesis de ADN utilizando una mezcla de nucleótidos y cada didesoxinucleótido en sendos tubos (uno con didesoxi A, otro con didesoxi C, otro con didesoxi G y otro con didesoxi T). Estos didesoxinucleótidos, al carecer de 3'OH, impiden que la síntesis de la hebra continúe, por lo tanto la síntesis de ADN en cada tubo se realiza hasta que se incorpora un didesoxinucleótido. La proporción entre desoxinucleótidos y didesoxinucleótidos así como la presencia de varias hebras de ADN templado satisfacen todas las posibilidades estadísticas de inserción de didesoxinucleótidos, obteniéndose todos los tamaños de síntesis, que son analizados al separar los productos de reacción en un gel de poliacrilamida al 6 %.

El kit presenta algunas adaptaciones de la técnica anteriormente mencionada. Por ejemplo se utiliza *Taq* ADN polimerasa en lugar del fragmento Klenow de la ADN polimerasa I de *E. coli*. Esta enzima permite catalizar la reacción de síntesis de ADN a una temperatura de 70°C. La alta temperatura de síntesis y la introducción de 7-desaza-dGTP en la mezcla de didesoxinucleótidos evitan la formación de estructura secundaria en el ADN templado. Cabe mencionar también que al utilizarse un protocolo de ciclos de reacción en el termociclador se necesita menos cantidad de ADN templado. La reacción de síntesis es solamente de una sola hebra, pues la mezcla de secuenciación utiliza un partidor a una concentración final de 1 pmol/μl. Anteriormente, éste ha sido marcado con [ $\gamma^{33}\text{P}$ ] ATP (NEN<sup>®</sup>) en su extremo 5'. La reacción de marcación utiliza la T4 Polinucleótido quinasa, que es una enzima que cataliza la transferencia del grupo fosforilo  $\gamma$  del [ $\gamma^{33}\text{P}$ ] ATP al 5'OH- del ADN y ARN. Esta reacción de la enzima, llamada "forward reaction", al ser muy eficiente, es uno de los métodos más utilizados para marcar oligonucleótidos.

Para la reacción de marcación del partidor se siguió el protocolo descrito en el manual dsDNA Cycle secuencing system (Gibco-BRL®). Se utilizó una solución de [ $\gamma^{33}\text{P}$ ] ATP 5 mM. El programa utilizado para marcar (MARSEC), consistió en 3 pasos: (1) 10 min a 37°C, (2) 5 min a 55°C y (3) tiempo indefinido a 4°C.

Para la reacción de secuenciación se utilizó una variación del protocolo indicado por el manual dsDNA Cycle secuencing system (Gibco-BRL®).

Luego de la amplificación por PCR de los fragmentos clonados en el vector pGEM-T, estos se purificaron en gel de agarosa y se utilizaron entre 15 y 25  $\mu\text{l}$  de ADN templado manteniendo la relación de 33 nanogramos por kilobase de ADN. A la mezcla de reacción se agregaron 2  $\mu\text{l}$  de DMSO al 100%. El volumen final fue de 37  $\mu\text{l}$  y se despacharon 8,5  $\mu\text{l}$  a cada tubo.

Al terminar la reacción, las muestras se desnaturaron en el termociclador a 95°C durante 10 min. Se aplicaron 5  $\mu\text{l}$  de cada reacción en el orden A, C, G, T en cada uno de los pocillos del gel.

Las electroforesis se corrieron a 1680 V con una corriente de 0.22 mA. Se realizaron corridas cortas de 1,5 h y largas de 3,5 h. Al terminar cada corrida, el gel se colocó sobre papel Whatman N°3 (Advantec MFS®) y se secó con vacío y calor durante 3 h para luego exponerlo mediante autorradiografía por un número de días, que varió dependiendo de la intensidad de la marca radiactiva. Luego del revelado de las placas de rayos X, el conjunto de las corridas corta y larga permitieron leer, como promedio, una secuencia de alrededor de 350 nucleótidos.

#### **4.3. Búsqueda del gen *ppk* de *At. ferrooxidans* ATCC 19859**

La búsqueda del gen *ppk* de la cepa de *At. ferrooxidans* ATCC 19859 se realizó mediante las técnicas de hibridación con una sonda heteróloga, utilizando el gen *ppk* de *E. coli*, las técnicas de DOP-PCR (Telenius y col., 1992) y CODEHOP-PCR (Rose y col., 1998). Se utilizaron además

las secuencias nucleotídicas del contig 2898 del proyecto de secuenciación del genoma de *At. ferrooxidans* ATCC 23270, que no está anotado pero contiene  $3 \times 10^6$  pb en contigs de diversos tamaños (<http://www.tigr.org>).

#### 4.3.1. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Según el tipo de experimento se diseñaron 3 tipos de partidores: partidores degenerados para DOP-PCR (“degenerate oligonucleotide primers”), partidores consenso degenerados para CODEHOP-PCR (“consensus-degenerate oligonucleotide primers”) y partidores no degenerados para experimentos de PCR común.

La técnica de DOP-PCR consiste en diseñar partidores degenerados a partir de las secuencias aminoacídicas de péptidos obtenidos por digestión de una proteína o bien utilizar las regiones más conservadas que se observan en un alineamiento de secuencias aminoacídicas de proteínas homólogas a la proteína de interés. Un problema de esta técnica es el alto grado de degenerancia de los partidores dado por la degeneración del código genético. Se diseñaron 6 partidores a partir de un alineamiento de 11 secuencias aminoacídicas de PPKs presentes en Genbank (Anexo 1).

La técnica de CODEHOP-PCR (Rose y col., 1998) es una modificación del DOP-PCR y consiste en la utilización de partidores consenso-degenerados diseñados a partir de bloques conservados de un alineamiento de secuencias aminoacídicas. Cada partidador consiste en una zona 3' de carácter degenerado y una zona 5' de consenso. Solamente se necesitan 3 a 4 aminoácidos conservados para el diseño de la zona 3', la que es estabilizada en los primeros ciclos de amplificación por la zona 5' consenso, que abarca dos tercios del partidador. Para el diseño de los partidores, se utilizaron 6 secuencias aminoacídicas de PPKs (*Acinetobacter baumannii*, *Campylobacter coli*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Pseudomonas aeruginosa* y

*Synechocystis sp.*). En estas se identificaron bloques de secuencias conservadas mediante el uso del programa "BLOCK MAKER" ([http://blocks.fhcrc.org/blocks/blockmkr/make\\_blocks.html](http://blocks.fhcrc.org/blocks/blockmkr/make_blocks.html)).

Los partidores se diseñaron en el mismo sitio web.

Los partidores de carácter no degenerado se diseñaron, en un principio a partir de las secuencias del gen *ppk* de *At. ferrooxidans* ATCC 19859 obtenidas en nuestro laboratorio. Posteriormente se diseñó el partidador *ppk5pri*, a partir de la secuencia del "contig" 2898 del proyecto de secuenciación del genoma de *At. ferrooxidans* ATCC 23270.

Se utilizaron otros partidores no degenerados, correspondientes a secuencias de los plasmidios utilizados en el clonamiento y expresión del gen *ppk*. Estos partidores son *sp6*, T7 y T7 terminador. Todos los oligonucleótidos se compraron a la empresa GENSET Corp, La Jolla, California y se resumen en la tabla 2.

#### 4.3.2. Condiciones de Reacciones de PCR

##### Reacciones de DOP-PCR y CODEHOP-PCR

Para las reacciones de DOP-PCR y CODEHOP-PCR se tomaron 3  $\mu$ l de ADN templado (40 ng/ $\mu$ l), 4  $\mu$ l de partidador directo (D) a una concentración de 100 ng/ $\mu$ l, 4  $\mu$ l de partidador reverso (R), a una concentración de 100 ng/ $\mu$ l, 5  $\mu$ l de dNTPs (1 mM), 10  $\mu$ l de Buffer 5X, (250 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.5% Triton X-100 y 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>), 21.5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O, 2.5  $\mu$ l de DMSO 100 % y 0.2  $\mu$ l de *Taq* ADN polimerasa (5 U/ $\mu$ l). El volumen de reacción fue de 50  $\mu$ l por cada tubo. El método utilizado para hacer estas reacciones consistió en incluir la mayor cantidad de elementos en la mezcla de reacción. Primero se agregó a cada tubo la pareja de partidores D y R correspondientes (4  $\mu$ l de cada uno), luego se preparó el mix 1, que contenía (para 1 tubo): 3  $\mu$ l de ADN templado (40 ng/l), 5  $\mu$ l de dNTP (1 mM), 6.5  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O y 2.5  $\mu$ l de DMSO 100 %.



Tabla 2. Partidores utilizados.

Partidor	Tipo y estrategia de Diseño	Secuencia
ppk7M <sup>a</sup>	DOP	5' aayytngaygarttywyatg 3'
ppk7E <sup>a</sup>	DOP	5' aayytngaygarttytwyga 3'
ppk7M <sup>a</sup>	DOP	5' aayytngaygarttytwyaa 3'
ppk8iA <sup>a</sup>	DOP	5' gcytsytcrctcraanckngc 3'
ppk8iN <sup>a</sup>	DOP	5' ttytsytcrctcraanckngc 3'
ppk8i <sup>a</sup>	DOP	5' ytstcrctcraanckngc 3'
ppk9CH <sup>b</sup>	CODEHOP	5' ggcgatcttctgctccaayytngayga 3'
ppk10CH <sup>b</sup>	CODEHOP	5' ggcccagtgaaatggtgttttsytcrctcraa 3'
ppk11CH <sup>b</sup>	CODEHOP	5' ggaactgaaggcccgccttygaygarsa 3'
ppk12CH <sup>b</sup>	CODEHOP	5' tccaggttgccggtgcatcmwrtcngc 3'
ppkCHNH <sub>2</sub> <sup>d</sup>	CODEHOP	5' atgtctgaggtgcctgcgcengaraargc 3'
ppkNH <sub>2</sub> Ec <sup>g</sup>	ND	5' atgggtcaggaaaagctatac 3'
ppkCOOHEC <sup>g</sup>	ND	5' ttattcagggttgctcgagtgat 3'
ppk1Nd <sup>c</sup>	ND	5' gatattccagagacgggga 3'
ppk2Nd <sup>c</sup>	ND	5' ggagaataaacctcaagtg 3'
ppk3Nd <sup>c</sup>	ND	5' gttcagaggaaacggccgacaatgga 3'
ppk4Nd <sup>c</sup>	ND	5' agcgtctggaagaagtgggtgtgca 3'
ppk5Nd <sup>c</sup>	ND	5' aggatgagaatcatcttggcatg 3'
ppk6Nd <sup>c</sup>	ND	5' ggggtggaaatcgacctgggtggtg 3'
ppk7Nd <sup>c</sup>	ND	5' accacctgcacaccacttcttc 3'
ppk8Nd <sup>c</sup>	ND	5' aggtgcatgccaagatgattctc 3'
ppk9Nd <sup>c</sup>	ND	5' gaagtgcagtagaccattaccga 3'
ppk10Nd <sup>c</sup>	ND	5' cagaaccgggttgaaagctct 3'
ppk11Nd <sup>c</sup>	ND	5' tgaccatcgtttccagcaatct 3'
ppk12Nd <sup>c</sup>	ND	5' ggaaacgatgggtcaggtagcgt 3'
ppk14Nd <sup>c</sup>	ND	5' ttccagcagcggtagcgcgtg 3'
ppk15Nd <sup>c</sup>	ND	5' ttggtgcgcccgcgcaatgg 3'
ppk16Nd <sup>c</sup>	ND	5' tgttgcgctcaccgaaactg 3'
ppk17Nd <sup>c</sup>	ND	5' cgcggcggcgcaacaagcga 3'
ppk18Nd <sup>c</sup>	ND	5' cgcgctggcogtagaattac 3'
ppk5pri <sup>d</sup>	ND	5' catgtaggggcgcgccaactgct 3'
ppkNH <sub>2</sub> Ndel <sup>c</sup>	ND	5' ccatatgtctgaggtgcctgcgcccggaaaaag 3'
ppkNH <sub>2</sub> Nde I <sub>2</sub> <sup>c</sup>	ND	5' ggggcaccatagctctgaggtgcctgcgccc 3'
ppkCOOHXho <sup>c</sup>	ND	5' gcgcctctcgagccataatgactgctcctggt 3'
ppkNH <sub>2</sub> Msc I <sup>c</sup>	ND	5' tggccatgtctgaggtgactgcgcccggaaaaagc 3'
SP6 <sup>e</sup>	ND	5' gatttaggtgacactataga 3'
T7-pGEM-T <sup>e</sup>	ND	5' ttgtaatacgactcactatag 3'
T7-Terminador <sup>f</sup>	ND	5' gctagttattgctcagcgg 3'
T7-pET <sup>f</sup>	ND	5' gaaattaatacgactcactatag 3'

**a:** Partidor diseñado desde un alineamiento de secuencias; **b:** Desde BLOCKS; **c:** Desde secuencia de *At. ferrooxidans* ATCC 19859 obtenida en nuestro laboratorio; **d:** Desde la secuencia del genoma de la cepa ATCC 23270; **e:** Desde vector pGEM-T; **f:** Desde vector pET; **g:** Desde genoma de *E. coli* K-12. **DOP:** Partidor degenerado, **CODEHOP:** partidor consenso degenerado, **ND:** Partidor no degenerado.

El volumen final es de 25  $\mu$ l. El mix 2 contenía para 1 tubo, 10  $\mu$ l de buffer *Taq* 5X, 15  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O y 0.2  $\mu$ l de *Taq* ADN polimerasa. Su volumen fue de 25  $\mu$ l.

Todas las reacciones de DOP-PCR y CODEHOP-PCR se hicieron con partida en caliente (“hot start”). Esta asegura que la reacción de amplificación comience cuando el ADN templado se encuentra totalmente desnaturado, evitando así la amplificación inespecífica que pudiese ocurrir si se mezclara la enzima con el ADN templado y los partidores antes de comenzar la desnaturación inicial. Para iniciar una reacción con “hot start” se colocaron los tubos con los partidores y el mix 1 en el termociclador. Se inició el programa hasta que la temperatura alcanzó los 95°C, luego se colocó pausa al termociclador y se despachó a cada tubo el volumen correspondiente de mix 2 (25  $\mu$ l).

Las reacciones de PCR se realizaron con el termociclador MJ Research. El esquema general fue el siguiente: 3 min a 95°C, seguidos por N ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a la temperatura de hibridación (X), con Y min de síntesis a 72°C. Finalizando con 3 min de síntesis final a 72°C. El número de ciclos (N), la temperatura de hibridación (X) y el tiempo de síntesis (Y), son función del tamaño del amplificado a obtener y de la T<sub>m</sub> de los partidores utilizados.

#### Reacción de PCR sobre las colonias recombinantes.

Con el fin de analizar los clones recombinantes obtenidos y comprobar la presencia de inserto, se hizo la reacción de PCR en colonias. Esta reacción se realizó sin purificar el ADN plasmidial. Su principio se basa en que este último queda en solución luego de la lisis que sufren las bacterias con el paso N°1 de la PCR, que se realiza a 95°C. Se utilizaron partidores complementarios a las secuencias del vector que flanquean el sitio donde está clonado el inserto. Por lo tanto si la colonia escogida tiene inserto, la reacción de PCR en colonias mostrará un

amplificado del tamaño del inserto más un número de pares de bases, que corresponden al tamaño que se amplificaría si el vector no tuviese inserto.

Para realizar esta reacción, se tocó una colonia con una punta estéril y el material extraído se resuspendió en un volumen de 100  $\mu$ l de agua estéril. Posteriormente se tomaron 2  $\mu$ l de la suspensión bacteriana y se agregó el mix, que está compuesto de 1  $\mu$ l de partidor D (100 ng/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l de partidor R (100 ng/ $\mu$ l), 1  $\mu$ l de dNTPs 1mM, 2  $\mu$ l de buffer 5X (250 mM KCl, 50 mM Tris-HCl, pH 9.0, 0.5% Triton X-100 y 12.5 mM MgCl<sub>2</sub>) y 3  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O. El volumen final de cada tubo fue de 10  $\mu$ l. Para todas las reacciones de PCR en volúmenes de 10  $\mu$ l fue necesario colocar en cada tubo una gota de aceite de silicona Gibco-BRL®. Esto se hizo para evitar la evaporación del H<sub>2</sub>O en el tubo.

El programa de reacción fue el siguiente: luego del "hot-start", (1) 3 min a 95°C, seguido por 25 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 50°C, 1-2 min a 72°C, para finalizar con 3 min a 72°C.

#### PCR inversa

La amplificación del extremo 3' del gen *ppk* se completó por PCR inversa (Ochman y col., 1988). Esta técnica consiste en amplificar las regiones 5' y 3' de un gen mediante PCR con partidores divergentes. La amplificación es posible debido a que el ADN templado es digerido con enzimas de restricción y recircularizado. Las enzimas de restricción son elegidas de acuerdo a un ensayo de hibridación que permite identificar fragmentos de hibridación dentro de los cuales se espera que el gen esté completo.

Para el experimento se diseñaron los partidores *ppk5Nd* y *ppk6Nd*, orientados en forma divergente. Se digirió 2  $\mu$ g de ADN de *At. ferrooxidans* ATCC 19859 con las enzimas *Nco* I, *Nru* I y *Sma* I. Posteriormente se ligó 320 ng en un volumen de 100  $\mu$ l para permitir la circularización de las moléculas de ADN sobre si mismas. Como templado para las reacciones de

PCR inverso se utilizaron 15 µl de las muestras de ADN circularizadas. Como el tamaño de los posibles fragmentos a amplificar fue superior a 4 Kb, se utilizó la mezcla de ADN polimerasas Elongasa (Gibco-BRL®).

#### 4.4. Aislamiento del gen *ppk* de *At. ferrooxidans*

Para clonar el gen *ppk* se hicieron experimentos de CODEHOP-PCR con los partidores *ppk9CH*, *ppk10CH*, *ppk11CH* y *ppk12CH*. Los dos fragmentos amplificados se clonaron en el vector pGEM-T, utilizando las instrucciones de ligación sugeridas por el proveedor. Los experimentos de PCR inversa y amplificación por PCR con partidores diseñados a partir de los datos obtenidos de la secuencia incompleta del genoma de *At. ferrooxidans* ATCC 23270 permitieron obtener la secuencia completa del gen *ppk*.

##### 4.4.1. Experimentos de Hibridación de ADN

Para los experimentos de hibridación con sonda heteróloga se utilizó como sonda el gen *ppk* de *E. coli*. La sonda *ppkEc*, marcada con digoxigenina se sintetizó a partir de ADN genómico de la cepa JM 109 de *E. coli*, utilizando el método PCR DIG Probe synthesis kit (Roche®) y los partidores no degenerados *ppkNH<sub>2</sub>Ec* y *ppkCOOHEc*. Para el experimento de hibridación se digirieron 3 µg de ADN cromosómico de la cepa ATCC 19859 con enzimas de restricción de acuerdo con las recomendaciones descritas por los proveedores para obtener una digestión total. Se utilizaron las enzimas de restricción *Ava* I, *Bam* HI, *Bgl* II, *Eco* RI, *Hae* III, *Hind* III, *Kpn* I y *Mbo* I. El volumen total de digestión fue de 30 µl.

Para el experimento de hibridación con la sonda homóloga *ppk1*-DIG se digirieron 3 µg de ADN cromosómico de las cepas ATCC 19859 y ATCC 23270 de *At. ferrooxidans* de acuerdo con las recomendaciones descritas por los proveedores para obtener una digestión total. Se

utilizaron las enzimas de restricción *Bam* HI, *Nru* I, *Nco* I, y *Ava* I. El volumen total de digestión fue de 30  $\mu$ l.

Los fragmentos de ADN totalmente digeridos se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa 0.9 % en buffer TAE 0.5X. Luego de la electroforesis el ADN fue desnaturado y transferido a una membrana de "nylon" positivamente cargada (Hybond-N+, Amersham<sup>®</sup>) mediante el método de transferencia semi-seca descrito por Sambrook y col., 1989. La sonda marcada con digoxigenina se sintetizó a partir de ADN genómico de la cepa ATCC 19859 utilizando el método PCR DIG Probe synthesis kit (Roche<sup>®</sup>) y los partidores no degenerados ppk3nd y ppk4nd.

Los experimentos de prehibridación e hibridación se realizaron a 37°C utilizando la solución DIG-Easy Hyb (Roche<sup>®</sup>). Luego de la hibridación, la membrana se lavó con soluciones de SSC/SDS, de acuerdo a lo descrito por Roche<sup>®</sup>. La detección de los fragmentos marcados con digoxigenina se realizó con un método quimioluminiscente utilizando el reactivo CSPD de acuerdo a lo descrito por Roche<sup>®</sup>.

#### **4.5. Clonamiento y expresión en *E. coli* del gen *ppk* de *At. ferrooxidans***

El gen *ppk* de *At. ferrooxidans* se amplificó por PCR con la enzima *Pwo* ADN polimerasa (Roche<sup>®</sup>), utilizando los partidores ppkNH2*Msc* I y ppkCOOH*Xho* I, diseñados a nivel de los extremos 5' y 3' de la región codificante del gen *ppk*, respectivamente. En la región 5' de cada partidor se incorporó un sitio de restricción *Msc* I para un partidor y un sitio *Xho* I para el otro, con el fin de orientar el clonamiento en el vector de expresión.

El fragmento se amplificó con un programa de ciclos de dos pasos. Las condiciones de amplificación fueron 3 min a 95°C, seguidos por 21 ciclos de 30 s de desnaturación a 95°C y 2 min 50 s de síntesis a 70°C y como paso final se dejó 3 min a 70°C. El fragmento amplificado se

purificó utilizando el kit Wizard PCR preps (Promega<sup>®</sup>), de acuerdo con las instrucciones del proveedor. Luego se realizó la reacción de “A-tailing”. Esta es necesaria para incorporar una base adenina en el extremo 3' de los amplificadores con la enzima *Pwo* y poder clonarlos en el vector pGEM-T easy de acuerdo a lo descrito por Promega<sup>®</sup>. El fragmento clonado se liberó mediante digestión con las enzimas *Msc* I y *Xho* I, cuyos sitios se utilizaron para ser clonados en el vector de expresión pET22b+ (Novagen<sup>®</sup>), previamente digerido con estas mismas enzimas. La construcción se transformó en la cepa JM109 de *E. coli* (Promega<sup>®</sup>). Las colonias transformantes se analizaron mediante una reacción de PCR en colonias utilizando los partidores universales T7 y T7 terminador, correspondientes a las secuencias flanqueantes al sitio de clonamiento del vector. Los clones positivos se crecieron en 5 ml de medio LB-Amp para realizar la extracción del ADN plasmidial. Esta se realizó utilizando el kit Wizard Minipreps (Promega<sup>®</sup>). Los plasmidios recombinantes obtenidos se utilizaron para transformar la cepa de expresión BL21(DE3) de *E. coli* (Novagen<sup>®</sup>), la cual se preparó competente de acuerdo al protocolo descrito por Chung y col., 1989.

El ensayo de inducción de la expresión del gen *ppk* de *At. ferrooxidans* en *E. coli* se realizó de acuerdo a lo descrito por Novagen<sup>®</sup>. Los clones recombinantes se crecieron en 5 ml de medio LB suplementado con ampicilina. La inducción se realizó durante 2 h a 37°C, agregando IPTG a una concentración final de 1 mM cuando los cultivos de *E. coli* alcanzaron una densidad óptica de 0.5 a 600 nm.

#### 4.5.1. Preparación de muestras para electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida-SDS.

Las muestras de células de *E. coli* para electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS se trataron con amortiguador de muestra (Laemmli, 1970) que contenía: Tris-HCl 0.0625 M (pH

6.8), SDS al 2%, glicerol al 10%, 2-mercaptoetanol al 5% y azul de bromofenol al 0.001% como colorante. Las muestras se desnaturaron 5 min a 100°C. Luego se centrifugaron 5 min a 8832 x g, para obtener solamente el sobrenadante con las proteínas solubilizadas, que fue utilizado para las electroforesis.

Para el análisis de las proteínas totales se utilizaron geles con un gel concentrador conteniendo 5% de poliacrilamida y un gel separador con un 10% de poliacrilamida. Las electroforesis se corrieron entre 100 o 200 V, hasta que el frente de migración alcanzó el borde inferior del gel. Los geles se tiñeron 30 min con una solución de azul de Coomasie al 0.2%, metanol al 50% y ácido acético al 7%. Se destiñeron luego mediante lavados sucesivos con una solución de metanol al 20% y ácido acético al 7%.

Como marcador de estándares de Peso molecular se utilizó “10 kDa protein ladder” (Gibco BRL<sup>®</sup>).

#### **4.6. Análisis *in silico* de secuencias y comparación con bases de datos.**

Las secuencias aminoacídicas de distintas PPKs se obtuvieron de Genbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Los alineamientos de secuencias aminoacídicas de PPKs se realizaron con el programa CLUSTAL W (<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu/multi-align/Options/clustalw.htmlbeauty>) y se pintaron posteriormente en cajas de acuerdo a su identidad y similitud mediante el uso del programa BOXSHADE ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)).

La identificación de bloques conservados de secuencias aminoacídicas de PPKs y el diseño de partidores para CODEHOP-PCR se realizaron mediante el programa BLOCK MAKER ([http://blocks.fhrc.org/blocks/blockmkr/make\\_blocks.html](http://blocks.fhrc.org/blocks/blockmkr/make_blocks.html)).

Para el registro y ensamblaje de las secuencias obtenidas a partir de los experimentos de secuenciación de los fragmentos de ADN amplificados mediante DOP-PCR, CODEHOP-PCR y PCR se utilizó el conjunto de programas GCG (Wisconsin Package Version 10.0, Genetics Computer Group, Madison, Wisc).

La comparación con bases de datos de las secuencias obtenidas en nuestro laboratorio se realizó mediante BLAST utilizando el programa BLASTx, que traduce los 6 marcos de lectura posibles y los compara con la base de datos (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

#### 4.6.1. Búsqueda un posible regulón *Pho* en *At. ferrooxidans*

A partir de la secuencia N-terminal de la proteína PstS de la cepa ATCC 19859 de *At. ferrooxidans*, aislada a partir de una electroforesis bidimensional, se realizó una búsqueda con el programa tBLASTx en la base de datos del genoma no terminado de *At. ferrooxidans* ATCC 23270. Esta permitió aislar 2 contigs que se analizaron mediante “caminatas” río arriba y río abajo. Las secuencias se ensamblaron con el programa GCG y se analizaron con el programa ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Algunas de las propiedades fisicoquímicas de las posibles proteínas obtenidas se analizaron mediante el programa ProtoParam de EXPASY (<http://expasy.cbr.nrc.ca/tools/protparam.html>). Posteriormente, mediante el uso del programa Cn3D viewer de NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/structure>) y la base de datos de estructuras de NCBI se obtuvo la estructura de la proteína PstS de *E. coli* y se realizó un alineamiento estructural entre esta proteína y sus posibles homólogos codificados en el genoma de *At. ferrooxidans*.

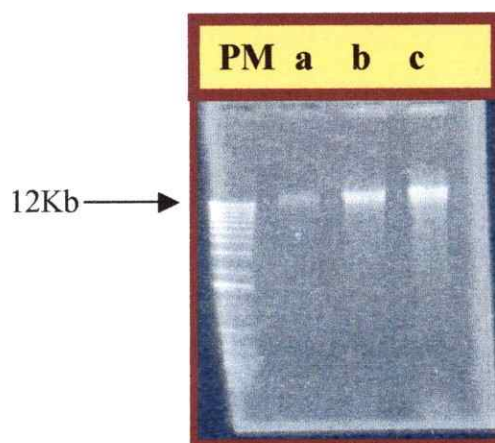


## 5. Resultados

### 5.1. Clonamiento del gen *ppk* de *At. ferrooxidans*

#### 5.1.1. Extracción de ADN cromosómico de *At. ferrooxidans*

La extracción del ADN cromosómico de *At. ferrooxidans* ATCC 19859 se realizó de acuerdo a lo descrito en materiales y métodos. Luego de la extracción se midió la densidad óptica a 260 nm de una dilución 1/100 (10  $\mu$ l de ADN en 990  $\mu$ l de agua). Se obtuvo un valor de 0,077. Tomando en cuenta que una unidad de densidad óptica corresponde a una concentración de ADN de 50  $\mu$ g/ml, se calculó que la concentración de ADN era de 385 ng/ $\mu$ l. El estado físico del ADN se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa, observándose bandas de tamaño superior a 12 Kb (Fig. 3). Se preparó una dilución a 40 ng/ $\mu$ l, la cual fue utilizada en todos los experimentos de amplificación por PCR.



**Figura 3.** Análisis de la preparación de ADN cromosómico de *At. ferrooxidans* ATCC 19859. Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% en la cual se aplicaron 40 (a), 200 (b) y 400 ng (c) de ADN cromosómico de *At. ferrooxidans* ATCC 19859. P.M., 1Kb DNA ladder.

### 5.1.2. Ensayos de DOP-PCR

En un intento por aislar el gen *ppk* de *At. ferrooxidans* se realizaron experimentos de DOP-PCR. Mediante un alineamiento de las secuencias de PPKs presentes en el anexo 1, se identificaron dos regiones conservadas que se utilizaron para el diseño de partidores degenerados, mostrados en la tabla 1. Luego de hacer los experimentos de DOP-PCR, clonamiento y secuenciación del fragmento amplificado, el análisis mediante BLASTn mostró que el fragmento no codificaba para el gen *ppk*. Los resultados se detallan en el anexo 2.

### 5.1.3. Ensayos de CODEHOP-PCR

Como segunda estrategia para el clonamiento del gen *ppk* de *At. ferrooxidans* se utilizó la técnica de CODEHOP PCR. Para el diseño de los partidores se tomaron las secuencias aminoacídicas de PPKs de las bacterias *A. baumannii*, *P. aeruginosa*, *M. tuberculosis*, *Synechocystis* sp., *C. coli* y *E. coli* y se buscaron bloques de secuencia conservados mediante el uso del programa Block Maker. Cabe mencionar que no se utilizaron todas las secuencias presentes en genbank porque muchas de ellas son de especies filogenéticamente emparentadas entre sí, lo cual le quita representatividad al alineamiento. El resultado de este análisis arrojó 9 bloques de secuencias conservadas. Para el diseño de los partidores se utilizaron tres de ellos (Fig. 4). Es importante destacar que mediante este procedimiento, los partidores presentan un grado de degenerancia mucho menor a los que fueron utilizados en los experimentos de DOP-PCR.

Los pares de partidores se utilizaron de manera de cumplir con las distintas combinaciones posibles (Fig. 5): *ppk9CH-ppk10CH*, *ppk11CH-ppk12CH*, y *ppk9CH-ppk12CH*.

**Bloque A**

*A. baumannii* 43 PLLEKLNK LIFSRNLDLFEIRV  
*P. aeruginosa* 31 PLLERLKE LIFSSNLDLFEIRI  
*M. tuberculosis* 31 PLLERAKE AIFASNLDLVMRV  
*Synechocystis* 77 PLLERLKE AIFCSNLDLVMRV  
*C. coli* 31 PLLERLKE AIYCTNLDLVMRV  
*E. coli* 43 PLLERMRF GLYSNNLDLTKVRF

A I F C S N L D E  
 5'ggc atc ttc tgc tcc aay ytn gay ga 3'

ppk9CH

**Bloque E**

*A. baumannii* 402 KEVTAV ELPAFDEE SNIQAVLQEFAGVAVVYGVYKTHAKM  
*P. aeruginosa* 386 KEVTAV ELPAFDEE SNIQIARLQOAGAVVYGVYKTHAKM  
*M. tuberculosis* 394 KQVAL ELKARFDEE CANLAWA RALEQAGVHVAYGLVGLKTHCKT  
*Synechocystis* 427 KEVTAV ELPAFDEE SNIQIARLQOAGAVVYGVYKTHAKM  
*C. coli* 394 IQVTVM ELKARFDEE NNHWA KALENAGAHVIYGITGFKVHAKV  
*E. coli* 450 KRVTVV ELQARFDEE ANLHWAKRLTEAGVHVIF SAPGLKIHKAL

F D E E N N I H W A  
 3'aar ctr cty stt ttg ttg taa gtg acc cgg 5'

ppk10CH

**Bloque I**

*A. baumannii* 615 YCSADW MERNLTKRVE  
*P. aeruginosa* 607 YLSADW MERNLDMRVE  
*M. tuberculosis* 665 WIGSADW MHRNLDORRVE  
*Synechocystis* 640 YIGSADW MSRNLERRVE  
*C. coli* 594 FISADW MPRNLERRLE  
*E. coli* 607 YLSADW MTRNLDYRIE

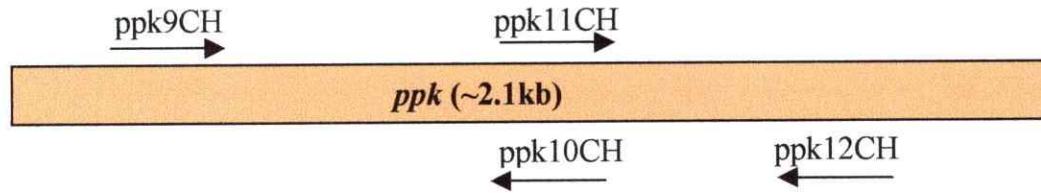
E L K A R F D E E  
 5'gaa ctg aag gcc cgc tty gay gar sa 3'

ppk11CH

A D W M H R N L D  
 3'cgn ctr wmc tac gtg gcg ttg gac cct 5'

ppk12CH

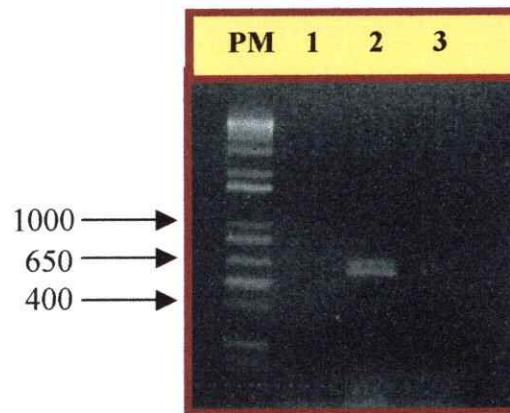
**Figura 4.** Bloques conservados de secuencia aminoacídica de las PPKs utilizados en el diseño de partidores CODEHOP-PCR. Los colores representan la zona del bloque utilizada para el diseño del correspondiente partidor CODEHOP y su orientación. Azul, hebra codificante; Naranja, hebra complementaria. (Ver Fig 5).



**Figura 5.** Esquema del gen *ppk* de *At. ferrooxidans* y representación de las combinaciones posibles empleadas con los partidores CODEHOP diseñados.

Suponiendo que el gen *ppk* de *At. ferrooxidans* tiene el mismo tamaño que sus homólogos presentes en otros genomas bacterianos, el tamaño esperado para cada amplificado de CODEHOP-PCR fue de ~1.1 Kb para el par ppk9CH-ppk10CH, ~1,6 Kb para el par ppk9CH-ppk12CH y ~630 pb para el par ppk11CH y ppk12CH.

De las tres posibles combinaciones solamente el par ppk11CH-ppk12CH dió amplificación positiva. Se obtuvieron 2 fragmentos A y B de aproximadamente 650 pb cada uno; tamaño muy similar al esperado. Para clonarlos fue necesario separarlos mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3% (Fig. 6).



**Figura 6.** Separación de los fragmentos amplificados por CODEHOP-PCR. Los productos de la reacción de amplificación con los partidores ppk11CH y ppk12CH (2) y los controles de especificidad con cada partidor solo ppk11CH (1) y ppk12CH (3), se separaron en un gel de agarosa al 3%. El fragmento de peso molecular mas alto (A) se separó del segundo (B). El programa de CODEHOP-PCR consistió en 3 min a 95°C, seguido por 30 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 60°C y 1 min 15 seg a 72°C, para finalizar con 3 min a 72°C. (PM), marcador de estándares de peso molecular 1Kb Plus DNA ladder.

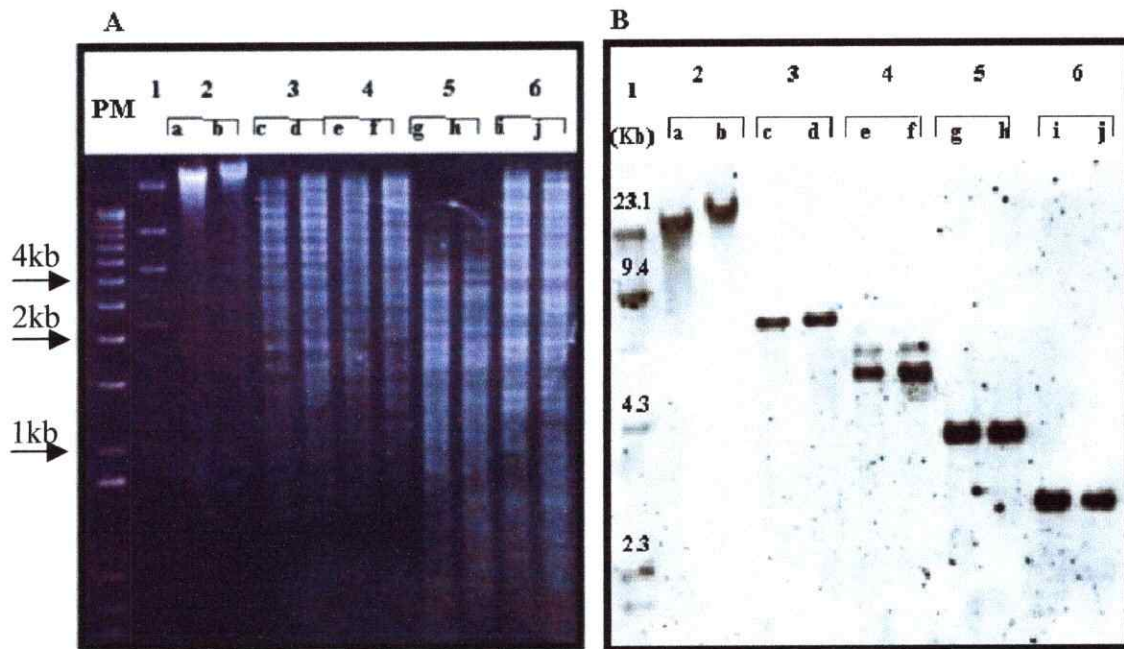
Los dos fragmentos se aislaron del gel separadamente y se purificaron con el kit Wizard PCR preps (Promega®). Cada uno se ligó al vector de clonamiento pGEM-T (Promega®) y cada construcción se transformó en la cepa JM109 de *E. coli*. El análisis de los clones recombinantes obtenidos permitió aislar 4 clones positivos para la familia A y 3 clones positivos para la familia B. La secuencia del fragmento de la familia A, al ser comparada con la base de datos, mostró una identidad de 44% con el gen *ppk* de *E. coli* y una similitud de secuencia aminoacídica de 50% con un fragmento interno de la PPK de *E. coli* (Fig. 7). Mientras que el fragmento B, mostró identidad con el gen *prf2*, codificante para el factor de terminación 2 de *E. coli* (Anexo 3).

<i>Af</i> 19859	1	NNIRMAERLEEVGQVYGVVNHKVHAKMILILRREEDGTRL YGHIGTGN
<i>Pa</i> 8830	1	-NIQLASRLQQAGAVV IYGVVGFKTHAKMMLILRREEDGELRRYAHIGTGN
<i>Ec</i> 10798	1	-NIHWAKRLTEAGVHV IFSAPGLKIHAKLFLISRKENGEVWRYAHIGTGN
<i>Af</i> 19859	51	YHPRNAR IYTDLSILLTANPDITADMNDLFMHTGMGKAPQLRCLLOSFFT
<i>Pa</i> 8830	50	YHAGNARLYTDYSLLTADVALCEDLHKLENQLIGMGKTLRMKKLLHAPFT
<i>Ec</i> 10798	50	FNEKTARLYTDYSLLTADARITNEVRRWFNFTENPYRPVTFDYLMVSPON
<i>Af</i> 19859	101	MFGGIQEAIDTEIRHGSKGR---ITIVRVNALVEPDLIRALYRASQAGVEI
<i>Pa</i> 8830	100	LKKNILLEM INREAAQAALGQPAHTMAKVNSLTDPKVIRALYKASQAGVRI
<i>Ec</i> 10798	100	SRRLIYEMVDREIANAQQGLPSGITLKLNNLVDKGLVDRLYAASSSGVPV
<i>Af</i> 19859	148	DLVVRGACALRPGIPGVSDHIVRSIVGRFLEHSRVYF GNNCHPRLWISS
<i>Pa</i> 8830	150	DLVVRGMCOLRPGIPGVSHNIHVRSLIGRFLEHSRIYYELNGGDEKLYLSS
<i>Ec</i> 10798	150	NLLVVRGMCSLIPNDEGISDNIRATSIVDRYLEHDRVYDFENGGDKKVYLSS

**Figura 7.** Alineamiento múltiple de secuencias aminoacídicas internas de PPKs. La secuencia obtenida a partir del fragmento amplificado por CODEHOP-PCR (*Af* 19859) fue alineada mediante el programa Clustal W con regiones internas de las PPK de *P. aeruginosa* (*Pa*) ATCC 8830 y *E. coli* (*Ec*) ATCC 10798 (K-12). Las regiones de identidad (cajas negras) y similitud (cajas grises) se pintaron con el programa BOXSHADE. Los números indican el inicio de la secuencia del fragmento interno y no representan la ubicación de dichos aminoácidos en la proteína PPK correspondiente.

## 5.2. Análisis de la región cromosomal que contiene el gen *ppk* mediante hibridación de ADN

Luego de clonar y secuenciar el fragmento A, amplificado por CODEHOP-PCR, se siguieron las estrategias de hibridación y PCR inversa para determinar completamente la secuencia del gen *ppk*. A partir de la secuencia del fragmento A se diseñaron los partidores internos no degenerados *ppk3Nd* y *ppk4Nd* que permitieron sintetizar la sonda marcada con digoxigenina *ppk1-DIG*. Con el objeto de comparar la organización física de la región cromosomal, la sonda se utilizó en un experimento de Southern Blot contra el ADN de las cepas ATCC 19859 y ATCC 23270 de *At. ferrooxidans* (Fig. 8).



**Figura 8** Análisis de la organización física de la región que contiene el gen *ppk* en dos cepas de *At. ferrooxidans*. **A)** Las muestras de ADN de las cepas de *At. ferrooxidans* ATCC 19859 (a, c, e, g, i) y ATCC 23270 (b, d, f, h, j) digeridas con las enzimas de restricción *Nru* I (3), *Bam* HI (4), *Nco* I (5) y *Sma* I (6) o sin digerir (2), se separaron mediante electroforesis en gel de agarosa 0.9% TAE 0.5X. **PM**, Estándar de peso molecular 1Kb DNA Ladder; **1**, Estándar de peso molecular  $\lambda$ /*Hind* III marcado con digoxigenina. **B)** Resultado de la autorradiografía luego de 17 h de exposición.

### 5.3. Determinación de la secuencia del gen *ppk* de la cepa ATCC 19859 de *At. ferrooxidans*

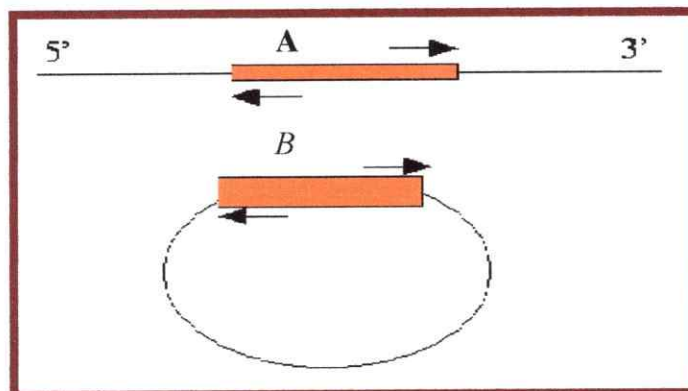
#### 5.3.1. Secuenciación del extremo 3' del gen *ppk*.

Mediante CODEHOP-PCR se aisló un fragmento interno del gen *ppk*. Para amplificar y obtener la secuencia de los extremos 5' y 3' del gen *ppk* se siguieron las estrategias de PCR inverso (Fig 9), clonamiento y secuenciación. Para ello se diseñaron los partidores *ppk5Nd* y *ppk6Nd*, orientados en forma divergente. El ADN genómico de *At. ferrooxidans* ATCC 19859 se digirió de manera separada con las enzimas *Nco* I, *Nru* I y *Sma* I, elegidas luego de obtener el resultado del experimento de hibridación. Posteriormente, el ADN digerido se ligó en un volumen 10 veces mayor para permitir la recircularización de las moléculas de ADN. Tras el experimento de PCR inverso, solamente se obtuvo un amplificado sobre el ADN digerido con la enzima *Nco* I (Fig. 10A). El tamaño de este fragmento es de 3.8 Kb, lo que está de acuerdo con el tamaño del fragmento de hibridación *Nco* I menos la zona del gen que no se incluye en el diseño de los partidores divergentes (332 pares de bases). Este fragmento se secuenció, permitiendo determinar la región 3' del gen. Además la secuencia reveló que uno de los sitios *Nco* I se encuentra localizado dentro del gen *ppk*. Esto impidió obtener, mediante esta estrategia, el extremo 5' del gen dentro del fragmento de 3.8 Kb.

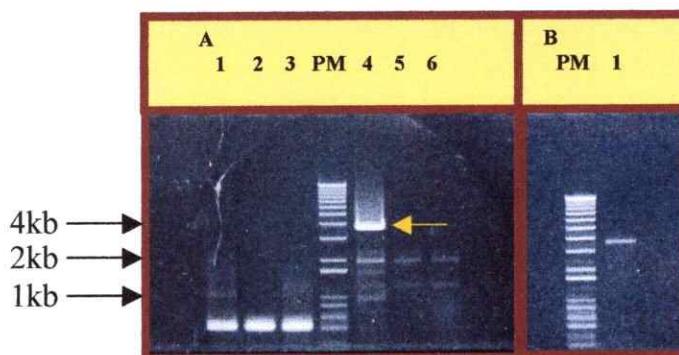
#### 5.3.2. Secuenciación del extremo 5' del gen *ppk*

A partir de datos del genoma de la cepa ATCC 23270 se diseñaron los partidores *ppkCHNH2* y *ppk5pri*, ubicados en la zona que codifica para el extremo amino de la PPK y 221 pares de bases río arriba del posible inicio de la traducción del gen *ppk*, respectivamente. Con estos partidores y los diseñados a partir de la secuenciación en nuestro laboratorio se logró

amplificar y secuenciar la zona codificante para el extremo 5' del gen, hasta obtener la secuencia completa (Fig. 11). El anexo 4 muestra la secuencia del gen junto con las posiciones correlativas de todos los oligonucleótidos utilizados.



**Figura 9.** Esquema de la técnica de PCR inversa. (A) Los partidores se diseñan de forma divergente. El DNA se digiere con una enzima de restricción y se liga en un volumen 10 veces mas alto para permitir la recircularización de las moléculas sobre si mismas. (B) Una vez que el templado se circulariza, es posible amplificar las regiones 5' y 3' mediante una reacción de PCR.



**Figura 10.** Aislamiento y purificación del fragmento de ADN de 3.8 Kb por PCR inversa. (A) Experimento de PCR inversa. En los carriles 1-3 se aplicó el producto resultante de la amplificación control con los partidores ppk4Nd y ppk5Nd sobre el ADN de *At. ferrooxidans* ATCC 19859 digerido con las enzimas *Nco* I (1), *Nru* I (2) y *Sma* I (3). En los carriles 4-6 se aplicó el producto de la amplificación con los partidores ppk5Nd y ppk6Nd sobre el ADN digerido con *Nco* I (4), *Nru* I (5) y *Sma* I (6). La flecha muestra el resultado de la amplificación. Las condiciones de amplificación fueron 3 min a 95°C, seguidos por 30 ciclos de 30 s a 95°C, 30 s a 55°C y 8 min a 68°C. La reacción se realizó con *Elongasa*. (B) El fragmento de 3.8 Kb, señalado con la flecha en (A) se purificó y se aplicaron 5µl del fragmento purificado P.M., marcador de estándares de peso molecular 1kb plus DNA Ladder.



### 5.3.3. Análisis del gen *ppk*

El marco abierto de lectura correspondiente al gen *ppk* de *At. ferrooxidans* codifica para una proteína de 701 aminoácidos (Fig. 11), con un peso molecular estimado de 79.4 kDa, un punto isoeléctrico teórico de 6.53 y un perfil de hidropatía de -0.145. La PPK de *At. ferrooxidans* presenta un 34% de identidad y un 55% de similitud con la PPK de *E. coli*

```

1  ggcaaacccgggttgatctctggtgctggtgattcgtgagggcgcggtggtgatcgaatga 60
61  ggaatcaaccgtcttccggatggcggggtgaccggcgacgtggactttgcccggcgagag 120
121 cagcgtgccccggtgatcaccgggtccccggcggggtcggaccatgactgtggctacc 180
181 cttctgcagaacaccctgatcgccgaggacaccgcatgggggaccgcatgctcgaagt 240
                                     M S E V
241 gcctgcgcccggaaaaagcccgttccgcgcccgcctctcgacagccctgagctgtacttcaa 300
    P A P E K A R S A P P L D S P E L Y F N
301 ccgagacctcagcatcctcgccctcaaccagcgggtactggccctggctgacgaccagcg 360
    R D L S I L A F N Q R V L A L A D D Q R
361 cgtaccgctgctggaacgtttacgctacctgacctcgtttccagcaatctggacgaatt 420
    V P L L E R L R Y L T I V S S N L D E F
421 ttttgaagtgcgcatggccggactgttgcagcggcttaaattcggcgccggccccttggg 480
    F E V R M A G L L Q R L K F G A G P L G
481 accggacatgcttgggcccacgcgaaatcgaggcagtagcgaaaaaggcccctgaaat 540
    P D M L G P Q R E I E A V A K K A H E I
541 cattccgaacaataccgatgcctgaatcagcgcctgctgcccgctctggctaaggaagg 600
    I S E Q Y R C L N Q R L L P A L A K E G
601 tattcgttgttgcgcccgcgcaatggcgggacagcgcagaaacgttggatcagcaatta 660
    I R L L R R R E W R A A Q K R W I S N Y
661 tttccagacggaggtgctgcctctgctcactccccctgagcctcgaccccggcccaccctt 720
    F Q T E V L P L L T P L S L D P A H P F
721 tcccaaggtacagaacaagggtgaatttcgctatcgttctggaaggccaggatgctta 780
    P K V Q N K G L N F A I V L E G Q D A Y
781 cggcgacacagccccatcgccatcgtagggcgccacgcatttcccccgcatcatctg 840
    G R H S P I A I V Q A P R I L P R I I W
841 gattccgcaacatctggcgggtccgaatgatttcgtgtttctctcctcogtcatccagga 900
    I P Q H L A G P N D F V F L S S V I H E
901 acatgtgcaggcgtctttccgggtctgaccatccagggtttttatcagtttcgggtgac 960
    H V Q A L F P G L T I Q G F Y Q F R V T
961 gcgcaacagtgaactctttgtggatgaggaagaggtggacaatctcctcgacgcgctggc 1020
    R N S E L F V D E E E V D N L L D A L A
1021 cgatgaattaccgctacgccccttggcgaggcggtacggctggaggtcgctaacaattg 1080
    D E L P L R P F G E A V R L E V A N N C
1081 tccgcccgaagtggggaatatcttctgaaacattttgaaactgagcagagcaacctgta 1140
    P R E V V E Y L L K H F E L S E S N L Y
1141 ttcatgacgggtcccgtgaatctgtcacgggttggcgccatcatcgaatgggtcccccg 1200
    S L Q G P V N L S R L A A I I E M V P R
1201 ccccgacttgctttatccgccccttataccggggtgccagcggtttgttcacaccccga 1260
    P D L L Y P P F I P G L P A V C S H P E
1261 gaacatattcgcgcatctacgggagggcggccatcctgctccatcaccataaccagagctt 1320
    N I F A H L R E A P I L L H H P Y Q S F
1321 caaccgggttctggatttccctccgcccaggcgggtcagcgcgatccaaaagtcatcggatcaa 1380
    N P V L D F L R Q A V S D P K V I G I K
1381 gcagacgctgtaccgtaccacccccgactccccgggtcatcgacgcgttgatagaagcggc 1440
    Q T L Y R T T P D S P V I D A L I E A A

```

```

1441 catggccgggaaacaggtcacggcagtggtcgaaactcaaggcccgtttgacgaagccaa 1500
      M A G K Q V T A V V E L K A R F D E A N
1501 taacatccgatggccgagcgtctggaagaagtgggtgtgcagtggtatacggcgtggt 1560
      N I R M A E R L E E V G V Q V V Y G V V
1561 caatcacaaggtgcatgccaaagatgattctcatcctgcgcccggaggaggacgggatccg 1620
      N H K V H A K M I L I L R R E E D G I R
1621 cctctacgggcaacttgggtacgggcaattatcatccccgcaatgcgcggtattactga 1680
      L Y G H L G T G N Y H P R N A R I Y T D
1681 tctcagcctgctcacggcaaattcccagacatcacggcggacatgaatgacctgttcacga 1740
      L S L L T A N P D I T A D M N D L F M H
1741 tactactggcatgggcaaggcaccacaattgcgctgtctgctgcagagtccctttacgat 1800
      I T G M G K A P Q L R C L L Q S P F T M
1801 gttccagggcatacaggaagccatcgatacggagatccgtcacggaagcaaaggtcgcat 1860
      F Q G I Q E A I D T E I R H G S K G R I
1861 catcgtgccccgtgaaacgcgctggtcgaaaccgatctgattcgcgccctgtaccgggccc 1920
      I V R V N A L V E P D L I R A L Y R A S
1921 ccaggccggggtgaaatcgacctgggtgctgcgcccgcctgtgccctgcgccccggcat 1980
      Q A G V E I D L V V R G A C A L R P G I
1981 cccaggtgtctccgatcatatccgggtacgttccattgtcgccgcttccctcgaacacag 2040
      P G V S D H I R V R S I V G R F L E H S
2041 tcgctctattacttcgaaacaacgggcatccccgtctctggatatacagagcggcactg 2100
      R V Y Y F G N N G H P R L W I S S A D W
2101 gatgggacgcaatctttccgcccgtctggaagtcgcagttaccattaccgaccccgactt 2160
      M G R N L F R R L E V A V P I T D P D L
2161 gcgccccgcatactcacgaaacccttcagctatacttggaaagacgactgtaacgcttg 2220
      R A R I L T E T L Q L Y L E D D C N A W
2221 ggcatgctgctgctggtgattatgaatttttacgcaacccccctggatgccaaactgcaa 2280
      A M R A D G D Y E F L R N P L D A N C K
2281 aatccgcacaggaccgtctgctggaactacaacaggagcagtcattatgggtgagagg 2340
      S A Q D R L L E H Y N R S S H Y G *
2341 cgcgagcagtgatcccgggtgctggtgctcaacagtaaggaggtgccggaa 2390

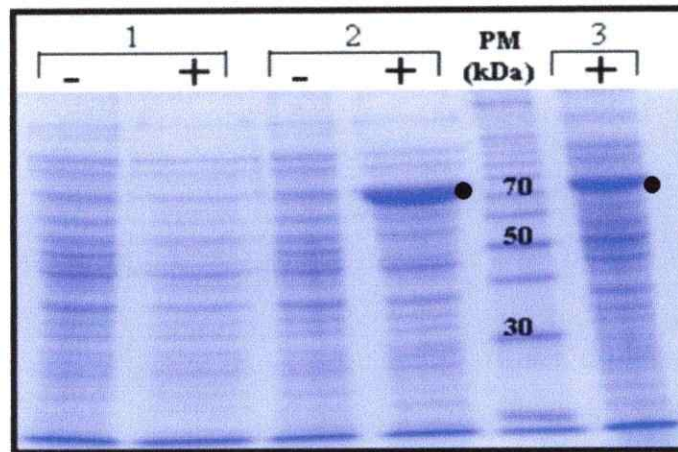
```

**Figura 11.** Secuencia del gen *ppk* de *At. ferrooxidans* 19859. El marco de lectura abierto codifica para una proteína de 701 aminoácidos (color rojo). El rectángulo indica el posible inicio de la traducción.

#### 5.4. Clonamiento y Expresión del gen *ppk* de *At. ferrooxidans* en *E. coli*

A partir de la secuencia completa del gen, se diseñaron los partidores *ppkNH2MscI* y *ppkCOOHXhoI*, los cuales permitieron amplificar el gen *ppk* completo de la cepa ATCC 19859. Como esta amplificación requirió de una alta fidelidad, se utilizó **i)** la enzima *Pwo* ADN polimerasa, cuya ventaja consiste en tener actividad correctora 3' → 5', por lo tanto su frecuencia de error es mucho menor que la de la *Taq* ADN polimerasa y **ii)** un bajo número de ciclos: 22. El fragmento amplificado se clonó en el vector pGEM-T, para ser liberado a partir de la doble digestión de este vector con las enzimas *Msc I* y *Xho I*. Posteriormente, se realizó la reacción de ligación al vector pET22b+, previamente cortado con las mismas enzimas y

desfosforilado con la enzima CIP. Luego de transformar la cepa JM 109 de *E. coli*, la selección de los clones recombinantes se realizó mediante PCR en colonias y se transformó la cepa BL21 (DE3) de *E. coli*, en la cual se realizó el experimento de sobreexpresión del gen *ppk* (Fig. 12).



**Figura 12.** Sobreexpresión del gen *ppk* de *At. ferrooxidans* ATCC 19859 en *E. coli*. La cepa de *E. coli* BL21(DE3) transformada con el vector pET22b sin inserto (1) o con el gen *ppk* (2) y la cepa de *E. coli* NR 100, que sobreexpresa la PPK de *E. coli* (3), fueron inducidas (+) o no (-) con IPTG 1 mM por 2 h. Las proteínas totales se separaron por SDS-PAGE y se tiñeron con azul de Coomassie. Los puntos muestran la sobreexpresión de la PPK de *At. ferrooxidans* (2+) y de *E. coli* (3+).

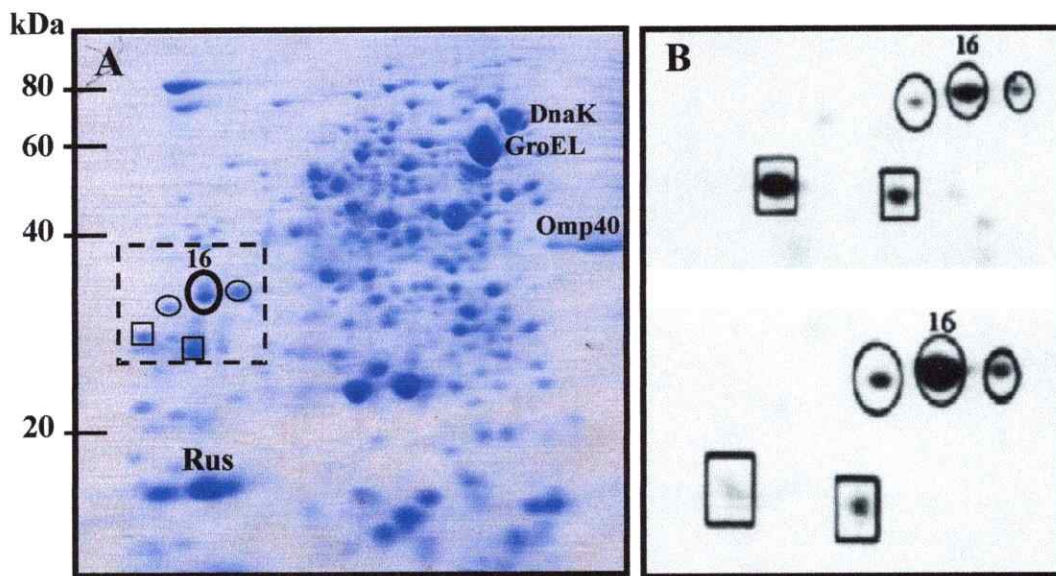
### 5.5. Búsqueda mediante genética reversa de genes homólogos a los del regulón

#### **Pho de *E. coli* en la cepa ATCC 19859 de *At. ferrooxidans*.**

En nuestro laboratorio se ha estudiado la respuesta de *At. ferrooxidans* ATCC 19859 a la carencia de fosfato (Seeger y Jerez, 1993). Mediante electroforesis bidimensional se han observado cambios en la expresión de al menos 25 proteínas cuando este microorganismo es traspasado desde medios de cultivo con fosfato a cultivos sin fosfato. Entre estas proteínas, una de ellas, la número 16 se induce en carencia de fosfato (Fig. 13). Mediante microsecuenciación

de Edman se determinó la secuencia del extremo amino de la proteína número 16. La secuencia obtenida fue APTISLLETGSTLLYPLFNLA V (Seeger y Jerez, 1992).

Al comparar la secuencia de este péptido contra la base de datos utilizando el programa BLASTp, el resultado arrojó una cierta similitud con la proteína PstS de *E. coli*, la que también se induce en carencia de fosfato. Esta es un proteína que une al fosfato en el periplasma para ser incorporado a la célula.



**Figura 13.** Cambio en la expresión de algunas proteínas de *At. ferrooxidans* ATCC 19859 por carencia de fosfato. (A) Las proteínas totales de *At. ferrooxidans* se separaron por electroforesis bidimensional y se tiñeron con Azul de Coomassie. El recuadro muestra la región de la proteína número 16, la cual fue analizada posteriormente. (Seeger y Jerez, 1992) (B) Se muestra esta misma región cuando células de *At. ferrooxidans* se crecieron en presencia de fosfato (parte superior) y en en carencia de fosfato (parte inferior). Como referencia se muestran las proteínas Omp40, DnaK, GroEL y Rusticianina, todas previamente identificadas en nuestro laboratorio.

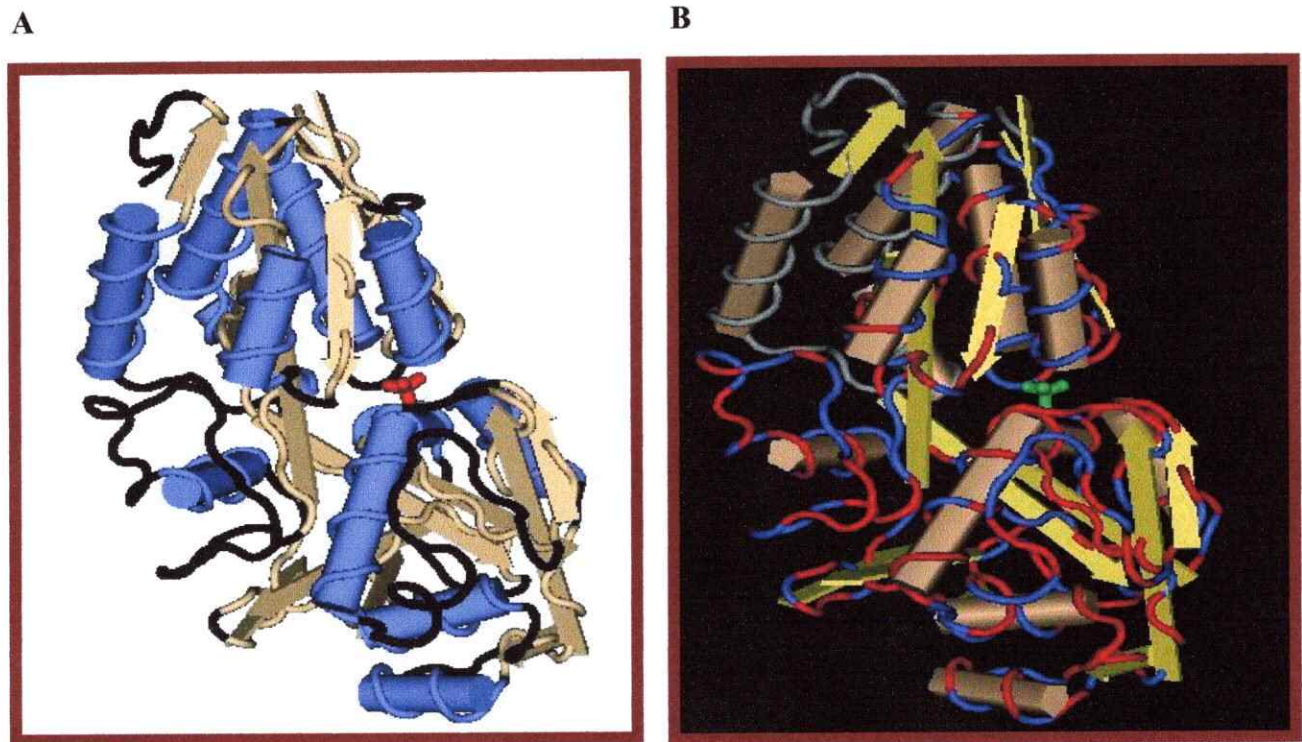
Se utilizó la secuencia completa de la proteína PstS de *E. coli* para hacer una búsqueda contra la base de datos de las secuencias genómicas de *At. ferrooxidans* mediante el programa tBLASTx. Se encontró la presencia de dos genes homólogos a *pstS*. Los genes se llamaron *pstS1* y *pstS2* de acuerdo a su nivel de identidad con *E. coli*. El gen *pstS2* codifica para la secuencia

amino terminal obtenida en nuestro laboratorio. La comparación a nivel proteico reveló que PstS1 y PstS2 presentan un 35% de identidad entre si y respectivamente un 50 y 35% de identidad con la PstS de *E. coli*. En la figura 14 se muestra un alineamiento entre las proteínas PstS de *At. ferrooxidans* y *E. coli*. Como las proteínas tienen un péptido señal necesario para la exportación de ellas al periplasma, el alineamiento se hizo excluyendo este último.

Las secuencias son conservadas. En lo que concierne a los aminoácidos que unen el fosfato, la proteína PstS1 de *At. ferrooxidans* tiene conservados siete (Thr 10, Ser 38, Asp 56, Arg 135, Ser 139, Gly 140 y Thr141) de los ocho residuos descritos en la PstS de *E. coli*, mientras que la proteína PstS2 tiene conservados 6 de ellos (Thr 10, Ser 38, Asp 56, Arg. 135, Ser 139, Gly 140).

PstSE.c	1	--EASLTGAGITTPAPVYAKHADTYOKET--GNKVNVOGIISSGGVKQIIANTVDFPGA: D
PstS1A.f	1	---ETISAAGHTLIYPVLSKVAETTKQKT--GIMVNYQAIISFGGIAQIKAKTVAFANS D
PstS2A.f	1	APTISLLETG:TLLYPLFNLVPPVYTKQNP G I Q L T T O G T S P T G I A E A I S G V A Q I G A S D
PstSE.c	58	APLSDEKLAQEG--LFQFFTVIGGVVLAVNIPGLKSGELVLDGKTLGDITLTKIKKDDDEA
PstS1A.f	56	MPLQPEYLNKDQ--LVQPPAVIIGITPVVNVPGIKPGELTFNGAVLTGIYLGKIKKNDAA
PstS2A.f	60	AYMSDAQIKQHPNILLRPLAISIQMINVNVPLNNVHLKLSGPVLAGIYS GKITNDDAA
PstSE.c	117	IAKLNPGLKLPSQNTAVWRIDCSGTSSEVFTSYLAKVNEEKRNVTGSGTVAWPIG---L
PstS1A.f	115	IADLRKGVHLPDMNITVWRIDCSGTEFETNYLAKVSPKORVGDNTAVSHPVG---V
PstS2A.f	120	IAKLNPGLKLPNHKIIPWRIDCSGTEIFITYLSDTTPASNSVGYSTIVSHPAVPGGI
PstSE.c	174	GGKGNDCIAAFVQRIPCAIGYVEYAYAK---QNNLAYTKLISADGKPVSPTEENFANAAK
PstS1A.f	172	GGKGNACVAAAYVQRIPCAIGYVEYAYAK---ENHMAVYCKMINAEGKVVVPLATFQAAAA
PstS2A.f	180	GAEGNPGLVQALKTTPMGIAYLGISWKKPVVEAHLGMAMLENRAGKFEVLP TVANAKAAAG
PstSE.c	231	GADWS--KTFADLTNQKGEDAWPITSTTEILDHKQKKPEQGTEVLEKFFDWAYKTGAQ
PstS1A.f	229	NADFTKVEDFYVILTNQPGAQSWPISAAVILMRQDAHKTVN--AGVLEKFAVFLTAPQAQ
PstS2A.f	240	EMVKKTPADERISLVYAPGASSYPIINYEYAVLSKTQPNAEVATAMRKFLNVAIDPKGGN
PstSE.c	289	NDLDYASLPDSVVEQVRAWKNIKDSSGKPLY
PstS1A.f	288	DEARGLDYVP-----
PstS2A.f	300	DPHFITAVNFVPLPDSAAKLSRKQIAEIQ-----

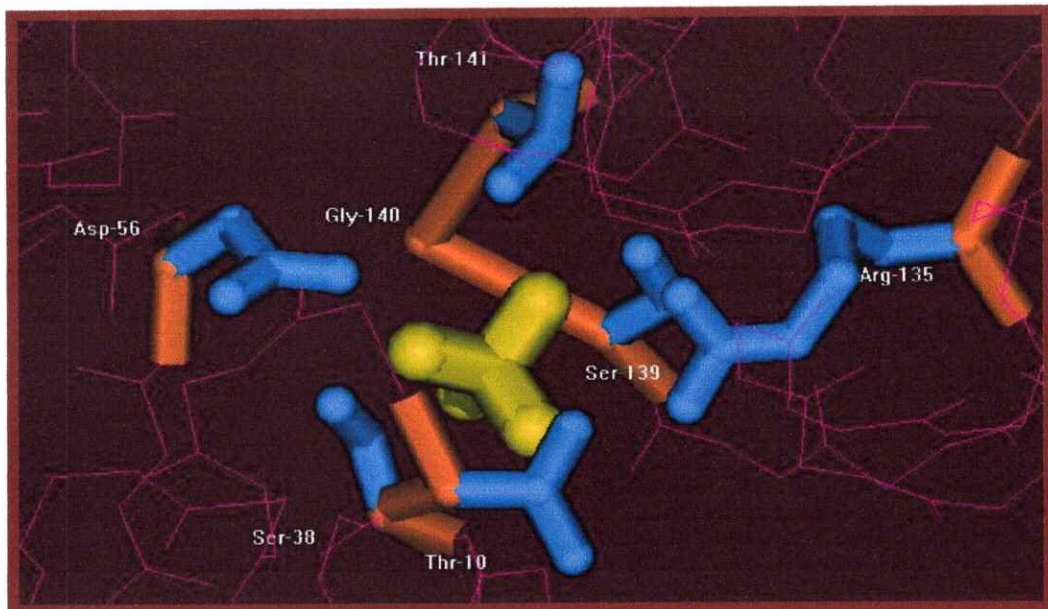
**Figura 14.** Alineamiento de secuencias aminoacídicas de las proteínas PstS maduras. Las proteínas PstS de *E. coli* y sus posibles homólogos PstS1 y PstS2 de *At. ferrooxidans* se alinearon con el programa ClustalW. Las regiones de identidad (cajas negras) y similitud (cajas grises) se determinaron con el programa BOXSHADE. En amarillo se destacan los aminoácidos necesarios para la unión del fosfato.



**Figura 15.** Análisis comparativo de las estructuras de las proteínas PstS de *E. coli* y PstS1 de *At. ferrooxidans* ATCC 23270. **(A)** Estructura cristalográfica de la proteína PstS de *E. coli*, con la molécula de fosfato unida en color rojo. En azul se muestran las zonas que forman estructura de tipo alfa-hélice, en color café claro se muestran las regiones formadoras de estructura tipo sábanas beta y en negro se muestran las vueltas. **(B)** Alineamiento estructural entre las proteínas PstS de *E. coli* y PstS1 de *At. ferrooxidans* realizado con el programa Cn3D; en rojo se muestran las regiones idénticas, mientras que en azul se muestran las regiones variables, (dentro de las cuales se incluyen las similares). El fosfato se muestra en color verde.

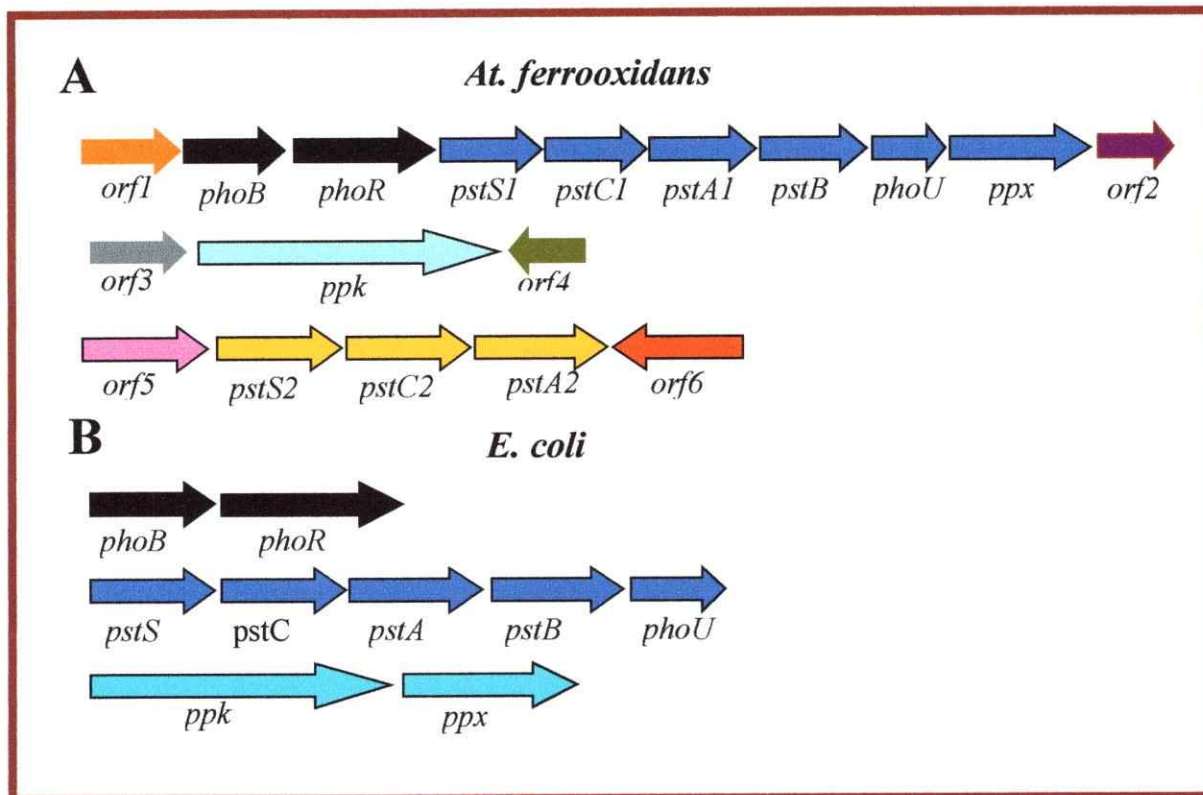
El alto porcentaje de identidad de las proteínas PstS de *E. coli* y PstS1 de *At. ferrooxidans* (50%) y la existencia de la estructura cristalográfica de la proteína PstS de *E. coli* nos permitió realizar un alineamiento estructural entre estas proteínas (Fig. 15).

El alineamiento estructural también nos permitió analizar la conservación del sitio de unión del fosfato entre las proteínas PstS de *E. coli* y PstS1 de *At. ferrooxidans* (Fig. 16).



**Figura 16.** Representación estructural del sitio de unión del fosfato de la proteína PstS1 de *At. ferrooxidans* luego de realizado el alineamiento estructural entre las proteínas PstS de *E. coli* y PstS1 de *At. ferrooxidans* ATCC 23270. Se destacan las cadenas peptídicas (salmón) y laterales (celeste) de cada residuo que interactúa directamente con la molécula de fosfato en amarillo.

La existencia de dos genes *pstS* en *At. ferrooxidans* nos decidió a analizar las regiones río arriba y río abajo de ellos mediante una especie de “caminata” en la secuencia incompleta del genoma de *At. ferrooxidans* ATCC 23270. Se encontraron e identificaron los marcos de lectura de dos regiones genómicas, una de 8.2 kilobases alrededor de *pstS1* y de otra de 3 kilobases alrededor de *pstS2*, que contienen posibles genes homólogos a componentes del regulón Pho de *E. coli* (Fig. 17). Para cada una de las posibles proteínas que codifican se calculó su peso molecular teórico, su pI teórico y su nivel de identidad con sus homólogos en *E. coli* (Tabla 3).



**Figura 17. (A)** Organización genética de los marcos de lectura abiertos que corresponderían a los posibles genes homólogos de *At. ferrooxidans* a los genes del regulón Pho de *E. coli* **(B)**. Los marcos de lectura con un mismo color representan la posible organización en operones en *At. ferrooxidans*. Los *orf* representan marcos de lectura abiertos contiguos a los genes de interés, los cuales al ser analizados mediante BLASTx no presentan identidad significativa con ninguna proteína del regulón Pho. En *E. coli*, la organización de estos operones ha sido demostrada.



**Tabla 3.** Comparación de algunas de las proteínas presentes en el regulón Pho de *E. coli* con sus posibles homólogos de *At. ferrooxidans*.

Proteínas	Peso Molecular (kDa)		Punto Isoeléctrico Teórico		Identidad (%)
	<i>At. ferrooxidans</i>	<i>E. coli</i> <sup>a</sup>	<i>At. ferrooxidans</i>	<i>E. coli</i> <sup>a</sup>	
<b>PhoB</b>	27,8	26,4	6,62	5,46	49
<b>PhoR</b>	49,7	49,6	5,44	9,63	37
<b>PstS1</b>	36,2	37	9,41	8,39	50
<b>PstS2</b>	38,4		9,30		35
<b>PstC1</b>	36,6	34,1	7,03	5,89	55
<b>PstC2</b>	34,4		8,86		36
<b>PstA1</b>	30,5	32,3	10,43	9,94	55
<b>PstA2</b>	32,3		9,39		35
<b>PstB</b>	32,2	29	5,81	6,13	69
<b>PhoU</b>	26,4	27,4	5,03	5,14	44
<b>PPX</b>	53,4	58,1	7,01	6,65	34
<b>PPK</b>	79,4	80,4	6,53	8,96	34

<sup>a</sup>*E. coli* tiene solamente una copia de los genes *pstS*, *pstA* y *pstC*.

## 6. Discusión

Para conocer mejor el metabolismo del fosfato en *At. ferrooxidans*, en el trabajo realizado durante esta tesis se ha clonado, secuenciado y expresado en *E. coli* el gen *ppk* de la cepa ATCC 19859 de *At. ferrooxidans* y se han utilizado los datos del proyecto de secuenciación del genoma de la cepa ATCC 23270 de *At. ferrooxidans* para identificar, mediante el uso de programas de análisis de secuencias, los componentes genéticos principales de un posible sistema de captación de fosfato homólogo al regulon Pho de *E. coli*.

En los primeros intentos que se hicieron para clonar el gen *ppk* se utilizaron las técnicas de DOP-PCR e hibridación heteróloga, obteniéndose resultados negativos. En el caso del DOP-PCR, los principales inconvenientes son el alto grado de degenerancia de los partidores sintetizados, y que se deben utilizar bajas temperaturas para el paso de hibridación de los partidores con el ADN templado. Cabe mencionar que las cajas de entre 6 a 10 aminoácidos, conservadas entre las distintas secuencias de PPKs utilizadas para el diseño de los partidores degenerados existen en la PPK de *At. ferrooxidans*. Sin embargo, nunca se pudo obtener un fragmento del tamaño esperado y el fragmento que se clonó no correspondía al gen *ppk*. En el experimento de hibridación heteróloga se utilizó como sonda el gen *ppk* completo de *E. coli* (2,1 Kb). El resultado indicó la presencia de señal de hibridación solamente en el control positivo (datos no mostrados). Posteriormente encontramos que la identidad de secuencia nucleotídica entre los genes *ppk* de *E. coli* y de *At. ferrooxidans* es de un 46%. Posiblemente este es un valor muy bajo para obtener un resultado positivo en un experimento de hibridación heteróloga de acuerdo a las condiciones utilizadas en nuestros experimentos.

Para obviar los inconvenientes ya mencionados empleamos la técnica de CODEHOP-PCR, la que permitió aislar un fragmento interno del gen *ppk* de *At. ferrooxidans*. Esta técnica presenta una mayor sensibilidad que el DOP-PCR debido a que i) aumenta el tamaño del partidador a cerca de treinta nucleótidos, ii) los partidores poseen una zona 5' de consenso, lo que permite estabilizar la zona 3' de carácter degenerado, logrando aumentar la temperatura de hibridación en los experimentos de amplificación por PCR y iii) disminuye en más de un orden de magnitud el grado de degenerancia de la mezcla de partidores. En la figura 4 (pág. 36) se muestran los bloques conservados utilizados para el diseño de los partidores CODEHOP. En ellos se destaca la principal característica de esta técnica. La región conservada no necesita mas de cuatro aminoácidos. Esta técnica, por lo tanto se veía como de particular uso en el aislamiento de un gen empleando partidores heterólogos.

La amplificación por CODEHOP-PCR con los partidores *ppk11CH* y *ppk12CH* dió como resultado dos fragmentos de ADN de tamaño similar, los que se separaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 3%, se clonaron en el vector pGEM-T y se secuenciaron. El análisis de la secuencia nucleotídica de uno de los fragmentos mediante los programas BLASTn y BLASTx reveló que ésta tenía un 44.2% de identidad con el gen *ppk* de *E. coli* y que codificaba para una secuencia aminoacídica que presenta una similitud de un 50% con una región interna de la PPK de *E. coli*. Este fragmento se utilizó como sonda marcada con digoxigenina en experimentos de hibridación con DNA de las cepas ATCC 19859 y ATCC 23270. De acuerdo con las enzimas de restricción que utilizamos, ambas cepas revelaron poseer solamente una copia del gen *ppk* y la misma organización física en la región donde se encuentra el gen *ppk*. Luego de haber amplificado la región Carboxilo terminal del gen mediante experimentos de PCR inverso y obtenido la secuencia de ésta, decidimos utilizar la secuencia del genoma de la cepa ATCC 23270 para diseñar nuevos partidores que nos permitieron amplificar y clonar el gen *ppk*

completo de la cepa ATCC 19859 de *At. ferrooxidans*. Se diseñó el partidor ppk5pri, que estaba ubicado 221 pares de bases río arriba del posible inicio de la traducción del gen. Con este partidor se amplificó la región 5' no codificante del gen. Este mismo partidor se utilizó para realizar la secuenciación de la zona 5' codificante. Con esto se evitó hacer un partidor amino basándose en la secuencia del genoma de la cepa ATCC 23270, aunque posteriormente comprobamos que las cepas tienen igual secuencia nucleotídica en el locus *ppk* (datos no mostrados). Los datos de la secuencia del ARN ribosomal 16S han mostrado que las cepas ATCC 19859 y 23270 están estrechamente relacionadas (Rawlings y Kusano, 1994). Esto nos permitirá a futuro, utilizar la secuencia incompleta disponible del genoma de la cepa ATCC 23270 para identificar, clonar y estudiar en la cepa ATCC 19859, otros genes de interés para nuestro laboratorio.

El gen *ppk* de *At. ferrooxidans* codifica para una proteína que tiene un 34% de identidad y un 54% de similitud con la PPK de *E. coli*. Nuestro siguiente objetivo consistió en realizar el clonamiento del gen *ppk* en el vector de expresión pET22b+. Luego de ser amplificado, el gen se clonó en el vector pET22b+, mediante un paso previo en el vector pGEM-T. La construcción de este vector resulta en la expresión de la PPK recombinante con el péptido líder pelB, codificado en el vector, el que permitiría la destinación de la proteína al periplasma de *E. coli* y una cola de 6 residuos de histidina en el extremo carboxilo, lo que permite la posterior purificación de la proteína mediante una columna de afinidad. Anteriormente se intentó expresar el gen *ppk* en el vector pET21b+, que no presenta secuencia líder pero también contiene la cola de polihistidinas. Esto no resultó debido a que un sitio *Nde* I contenido en el partidor ppkNH<sub>2</sub>*Nde*I nunca se pudo digerir con esta enzima. Como el vector pGEM-T presenta un sitio de corte para la enzima *Nde* I, al digerir este vector se obtuvo una banda con 48 pares de bases provenientes del vector pGEM-T en la zona 5', lo que impedía la expresión del gen al generarse un codon de término de la traducción. El resultado de inducción de la expresión del inserto clonado en el vector pET22b+

muestra que se ha clonado un marco abierto de lectura que codifica para una proteína predicha de 79 kDa, tamaño que está de acuerdo a lo descrito para otras PPK. Mas adelante será necesario demostrar la presencia de actividad PPK en esta proteína, para lo cual se deberían seguir los siguientes pasos: i) purificación de la proteína recombinante para intentar demostrar actividad PPK *in vitro*, ii) estudiar si el gen es capaz de expresarse bajo su propia región promotora en *E. coli* y iii) estudiar la regulación de la expresión del gen bajo distintas condiciones de crecimiento de *At. ferrooxidans*.

En nuestro laboratorio determinamos la secuencia N-terminal de una proteína que se encontraba inducida en carencia de fosfato. El péptido presentaba una alta identidad de secuencia con la PstS de *E. coli*, proteína que une el fosfato para incorporarlo al interior de la célula (Fig. 9). Mediante análisis de tBLASTx, utilizando la proteína PstS de *E. coli* y la base de datos de la secuencia del genoma no terminado de *At. ferrooxidans* ATCC 23270, se encontró la presencia de dos genes, llamados *pstS1* y *pstS2* que posiblemente codificarían para dos proteínas PstS. Interesantemente, una especie de "paseo cromosómico *in silico*", reveló que en el genoma de *At. ferrooxidans* existen genes homólogos a *pstA*, *pstC*, *phoB*, *phoR*, *phoU* y *ppx*, sugiriendo fuertemente la existencia de un regulón Pho similar al descrito en otros microorganismos.

El análisis de las proteínas PstS1 y PstS2 de *At. ferrooxidans* muestra que la PstS1 tiene conservados siete de los ocho aminoácidos necesarios para formar puentes de hidrógeno con el fosfato. Estos incluyen Treonina 10, Serina 38, Aspártico 56, Arginina 135, Serina 139, Glicina 140 y Treonina 141 con el solo cambio de Fenilalanina 11 por Alanina. Esta sustitución en la proteína quizás no afecte mayormente su actividad, debido a que este grupo forma un puente de hidrógeno con el fosfato utilizando el grupo NH de la cadena peptídica. La proteína PstS2 tiene conservados seis de los residuos y sustituidos la Fenilalanina 11 por Leucina y la Treonina 141 por Acido Aspártico. Este cambio puede afectar alguna de las propiedades de transporte del

fosfato, que se encuentra completamente determinado por enlaces de hidrógeno. Cabe mencionar que en la estructura de la PstS debe tenerse especial atención a los aminoácidos que unen a los oxígenos O<sub>3</sub> y O<sub>4</sub> del fosfato. El grupo -OH de la Serina 38 es el grupo favorablemente posesionado para aceptar con su par de electrones desapareados al segundo protón del fosfato que está en O<sub>3</sub>. El Aspártico 56 es responsable de reconocer un protón del fosfato (que pasa como H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub><sup>-</sup>) y facilitar la unión del segundo protón del fosfato aceptando un enlace de hidrógeno de la Serina 38. La carga negativa del fosfato queda entonces concentrada en los oxígenos 1 y 2, que interactúan con la Arg 135 (Luecke y Quioco, 1990).

Es interesante notar que de los dos genes *pstS*, el gen *pstSI*, es el que presenta un mayor porcentaje de identidad con *E. coli* y se encuentra ubicado en un posible operón que presenta una organización genética muy similar a *E. coli* (*pstSCAB-phoU*), salvo por la presencia del gen *ppx*, el cual se encuentra ubicado río abajo de *phoU* en *At. ferrooxidans*. En *E. coli*, los genes *ppk* y *ppx* se encuentran formando un operón, mientras que en *At. ferrooxidans* no se encuentran juntos.

La proteína PhoB actúa uniéndose a las cajas "pho", que están en las regiones -35 de los genes que forman parte del regulón Pho (Wanner, 1996). A la fecha, hemos encontrado similitud en las posibles zonas promotoras de los genes *phoB* y *pstSI* de *At. ferrooxidans* (datos no mostrados). No obstante, como no satisfacen exactamente el consenso para las cajas *pho*, se necesitarán futuros experimentos para demostrar la unión de PhoB a estas zonas. En la zona 5' del marco abierto de lectura codificante para la PPK no hemos encontrado una posible secuencia promotora ni una caja *pho* de acuerdo al algoritmo utilizado. ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)). Es posible que exista un tipo de promotor que no es predecido por el método empleado o que el gen se cotranscriba con un pequeño marco abierto de lectura presente río arriba. Este marco abierto codifica para una proteína hipotética que no tiene homología con alguna proteína conocida en la base de datos. Se necesitarán futuros

experimentos de extensión del partidor y Northern Blot para definir el o los posibles promotores que controlarían la expresión del gen *ppk* de *At. ferrooxidans*. Cabe mencionar que en *Acinetobacter* sp. ADP1, el cual es un organismo acumulador de poliP, se ha demostrado que el gen *ppk* tiene 2 promotores y que uno de ellos es inducible en carencia de fosfato. No se ha encontrado en este organismo una secuencia tipo caja *pho* en su región promotora (Geidörfer y col., 1998).

En *E. coli* se ha propuesto que el operón formado por los genes *ppk* y *ppx* formaría parte del regulón Pho debido a que una cepa mutante en el gen *phoB* no acumula poliP (Rao y col., 1998). En nuestro laboratorio hemos observado que *At. ferrooxidans* acumula granulos de poliP cuando se crece en presencia de fosfato y las mediciones de actividad PPK realizadas en extractos crudos de *At. ferrooxidans* así lo demuestran. Los gránulos de poliP desaparecen al traspasar un cultivo crecido con fosfato a un medio sin fosfato, lo que podemos atribuir a la actividad PPX. Es posible pensar entonces que el gen *ppk* de *At. ferrooxidans* quizás pueda tener una regulación independiente del gen *ppx* y posiblemente de los genes del regulón Pho.

En el posible operón *pstSCAB-phoU-ppx* será interesante estudiar la regulación de la expresión del gen *ppx* debido a su relación con la tolerancia a metales pesados. Una posible hipótesis sería que los metales presentes en la superficie de *At. ferrooxidans*, al formar precipitados con fosfato, disminuyen la concentración y biodisponibilidad de este último. La expresión conjunta de los genes *pstSCAB-phoU* y *ppx* permitiría tener un sistema que: (i) permita desintoxicar a la bacteria de los metales por la hidrólisis del poliP y posterior salida de este acomplexado con metales (Keasling, 1997) y (ii) que permita internalizar el fosfato liberado hacia el medio extracelular mediante la expresión de sistemas de transporte de alta afinidad de tipo Pst. La duplicación de los genes *pstS*, *pstC* y *pstA* podría dar cuenta de una regulación diferencial de la expresión de estos transportadores.

El arseniato, al ser un análogo del fosfato, utiliza los mismos sistemas de entrada de éste a la célula. En *E. coli* se ha mostrado que el arseniato entraría por los sistemas Pit y Pst. En nuestro laboratorio se ha estudiado la resistencia de *At. ferrooxidans* a arseniato y se ha encontrado que esta se relaciona con la cantidad de fosfato presente en el medio (Varela y col. 1998). A la fecha no hemos encontrado en el genoma incompleto de *At. ferrooxidans*, genes a los cuales se les pueda asignar homología con los transportadores Pit de *E. coli*. Quizas sea posible que *At. ferrooxidans* solamente tenga transportadores específicos de tipo Pst.

Al encontrarse posibles genes homólogos a componentes del regulón Pho en *At. ferrooxidans* ATCC 23270, podemos pensar que la cepa ATCC 19859 posee un posible sistema Pho similar debido a que los genes que hemos estudiado en nuestro laboratorio, presentan una identidad de secuencia nucleotídica superior a un 99% al comparar ambas cepas de *At. ferrooxidans*.

La tecnología de microarrays de ADN, una vez que se encuentre disponible para *At. ferrooxidans* permitirá dilucidar algunos aspectos del metabolismo del fosfato y del poliP en este organismo. Por ejemplo cómo se regula la expresión de este conjunto de genes en carencia de fosfato y presencia de metales. Posiblemente existan otros genes a los cuales no se les haya podido asignar una posible función por tener niveles de identidad muy bajos con los genes conocidos y estudiados en otros organismos. Uno de estos genes podría codificar para una porina de membrana externa que tenga una mayor afinidad por aniones, tales como fosfato. Los resultados de este trabajo son esenciales para conocer el sistema de captación de fosfato en *At. ferrooxidans*. Este conocimiento será de suma importancia en definir la forma como estos microorganismos se adaptan en las faenas de biominería y ayudará a definir etapas limitantes como la biodisponibilidad de fosfato entre muchas otras.



## 7. Referencias Bibliográficas

- Ahn, K. y Kornberg, A. (1990). Polyphosphate kinase from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 265: 11734-11739.
- Akiyama, M., Crooke, E. y Kornberg, A. (1992). The polyphosphate kinase gene of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 267: 22556-22561.
- Akiyama, M., Crooke, E. y Kornberg, A. (1993) An exopolyphosphatase of *Escherichia coli*. The enzyme and its *ppx* gene in a polyphosphate operon. J. Biol. Chem. 268: 633-639.
- Altschul S., Madden T., Schäffer A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. y Lipman D. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, Nucl. Acid. Res. 25: 3389-3402.
- Alvarez, S., Vera, M., Jerez, C. A. y Guilian, N. (2001). Polyphosphates, polyphosphate kinase activity and *ppk* gene in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 19859. Biohydrometallurgy: Fundamentals, Technology and Sustainable Development, Part A. Ciminelli V, and García O. (Eds.), pp. 355-362. Elsevier.
- Blum, E., Py, B., Carpousis, A., y Higgins, C. (1997). Polyphosphate kinase is a component of the *Escherichia coli* RNA degradosome. Mol. Microbiol 26: 387-398.
- Bond P., Keller J. y Blackall L. (1999). Anaerobic phosphate release from activated sludge with enhanced biological phosphorous removal. A possible mechanism of intracellular pH control. Biotechnol. Bioeng 63: 507-515.
- Cardona, S., Remonsellez, F., Guilian, N. y Jerez, C. A. (2000). The glycogen-bound polyphosphate kinase from *Sulfolobus acidocaldarius* is actually a Glycogen Synthase. Appl. Environ. Microbiol. 67: 4773-4780.
- Chung, C., Niehela, S. y Miller, R. (1989) One-step preparation of competent *Escherichia coli*. Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc. Natl. Sci. Acad. USA. 86: 2172-2175.
- Das, S., Lengweiler, U., Seebach, D. y Reusch, R. (1997). Proof for a nonproteinaceous calcium-selective channel in *Escherichia coli* by total synthesis from (R)-3-hydroxybutanoic acid and inorganic polyphosphate. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 9075-9079.
- Devereux J., Haerberh P. y Smithies O. (1984). A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. Nucl. Acid. Res. 12: 387-395.

- Gavigan, J., Marshall, L. y Dobson, A. (1999). Regulation of polyphosphate kinase gene expression in *Acinetobacter baumannii* 252. *Microbiol.* 145: 2931-2937.
- Geißdörfer, W., Ratajczak, A. y Hillen, W. (1998). Transcription of *ppk* from *Acinetobacter* sp. strain ADP1, encoding a putative polyphosphate kinase, is induced by phosphate starvation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 896-901.
- Kato, J., Yamamoto, T., Yamada, K. y Ohtake, H. (1993). Cloning, sequence and characterization of the polyphosphate kinase-encoding gene (*ppk*) of *Klebsiella aerogenes*. *Gene* 137: 237-242.
- Keasling, J. (1997). Regulation of intracellular toxic metals and other cations by hydrolysis of polyphosphate. *Ann. N.Y.Acad. Sci.* 829: 242-249.
- Keasling, J., Van Dien, S., Trelstad, P., Renninger, N. y McMahon, K. (2000). Application of polyphosphate metabolism to environmental and biotechnological problems. *Biochemistry (Moscow)*, 65: 324-331.
- Kornberg, A. (1995). Inorganic polyphosphate: toward making a forgotten polymer unforgettable. *J. Bacteriol.* 177: 491-496.
- Kornberg, A., Rao, N. y Ault-Riche, D. (1999). Inorganic polyphosphate: a molecule with many functions. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 89-125.
- Kulaev, I. y Kulakovskaya, T. (2000). Polyphosphate and phosphate pump. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 709-734.
- Kulaev, I., Vagabov, V., Kulakovskaya, T., Lichko, L., Andreeva, N. y Trilisenko, L. (2000). The development of A.N. Belozersky's ideas in polyphosphate biochemistry. *Biochemistry (Moscow)*. 65: 271-278.
- Kumble, K., Ahn, K., y Kornberg, A. (1996). Phosphohistidyl active sites in polyphosphate kinase of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14391-14395.
- Kuroda, A. y Kornberg, A. (1997). Polyphosphate kinase as a nucleoside diphosphate kinase in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 439-442.
- Kuroda, A., Nomura, K., Ohtomo, R., Kato, J., Ikeda, T., Takiguchi, N., Ohtake, H. y Kornberg, A. (2001) Role of inorganic polyphosphate in promoting ribosomal protein degradation by the Lon protease in *E. coli*. *Science* 293: 705-8.
- Kusano, S. y Ishihama A. (1997). Functional interaction of *Escherichia coli* RNA polymerase with inorganic polyphosphate. *Genes Cells* 2: 433-441.

- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Luecke, H. y Quioco, F.** (1990). High specificity of a phosphate transport protein determined by hydrogen bonds. *Nature* 347: 402-406.
- Maier S., Scherer S. y Loessner, M.** (1999). Long-chain polyphosphate causes cell lysis and inhibits *Bacillus cereus* septum formation which is dependent on divalent cations. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3942-3949.
- Mino, T.** (2000). Microbial selection of polyphosphate-accumulating bacteria in activated sludge wastewater treatment processes for enhanced biological phosphate removal. *Biochemistry (Moscow)* 65: 341-348.
- Nesmeyanova, N.** (2000). Polyphosphates and enzymes of polyphosphate metabolism in *Escherichia coli*. *Biochemistry (Moscow)* 65: 309-314.
- Ochman, H., Gerber, A. y Harti, D.** (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics*, 120: 621-623.
- Ogawa, N., Tzeng, C., Fraley, C. y Kornberg, A.** (2000). Inorganic polyphosphate in *Vibrio cholerae*: genetic, biochemical, and physiologic features. *J. Bacteriol.* 182: 6687-6693.
- Orians, G.** (1986). *Ecological Knowledge and Environmental Problem-Solving. Concepts and Case Studies.* Committee on the Applications of Ecological Theory to Environmental Problems. Commission on Life Sciences. National Research Council. National Academy Press, Washington, D.C.
- Rao, N., Liu, S., y Kornberg, A.** (1998). Inorganic polyphosphate in *Escherichia coli*: the phosphate regulon and the stringent response. *J. Bacteriol.* 176: 2892-2897.
- Raschid, N., Rao, N. y Kornberg, A.** (2000). Inorganic polyphosphate is required for motility of bacterial pathogens. *J. Bacteriol.* 182: 225-227.
- Rawlings, D. y Kusano, T.** (1994). Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol. Rev.* 58: 39-55.
- Reusch, R.** (1999). *Streptomyces lividans* potassium channel contains poly-(R)-3-hydroxybutyrate and inorganic polyphosphate. *Biochemistry* 38: 15666-15672.
- Reusch, R.** (2000). Transmembrane ion transport by polyphosphate/Poly-R-3-hydroxybutyrate complexes. *Biochemistry (Moscow)* 65: 280-295.

- Rose, T., Schultz, E., Henikoff, J., Pietrokovski, S., McCallum, C. Y Henikoff, S. (1998). Consensus-degenerate hybrid oligonucleotide primers for amplification of distantly related sequences. *Nucl. Acid. Res.* 26: 1628-1635.
- Sambrook, J., Fritsch, E. y Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Seeger, M y Jerez, C. A. (1992). The lack of phosphate affects global gene expression in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Geomicrobiol. J.* 10: 227-237.
- Seeger, M. y Jerez, C. A. (1993). Response of *Thiobacillus ferrooxidans* to phosphate limitation. *FEMS Microbiol. Rev.* 11: 37-42.
- Shiba, T., Tsutsumi, K., Yano, H., Ihara, Y., Kameda, A., Tanaka, K., Takahashi, H., Mukenata, M., Rao, N., y Kornberg, A. (1997). Inorganic polyphosphate and the induction of *rpoS* expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94: 11210-11215.
- Skórko, R., Osipuk, J. y Stetter K. (1989) Glycogen-bound polyphosphate from the archaeobacterium *Sulfolobus acidocaldarius*. *J. Bacteriol.* 171: 5162-64.
- Telenius, H., Carter, N., Bebb, C., Nordeskjold, M., Ponder, B y Tunnacliffe A. (1992) Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. *Genomics* 13: 718-725.
- Thompson, J., Higgins, D. y Gibson, T. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acid. Res.* 22: 4673-4680.
- Tinsley, C. y Gotschlich, E. (1995) Cloning and characterization of the meningococcal polyphosphate kinase gene: production of polyphosphate synthesis mutants. *Infect. Immun.* 63: 1624-1630.
- Trelstad, P., Purdhani, P., Geidörfer, W., Hillen, W. y Keasling, J. (1999) Polyphosphate kinase of *Acinetobacter sp.* strain ADP1: Purification and characterization of the enzyme and its role during changes in extracellular phosphate levels. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3780-3786.
- Tsutsumi, K., Munekata, M. y Shiba, T. (2000). Involvement of inorganic polyphosphate in expression of SOS genes. *Biochim. Biophys. Acta* 1493: 73-81.
- Tuovinen, O. (1990). Biological fundements of mineral leaching processes. En *Microbial Mineral Recovery*, H.L. Ehlrich & C.L. Bierley (Eds). Mc Graw-Hill, New York. pp. 55-77.

- Tzeng, C. y Kornberg, A.** (1998). Polyphosphate kinase is highly conserved in many bacterial pathogens. *Mol. Microbiol.* 29: 381-382.
- Van Veen, H.** (1997). Phosphate transport in prokaryotes: molecules, mediators and mechanisms. *Antoine van Leeuwenhoek* 72: 299-315.
- Varela, P., Levican, G., Rivera, F., Jerez, C.A.** (1998) An immunological strategy to monitor *In situ* the phosphate starvation state in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol.* 64:4990-4993.
- Vera, M., Guiliani, N. Ramírez, P., Alvarez, S. y Jerez, C. A.** (2001) Proteomic and genomic strategy for the study of the extremely acidophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biohydrometallurgy: Fundamentals, Technology and Sustainable Development, Part A.* Ciminelli V, and García O. (Eds.). 325-333. Elsevier.
- Vera, M., Guiliani, N. y Jerez, C. A.** (2002) Proteomic/genomic analysis of phosphate starvation response of *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *Biohydrometallurgy: En preparación.*
- Wächtershäuser, G.** (1992). Groundworks for an evolutionary biochemistry: The iron- sulphur world. *Prog. Biophys. Molec. Biol.* 28: 85-201.
- Wanner, B.** (1996). Phosphorous assimilation and control of the phosphate regulon. En *E. coli* and *Salmonella*, molecular and celular biology. Ed. Neidhardt, ASM press, New York. pp. 1357-1381.
- Wisconsin Package Version 10.0,** Genetics Computer Group (GCG), Madison, Wisc.
- Zago, A., Chugani, S. y Chakrabarty, A.** (1999). Cloning and characterization of polyphosphate kinase and exopolyphosphatase genes from *Pseudomonas aeruginosa* 8830. *Appl. Environ. Microbiol* 65: 2065-2071.

## **Anexo 1**

**Alineamiento de Secuencias aminoacídicas de  
PPKs y ubicación de los partidores utilizados  
en los experimentos de DOP-PCR**

1 P. aeruginosa ---LYIH---EHSOENIRVIEQALDESYPELKE---LIFSSNLDDEE---EHRIRI  
 Acinetobacter sp.1 ---EHSILDENIRVIEQAVDPINPL---E---LIFSSNLDDEE---EHRIRI  
 N. meningitidis ---RILC---EHSLLAENRVLQAEDKNVPELE---LIFSSNLDDEE---EHRIRI  
 M. leprae ---RILC---EHSLLAENRVLQAEDKNVPELE---LIFSSNLDDEE---EHRIRI  
 1 MMSNDRKVIENSPVTEVREEHANYPDDSAALAPPAATPAASDQLPSDRYLN---EHSWLDENARVLAALAAADKSNMPL---E---LIFSSNLDDEE---EHRIRI  
 Synchocystis sp.1 ---EHSWLDENARVLAALAAADKSNMPL---E---LIFSSNLDDEE---EHRIRI  
 H. pylori ---EHSWLDENARVLAALAAADKSNMPL---E---LIFSSNLDDEE---EHRIRI  
 1 ---EHSWLDENARVLAALAAADKSNMPL---E---LIFSSNLDDEE---EHRIRI  
 C. coli ---EHSWLDENARVLAALAAADKSNMPL---E---LIFSSNLDDEE---EHRIRI  
 1 ---EHSWLDENARVLAALAAADKSNMPL---E---LIFSSNLDDEE---EHRIRI  
 E. coli ---EHSWLDENARVLAALAAADKSNMPL---E---LIFSSNLDDEE---EHRIRI  
 1 ---EHSWLDENARVLAALAAADKSNMPL---E---LIFSSNLDDEE---EHRIRI  
 S. typhimurium ---EHSWLDENARVLAALAAADKSNMPL---E---LIFSSNLDDEE---EHRIRI  
 1 ---EHSWLDENARVLAALAAADKSNMPL---E---LIFSSNLDDEE---EHRIRI  
 K. aerogenes ---EHSWLDENARVLAALAAADKSNMPL---E---LIFSSNLDDEE---EHRIRI  
 1 ---EHSWLDENARVLAALAAADKSNMPL---E---LIFSSNLDDEE---EHRIRI  
 V. cholerae ---EHSWLDENARVLAALAAADKSNMPL---E---LIFSSNLDDEE---EHRIRI

ppk7M  
 ppk7E  
 ppk7K

55 P. aeruginosa ---AKHO---FIRRRHTLKLKIVVRR---RDE---APIT---EIGD---P-THPFPPLIV  
 Acinetobacter sp.67 ---AKHO---FIRRRHTLKLKIVVRR---RDE---APIT---EIGD---P-THPFPPLIV  
 N. meningitidis ---AKHO---FIRRRHTLKLKIVVRR---RDE---APIT---EIGD---P-THPFPPLIV  
 55 ---AKHO---FIRRRHTLKLKIVVRR---RDE---APIT---EIGD---P-THPFPPLIV  
 M. leprae ---AKHO---FIRRRHTLKLKIVVRR---RDE---APIT---EIGD---P-THPFPPLIV  
 101 ---AKHO---FIRRRHTLKLKIVVRR---RDE---APIT---EIGD---P-THPFPPLIV  
 Synchocystis sp.67 ---AKHO---FIRRRHTLKLKIVVRR---RDE---APIT---EIGD---P-THPFPPLIV  
 H. pylori ---AKHO---FIRRRHTLKLKIVVRR---RDE---APIT---EIGD---P-THPFPPLIV  
 52 ---AKHO---FIRRRHTLKLKIVVRR---RDE---APIT---EIGD---P-THPFPPLIV  
 C. coli ---AKHO---FIRRRHTLKLKIVVRR---RDE---APIT---EIGD---P-THPFPPLIV  
 55 ---AKHO---FIRRRHTLKLKIVVRR---RDE---APIT---EIGD---P-THPFPPLIV  
 E. coli ---AKHO---FIRRRHTLKLKIVVRR---RDE---APIT---EIGD---P-THPFPPLIV  
 55 ---AKHO---FIRRRHTLKLKIVVRR---RDE---APIT---EIGD---P-THPFPPLIV  
 S. typhimurium ---AKHO---FIRRRHTLKLKIVVRR---RDE---APIT---EIGD---P-THPFPPLIV  
 55 ---AKHO---FIRRRHTLKLKIVVRR---RDE---APIT---EIGD---P-THPFPPLIV  
 K. aerogenes ---AKHO---FIRRRHTLKLKIVVRR---RDE---APIT---EIGD---P-THPFPPLIV  
 55 ---AKHO---FIRRRHTLKLKIVVRR---RDE---APIT---EIGD---P-THPFPPLIV  
 V. cholerae ---AKHO---FIRRRHTLKLKIVVRR---RDE---APIT---EIGD---P-THPFPPLIV

154 P. aeruginosa ---YFLSS---HAHADDELEPG---MKVKGCYQF---TRNA---LS---DT  
 Acinetobacter sp.166 ---YFLSS---HAHADDELEPG---MKVKGCYQF---TRNA---LS---DT  
 N. meningitidis ---YFLSS---HAHADDELEPG---MKVKGCYQF---TRNA---LS---DT  
 154 ---YFLSS---HAHADDELEPG---MKVKGCYQF---TRNA---LS---DT  
 M. leprae ---YFLSS---HAHADDELEPG---MKVKGCYQF---TRNA---LS---DT  
 200 ---YFLSS---HAHADDELEPG---MKVKGCYQF---TRNA---LS---DT  
 Synchocystis sp.166 ---YFLSS---HAHADDELEPG---MKVKGCYQF---TRNA---LS---DT  
 H. pylori ---YFLSS---HAHADDELEPG---MKVKGCYQF---TRNA---LS---DT  
 150 ---YFLSS---HAHADDELEPG---MKVKGCYQF---TRNA---LS---DT  
 C. coli ---YFLSS---HAHADDELEPG---MKVKGCYQF---TRNA---LS---DT  
 153 ---YFLSS---HAHADDELEPG---MKVKGCYQF---TRNA---LS---DT  
 E. coli ---YFLSS---HAHADDELEPG---MKVKGCYQF---TRNA---LS---DT  
 152 ---YFLSS---HAHADDELEPG---MKVKGCYQF---TRNA---LS---DT  
 S. typhimurium ---YFLSS---HAHADDELEPG---MKVKGCYQF---TRNA---LS---DT  
 152 ---YFLSS---HAHADDELEPG---MKVKGCYQF---TRNA---LS---DT  
 K. aerogenes ---YFLSS---HAHADDELEPG---MKVKGCYQF---TRNA---LS---DT  
 152 ---YFLSS---HAHADDELEPG---MKVKGCYQF---TRNA---LS---DT  
 V. cholerae ---YFLSS---HAHADDELEPG---MKVKGCYQF---TRNA---LS---DT

P. aeruginosa 241 DVEDLARAERGEFERRYG-DAVRLVVDVTCFONINYLK-----QFGLSES-----EYKVSQPVNLTRELFSVTGLESHPEYQPPFTPAIPR-----  
 Acinetobacter sp. 252 DVEDLAENKDESSRRFG-RAVRLVKNKCPHVEYLLK-----EFDLDTH-----QYRVDGPFVNLARLVSDF--K-RBYRRIEPTHTVPIPK-----  
 N. meningitidis 241 DLQNLRAAKQNEHHDREYG-DGVRLEVADICPAYRDFLLA-----QFKLTA-----EYQVKGPFVNLVRLNAVDPOLVNRPDKFPHTHPRGLK-----  
 M. leprae 294 RDEDLQAEREHARRRFG-SFVRLEIADDMTESLEILLR-----ELDVHPG-----DLEVPGLDSSLMQIYA-VDRPTLKDRTFVPAHP-----  
 Synecocystis sp. 257 EADDLLAEEERKRRVGSAAVLEINASTFKNRDRMT-----DIGLEEI-----DYDIDGLGLKDLFFELS-LPAPHKDEPWASVTPPRLKHV-----  
 H. pylori 229 EAHDYADI SKSRKRNGQ-ELVRLQTKGSOELKTLASLRSFQTHSYKHKLTKGMYKSALMNLGDLWLVNHSDEKAMKSNFPTPKIHP-----  
 C. coli 233 EADDFMLEEQGKLRKRG-ARVRLQIQKGDQVVEFN-----THMKIFHK-----DVEYSILLNPLSLMQIAGNKYFTHLSPLYTPKYL-----  
 E. coli 239 MEASIMELSSSKQR-LTAEFVRFVYQDMENA VEVRE-----KLTISRVD--SVPGGRYHNEKDFINFPN-VGKANLVNKPRLRLRHLWFDKA-----  
 S. typhimurium 239 MEASIMELSSSKQR-LTAEFVRFVYQDMENAVDVIRE-----KLTISRVD--SVPGGRYHNEKDFINFPN-VGKANLVNKPRLRLRHLWFDKA-----  
 K. aerogenes 239 MEASIMELSSSKQR-LTAEFVRFVYQDMENAVDVIRE-----KLTISRVD--SVPGGRYHNEKDFINFPN-VGKANLVNKPRLRLRHLWFDK-----  
 V. cholerae 239 VEYSLLSEQSEGFSQR-LTALFVRFVYEREMPEALKFLCY-----KLIKISHYD--SIPGGRYHNEKDFISFPN-VGRDYENKPLFPEMTCADFEG-----

P. aeruginosa 325 -LLOKKN-----LRFNLSKLDLIMHEPESHP-IDLRFQAQKDNVIAQTYRSGANSEDAVEARNGKETAIEPARDEESN-----  
 Acinetobacter sp. 333 -ILKKSAN-----IFSAMQKODLHHEPESHP-IRLREAAQDPHVIAQTYRSGANSEDAVEARNGKETAIEPARDEESN-----  
 N. meningitidis 325 -ALGTAS-----IFDLVRQSPILHHEPESHP-VEMRERAAQDPVIANMTYRTGTRSEPRAMKAALAGKQTVIEWAEDEANN-----  
 M. leprae 377 -AFAER-ETPKS-----IFAIRREGDILHHEPESHP-QRFLEQAADPNVPAQTYRTSGDSPVIRADAEAGKQVAIEKAEDEQAN-----  
 Synecocystis sp. 346 YEFVDGEDGRVQOEGIDIFILRQGDILHHEPESHP-QRFLEQAADPNVPAQTYRTSGDSPVIRADAEAGKQVAIEKAEDEANN-----  
 H. pylori 323 -HFENND-----LFSKIEKQDILHHEPESHP-IDLRFQAQKDNVIAQTYRSGANSEDAVEARNGKETAIEPARDEESN-----  
 C. coli 317 -PEDENLS-----IFDAIDKEDLHHEPESHP-VYKFEASKDPEVISHMTYRVEKNSMQAIGASAGLQTVIEKAEDEANN-----  
 E. coli 328 -QFRNG-----FDAIR-ERDLHHEPESHP-LELRFQASDFPSVAALINRYVAKDSRDSIHAHNGKQTVIEKAEDEANN-----  
 S. typhimurium 328 -KFRNG-----FDAIR-ERDLHHEPESHP-LELRFQASDFPSVAALINRYVAKDSRDSIHAHNGKQTVIEKAEDEANN-----  
 K. aerogenes 326 ---FRNG-----FDAIR-ERDLHHEPESHP-LELRFQASDFPSVAALINRYVAKDSRDSIHAHNAKQTVIEKAEDEANN-----  
 V. cholerae 327 ---YANA-----FDAIR-AQDILHHEPESHP-TELRFQASEDEKVSIAALINRYVAKDSRDSIHAHNGKQTVIEKAEDEANN-----

ppk81A  
 ppk81N  
 ppk81

P. aeruginosa 413 QLASRIQOAGAVVITGVGFRTEARMMILREDEGLRRRAHGTENHAGNARVTDYSLLADVALCELEHKLIN-QIGMCKTLRMKKLIHAEFTI-----  
 Acinetobacter sp. 421 AVANVQERAGVWVGVGFRTEARMMILVRENQKLVRAHGTENHAGNARVTDYSLLADVALCELEHKLIN-QIGMCKTLRMKKLIHAEFTI-----  
 N. meningitidis 413 NWAKOLEEAGAVVGVGFRTEARMMILVREDGVLKRAHGTENHAGNARVTDYSLLADVALCELEHKLIN-QIGMCKTLRMKKLIHAEFTI-----  
 M. leprae 469 AWARALEQAQAVHVAQLVGLKTECKTALVREGPTIRRCHGTENNSKTARVYEDVGLLAAPDIGALTDLEN-SITGYSRKLSTYRNLIVAPHGIL-----  
 Synecocystis sp. 446 NWARKEQYGVHVVGLVGLKTECKTALVREGPTIRRCHGTENNSKTARVYEDVGLLAAPDIGALTDLEN-SITGYSRKLSTYRNLIVAPHGIL-----  
 H. pylori 409 HWAKALENACAVLGITGEKHAHVSOILKKGDKLKFMBHSTGNNASSAKVTDVSYFSKVEFARVTSSEH-ITSGFSKNRRIQTLMSNPNQI-----  
 C. coli 405 HWAKALENACAVLGITGEKHAHVSOILKKGDKLKFMBHSTGNNASSAKVTDVSYFSKVEFARVTSSEH-ITSGFSKNRRIQTLMSNPNQI-----  
 E. coli 413 HWAKRLETEAGVHVSAPGLKIHAKLFLSKEGDDVVRVAHGTENNEKTARVTDYSLLADARITNRYRVEN-FIENPYRPTFDYLVSPONS-----  
 S. typhimurium 413 HWAKRLETEAGVHVSAPGLKIHAKLFLSKEGDDVVRVAHGTENNEKTARVTDYSLLADARITNRYRVEN-FIENPYRPTFDYLVSPONS-----  
 K. aerogenes 410 HWARRLETEAGVHVSAPGLKIHAKLFLSKEGDDVVRVAHGTENNEKTARVTDYSLLADARITNRYRVEN-FIENPYRPTFDYLVSPONS-----  
 V. cholerae 411 EWSRIITDAGVHVSAPGLKIHAKLFLSKEGDDVVRVAHGTENNEKTARVTDYSLLADARITNRYRVEN-FIENPYRPTFDYLVSPONS-----



P. aeruginosa 512 KNFLEMNRE-AAQAALG---QPARIKAVKNSITDPKVRIRAKVAKASOAGVADIDVIRGVCCEPRGPIGVGSHNTHVRSKIGCFLEHSRYYFLN-GGDEKL  
 Acinetobacter sp. 520 SQMNFENE-IVLAKAG---KPAKJLIIKVNALTEVQVQENKLYEASOAGVAGBEPIKRSKCCDRPGLAGLSENIRVRSKICGFLEHTRYYFYN-NGDTRV  
 N. meningitidis 512 KMVIDRARE-TEHAKAG---KPARITAKANSIIEPTAELEKASAAQVQIDLRGCTREGVKGLSENIRVRSKICGLEHARVCFHN-NGADDT  
 M. leprae 568 AGHIDRVEREVAAHRAE GAHNGKGRRLKMANVLEQVODALVRSRAGVATEWARGHCADRPGAQGISNIIVRSKICGFLEHSRMLHER---AIDEF  
 Synecocystis sp. 545 ERVAAGERE-ADGICNG---GTRIVAKANSIVDTQIRALVYASOAGVQIDIRIRGHCCEPRGVENYSENIRVRSKICGFLEHSRPFYFN-GGEEI  
 H. pylori 509 PKLIELONE-MHQEGC-----YILKANALVSETEWILCASOKVADLRGHCCEKPOVKGISENIRVRSKICGFLEHARVYFKH---ENI  
 C. coli 504 EKLEMGALE-ASKGEGC-----VIAKANSVSDIKALVEASIKRTOIDVARGHFCRKNEE-FSKNILVRSKICGFLEHARVYFKH---EPNY  
 E. coli 512 RLHYEMDRE-IANAQCG---LPSGITLKNVVKGVDRVYASSSGVPYNIHARGVCSHIPNLEGISDNIRARISADVLEHDIRYIFEN-GGDKVY  
 S. typhimurium 512 RLHYEMDRE-IANAQCG---LPSGITLKNVVKGVDRVYASSSGVPYNIHARGVCSHIPNLEGISDNIRARISADVLEHDIRYIFEN-GGDKVY  
 K. aerogenes 509 RLHYDMDKI-IANAQCG---LSSGITLKNVVKGVDRVYASSSGVPYNIHARGVCSHIPNLEGISDNIRARISADVLEHDIRYIFEN-GGDKVY  
 V. cholerae 510 TQHYRIQDSE-IANARACG---KKAAMTLKVVNVKGVDRVYASAAAGVQRVIRGVCSEVPEGVEGSDNIEIISIDCFLEHPRVAVVHN-DGNPQV

P. aeruginosa 607 YLSADWERNLDFEETCFVVEGKIVQVAKKE-LETYLDNTQAWVQADGSG---LOR---LSPTGNQN---PRNTOATLLEKLAAPVLTAR-----  
 Acinetobacter sp. 615 YCSADWERNLDFEVEVCLPIENTGLKRRYQCGLENYMDNQSWLQSDGSG---CR---NISTEDQK---PHNAQQMLLDGII-----  
 N. meningitidis 607 YISSADWGRNFFREHETAAPIAAPELKKRYIREGLEMALADNTHAWLQPDGSG---VIR---AAPAGES---EADLQNDLWTLGG-----  
 M. leprae 665 YIGSADWHRNLDREVEVMAQVKNPRTAQDEL-FESALDPCRWEHGDGQ---T-----ASPQEGHS---VRDHQESLMEHRHRSP-----  
 Synecocystis sp. 640 YIGSADWGRNFFREHETAAPVVEQDILKQESI-LGILLADNRQAWEPDQGT---VORRPAPEQSQSSQALFTAQAIAETTEDPELRSV-----  
 H. pylori 598 YFSADLMPNLERREHLLIPATNPKIAHKLHI-LEIQLDKTLKRYEHNKSGR---IK---VSNPNDPLN---SQDYFEKQALKTF-----  
 C. coli 594 YISSADWPRNLERREHMLTPIYDERSKAKTAQF-LRLQLSDNLLAYEHQNDGE---YAK---VASNEKVID---SQQILEEYVSKIKYTKLKKDQDSRATHL-----  
 E. coli 607 YLSADWTRNIDYHEVATPILDPRLKQRLDI-IDILFSDTVKARYDKELSNRVP---RGNRRKVR---AQLAIYDIKSLQPE-----  
 S. typhimurium 607 YLSADWTRNIDYHEVATPILDPRLKQRLDI-IDILFSDTVKARYDKELSNRVP---RGNRRKVVQ---AQLAIYDIKSLQPD-----  
 K. aerogenes 604 YLSADWTRNIDYHEVAAPLLDPRLKQRLDI-IEILFSDTVKARYDKELSNRVP---RGNRRKVR---SQLAIYDIKSLQPE-----  
 V. cholerae 605 YISSADWERNLDFEHWAPIRDERLQKQRLIDI-LNIQIFIDTVKARRDKEMSNQVVE---RGNRRKVR---SQIAIYDILKNVEKQTRAKGQOETNDN-----

**Anexo 3.** Alineamiento de secuencias aminoacídicas de PPKs. Las secuencias de PPKs de *Pseudomonas aeruginosa* 8800, *Acinetobacter* sp., *Neisseria meningitidis*, *Mycobacterium leprae*, *Synecocystis* sp., *Helicobacter pylori*, *Campylobacter coli*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Klebsiella aerogenes*, y *Vibrio cholerae* fueron alineadas con el programa CLUSTAL W y pintadas en cajas de acuerdo a su identidad y conservación mediante el programa BOXSHADE. En negro se muestran los residuos idénticos, mientras que en gris se muestran los residuos similares.

**Anexo 2**

Comparación mediante BLASTx de la secuencia del fragmento  
amplificado mediante DOP-PCR

BLASTP 2.2.1 [Apr-13-2001]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.

RID: 998071309-9664-906

Query=

(171 letters)

Database: nr

736,524 sequences; 233,319,389 total letters

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
ref NP_082120.1  RIKEN cDNA 4833428E21 gene [Mus musculus] >gi 1...	124	3e-28
prf  1209265U chorion protein B11 [Bombyx mori]	122	1e-27
prf  1209265R chorion protein B13 [Bombyx mori]	120	6e-27
pir  I46413 keratin KAP5.5 - sheep (fragment) >gi 313722 emb CAA...	119	1e-26
dbj BAB32180.1  (AK020699) putative [Mus musculus]	116	7e-26
ref NP_056623.1  keratin-associated protein 5-1 [Mus musculus] >...	116	7e-26
emb CAB57791.1  (X01068) Hc-B chorion protein [Bombyx mori]	115	2e-25
sp P20730 CHHC_BOMMO CHORION CLASS HIGH-CYSTEINE HCB PROTEIN 13 ...	114	4e-25
pir  I46412 keratin KAP5.4 - sheep >gi 313720 emb CAA51829.1  (X...	114	4e-25
ref NP_056624.1  keratin-associated protein 5-4 [Mus musculus] >...	113	6e-25

ALIGNMENTS

>ref|NP\_082120.1| RIKEN cDNA 4833428E21 gene [Mus musculus]  
dbj|BAB29552.1| (AK014785) putative [Mus musculus]  
Length = 189

Score = 124 bits (311), Expect = 3e-28  
Identities = 65/187 (34%), Positives = 87/187 (45%), Gaps = 33/187 (17%)

Query: 4 ACAGAATGCGGACCTGCAGGCGA-----ACACCAATGTGATCAATGGC 46  
+C G + GCG +C GGCG+ AC+C + C + GGC  
Sbjct: 2 SCCGCSGGCGSSC-----GGCGSNCKPVCCCKPVCCVPACSSCGDCKGGCGSCGGC 56

Query: 47 ATGT-TCAGTGGTGGTCCGCTGAC--CAGCAACGCGCCGTCTTTGGCGTCGGACAGCCTG 103  
G +C G G G+C GC G C C GC +CG GC G C++ GGCG+CGG GC G  
Sbjct: 57 KGGCGSCGGCKGGCGSCGGCKGGCGSCGGCGSCG-GCKGGCSCGGCGSCGGCKGGC--G 113

Query: 104 TCCGGGTACTGACAATGATGTTTAAACGCATAACGCTTCCGTCTTGGCGAGACGGCACTTG 163  
+C GG G C + G ++ C ++C C CC C + C + C CC +  
Sbjct: 114 SC--GGCGSCGGCGSCGCCQSSCKPCCQSSC-CKPCC--CQSSCCQSSCKPCCQSS 168

Query: 164 TCACCAC 170  
C C C  
Sbjct: 169 CCKPCCC 175

Score = 115 bits (287), Expect = 2e-25  
Identities = 64/179 (35%), Positives = 82/179 (45%), Gaps = 40/179 (22%)

Query: 4 ACAGAATG-CGGAC--CTGCAGGCGAACACCAATGTGATCAATGGCATGTTTCAGTGGTGG 60  
AC+ ++ G C G C C GC GGCG+ C C + GGC G C GG G  
Sbjct: 37 ACSSSCGDCKGGCGSCGGCKGGCGSCGGCKGG-----CGSCGGCKGG--CGSCGGCG- 87

Query: 61 TCCGTGAC--CAGCAACG-----CGCGTCTTTGGCGTCGGACAGCCTGTCCGGGTACT 113  
+C GC G C C GC +CG CG CG C + GGCG+CG + CC CC ++C  
Sbjct: 88 SCGGCKGGCSCGGCGSCGGCKGGCGSCGGCGSCGGCGSCGCCQSSCKPCCC--QSSCC 145

Query: 114 GACAATGATGTTTAAACGCATAACGCTTCCGTCTTGGCGAGACGGCACTTGTC--CCAC 170  
C C ++C ++CC C C + C C C + CA CC C  
Sbjct: 146 KPC-----CCQSSCCQSSCKPC---CCQSSCKPCCQSSCCAPVCCQC 187

Score = 33.9 bits (76), Expect = 0.59  
Identities = 14/41 (34%), Positives = 20/41 (48%), Gaps = 4/41 (9%)

Query: 134 AACGCTTCCGTCTTGGCGAGACGGCACTTGTTCAC---CACA 171  
+ CGC+ CG+ GCG + C C C C C+C+  
Sbjct: 2 SCCGCSGGCGSSCGGCG-SNCKPVCCKPVCCCVFACSCS 41

>prf||1209265U chorion protein B11 [Bombyx mori]  
Length = 202

Score = 122 bits (306), Expect = 1e-27  
Identities = 71/191 (37%), Positives = 74/191 (38%), Gaps = 43/191 (22%)

Query: 5 CAGAATGCGGACCTGCAGGC-----GAACACCAATGTGAT 39  
C G GCGG C GC GC G C C G  
Sbjct: 28 CRGCGCGCGG--CGGCGSGCCDRFCVRSNSAAPTGLSICSENRYNGDVCVCGEVPFLGTA 85  
Query: 40 CAATGGCATGTTTCAGTGGTGGTCCGCTGACCAGCAACGCGCCGTCTT-TGGCGTCGGACA 98  
C++G C G G C G T +C GC CGCG CG C GGCG CG C  
Sbjct: 86 DVCGDMCSSLGCGCIDYG-CGDDCIGITQSC-GCGGCGCGGGCGGCGCGGGCGGCGCGG 143  
Query: 99 GCCTGTCCGGTACTGACAATGATGTTAAC-GCATAACGCTTCCGTCTTGCGCAGACGG 157  
GC GG C G C G G C GC CGC C G GGCG G CGG  
Sbjct: 144 GC-----GGCGC-GGCGGCGGGCGGCGGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG 191  
Query: 158 CACTTGTTCACC 168  
C C G C CC  
Sbjct: 192 CGCGCGGCGCC 202

Score = 105 bits (261), Expect = 2e-22  
Identities = 70/188 (37%), Positives = 78/188 (41%), Gaps = 38/188 (20%)

Query: 2 AACAGAAATGCGGACCTGCAGGCGAACACCAATGTGATCAATGGCA-TGTT-CAGTGGTG 59  
A + G GCG C GC GCG C C + C + A TG + C+ G  
Sbjct: 16 AQSVLGTGCGCG---CRGCGCGCGG-CGGCGSGCCDRFCVRSNSAAPTGLSICSENRYNG 71  
Query: 60 GTC-CG-----CTGACCAGCAA----CGCGCCGTCTTTGGCGTCG-GACAGCCTG 103  
C CG C C +GC CG C G + GGCG CG G C GC G  
Sbjct: 72 DVCVCGEVPFLGTADVCGDMCSSLGCGCIDYGCDDCIGITQSCGCGGCGGCGGCGGCGG 131  
Query: 104 TCCGGTACTGACAATGATGTTAACGCATAACGCTTC-CGTCTTGCGCAGACGGCACTT 162  
CGG C C G CGC GC C CG C GGCG G CGGC C  
Sbjct: 132 --CGGCGGCGCGGCGG-----CGCG----GCGGCGGCGG-CGCGGG-CGGCGCGC 176  
Query: 163 GTCACCAC 170  
G C+ C C  
Sbjct: 177 GGCSGCGC 184

Score = 63.9 bits (154), Expect = 5e-10  
Identities = 35/79 (44%), Positives = 35/79 (44%), Gaps = 10/79 (12%)

Query: 1 GAAACAGAAATGCGGACCTGCA-GGCGAACACCAATGTGATCAATGGCATGTTTCAGTGGTG 59  
G C G GCGG C GC GGCG C C G G C GGC G C G G G  
Sbjct: 131 GCGGCGGCGCGCGG--CGGCGGCGGCG-CGCGGCGGCG--CGGCGGCGG--CGGCSGCG 183  
Query: 60 GTCCGC--TGACCAGCAAC 76  
C GC G C GC C  
Sbjct: 184 CGCGGCGGCGCGGCGGCGGCGG 202

Score = 36.6 bits (83), Expect = 0.090  
Identities = 19/49 (38%), Positives = 19/49 (38%), Gaps = 12/49 (24%)

Query: 112 CTGACAATGATGTTTAAACGCATAACGCTTCCGTCTTGCGCAGACGGCAC 160  
CT A A GT CGC CGC GCG G CG C  
Sbjct: 10 CTIALVAQSVLGT---GCGCGCRGCGC-----GCGGCGGCGSGCC 46

>prf||1209265R chorion protein B13 [Bombyx mori]  
Length = 182

Score = 120 bits (300), Expect = 6e-27  
Identities = 68/177 (38%), Positives = 74/177 (41%), Gaps = 34/177 (19%)

Query: 10 TCGGACCTGCAGGCGAACACCAATGTGATCAATGGCA-TGTT-CAGTGGTGGTC-CG-- 64

Sbjct: 22 TGCG CC GC GCG C C + C + A TG + C+ G C CG  
TGCG-CCCRGCGCGCGG-CGGCGSRCCDRFCVCSNSAAPTGLSICSENRYNGDVCVCGEV 79  
Query: 65 -----CTGACCAGCAA----CGCGCCGTCTTTGGCGTCG-GACAGCCTGTCCGGGTA 111  
C C +GC CG GC G + GGCG CG G C GC G C G G  
Sbjct: 80 PFLGTADVCGDMCSSGCGCIDYGC GDGCVGITQSCGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGG 139  
Query: 112 CTGACAATGATGTTTAACGCATAACGCTTCCGTCTTGCGCAGACGGCACTTGTCCACC 168  
G C G G CGC CG GCGC G CGGC C G C CC  
Sbjct: 140 GCGGCGCGGGCG----GCGCGCGGGC-----GCGCCGGCGGGCGGGCGGGCGCC 182

Score = 97.1 bits (240), Expect = 6e-20  
Identities = 51/141 (36%), Positives = 53/141 (37%), Gaps = 39/141 (27%)

Query: 1 GAAACAGAATGCGGACCTGCAG---GCGAACACCAATGTGATCAATGGCATGTTTCAGTGG 57  
G G A CG C +GC GCG C G +C GGC  
Sbjct: 77 GEVPFLGTADVCGDMCSSGCGCIDYGC GDGCV-----GITQSCGGCGGGC----- 121  
Query: 58 TGGTCCGCTGACCAGCAACGCGCCGTCTTTGGCGTCGGACAGCCTGTCCGGGTACTGACA 117  
C GC G C GC CGCG CG C GGCG CG C GC GG C G C  
Sbjct: 122 ----CGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGCGGGC-----GGCGCCGGC- 169  
Query: 118 ATGATGTTTAAACGCATAACGC 138  
CGC CGC  
Sbjct: 170 -----GCGCGCGGGCGC 181

Score = 86.3 bits (212), Expect = 1e-16  
Identities = 55/153 (35%), Positives = 57/153 (36%), Gaps = 13/153 (8%)

Query: 24 CGAACACCAATGTGATCAATGGCATGTTTCAGTGGTGGTCCGCTGACCAGCAACGCGCCGT 83  
C A + GTG C G C G G G CC C A G C  
Sbjct: 10 CAIALVAQSVLGTGCGCCCRG-CGCG--CGGCGGCGSRCCDRFCVCSNSAAPTGLSICSE 66  
Query: 84 CTTTGGCGTCGGA----CAGCCTGTCCGGGTACTGACAATGATGTTTAAACGCATAACG-C 138  
G CG A C G C G C G G T + GC CG C  
Sbjct: 67 NRYNGDVCVCGEVPFLGTADVCGDMCSSGCGCIDYGC GDGCVGITQSCGGCGGGCGGGC 125  
Query: 139 TTC-CGTCTTGCGCAGACGGCACTTGTCCACCAC 170  
C CG C GCGC G CGGC C G C C C  
Sbjct: 126 GCGCGGGCG-GCGCGG-CGGCGC-CGGCGGGCGC 155

>pir||I46413 keratin KAP5.5 - sheep (fragment)  
emb|CAA51830.1| (X73435) KAP5.5 keratin protein [Ovis aries]  
Length = 197

Score = 119 bits (297), Expect = 1e-26  
Identities = 64/190 (33%), Positives = 89/190 (46%), Gaps = 37/190 (19%)

Query: 1 GAAACAGAATGCGGACCTGCAGGCGAACA---CCAATGTGATCAATGGCATGTTTCAGTGG 57  
G +C G+ GCG C GC GCG++C CC + ++C+ GGC + C G+ G  
Sbjct: 20 GCGSCGGSKGGCGS--CGGCGSGCGSSCCVPVCCVPACSCSSCSK-GGCGS---CGGSKG 73  
Query: 58 TGGTCCGCTGACCA-----GCAACGCGCCGTCT-TTGGCGTCGGACAGCCTGTCCG 107  
G+C GC +CC C++CG G CG+C + GGCG+CGG+ GC G+C G  
Sbjct: 74 GCGSCGGSVCCVPVCCVPACSCSSCGKGGCGSGGSKGGCGSGGSKGGC--GSCGG 131  
Query: 108 GGTACTGACAATGATGTTTAAACGCATAACGCTTCCGTCTTGCGCAGACGGC-----AC 160  
G+ C +C C C C C C + G G G+CGG C  
Sbjct: 132 CGSGCGSSCCVP-----VCCCKPVCC-CVPACSCSSCGKGGCGSGGSKGGCQSSCCQHTC 182  
Query: 161 TTGTCACCAC 170  
+ +C C  
Sbjct: 183 SQSSCCVPVC 192

Score = 107 bits (267), Expect = 4e-23  
Identities = 59/185 (31%), Positives = 81/185 (42%), Gaps = 22/185 (11%)

Query: 1 GAAACAGAATGCGGACCTGCAGGCGAACACCAATGTGATCAATGGCATGTTTCAGTGGTGG 60  
G +C G+ GCG C G GCGG+ C +G G++C C +C+ G  
Sbjct: 10 GCGSCGGSKGGCGS--CGGSKGGCGSGGC--GSGCGSSCCVPVCCVPACSCSSCSKGGC 65

**Anexo 3**

Análisis mediante BLASTx del fragmento B de 650 pb, amplificado por CODEHOP-PCR.

BLASTX 2.2.1 [Apr-13-2001]

Reference: Altschul, Stephen F., Thomas L. Madden, Alejandro A. Schaffer, Jinghui Zhang, Zheng Zhang, Webb Miller, and David J. Lipman (1997), "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs", Nucleic Acids Res. 25:3389-3402.  
RID: 998060234-468-15854

Query=  
(2196 letters)

Database: nr  
736,524 sequences; 233,319,389 total letters

Sequences producing significant alignments:	Score (bits)	E Value
gi 7688054 emb CAB89696.1  (AJ276418) putative peptide release f...	471	e-131
gi 132468 sp P28353 RF2_SALTY PEPTIDE CHAIN RELEASE FACTOR 2 (RF...	465	e-129
gi 13363235 dbj BAB37186.1  (AP002563) peptide chain release fac...	461	e-128
gi 2507293 sp P07012 RF2_ECOLI PEPTIDE CHAIN RELEASE FACTOR 2 (R...	459	e-128
gi 147569 gb AAA24520.1  (M11520) peptide chain release factor 2...	458	e-127
gi 12517417 gb AAG58019.1 AE005519_5 (AE005519) peptide chain re...	458	e-127
gi 1172913 sp P43918 RF2_HAEIN PEPTIDE CHAIN RELEASE FACTOR 2 (R...	458	e-127
gi 887841 gb AAA83072.1  (U28375) peptide chain release factor 2...	456	e-127
gi 11277786 pir  D82721 translation releasing factor RF-2 XF1111...	452	e-126
gi 12720411 gb AAK02274.1  (AE006053) PrfB [Pasteurella multocida]	441	e-122

ALIGNMENTS

>gi|7688054|emb|CAB89696.1| (AJ276418) putative peptide release factor 2 [Xanthomona:  
pv. campestris]  
Length = 374

Score = 471 bits (1212), Expect = e-131  
Identities = 232/343 (67%), Positives = 272/343 (78%)  
Frame = -1

Query: 1644 GIFDLEEKRRGRLEEVQRELEDPTIWNNAEKAQELGRERSALEAVITPMDKLTASLADGGE 1465  
G D + K+ RLEEV RELE P +WN+AE+AQ LGRERS LE + + + A L D GE  
Sbjct: 23 GYLDYDVKKERLEEVSRLESPDVWDAERAQALGRERSMLEKTVIGIADVLGLTDTAGE 82

Query: 1464 MLELALSEQXXXXXXXXXXXXXXXXXXLVEKLEFQRMFSGAQDAANCFVDIQAGAGGTEAQ 1285  
+L+LA SEQ VEKLEFQRMFSG D AN FVDIQAGAGGTEAQ  
Sbjct: 83 LLDLAESEQEDTAVAVIADLDKYQAHVEKLEFQRMFSGQMDGANAFVDIQAGAGGTEAQ 142

Query: 1284 DWAEMILRMYLHWAESHGFAELVEVSEGEVAGIKSASIHVRGDHAFGWLRTETGVHRLV 1105  
DWAEE+LRMYL WAES G+ EL+EVS GEVAGIKSA+I + G++A+GWL+TE GVHRLV  
Sbjct: 143 DWAIEILLRMYLRWAESRGWKTELMEVSGGEVAGIKSATIRIEGEYAYGWLKTEIGVHRLV 202

Query: 1104 RKSPFDSGNRRHTSFASVFVYPEIDDSFEVDINPADLKVDTYRASGAGGQHVNKTD SAIR 925  
RKSPFDS NRRHTSF SVFV PE+DD+ E+DINPADL+ D YR+SGAGGQHVNKTD+SA+R  
Sbjct: 203 RKSPFDSNRRHTSF TSVFVSPEVDDNIEIDINPADLRTDVYRSSGAGGQHVNKTESAVR 262

Query: 924 ITHVPSGIVVACQTDTRSQHKNRAEAMRMLRSKLYEMEMQKRAVEKQALEDSKSDIGWG HQ 745  
ITH+P+ VVACQT RSQH+NR AM+ML +KLYE+E+QKR VE+ ALE +KSDIGWG Q  
Sbjct: 263 ITHIPTNTVVACQTDGRSQHQRNDNAMKMLAALYELVQKRNVERDALEATKSDIGWGSQ 322

Query: 744 IRSYVLDQSRIKDLRTGVEVGD TQKVLGDGALDMFIEAALKAGL 616  
IR+YVLDQSRIKDLRTG+E DTQKVLGD LD F+EA+LKAGL  
Sbjct: 323 IRNVYVLDQSRIKDLRTGIERSDTQKVLGDGDLDEFVEASLKAGL 365

>gi|132468|sp|P28353|RF2\_SALTY PEPTIDE CHAIN RELEASE FACTOR 2 (RF-2)  
gi|96819|pir||A36480 translation releasing factor RF-2 - Salmonella typhimurium  
gi|154276|gb|AAA72914.1| (M38590) peptide chain release factor 2 [Salmonella typhimurium]  
Length = 365

Score = 465 bits (1196), Expect(2) = e-129  
Identities = 219/343 (63%), Positives = 273/343 (78%)  
Frame = -1

Query: 1644 GIFDLEEKRGRLEEVQRELEDPTIWNNAEKAQELGRERSALEAVITPMDKLTASLADGGE 1465  
G D + K+ RLEEV ELE P +WN E+AQ LG+ERS+LEA++ +D++T L D  
Sbjct: 23 GYLDYDAKKERLEEVEAELEQPDVWNEPERAQAALGKERSSLEAIVDTLDQMTQGLDDVSG 82

Query: 1464 MLELALSEQXXXXXXXXXXXXXXXXXXLVEKLEFORMFSGAQDAANCFVDIQAGAGGTEAQ 1285  
+LELA+ + +LEF+RMFSG D+A+C++DIQAG+GGTEAQ  
Sbjct: 83 LLELAVEADDEETFNEAVALNTLEEKLAQLEFRMFSGEYDSADCYLDIQAGSGGTEAQ 142

Query: 1284 DWAEMILRMYLHWAESHGFAAELVEVSEGEVAGIKSASIHVRGDHAFGWLRTETGVHRLV 1105  
DWA M+LRMYL WAE+ GF E++E SEGEVAGIKSA+I + G++A+GWLRTETGVHRLV  
Sbjct: 143 DWASMLLRMYLRWAEARGFKTEVIEESEGEVAGIKSATIKISGEYAYGWLRTETGVHRLV 202

Query: 1104 RKSPFDGSGRRHTSFASVFVYPEIDDSFEVDINPADLKVDTYRASGAGGQHVNTDSAIR 925  
RKSPFDG RRHTSF+S FVYPE+DD ++DINPADL++D YRASGAGGQHVNT+T+SA+R  
Sbjct: 203 RKSPFDGSGRRHTSFSSAFVYPEVDDDDIDIDINPADLRIDVYRASGAGGQHVNRTEAVR 262

Query: 924 ITHVPSGIVVACQTDERSQHKNRAEAMRLRSKLYEMEMQKRAVEKQALEDSKSDIGWGHQ 745  
ITH+P+GIV CQ DRSQHKN+ +AM+ +++KLYE+EMQK+ EKQA+ED+KSDIGWG Q  
Sbjct: 263 ITHIPTGIVTQCQNDERSQHKNKDQAMKQMKAKLYELEMQKNAEKQAMEDTKSDIGWGSQ 322

Query: 744 IRSYVLDQSRIKDLRTGVEVGDTQKVLGDALDMFIEAALKAGL 616  
IRSYVLD SRIKDLRTGVE +TQ VLDG+LD FIEA+LKAGL  
Sbjct: 323 IRSYVLDQSRIKDLRTGVETRNTQAVLDGSLDQFIEASLKAGL 365

Score = 20.8 bits (42), Expect(2) = e-129  
Identities = 11/25 (44%), Positives = 13/25 (52%)  
Frame = -3

Query: 1711 MREVNEMRALHDDLQVRVAGLRGYL 1637  
M E+N + DL R LRGYL  
Sbjct: 1 MFEINPVNNRIQDLTERTNVLRGYL 25

>gi|13363235|dbj|BAB37186.1| (AP002563) peptide chain release factor RF-2 [Escherich:  
O157:H7]  
Length = 365

Score = 461 bits (1185), Expect = e-128  
Identities = 218/343 (63%), Positives = 270/343 (78%)  
Frame = -1

Query: 1644 GIFDLEEKRGRLEEVQRELEDPTIWNNAEKAQELGRERSALEAVITPMDKLTASLADGGE 1465  
G D + K+ RLEEV ELE P +WN E+AQ LG+ERS+LEAV+ +D++ L D  
Sbjct: 23 GYLDYDAKKERLEEVEAELEQPDVWNEPERAQAALGKERSSLEAVVDTLDQMKQGLDDVSG 82

Query: 1464 MLELALSEQXXXXXXXXXXXXXXXXXXLVEKLEFORMFSGAQDAANCFVDIQAGAGGTEAQ 1285  
+LELA+ + +LEF+RMFSG D+A+C++DIQAG+GGTEAQ  
Sbjct: 83 LLELAVEADDEETFNEAVALDALEEKLAQLEFRMFSGEYDSADCYLDIQAGSGGTEAQ 142

Query: 1284 DWAEMILRMYLHWAESHGFAAELVEVSEGEVAGIKSASIHVRGDHAFGWLRTETGVHRLV 1105  
DWA M+ RMYL WAES GF E++E SEGEVAGIKS +I + GD+A+GWLRTETGVHRLV  
Sbjct: 143 DWASMLRMYLRWAEARGFKTEIEESEGEVAGIKSVTIKISGDYAYGWLRTETGVHRLV 202

Query: 1104 RKSPFDGSGRRHTSFASVFVYPEIDDSFEVDINPADLKVDTYRASGAGGQHVNTDSAIR 925  
RKSPFDG RRHTSF+S FVYPE+DD +++INPADL++D YRASGAGGQHVNT+T+SA+R  
Sbjct: 203 RKSPFDGSGRRHTSFSSAFVYPEVDDDDIDIEINPADLRIDVYRASGAGGQHVNRTEAVR 262

Query: 924 ITHVPSGIVVACQTDERSQHKNRAEAMRLRSKLYEMEMQKRAVEKQALEDSKSDIGWGHQ 745  
ITH+P+GIV CQ DRSQHKN+ +AM+ +++KLYE+EMQK+ EKQA+ED+KSDIGWG Q  
Sbjct: 263 ITHIPTGIVTQCQNDERSQHKNKDQAMKQMKAKLYELEMQKNAEKQAMEDNKSDIGWGSQ 322

Query: 744 IRSYVLDQSRIKDLRTGVEVGDTQKVLGDALDMFIEAALKAGL 616



IRSYVLD SRIKDLRTGVE +TQ VLDG+LD FIEA+LKAGL  
Sbjct: 323 IRSYVLDD SRIKDLRTGVETRNTQAVLDGSLDQFIEASLKAGL 365

>gi|2507293|sp|P07012|RF2\_ECOLI PEPTIDE CHAIN RELEASE FACTOR 2 (RF-2)  
gi|7428983|pir||FCECR2 translation releasing factor RF-2 - Escherichia coli (strain  
gi|2367172|gb|AAC75929.1| (AE000372) peptide chain release factor RF-2 [Escherichia  
gi|228558|prf||1806195A peptide chain-releasing factor:ISOTYPE=2 [Escherichia coli]  
Length = 365

Score = 459 bits (1181), Expect = e-128  
Identities = 217/343 (63%), Positives = 269/343 (78%)  
Frame = -1

Query: 1644 GIFDLEEKGRLEEVQRELEDPTIWNNAEKAQELGRERSALEAVITPMDKLTASLADGGE 1465  
G D + K+ RLEEV ELE P +WN E+AQ LG+ERS+LEAV+ +D++ L D  
Sbjct: 23 GYLDYDAKKERLEEVNAELEQPDVWNEPERAQAALGKERSSLEAVVDTLDQMKQGLEDEVSG 82

Query: 1464 MLELALSEQXXXXXXXXXXXXXXXXXXLVEKLEFORMFSGAQDAANCFVDIQAGAGGTEAQ 1285  
+LELA+ + +LEF+RMFSG D+A+C++DIQAG+GGTEAQ  
Sbjct: 83 LLELAVEADDEETFNEAVALDALEEKLAQLEFRMFSGEYDSADCYLDIQAGSGGTEAQ 142

Query: 1284 DWAEMILRMYLHWAESHGFAAELVEVSEGEVAGIKSASIHVRGDHAFGWLRTETGVHRLV 1105  
DWA M+ RMYL WAES GF E++E SEGEVAGIKS +I + GD+A+GWLRTETGVHRLV  
Sbjct: 143 DWASMLERMYLRWAESRGFKTEIEESEGEVAGIKSVTIKISGDYAYGWLRTETGVHRLV 202

Query: 1104 RKSPFDSGNRRHTSFASVFVYPEIDDSFEVDINPADLKVDTYRASGAGGQHVNKTD SAIR 925  
RKSPFDSG RRHTSF+S FVYPE+DD +++INPADL++D YR SGAGGQHVN+T+SA+R  
Sbjct: 203 RKSPFDSGRRHTSFSSAFVYPEVDDDDIDIEINPADLRIDVYRTSGAGGQHVNRTE SAVR 262

Query: 924 ITHVPSGIVVACQTD RSQHKNRAEAMRMLRSKLYEMEMQKRAVEKQALEDSKSDIGWGHQ 745  
ITH+P+GIV CQ DRSQHKN+ +AM+ +++KLYE+EMQK+ EKQA+ED+KSDIGWG Q  
Sbjct: 263 ITHIPTGIVTQCQNDRSQHKNKDQAMQMKAKLYELEMQKNAEKQAMEDNKSDIGWGSQ 322

Query: 744 IRSYVLDQSRIKDLRTGVEVGD TQKVLGDALDMFIEAALKAGL 616  
IRSYVLD SRIKDLRTGVE +TQ VLDG+LD FIEA+LKAGL  
Sbjct: 323 IRSYVLDD SRIKDLRTGVETRNTQAVLDGSLDQFIEASLKAGL 365

>gi|147569|gb|AAA24520.1| (M11520) peptide chain release factor 2 [Escherichia coli]  
Length = 365

Score = 458 bits (1178), Expect = e-127  
Identities = 216/343 (62%), Positives = 269/343 (77%)  
Frame = -1

Query: 1644 GIFDLEEKGRLEEVQRELEDPTIWNNAEKAQELGRERSALEAVITPMDKLTASLADGGE 1465  
G D + K+ RLEEV ELE P +WN E+AQ LG+ERS+LEAV+ +D++ L D  
Sbjct: 23 GYLDYDAKKERLEEVNAELEQPDVWNEPERAQAALGKERSSLEAVVDTLDQMKQGLEDEVSG 82

Query: 1464 MLELALSEQXXXXXXXXXXXXXXXXXXLVEKLEFORMFSGAQDAANCFVDIQAGAGGTEAQ 1285  
+LELA+ + +LEF+RMFSG D+A+C++DIQAG+GGTEAQ  
Sbjct: 83 LLELAVEADDEETFNEAVALDALEEKLAQLEFRMFSGEYDSADCYLDIQAGSGGTEAQ 142

Query: 1284 DWAEMILRMYLHWAESHGFAAELVEVSEGEVAGIKSASIHVRGDHAFGWLRTETGVHRLV 1105  
DWA M+ RMYL WAES GF E++E SEGEVAGIKS +I + GD+A+GWLRTETGVHR+V  
Sbjct: 143 DWASMLERMYLRWAESRGFKTEIEESEGEVAGIKSVTIKISGDYAYGWLRTETGVHRV 202

Query: 1104 RKSPFDSGNRRHTSFASVFVYPEIDDSFEVDINPADLKVD TYRASGAGGQHVNKTD SAIR 925  
RKSPFDSG RRHTSF+S FVYPE+DD +++INPADL++D YR SGAGGQHVN+T+SA+R  
Sbjct: 203 RKSPFDSGRRHTSFSSAFVYPEVDDDDIDIEINPADLRIDVYRTSGAGGQHVNRTE SAVR 262

Query: 924 ITHVPSGIVVACQTD RSQHKNRAEAMRMLRSKLYEMEMQKRAVEKQALEDSKSDIGWGHQ 745  
ITH+P+GIV CQ DRSQHKN+ +AM+ +++KLYE+EMQK+ EKQA+ED+KSDIGWG Q  
Sbjct: 263 ITHIPTGIVTQCQNDRSQHKNKDQAMQMKAKLYELEMQKNAEKQAMEDNKSDIGWGSQ 322

Query: 744 IRSYVLDQSRIKDLRTGVEVGD TQKVLGDALDMFIEAALKAGL 616  
IRSYVLD SRIKDLRTGVE +TQ VLDG+LD FIEA+LKAGL

**Anexo 4**

Secuencia del gen *ppk* de *At. ferrooxidans* y ubicación de los  
partidores utilizados.

1 ggcaaaccggggttgatctctggtgcggtggattcgtgagggcgcggtggtgatcgatgta 60  
-----+-----+-----+-----+-----+  
ccgtttggcccaactagagaccacgcacctaagcactcccgcgccaccactagctacat  
a G K P G L I S G A W I R E G A V V I D V

61 ggaatcaaccgtcttccggatgggcggtgaccggcgacgtggactttgccggcgagag 120  
-----+-----+-----+-----+-----+  
ccttagttggcagaaggcctaccgcccactggccgctgcacctgaaacggcccgctctc  
a G I N R L P D G R V T G D V D F A G A E


121 cagcgtgcgggcgtggatcaccccggtccccggcggggtcggacccatgactgtggctacc 180  
-----+-----+-----+-----+-----+  
gtcgcacgcccacactagtgggggccaggggcccagcctgggtactgacaccgatgg  
a Q R A A W I T P V P G G V G P M T V A T

181 cttctgcagaacaccctgatcgccgaggaccgcacatgggggacccgcacatgtctgaggt 240  
-----+-----+-----+-----+-----+  
gaagacgtcttgggactagcggcgccctcgtggcgtacccccgtggcgtacagactcca  
a L L Q N T L I A A E H R M G A P H V \*  
b M S E V

  
*ppkNH<sub>2</sub>MscI*

241 gcctgcgccggaaaaagcccgttccgcgccgctctcgacagccctgagctgtacttcaa 300  
-----+-----+-----+-----+-----+  
cggacgcggcctttttcgggcaaggcgcgggcggagagctgtcgggactcgacatgaagtt  
b P A P E K A R S A P P L D S P E L Y F N

301 ccgagacctcagcatcctcgcttcaaccagcgggtactggccctggctgacgaccagcg 360  
-----+-----+-----+-----+-----+  
ggctctggagtcgtaggagcgggaagttggctcgcccatgaccgggaccgactgctggtcgc  
b R D L S I L A F N Q R V L A L A D D Q R

  
*ppk11Nd*

361 cgtaccgctgctggaacgtttacgctacctgaccatcgtttccagcaatctggacgaatt 420  
-----+-----+-----+-----+-----+  
gcatggcgacgaccttgcaaatgcatggactggtagcaaaggctcgttagacctgcttaa  
b *ppk14Nd* *ppk12Nd*

V P L L E R L R Y L T I V S S N L D E F

421 ttttgaagtgcgatggccgactggtgcagcggcttaaattcggcgccggccccttggg 480  
-----+-----+-----+-----+-----+  
aaaacttcacgctaccggcctgacaacgtcgccgaatttaagccgcgccggggaaccc  
b F E V R M A G L L Q R L K F G A G P L G

481 accggacatgcttgggcccccaacgcgaaatcgaggcagtagcgaaaaaggcccatgaaat 540  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
tggcctgtacgaaccgggggttgcgcttttagctccggtcatcgctttttccgggtacttta

b P D M L G P Q R E I E A V A K K A H E I

541 catttccgaacaataccgatgcctgaatcagcgcctgctgcccgctctggctaaggaagg 600  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
gtaaaggcttgttatggctacggacttagtcgaggacgacgggagaccgattccttcc

b I S E Q Y R C L N Q R L L P A L A K E G

*ppk15Nd*

601 tattcgcttgttgcgcccgcgaaatggcgggcagcgcagaaacgcttggatcagcaatta 660  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
ataagcgaacaacgcggcgcgcttaccgccgctcgcgctctttgcaacctagtcgttaat

*ppk17Nd*

b I R L L R R R E W R A A Q K R W I S N Y

661 tttccagacggaggtgctgcctctgctcactcccctgagcctcgacccccgccaccóctt 720  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
aaaggtctgcctccacgacggagacgagtgaggggactcggagctggggcggggtggggaa

b F Q T E V L P L L T P L S L D P A H P F

721 tcccaaggtacagaacaaagggctgaatttcgctatcgcttctggaaggccaggatgctta 780  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
agggttccatgtcttgtttcccgacttaaagcgatagcaagaccttccggtcctacgaat

b P K V Q N K G L N F A I V L E G Q D A Y

781 cggcgacacagccccatcgccatcgtaacggcgccacgcatttccccgcacatctg 840  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
ggccgctgtgtcgggtagcggtagcatgtccgcggtgcgtaagagggggcgtagtagac

b G R H S P I A I V Q A P R I L P R I I W

841 gattccgcaacatctggcggtccgaatgatttcgtgtttctctcctccgcatccacga 900  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
ctaaggcgtttagtagaccgcccaggcttactaaagcacaagagaggaggcagtaggtgct

b I P Q H L A G P N D F V F L S S V I H E

901 acatgtgcaggcgtctttccgggtctgaccatccagggtttttatcagtttcgggtgac 960  
-----+-----+-----+-----+-----+-----+  
tgtacacgtccgcgagaaaggcccagactggtaggtoccaaaaatagtcaaagcccactg

*ppk16Nd*

b H V Q A L F P G L T I Q G F Y Q F R V T

**ppk18Nd**

gcgcaacagtgaactctttgtggatgaggaagaggtggacaatctcctcgacgcgctggc  
961-----+-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1020  
cgcgttgtcacttgagaaacacctactccttctccacctgttagaggagctgcgcgaccg

b     R N S E L F V D E E E V D N L L D A L A  
    ▶

cgatgaattaccgctacgccccctttggcgaggcgggtacggctggaggctcgaataattg  
1021-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1080  
gctacttaatggcgatgcggggaaaccgctccgccatgccgacctccagcgattgttaac

b     D E L P L R P F G E A V R L E V A N N C

tccgcgggaagtgggtggaatatcttctgaaacatcttgaactgagcgagagcaacctgta  
1081-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1140  
aggcgcccttcaccaccttatagaagactttgtaaaacttgactcgcctctcgttggacat

b     P R E V V E Y L L K H F E L S E S N L Y

ttcattgcagggtcccgtgaatctgtcacggttggcgggccatcatcgaaatgggtcccccg  
1141-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1200  
aagtaacgtcccagggcacttagacagtgccaaccgcccggtagtagctttaccagggggc

b     S L Q G P V N L S R L A A I I E M V P R

ccccgacttgctttatccgccccttcataaccggggctgccagcggtttgttcacacccccga  
1201-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1260  
ggggctgaacgaaataggcgggaagtatggccccgacggtcgccaaacaagtgtggggct

b     P D L L Y P P F I P G L P A V C S H P E

gaacatattcgcgcacatctacgggagggcggccatcctgctccatcacccataccagagctt  
1261-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1320  
cttgataagcgcgtagatgccctccgcggttaggacgaggtagtggtatggtctcgaa

b     N I F A H L R E A P I L L H H P Y Q S F  
    ◀

caaccoggttctggatttctccgccaggcgggtcagcgatccaaaagtcacggcatcaa  
1321-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1380  
gttgggccaagacctaaggaggcgggtccgccagtcgctaggttttcagtagccgtagtt

**ppk10Nd**

b     N P V L D F L R Q A V S D P K V I G I K

gcagacgctgtaccgtaccacccccgactccccggtcacgcgcggttgatagaagcggc  
1381-----+-----+-----+-----+-----+-----+ 1440  
cgtctgcgacatggcatggtgggggctgagggggccagtagctgcgcaactatcttcgccg

b     Q T L Y R T T P D S P V I D A L I E A A

1441 catggccgggaaacaggtcacggcagtggtcgaactcaaggcccgtttgacgaagccaa 1500  
-----+-----+-----+-----+-----+  
gtaccggccctttgtccagtgccgtcaccagcttgagttccgggcgaaactgcttcggtt

b M A G K Q V T A V V E L K A R F D E A N  
*ppk4Nd* →

1501 taacatccggatggccgagcgtctggaagaagtgggtgtgcaggtggtatacggcgtggt 1560  
-----+-----+-----+-----+-----+  
attgtaggcctaccggctcgcagaccttcttcacccacacgtccaccatagccgcacca

b N I R M A E R L E E V G V Q V V Y G V V  
← *ppk7Nd*  
→ *ppk8Nd*

1561 caatcacaaggtgcatgccaaagatgattctcatcctgcccgggaggagacgggatccg 1620  
-----+-----+-----+-----+-----+  
gttagtgttccacgtacggttctactaagagtaggacgcggccctcctcctgcctaggc

b N H K V H A K M I L I L R R E E D G I R  
← *ppk5Nd*

1621 cctctacgggcacttgggtacgggcaattatcatccccgcaatgcgcggatttacactga 1680  
-----+-----+-----+-----+-----+  
ggagatgcccgtgaacccatgcccgttaatagtaggggcgttacgcgcctaaatgtgact

b L Y G H L G T G N Y H P R N A R I Y T D

1681 tctcagcctgctcacggcaaatcccgacatcacggcggacatgaatgacctgttcatgca 1740  
-----+-----+-----+-----+-----+  
agagtcggacgagtgccgttagggctgtagtgccgcctgtacttactggacaagtagct

b L S L L T A N P D I T A D M N D L F M H

1741 tatcactggcatgggcaaggcaccacaattgcgctgtctgctgcagagtccctttacgat 1800  
-----+-----+-----+-----+-----+  
atagtgaccgtaccggttccgtggtgtaacgcgacagacgctctcagggaaatgcta

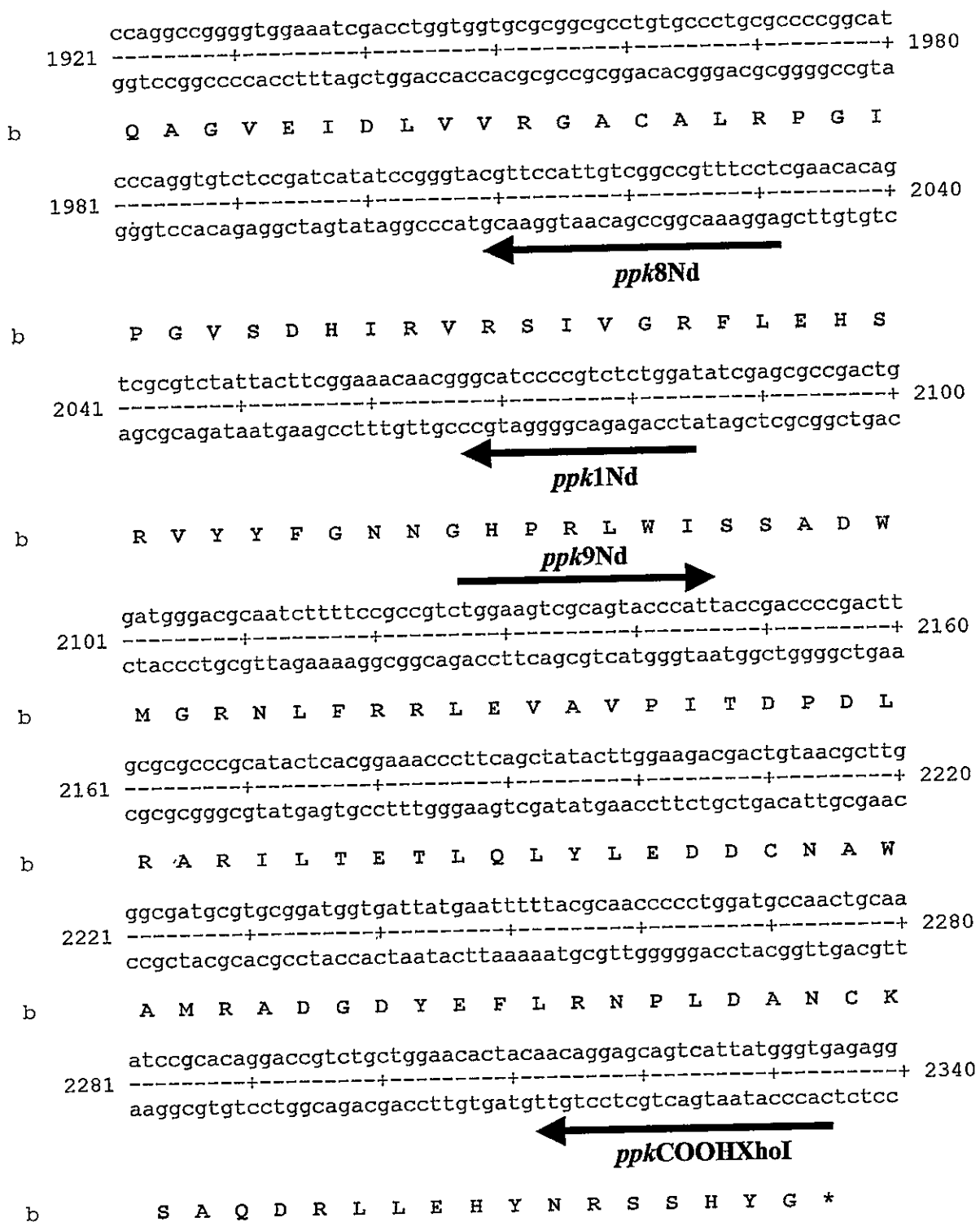
b I T G M G K A P Q L R C L L Q S P F T M

1801 gttccagggcatacaggaagccatcgatagcggatccgtcacggaagcaaggctcgcat 1860  
-----+-----+-----+-----+-----+  
caaggtcccgtatgtccttcggtagctatgcctctaggcagtgcccttcggttccagcgta

b F Q G I Q E A I D T E I R H G S K G R I

1861 catcgtgcgggtgaacgcgctggtcgaacccgatctgattcgcgcctgtaccgggcctc 1920  
-----+-----+-----+-----+-----+  
gtagcacgcccacttgccgcgaccagcttgggctagactaagcgcgggacatggcccggag

b I V R V N A L V E P D L I R A L Y R A S  
→ *ppk6Nd*



(a) secuencia aminoacídica deducida a partir del marco abierto de lectura que se encuentra río arriba del marco abierto de lectura codificante para el gen *ppk* (b).

**Anexo 5**

Publicaciones generadas durante esta tesis



Trabajo aceptado para ser publicado en un número especial  
de la revista Hydrometallurgy

1  
2  
3  
4 **Proteomic and genomic analysis of the phosphate starvation response of**  
5 *Acidithiobacillus ferrooxidans*  
6  
7  
8  
9  
10

11 **M. Vera, N. Guiliani, and C.A. Jerez<sup>\*</sup>.**  
12  
13

14 Laboratory of Molecular Microbiology and Biotechnology, Department of Biology, Faculty  
15 of Sciences, The Millennium Institute for Advanced Studies in Cell Biology and  
16 Biotechnology, University of Chile, Santiago, Chile. [cjerez@uchile.cl](mailto:cjerez@uchile.cl)  
17  
18  
19  
20  
21

22 <sup>\*</sup>:Corresponding author  
23  
24

1 **ABSTRACT**

2

3 The recent availability of an incomplete genomic sequence from *At. ferrooxidans* allowed us  
4 to continue and strengthen the demanding task of investigating the proteome and its functional  
5 implications in this extremophilic microorganism. The proteins of *At. ferrooxidans* were  
6 separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and their levels of synthesis  
7 and the microsequencing of their N-terminal end amino acids were determined. To link the  
8 2D gel spots of interest with the genes that encodes them, we studied the global changes in  
9 gene expression of *At. ferrooxidans* when the bacterium was confronted with phosphate  
10 starvation. By comparing the amino acid sequences of the proteins whose synthesis was  
11 induced or repressed under these conditions, with the available *At. ferrooxidans* genomic  
12 database, we found several putative genes whose expression may be related to phosphate  
13 starvation. Analysis of the genome DNA sequences upstream and downstream of these genes  
14 showed us details of the structure of putative operons present in *At. ferrooxidans*, strongly  
15 suggesting the existence of a Pho regulon containing the putative genes *phoB*, *phoR*, *pstS*,  
16 *pstC*, *pstA*, *pstB*, *phoU*, *ppx* and *ppk*. Some differences were seen in the organization of the  
17 genes in the possible Pho regulon of *At. ferrooxidans* when compared with the Pho operons  
18 from other microorganisms. This was specially evident in the organization of the genes  
19 involved in polyphosphate metabolism (*ppk* and *ppx*). Regulation of phosphate metabolism is  
20 of particular relevance when *At. ferrooxidans* grows in the presence of arsenopyrites, which  
21 release arsenate, a structural analog of phosphate. Structural comparison between the specific  
22 phosphate-binding protein PstS from *E. coli* and the corresponding *At. ferrooxidans* homolog  
23 showed that both proteins are highly conserved, including the phosphate/arsenate binding site,

1 which shares seven of the eight amino acid residues necessary for the hydrogen bonding to the  
2 four oxygens of phosphate.

3

#### 4 **1. INTRODUCTION**

5

6 *Acidithiobacillus ferrooxidans* (former *Thiobacillus ferrooxidans*) is an important  
7 bacterium for the bioleaching of ores (Rawlings, 1997; Tuovinen, 1990; Lundgren and Silver,  
8 1980). During this process, changes in several conditions, for instance nutrient starvation,  
9 may adversely affect the microorganisms. Inorganic phosphate (Pi) is an essential nutrient for  
10 all living cells. Therefore, the lack of phosphate may affect the bioleaching of minerals  
11 (Tuovinen, 1990; Matin, 1991; Beck and Shafia, 1964). The physiological response to  
12 phosphate deprivation has been well characterized in *Escherichia coli* (Wanner, 1996;  
13 Torriani-Gorini, 1994), which possesses an emergency system known as the Pho regulon  
14 (Wanner, 1996; Torriani-Gorini, 1994; Makino et al., 1994), consisting of a number of genes  
15 coding for proteins that allow the bacteria to scavenge traces of usable phosphate sources  
16 from the environment. Responses include the production of proteins within the outer  
17 membrane and interior membrane that transport phosphate into the cytoplasm.

18 Some of these Pi starvation-induced proteins are the outer membrane pore protein PhoE,  
19 alkaline phosphatase (PhoA), the PhoR/PhoB two-component system controlling the  
20 response: PhoR being the sensor and PhoB the response regulator. In *E. coli*, PhoB activates  
21 the transcription of the genes belonging to the Pho regulon by recognizing and binding to the  
22 upstream regulatory element known as the Pho box. Several other proteins (PstA, PstB, PstC,  
23 PstS) which are part of the high affinity phosphate-specific transport (Pst) system are also  
24 induced in their synthesis as part of the response to phosphate starvation (Wanner, 1996;

1 Torriani-Gorini, 1994; Makino et al., 1994). Additionally, bacteria synthesize inorganic  
2 polyphosphates (polyP) as a Pi reservoir (Kornberg et al., 1999). The enzyme responsible for  
3 the synthesis of polyP is the polyphosphate kinase (PPK), and the enzyme degrading polyP to  
4 Pi is the exopolyphosphatase (PPX). Both genes (*ppk* and *ppx* respectively) are apparently  
5 part of the Pho regulon in *E. coli* (Torriani-Gorini, 1994).

6 We have previously analyzed the global protein changes in *At. ferrooxidans* when  
7 subjected to phosphate starvation (Seeger and Jerez, 1993; Jerez et al, 1992). By two-  
8 dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, at least 25 proteins changed their levels of  
9 expression under the limiting conditions (Seeger and Jerez, 1993; Seeger and Jerez, 1992).  
10 Recently, we have also developed an assay based on the induction of outer membrane proteins  
11 during phosphate starvation to determine *in situ* the phosphate-lacking state of *At.*  
12 *ferrooxidans* (Varela et al., 1998). The determination of this physiological state is particularly  
13 important when the microorganisms are grown in the presence of arsenate. Being a structural  
14 analog of phosphate, arsenate enters the cell through both the Pit (phosphate inorganic  
15 transporter, constitutive system) and the Pst (inducible) systems employed to incorporate  
16 phosphate (van Veen, 1997; Luecke and Quioco, 1990). As a consequence, the resistance of  
17 *At. ferrooxidans* to arsenate will greatly depend not only in having an arsenic resistance *ars*  
18 operon (Nies and Silver, 1995) but also on the phosphate concentration present in the growth  
19 medium (Varela et al., 1998).

20 In the present report, we illustrate the use of reverse genetics and the available genomic  
21 database to analyze the putative genes of *At. ferrooxidans* whose expression may be related to  
22 phosphate starvation. Starting with the amino acid N-terminal sequence of a protein induced  
23 under phosphate starvation, we found it to be highly similar to PstS, the phosphate binding  
24 protein of the (ABC type) Pst phosphate transporter. The analysis of the genome DNA

1 sequences upstream and downstream of the putative *At. ferrooxidans* *pstS* gene strongly  
2 suggests the existence of a Pho regulon in this bacterium. On the other hand, the database  
3 currently available showed that a Pit system was not apparent in this microorganism.

4

## 5 **2. MATERIALS AND METHODS**

6

### 7 **2.1. Bacterial strains, plasmids, and growth conditions.**

8 The *At. ferrooxidans* strain ATCC 19589 was used in these studies. Growth on ferrous iron  
9 was in modified 9K medium as previously described (Amaro et al., 1991).

10

### 11 **2.2. Polyacrylamide gel electrophoresis.**

12 Standard two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE) (pH 5 to 7 in  
13 the first dimension) or non-equilibrium pH (2-D NEPHGE) (pH 3 to 10 in the first dimension)  
14 (O'Farrel et al., 1977) was performed as described before for *At. ferrooxidans* (Seeger and  
15 Jerez, 1993; Jerez et al., 1992; Seeger and Jerez, 1992).

16

### 17 **2.3 N-terminal end amino acid sequencing.**

18 Total *At. ferrooxidans* proteins were separated by 2D-PAGE and the spots of interest were  
19 cut out from the gels and transferred to PVDF membranes for determination of the N-terminal  
20 amino acid sequence (Jerez et al., 1992). Some sequencing was performed by the Lab. de  
21 Microséquençage des Protéines of the Institut Pasteur Laboratory (Paris) and others  
22 performed at the sequencing facilities of the GBF, Germany.

23

24

## 1 **2.4. Sequence and database analysis.**

2 A tBLASTx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) search against the *At. ferrooxidans*  
3 ATCC 23270 unfinished genome sequence database (The Institute for Genomic Research,  
4 <http://www.tigr.org>) was run using the N-terminal sequence of the protein of interest. After  
5 the identification of the contig containing the gene of interest we looked for the upstream  
6 and downstream sequences in a kind of "internal contig walking". In each iteration we  
7 obtained 1 kb of new sequences from this contig. The resulting sequences were merged by  
8 using the GCG set of programs. The ORFs, corresponding to homologs of the genes analyzed  
9 were searched for by using the ORF finder program  
10 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). The physicochemical properties of the proteins  
11 derived from the ORF finder program were obtained using the PROTOPARAM program at  
12 the Expasy molecular biology site (<http://expasy.cbr.nrc.ca/tools/protparam.html>). The amino  
13 acidic sequence alignment between a given *E. coli* gene and its *At. ferrooxidans* homolog was  
14 performed with Clustal W (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html>)  
15 and edited by using the BOXSHADE program  
16 ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)). Structural alignments between the  
17 PstS protein and its *At. ferrooxidans* homolog were done using the available structure and the  
18 Cn3D program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure>).  
19

## 20 **3. RESULTS AND DISCUSSION**

### 22 **3.1. Proteomic analysis of *At. ferrooxidans*.**

23 Total protein from *At. ferrooxidans* from different growth conditions were separated by 2D  
24 NEPHGE. Figure 1A shows the gel protein pattern obtained for *At. ferrooxidans* ATCC

1 19859. The proteins were stained with Coomassie Blue and these gels were the starting point  
2 to isolate proteins of interest that change their levels under different growth conditions  
3 (Seeger and Jerez, 1993; Jerez et al., 1992; Seeger and Jerez, 1992; Varela et al., 1998).  
4 Although the sensitivity and resolution of this type of gels does not allow the separation of all  
5 the proteins from *At. ferrooxidans*, the method is sensitive enough to start the proteomic  
6 analysis of a number of gene products.

7 By employing this 2D PAGE procedure we have previously identified several proteins  
8 induced or repressed under a variety of conditions as indicated in Fig. 1A (Seeger and Jerez,  
9 1993; Jerez et al., 1992; Seeger and Jerez, 1992; Varela et al., 1998). Some of these proteins  
10 are the molecular chaperones DnaK (sp/P29133) and GroEL (sp/P29134) induced under heat  
11 shock, ethanol and pH changes (Amaro et al., 1991; Varela and Jerez, 1992), the outer  
12 membrane protein Omp40 (bbs/120030; emb/CAA10107 and AJ012661) changing under  
13 phosphate starvation (Jerez et al., 1992; Guilianì and Jerez, 2000) and rusticyanin (Ru),  
14 induced by the presence of ferrous iron and repressed by the presence of sulfur (Osorio et al.,  
15 1993). As seen in Fig. 1 B and C, the inset window shows the change in the levels of  
16 synthesis of several proteins when the cells were subjected to phosphate starvation. Protein 16  
17 synthesis increased due to the lack of phosphate, and was therefore isolated from the 2D gel  
18 and subjected to N-terminal amino acid sequencing, resulting in the sequence  
19  $_1\text{APTISLLETGSTLLYPLFNLA}_{22}$ .

20 Comparison of this amino acid sequence with the GeneBank database showed that this  
21 protein was similar to PstS. This result was not surprising, since protein 16 was induced in the  
22 absence of phosphate, as is PstS from *E. coli* together with the other proteins of the Pho  
23 regulon (Torriani-Gorini, 1994). This result strongly suggests that *At. ferrooxidans* has a  
24 phosphate scavenging system similar to the one present in *E. coli* and other bacteria. In this



1 regard, we have previously detected changes in the outer membrane proteins of *At.*  
2 *ferrooxidans* when the cells were subjected to phosphate starvation (Jerez et al., 1992; Varela  
3 et al., 1998).

### 4 5 **3.2. Location of the *pstS*-like sequence in the genome of *At. ferrooxidans***

6 To locate the putative *pstS*-gene in *At. ferrooxidans*, we run a tBLASTx search against the  
7 *At. ferrooxidans* ATCC 23270 unfinished genome sequence database using the N-terminal  
8 amino acid sequence of the PstS protein obtained or the sequence of PstS from *E. coli*. We  
9 found two different contigs in the genome from *At. ferrooxidans*, containing significant scores  
10 with the *E. coli* PstS sequence, suggesting the possible existence of two *pstS*-like genes in *At.*  
11 *ferrooxidans* (*pstS1* and *pstS2*). The *pstS2* gene contained the N-terminal sequence obtained  
12 from protein 16. With the current available information, we considered the *pstS1* gene with  
13 highest score the possible *pstS* homolog. Fig. 2 shows the entire amino acid sequence of the  
14 putative *At. ferrooxidans* PstS1 compared with that of *E. coli* PstS.

15 Both *At. ferrooxidans* *pstS* genes showed a putative signal peptide, supporting the putative  
16 periplasmic location of the proteins, as found for the *E. coli* PstS. The putative PstS1 amino  
17 acid sequence showed an identity of 50 percent and a similarity of 64 percent with the *E. coli*  
18 PstS protein.

19 All Pho regulon genes or operons are preceded by a promoter containing an upstream  
20 activation site with a consensus Pho box sequence for transcriptional activation by  
21 phosphorylated PhoB (Makino et al., 1994). Also, all Pho regulon promoters have a number of  
22 features in common. The Pho box is composed of two 7-bp direct repeats with the well  
23 conserved consensus CTGTCAT separated by a 4-bp segment that is part of the -35 region (  
24 Makino et al., 1986). As Fig. 3 shows, the putative gene coding for PstS1 from *At.*

1 *ferrooxidans* shows a possible 18-bp Pho box with the aforementioned characteristics. In the  
2 case of the putative gene for PhoB from *At. ferrooxidans*, although less conserved, a possible  
3 Pho box is also apparent.

4

### 5 **3.3. Structural comparison of *At. ferrooxidans* PstS-like protein with *E. coli* PstS**

6 The high degree of conservation between the *E. coli* and the putative *At. ferrooxidans* PstS,  
7 and the fact that a crystallographic structure for the *E. coli* PstS protein has been reported  
8 (Luecke and Quioco, 1990), prompted us to do a structural alignment between the two  
9 proteins. Fig 4, A,B shows the results of this comparison. There is a high degree of structural  
10 conservation between the two proteins, indicating that both may have the same function in  
11 binding phosphate and its structural analog arsenate.

12 The degree of structural similarity between the PstS from *E. coli* and that of the putative  
13 *At. ferrooxidans* PstS is more evident when the active site for the phosphate binding is  
14 compared. Seven of the eight residues necessary for the hydrogen bonding to the four oxygens  
15 of phosphate are conserved. These residues include Thr 10, Arg 135, Ser 139, Thr141, Ser 38,  
16 Gly 140 and Asp56, as shown in Fig. 4C.

17

### 18 **3.4. *In silico* search of a putative Pho regulon containing the *pstS*-like gene in the** 19 ***At. ferrooxidans* genome**

20 After locating part of the contig containing the *pstS*-like gene with a high degree of  
21 homology to the *E. coli* *pstS*, we searched for the upstream and downstream sequences (see  
22 Materials and Methods). A tBLASTx search was run against the incomplete genome sequence  
23 of the *At. ferrooxidans* ATCC 23270. After running the program ORF Finder with an 8.2 Kb  
24 of the sequence, we identified eight ORFs that are summarized in Table 1. In general, the

1 molecular sizes of all the proteins from *At. ferrooxidans* that had putative homologs in the  
2 Pho regulon from *E. coli* were very similar. The theoretical isoelectric points showed a greater  
3 variation, specially in the case of PhoR. Some of these differences may reflect adaptations of  
4 the proteins which are or have a region in the acidic periplasmic space of *At. ferrooxidans*.

5 Fig. 5 shows that the eight ORFs present in this region of the *At. ferrooxidans* DNA seem  
6 to be organized in two operons. The first one is the one composed of *phoB-phoR*, and the  
7 second is *pstSCAB-phoU-ppx*. This last operon shows almost the same physical organization  
8 as the *E. coli* operon (*pstSCAB-phoU*), except for the presence of the *ppx* gene. In *E. coli*, the  
9 *ppx* gene is located downstream of the *ppk* gene, both forming a separate operon. The Pho  
10 operon of *Burkholderia fungorum* LB400 deduced from the currently available NCBI  
11 genomic sequence (Chávez and Jerez, unpublished results) also shows similar features with  
12 the other Pho operons although with a different location for the *phoB/phoR* pair. The  
13 organization of the *ppx* and *ppk* genes is different in all the Pho regulon gene groupings  
14 shown in Fig. 5. *E. coli* has both *ppk* and *ppx* genes in the same operon (Kornberg et al.,  
15 1999), and therefore if they are coregulated at the transcriptional level, it is difficult to  
16 envisage an accumulation of polyP granules since the two enzymes have opposite activities  
17 (synthesis versus degradation of polyP). In fact, *E. coli* only transiently increases polyP  
18 synthesis under adverse conditions, and no polyP granules have been reported in this  
19 bacterium. One could speculate that microorganisms having the *ppk* and *ppx* genes organized  
20 in separate operons, could regulate synthesis and degradation of polyP separately, allowing  
21 them to accumulate these polymers in response to stressing conditions. Interestingly, we have  
22 observed that both *At. ferrooxidans* (Alvarez et al., 2001) and *B. fungorum* (Chávez and Jerez,  
23 unpublished results) have great capacity to accumulate polyphosphate granules. It will be of

1 great interest to study the mechanism of regulation of the expression of these operons and the  
2 role they could play in adaptation of *At. ferrooxidans* to its environment.

3 In conclusion, we have shown, using 2D-PAGE for protein separation and reverse genetics  
4 for gene determinations, that the putative phosphate and arsenate binding protein PstS1  
5 present in *At. ferrooxidans* is highly conserved when compared with *E. coli* PstS both in  
6 sequence and structure. *At. ferrooxidans* ATCC 23270 contains a putative Pho regulon similar  
7 to the one present in other bacteria. This is also likely to occur in strain ATCC 19859, since  
8 the genes from this strain that we have sequenced so far (not shown) have 98-99% identity  
9 compared with those of strain ATCC 23270. Obviously, it will be necessary to confirm the  
10 proposed genetic organization with expression studies.

11

## 12 ACKNOWLEDGEMENTS

13

14 This research was supported by grants FONDECYT 1000-679, ICM P99-031-F and ICGEB  
15 (Proj. CRP/CHI00-04, contract 01/001).

16

## 17 REFERENCES

18

19

20 Alvarez, S., Vera, M., Jerez, C.A., Guiliani, N., 2001. Polyphosphates, polyphosphate kinase  
21 activity and *ppk* gene in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC  
22 19859. In: Ciminelli, V.S.T., Garcia Jr., O. (Eds.), Biohydrometallurgy: fundamentals,  
23 technology and sustainable development, Part A, Elsevier Science B.V. pp. 355-362.

- 1 Amaro, A.M., Chamorro, D., Seeger, M., Arredondo, R., Peirano, I., Jerez, C.A., 1998. Effect  
2 of external pH perturbations on in vivo protein synthesis by the acidophilic bacterium  
3 *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol. 173, 910-915.
- 4 Beck, J.V., Shafia, F.M., 1964. Effect of phosphate ion and 2,4-dinitrophenol on the activity  
5 of intact cells of *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol. 88, 850-857.
- 6 Guiliani, N., Jerez, C.A., 2000. Molecular cloning, sequencing, and expression of *omp-40*, the  
7 gene coding for the major outer membrane protein from the acidophilic bacterium  
8 *Thiobacillus ferrooxidans*. Appl. Environ. Microbiol. 66, 2318-2324.
- 9 Kornberg, A., Rao, N. N., and Ault-Riché, D., 1999. Inorganic polyphosphate: a molecule of  
10 many functions. Annu. Rev. Biochem. 68, 89-125.
- 11 Jerez, C.A., Seeger, M., Amaro, A. M., 1992. Phosphate starvation affects the synthesis of  
12 outer membrane proteins in *Thiobacillus ferrooxidans*. FEMS Microbiol. Lett. 77, 29-33.
- 13 Luecke, H., Quioco, F., 1990. High specificity of a phosphate transport protein determined  
14 by hydrogen bonds. Nature 347, 402-406.
- 15 Lundgren, D.G, Silver M., 1980. Ore leaching by bacteria. Annu. Rev. Microbiol. 34, 263-  
16 283
- 17 Makino, K., Amemura, M., Kim, S., Nakata, A., Shingawa, H., 1994. Mechanism of  
18 transcriptional activation of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. In: Torriani-Gorini,  
19 A., Yagil, E., Silver, S. (Eds). Phosphate in Microorganisms. ASM Press, 5-12.
- 20 Makino, K., Shinagawa, H., Amemura, M. and Nakata, A., 1986. Nucleotide sequence of the  
21 *phoB* gene, the positive regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli* K-12.  
22 J. Mol. Biol. 190, 37-44.
- 23 Matin, A., 1991. The molecular basis of carbon-starvation-induced general resistance in  
24 *Escherichia coli*. Mol. Microbiol. 5, 3-10.

- 1 Nies, D.H., Silver S., 1995. Ion efflux systems involved in bacterial metal resistances. *J. Ind.*  
2 *Microbiol.* 14, 186-199.
- 3 O'Farrell, P.Z., Goodman, H.M., O'Farrell P.H., 1977. High resolution two-dimensional  
4 electrophoresis of basic as well as acidic proteins. *Cell* 12, 1133-1141.
- 5 Osorio, G., Varela, P., Arredondo, R., Seeger, M., Amaro, A.M., Jerez, C.A. 1993. Changes  
6 in global gene expression of *Thiobacillus ferrooxidans* when grown on elementary sulphur.  
7 In: Torma A.E., Apel, M.L., Brierley, C.L. (Eds.), *Biohydrometallurgical technologies, Vol*  
8 *II, The Minerals, Metals & Materials Society, TMS, Warrendale, PA, USA, pp. 565-575.*
- 9 Rawlings, D. (Ed.), 1997. *Biomining: theory, microbes and industrial process.* Springer-Verlag,  
10 Berlin, Germany.
- 11 Seeger, M., Jerez, C. A., 1992. The lack of phosphate affects global gene expression in  
12 *Thiobacillus ferrooxidans*. *Geomicrobiol. J.* 10, 227-237.
- 13 Seeger, M., Jerez, C. A., 1993. Response of *Thiobacillus ferrooxidans* to phosphate  
14 limitation. *FEMS Microbiol. Rev.* 11, 37-42.
- 15 Torriani-Gorini, A., 1994. The Pho Regulon of *Escherichia coli*. In: Torriani-Gorini, A.,  
16 Yagil, E., Silver, S. (Eds). *Phosphate in Microorganisms.* ASM Press, pp.1-4.
- 17 Tuovinen, O., 1990. Biological Fundamentals of Mineral Leaching Processes. In: Ehrlich, H.,  
18 Brierley, C. (Eds.): *Microbial Mineral Recovery,* Mc Graw-Hill, New York, pp 55-77.
- 19 Van Veen, H., 1997. Phosphate transport in prokaryotes: molecules, mediators and  
20 mechanisms. *Antoine van Leeuwenhock* 72, 299-315.
- 21 Varela, P., Levican, G., Rivera, F., Jerez, C. A., 1998. An immunological strategy to monitor  
22 in situ the phosphate starvation state in *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ.*  
23 *Microbiol.* 64, 4990-4993.

- 1 Varela, P., Jerez, C.A., 1992. Identification and characterization of GroEL and DnaK  
 2 homologues in *Thiobacillus ferrooxidans*. FEMS Microbiol. Lett.. 77, 149-153.
- 3 Wanner, B., 1996. Phosphorous assimilation and control of the phosphate regulon. In:  
 4 Neidhardt, et al. (Eds.), *Escherichia coli* and *Salmonella*, molecular and celular biology.,  
 5 ASM Press, New York, pp. 1357-1381.

6

7

- 8 Table 1. Some properties of the proteins present in the Pho regulon from *E. coli* with the  
 9 corresponding homolog proteins from *At. ferrooxidans*.

Proteins	Molecular Mass		Theoretical		Identity (%)
	(kDa)		Isoelectric Point		
	<i>At. ferrooxidans</i>	<i>E. coli</i>	<i>At. ferrooxidans</i>	<i>E. coli</i>	
PhoB	27.8	26.4	6.62	5.46	49
PhoR	49.7	49.6	5.44	9.63	37
PstS*	36.2	37	9.41	8.39	50
PstC	36.6	34.1	7.03	5.89	55
PstA	30.5	32.3	10.43	9.94	55
PstB	32.2	29	5.81	6.13	69
PhoU	26.4	27.4	5.03	5.14	44
PPX	53.4	58.1	7.01	6.65	34

10

11 \*: PstS1 from *At. ferrooxidans*.

12

**FIGURE LEGENDS**

1

2

3

4

5

6

7

8

9

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

Fig 1. 2D NEPHGE of total proteins from *At. ferrooxidans*. A, total protein from *At. ferrooxidans* ATCC 19859 separated by 2D PAGE and stained with Coomassie Blue. The inset indicates a group of proteins of which spot 16 was further analyzed in cells grown in the presence of phosphate (B) and in phosphate-starved cells (C). Numbers to the left indicate molecular weight markers in kilodaltons.

Fig 2. Amino acid sequence alignment between *E. coli* (*Ec*) PstS1 protein and its *At. ferrooxidans* (*Atf*) homolog PstS1. This alignment was done excluding the signal peptide necessary for the periplasmic export of these proteins. Black boxes, identity; gray boxes, similarity.

Fig 3. Possible existence of Pho boxes in the promoter regions of *phoB* and *pstS* from *At. ferrooxidans*. A. The nucleotide sequence alignments between the *pstS1* (*pstS1Atf*) and *phoB* putative promoter regions of *At. ferrooxidans* (*phoBAtf*) are compared with the corresponding Pho boxes from the homolog genes from *E. coli* (*pstSEc* and *phoBEc*). The known -10 regions and the mRNA start sites (a G at +1) described for *E. coli* are indicated (Makino et al., 1994).



1 Fig 4. Structural alignment between *E. coli* PstS and the *At. ferrooxidans* *pstS1*  
2 homolog. A, secondary structure style; B, hierarchical style. The identity between the  
3 two proteins is shown in red. The gray regions show a segment of PstS from *E. coli*  
4 which is not present in the protein from *At. ferrooxidans*. The phosphate molecule  
5 bound to its binding site is shown in yellow. C. Structure of the phosphate binding site  
6 of PstS protein from *E. coli* (taken from Luecke and Quioco, 1990) aligned with the  
7 putative equivalent site in the PstS-like protein from *At. ferrooxidans*. The amino acid  
8 residues interacting directly with the phosphate molecule are indicated and are  
9 represented by yellow tubes. The rest of the structure is shown as a wire for clarity.  
10 The phosphate molecule in green, is seen bound to the binding site at the center of the  
11 figure.

12  
13 Fig 5. Possible genetic organization of the ORFs flanking the putative *At.*  
14 *ferrooxidans* *pstS1* compared with Pho operons from other microorganisms. Arrows  
15 indicate the proposed direction and approximate extension of the putative ORFs.

16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24

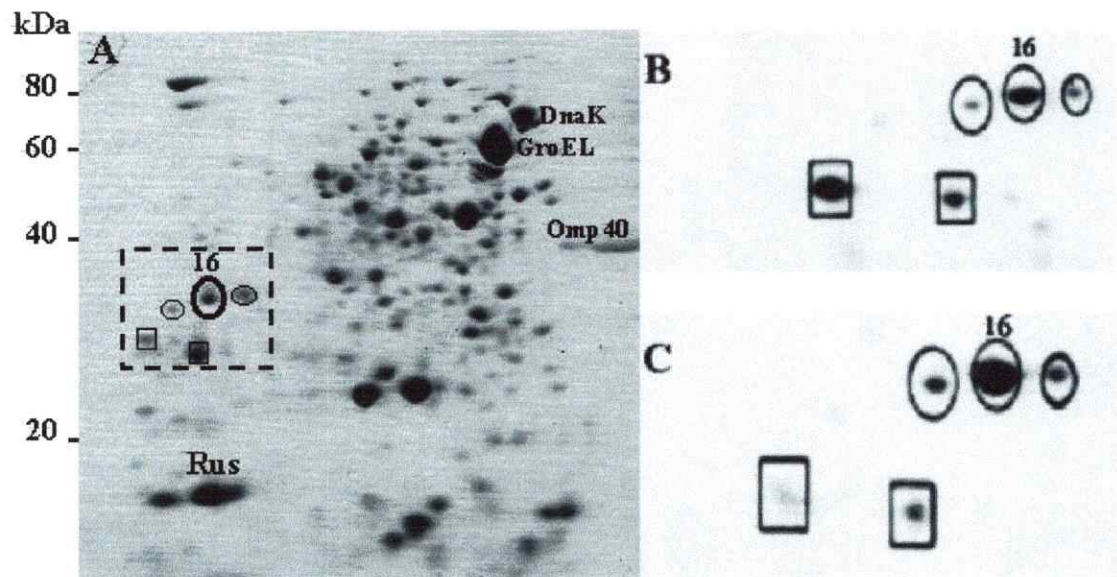
1  
2  
3  
4  
5  
67  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14

Fig. 1

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34

<i>Ec</i>	1	EASLTGAGATEFPAPVYAKWADTYQKETGNKVNYQGIGSSGGVKQLIANIV
<i>Atf</i>	1	-ETLSAAGGTATYPVLSKWAETYKOKTGIMVNYQAIGSGGGLAQIKAKTV
<i>Ec</i>	51	DFGASDAPLSDEKLAQEGLEFQFPPIVIGGVVLAVNIPGLKSGELVLDGKTL
<i>Atf</i>	50	AFANSDMPLQPEYLNKDQLVQFPVAVIGITFVVNVPGIKPGELTFNGAVL
<i>Ec</i>	101	GDIYLGKIKKWDDEALAKLNEGLKLEPSONIAVRRADGSGTSEVFTSYLA
<i>Atf</i>	100	TGIYLGKIKKWNDAALADLNKGVHLEDMNITLVVHRS DGSGTTFETNYLA
<i>Ec</i>	151	KVNEEWKNNVGTGSTVWPIGLGGKNDGIAAFVQRLPGAIGYVEYAYAK
<i>Atf</i>	150	KVSPQEKQKRVCDNTAVSWPVGVGKGNACVAAYVQRLPGAIGYVEYAYAK
<i>Ec</i>	201	QNNLAYTKLISADGKPVSPTEENFANAAGADWS--KTFEQDLTNQKGED
<i>Atf</i>	200	ENEMAYGKMINAAGKVVAPDLATFOAAAANADFTKVEDEYVILTNQPGAQ
<i>Ec</i>	249	AWPIHSTTFILTHKDQKKPEQGTQEVLEKFFDWAYKTFGAKQANDLDYASLPD
<i>Atf</i>	250	SWPISAATYILMRODAHKTVN-AGVLKEARWFLTAPQAQAEARGLDYVP-
<i>Ec</i>	299	SVVEQVRAAWKTNIKDSSGKPLY
<i>Atf</i>		-----

Fig. 2

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29

Pho box                      -10 region      +1

<p><i>pstSEc</i></p> <p><i>pstS1atf</i></p> <p><i>phoBEc</i></p> <p><i>phoBAtf</i></p>	<p>1</p> <p>1</p> <p>1</p> <p>1</p>	<pre> CTTACATAAAGTGCAGCTGTTTGTCCTATTTGCTTCTCG GTGTCATAAAACAGTAATAAAACCTTGCTATAGTCTCTGT-G TTTTCATAAATCTGTCATAAATCTGACGCATAATGA----CG TGGGTGTGCAAC-GTCTT--GCCATTCCGCCAGGGCTTG-CG *  . . . * . * * * . . . . . . . . . . . . . . . . . . </pre>
--	-------------------------------------	--

Fig. 3

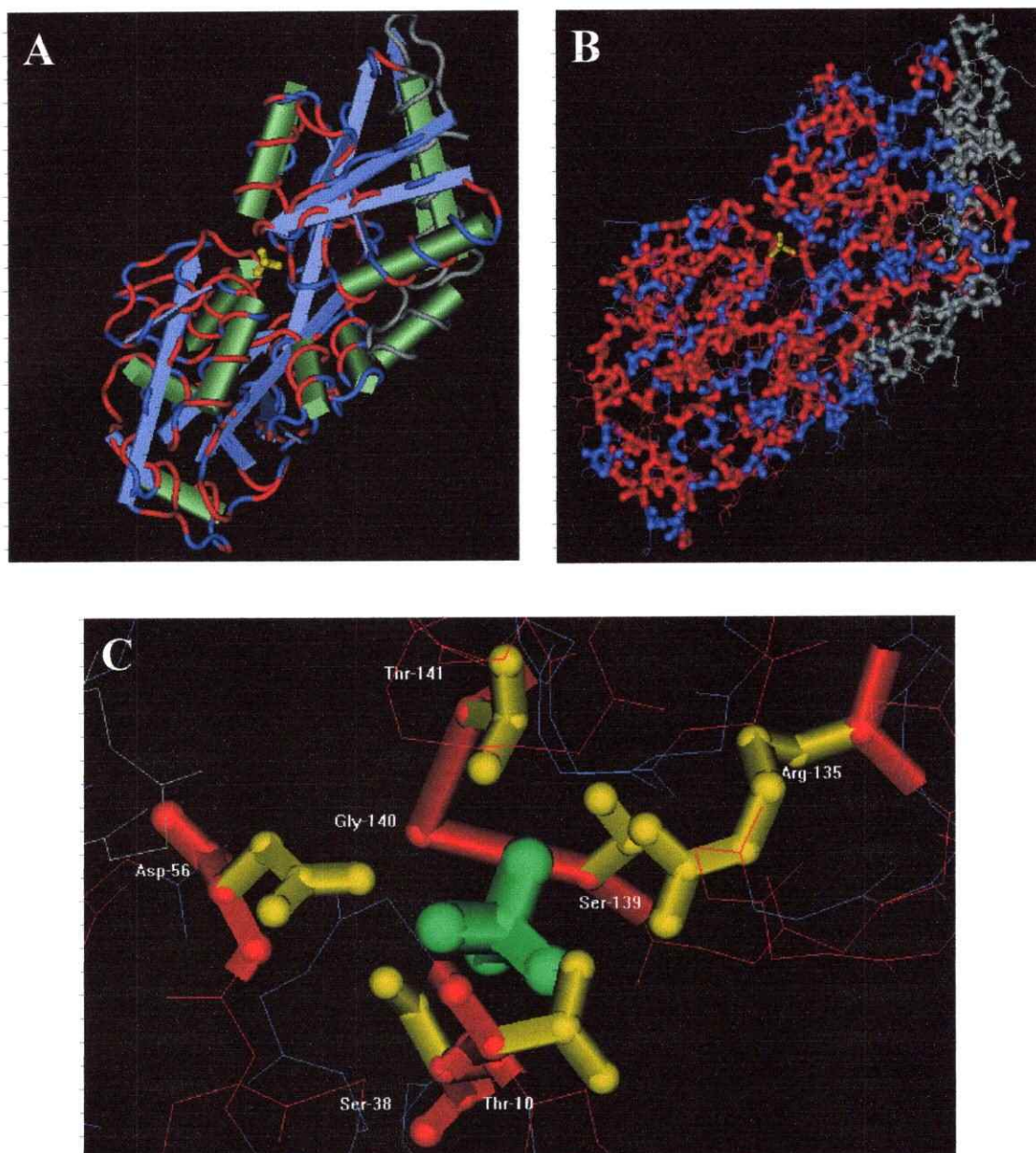


Fig. 4

1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14

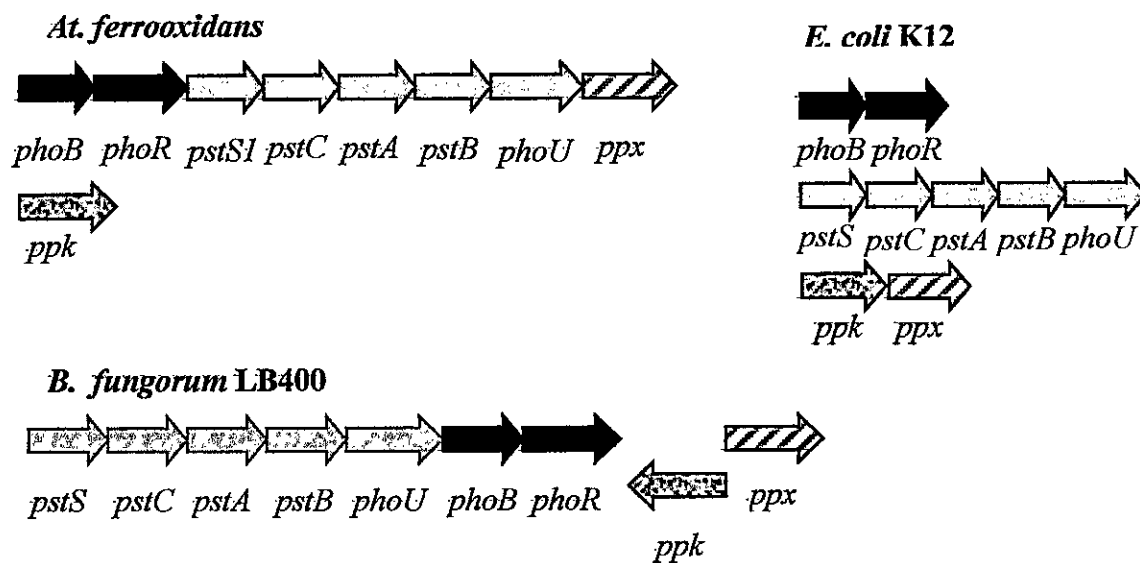


Fig. 5

## Proteomic and genomic strategy for the study of the extremely acidophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans*

M. Vera, N. Guiliani, P. Ramírez, S. Alvarez, and C.A. Jerez.

Laboratory of Molecular Microbiology and Biotechnology, Department of Biology, Faculty of Sciences, The Millennium Institute for Advanced Studies in Cell Biology and Biotechnology, University of Chile, Santiago, Chile. cjerez@uchile.cl

The recent availability of an incomplete genomic sequence from *At. ferrooxidans* allowed us to continue and strengthen the demanding task of investigating the proteome and its functional implications in this extremophilic microorganism. The proteins of *At. ferrooxidans* were separated by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and their levels of synthesis and the microsequencing of their N-terminal end amino acids were determined. To link the 2D gel spots of interest with the genes that encode them, we studied the global changes in gene expression of *At. ferrooxidans* when the bacterium was confronted with changes in pH, oxidizable substrate, and during nutrient starvation. By comparing the amino acid sequences of the proteins whose synthesis was induced or repressed under the different conditions, with the available *At. ferrooxidans* genomic database, we found several putative genes whose expression may be related to iron or sulfur oxidation and to phosphate starvation. Analysis of the genome DNA sequences upstream and downstream of these genes showed us details of the possible structure of putative operons present in *At. ferrooxidans*, such as the Pho regulon and others. It is expected that the DNA microarray technology, once available for *At. ferrooxidans* combined with the recently described method of introducing genes into this chemolithoautotroph will greatly help in understanding how these microorganisms interact and adapt to their biomining environment.

### 1. INTRODUCTION

*Acidithiobacillus ferrooxidans* (former *Thiobacillus ferrooxidans*) is an important bacterium for the bioleaching of ores (1-3). During this process, changes in several conditions, for instance nutrient starvation, may adversely affect the microorganisms. Phosphate (Pi) is an essential nutrient for all living cells. Therefore, the lack of phosphate may affect the bioleaching of minerals (2, 4, 5). The physiological response

to phosphate deprivation has been well characterized in *Escherichia coli* (6, 7), which possesses an emergency system known as the Pho regulon (6-8), consisting of a number of genes coding for proteins that allow the bacteria to scavenge traces of usable phosphate sources from the environment. Responses include the production of proteins within the outer membrane and interior membrane that transport phosphate into the cytoplasm.

Some of these Pi starvation-induced proteins are the outer membrane pore protein PhoE, alkaline phosphatase (PhoA), the PhoR/PhoB two-component system controlling the response: PhoR being the sensor and PhoB the response regulator. In *E. coli*, PhoB activates the transcription of the genes belonging to the Pho regulon by recognizing and binding to the upstream regulatory element known as the pho box. Several other proteins (PstA, PstB, PstC, PstS) which are part of the high affinity phosphate-specific transport (Pst) system are also induced in their synthesis as part of the response to phosphate starvation (6-8). Additionally, bacteria synthesize inorganic polyphosphates (polyP) as a Pi reservoir (7). The enzyme responsible for the synthesis of polyP is the polyphosphate kinase (PPK), and the enzyme degrading polyP to Pi is the polyphosphate exophosphatase (PPX). Both genes (*ppk* and *ppx* respectively) are part of the *pho* regulon in *E. coli* (see article by Cardona *et al.* in this volume and the cited references therein).

We have previously analyzed the global protein changes in *At. ferrooxidans* when subjected to phosphate starvation (9, 10). By two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, at least 25 proteins changed in their levels of expression under the limiting conditions (9, 11). Recently, we have also developed an assay based on the induction of outer membrane proteins during phosphate starvation to determine *in situ* the phosphate-lacking state of *At. ferrooxidans* (12). The determination of this physiological state is particularly important when the microorganisms are grown in the presence of arsenate. Being a structural analog of phosphate, arsenate enters the cell through both the Pit (phosphate inorganic transporter, constitutive system) and the Pst (inducible) systems employed to incorporate phosphate (13, 14). As a consequence, the resistance of *At. ferrooxidans* to arsenate will greatly depend not only in having an arsenic resistance *ars* operon (15) but also on the phosphate concentration present in the growth medium (12).

The recent availability of an incomplete genomic sequence from *At. ferrooxidans* ([www.tigr.org/cgi-bin/BlastSearch/blast.cgi](http://www.tigr.org/cgi-bin/BlastSearch/blast.cgi)) allowed us to continue and strengthen the demanding task of investigating the proteome and its functional implication in this extremophilic microorganism. In the present report, we illustrate the use of reverse genetics and the available genomic database to analyze the putative genes of *At. ferrooxidans* whose expression may be related to phosphate starvation. Starting with the amino acid N-terminal sequence of a protein induced under phosphate starvation, we found it to be highly similar to PstS, the phosphate binding protein of the (ABC type) Pst phosphate transporter. The analysis of the genome DNA sequences upstream and downstream of the putative *At. ferrooxidans* *pstS* gene strongly suggests the existence of a *Pho* regulon in this bacterium. On the other hand, the database currently available showed that a Pit system was not present in this microorganism.



## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Bacterial strains, plasmids, and growth conditions

The *At. ferrooxidans* strain ATCC 19589 was used in these studies. Growth on ferrous iron was in modified 9K medium as previously described (16).

### 2.2. Polyacrylamide gel electrophoresis

Standard two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2-D PAGE) (pH 5 to 7 in the first dimension) or non-equilibrium pH (2-D NEPHGE) (pH 3 to 10 in the first dimension) (17) was performed as described before for *At. ferrooxidans* (9-11).

### 2.3 N-terminal end amino acid sequencing

Total *At. ferrooxidans* proteins were separated by 2D-PAGE and the spots of interest were cut out from the gels and transferred to PVDF membranes for determination of the N-terminal amino acid sequence (10). Some sequencing was performed by the Lab. de Microséquence des Protéines of the Institut Pasteur Laboratory (Paris) and others performed at the sequencing facilities of the GBF, Germany.

### 2.4. Sequence and database analysis

A tBLASTx search against the *At. ferrooxidans* ATCC 23270 unfinished genome sequence database (Institute for Genomic Research, <http://www.tigr.org>) was run using the N-terminal sequence of the protein of interest. After the identification of the contig containing the gene of interest we looked for the upstream and downstream sequences in a kind of "Internal Contig Walking". In each iteration we obtained 1 Kb of new sequences from this contig. The resulting sequences were merged by using the GCG set of programs. The ORFs, corresponding to homologs of the genes analyzed were searched for by using the ORF finder program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). The physicochemical properties of the proteins derived from the ORF finder program were obtained using the PROTOPARAM program at the ExPASy molecular biology server (<http://expasy.cbr.nrc.ca/tools/protparam.html>). The amino acidic sequence alignment between a given *E. coli* gene and its *At. ferrooxidans* homolog was carried out using the program Clustal W (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html>) and the BOXSHADE program ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)). Structural alignments between the different proteins and its *At. ferrooxidans* homologs was done using the available structure and the Cn3D program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure>).

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. Proteomic analysis of *At. ferrooxidans*

Total protein from *At. ferrooxidans* from different growth conditions were separated by 2D NEPHGE. Figure 1A shows the gel protein pattern obtained for *At. ferrooxidans* ATCC 19859. The proteins were stained with Coomassie Blue and these gels were the

starting point to isolate proteins of interest that change their levels under different growth conditions (9-12). Although the sensitivity and resolution of this type of gels do not allow the separation of all the proteins from *At. ferrooxidans*, the method is sensitive enough to start the proteomic analysis of a number of gene products.

By employing this 2D PAGE procedure we have previously identified several proteins induced or repressed under a variety of conditions as indicated in Fig. 1A (9-12). Some of these proteins are the molecular chaperones DnaK (sp/P29133) and GroEL (sp/P29134) induced under heat shock, ethanol and pH changes (16, 18), the outer membrane protein Omp40 (bbs/120030; emb/CAA10107 and AJ012661) changing under phosphate starvation (10, 19) and rusticyanin (Ru), induced by the presence of ferrous iron and repressed by the presence of sulfur (20). The use of mass spectrometry to identify the proteins that are synthesized at very low levels will greatly help to expand the catalog of identified *At. ferrooxidans* proteins. As seen in Fig. 1 B and C, the inset window shows the change in the levels of synthesis of several proteins when the cells were subjected to phosphate starvation. Protein 16 synthesis increased due to the lack of phosphate, and was therefore isolated from the 2D gel and subjected to N-terminal amino acid sequencing, resulting in the sequence  $\text{APTISLLETGSTLLYPLFNLA V}_{22}$ .

Comparison of this amino acid sequence with the database showed that this protein

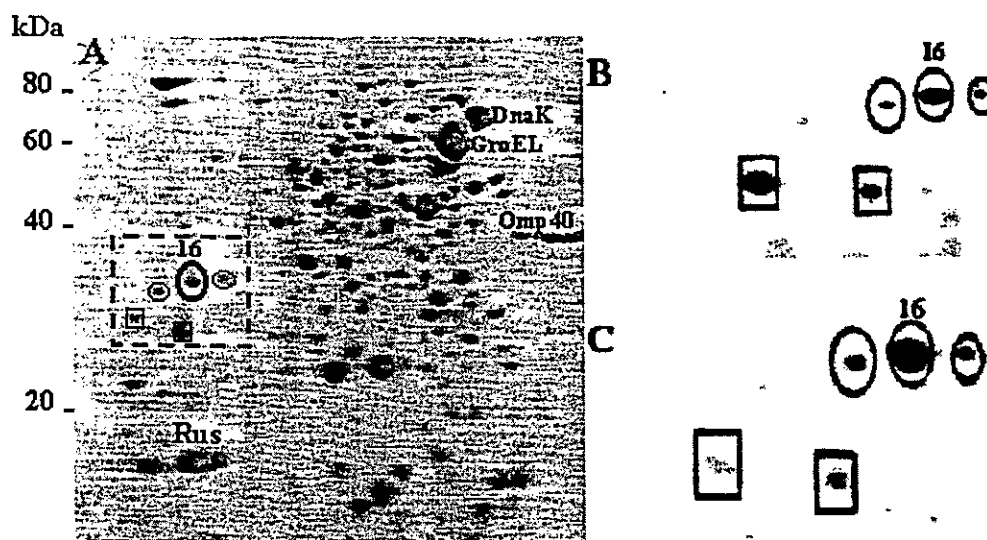


Figure 1. 2D NEPHGE of total proteins from *At. ferrooxidans*. (A) Total protein from *At. ferrooxidans* ATCC 19859 separated by 2D PAGE and stained with Coomassie Blue. The inset indicates a group of proteins of which spot 16 was further analyzed in cells grown in the presence of phosphate (B) and in phosphate-starved cells (C). Numbers to the left indicate molecular weight markers in kilodaltons.

was similar to PstS. This result was not surprising, since protein 16 was induced in the absence of phosphate, and PstS from *E. coli* is the high affinity phosphate binding protein, which is also induced under this condition, together with the other proteins of

the Pho regulon (7). This result strongly suggests that *At. ferrooxidans* may have a phosphate scavenging system similar to the one present in *E. coli* and other bacteria. In this regard, we have previously detected, changes in the outer membrane proteins of *At. ferrooxidans* when the cells were subjected to phosphate starvation (10, 12).

### 3.2. Location of the *pstS*-like sequence in the genome of *At. ferrooxidans*

To locate the putative *pstS* gene in *At. ferrooxidans*, we run a tBLASTx search against the *At. ferrooxidans* ATCC 23270 unfinished genome sequence database using the N-terminal amino acid sequence of the PstS protein obtained or the sequence of PstS from *E. coli*. We found two contigs in the genome from *At. ferrooxidans*, containing two blast hits with the *E. coli* PstS sequence: one with a score/E-value of 324/8e-90 and the other with 186/2e-48, suggesting the possible existence of two *pstS*-like genes in *At. ferrooxidans*. The second gene contained the N-terminal end sequence obtained from protein 16. With the current available information, we considered the gene with highest score the possible *pstS* homolog. Fig. 2 shows the entire amino acid sequence of the putative *At. ferrooxidans* PstS compared with that of *E. coli* PstS.

The *At. ferrooxidans* *pstS* gene showed a putative signal peptide, supporting the putative periplasmic location of the protein, as found for the *E. coli* PstS. The putative PstS amino acid sequence showed an identity of 50 percent and a similarity of 64 percent with the *E. coli* PstS protein.

### 3.3. Structural comparison of *At. ferrooxidans* PstS-like protein with *E. coli*

<i>E. c</i>	1	EASIFUGAGYVFPAPVYAKWADRMQKEFGNRVAVYQIGIGSSGCVKQIITANFV
<i>At. f</i>	1	-EAMISFAGGTAIYEPVLSKWAETTKORFGIMAVYQAIICSGGGIAQIKARV
<i>E. c</i>	51	DEASDAPFSDKLAQEGLEFQPPFVIGGVVLAVNIRGERSGELVLDGKYL
<i>At. f</i>	50	AEIINSDMPLQPEYLNKDOFVQEPAVLIGITPFVAVNIPGIRPGETTFNGAVL
<i>E. c</i>	101	GDVMEGKIKKWDDEATAKLNPGKRLPSONTAVVRRADGSGITSEVFISYLA
<i>At. f</i>	100	TCVMEGKIKKWDAAALADLNKGVHLRDMNITVVRSDGSGITSEVFISYLA
<i>E. c</i>	151	KVNEEWKQNVGTCSTVWRWPIGIGGGKGDGTAAEVQRTPGAIQYVEYAYAK
<i>At. f</i>	150	KVSPENKQRVGDNFAVSWPEVGGGGKGNAGVAAVQRTPGAIQYVEYAYAK
<i>E. c</i>	201	QNNFAYTKHISADGKPVSETEENFANAAGKADWS--KTFADLITNOKGED
<i>At. f</i>	200	ENEMAYGKMIHFAAGKVVADLATEQAAANADEKVEDFYVILITNQPQAQ
<i>E. c</i>	249	AWPLLSITVETLLEKDKKPEOGTEVHKFDWAYKTGAKQANDLDYASLFD
<i>At. f</i>	250	SWPLISAATVILLRQDAHKTVN-AGVILKEARWFLTAPQAQAEARGLDYVF-
<i>E. c</i>	299	SVVEQVRAAWKTNIKDSSGKPLY
<i>At. f</i>		-----

Figure 2. Amino acid sequence alignment between *E. coli* (*E. c*) PstS protein and its *At. ferrooxidans* (*At. f*) homolog. This alignment was done excluding the signal peptide necessary for the periplasmic export of these proteins. Black boxes, identity; gray boxes, similarity.

### PstS

The high degree of conservation between the *E. coli* and the putative *At. ferrooxidans* PstS, and the fact that a crystallographic structure for the *E. coli* PstS protein has been reported (14), prompted us to do a computational structural alignment between the two proteins. Fig 3 shows the results of this comparison.

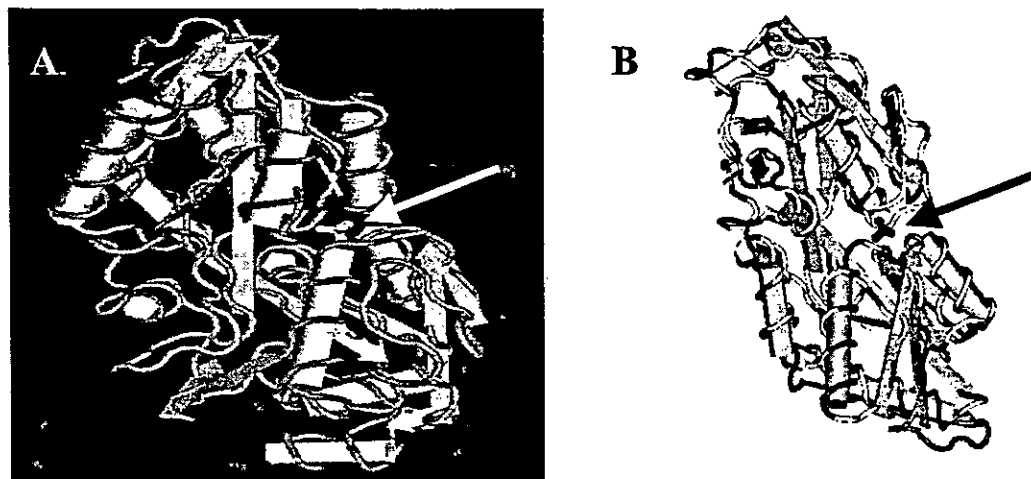


Figure 3. A, Structure of the PstS protein from *E. coli* showing the  $\alpha$ -helices and  $\beta$ -sheets. The arrow indicates the phosphate molecule bound to its binding site. B, structural alignment between *E. coli* PstS and the *At. ferrooxidans* homolog. Within the wire representation of the structure, the white fragments indicate identity and the dark gray regions show the similarity between the two proteins.

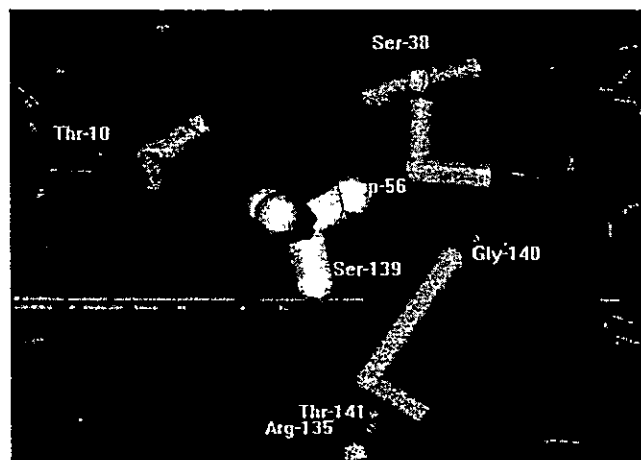


Figure 4. Structure of the phosphate binding site of PstS protein from *E. coli* (taken from ref. 14) aligned with the putative equivalent site in the PstS-like protein from *At. ferrooxidans*. The amino acid residues interacting directly with the phosphate molecule are indicated and are represented by gray tubes. The rest of the structure is shown as a wire for clarity. The phosphate molecule is seen bound to the binding site at the center of the figure.

There is a high degree of structural conservation between the two proteins, indicating that both may have the same function in binding phosphate and its structural analog arsenate.

The degree of structural similarity between the PstS from *E. coli* and that of the putative *At. ferrooxidans* PstS is more evident when the active site for the phosphate binding is compared. Seven of the eight residues necessary for the hydrogen bonding to the four oxygens of phosphate are conserved. These residues include Thr 10, Arg 135, Ser 139, Thr141, Ser 38, Gly 140 and Asp56, as shown in Fig. 4.

#### 3.4. *In silico* search of a putative pho regulon containing the pstS-like gene in the *At. ferrooxidans* genome

After locating part of the contig containing the *pstS*-like gene with a high degree of similarity to the *E. coli pstS*, we searched for the upstream and downstream sequences (see Materials and Methods). A tBLASTx search was run against the incomplete genome sequence of the *At. ferrooxidans* ATCC 23270. After running the program ORF Finder with an 8.2 Kb of the sequence, we identified eight ORFs that are summarized in Table 1. In general, the molecular sizes of all the proteins from *At. ferrooxidans* that had putative homologs in the Pho regulon from *E. coli* were very similar. The theoretical isoelectric points showed a greater variation, specially in the case of PhoR. Some of these differences may reflect adaptations of the proteins which are or have a region in the acidic periplasmic space of *At. ferrooxidans*.

Table 1. Some properties of the proteins present in the Pho regulon.

Proteins	Molecular Mass (kDa)		Theoretical Isoelectric Point		Identity (%)
	<i>At. ferrooxidans</i>	<i>E. coli</i>	<i>At. ferrooxidans</i>	<i>E. coli</i>	
PhoB	27.8	26.4	6.62	5.46	49
PhoR	49.7	49.6	5.44	9.63	37
PstS	36.2	37	9.41	8.39	50
PstC	36.6	34.1	7.03	5.89	55
PstA	30.5	32.3	10.43	9.94	55
PstB	32.2	29	5.81	6.13	69
PhoU	26.4	27.4	5.03	5.14	44
PPX	53.4	58.1	7.01	6.65	34

Fig. 5 shows that the eight ORFs present in this region of the *At. ferrooxidans* DNA seem to be organized in two operons. The first one is the one composed of *phoB-phoR*, and the second is *pstSCAB-phoU-ppx*. This last operon shows almost the same physical organization of the *E. coli* operon (*pstSCAB-phoU*), except for the presence of the *ppx* gene. In *E. coli*, the *ppx* gene is located downstream of the *ppk* gene, both forming a separate operon, whereas in *At. ferrooxidans* the *ppx* gene is located

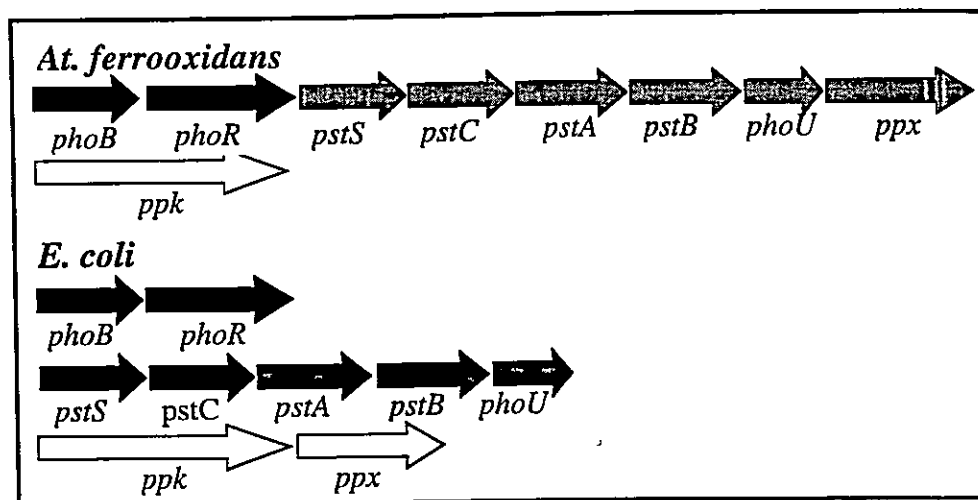


Figure 5. Possible genetic organization of the ORFs flanking the putative *At. ferrooxidans* *pstS* compared with that of *E. coli*. Arrows indicate the proposed direction and approximate extension of the putative ORFs.

downstream of the *phoU* gene. Compared with the genetic organization of the *pho* regulon in *E. coli*, they are very similar, except that the *phoB/phoR* pair is located contiguous to the other genes in *At. ferrooxidans*. It will be of great interest to study if the mechanism of regulation of the expression of these operons is similar in both kinds of bacteria.

#### 4. CONCLUSIONS

We have shown, using 2D-PAGE for protein separation and reverse genetics for gene determinations, that:

1. The putative phosphate and arsenate binding protein PstS present in *At. ferrooxidans* is highly conserved when compared with *E. coli* PstS both in sequence and structure.

2. *At. ferrooxidans* ATCC 23270 contains a putative *Pho* regulon similar to the one present in other bacteria. This is also likely to occur in strain ATCC 19859, since the genes from this strain that we have sequenced so far (not shown) have 98-99% identity compared with those of strain ATCC 23270.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

This research was supported by grants FONDECYT 1000-679, ICM P99-031-F and ICGEB (Proj. CRP/CHI00-04, contract 01/001).

## REFERENCES

1. D.E. Rawlings (ed.) *Biomining: theory, microbes and industrial process*. Springer-Verlag, Berlin, Germany (1997).
2. O. Tuovinen, In: *Microbial Mineral Recovery*, H.L. Ehrlich and C.L. Brierley (eds.), pp. 55 (1990), McGraw-Hill Book Co., New York.
3. D.G. Lundgren and M. Silver, *Annu. Rev. Microbiol.*, 34 (1980) 263.
4. A. Matin, *Mol. Microbiol.*, 5 (1991) 3.
5. J.V. Beck and F. M. Shafia, *J. Bacteriol.*, 88 (1964) 850.
6. B. Wanner. In: F. Neidharth (ed.) *Escherichia coli and Salmonella*, Cellular and Molecular Biology, 2<sup>nd</sup> ed, (1996), p 1357.
7. A. Torriani-Gorini, In: *Phosphate in Microorganisms*, (1994) ASM press, p 1.
8. K. Makino, M. Amemura, S. Kim, A. Nakata and H. Shingawa, In: *Phosphate in Microorganisms*, (1994) ASM press, p 5.
9. M. Seeger and C.A. Jerez, *FEMS Microbiol. Revs.*, 11 (1993) 37.
10. C.A. Jerez, M. Seeger and A.M. Amaro, *FEMS Microbiol. Lett.*, 98 (1992) 29.
11. M. Seeger, and C.A. Jerez, *Geomicrobiol. J.*, 10 (1992) 227.
12. P. Varela, G. Levican, F. Rivera and C.A. Jerez, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 (1998) 4990.
13. H. van Veen, *Antoine van Leuvenhock*, 72 (1997) 299.
14. H. Luecke and F. Quioco, *Nature*, 347 (1990) 402.
15. D.H. Nies and S. Silver, *J. Ind. Microbiol.*, 14 (1995) 186.
16. A.M. Amaro, D. Chamorro, M. Seeger, R. Arredondo, I. Peirano and C.A. Jerez, *J. Bacteriol.*, 173 (1991) 910.
17. P.Z. O' Farrell, H.M. Goodman and P.H. O' Farrell, *Cell*, 12 (1977) 1133.
18. P. Varela and C.A. Jerez, *FEMS Microbiol. Lett.*, 98 (1992) 149.
19. N. Guilianani and C.A. Jerez, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (2000) 2318.
20. G. Osorio, P. Varela, R. Arredondo, M. Seeger, A.M. Amaro, and C.A. Jerez, In: *Biohydrometallurgical Technologies*, Vol II, A.E Torma, M. L. Apel, and C.L. Brierley, eds., The Minerals, Metals & Materials Society, TMS, Warrendale, PA, USA, p 565.

## Polyphosphates, polyphosphate kinase activity and *ppk* gene in the extremophilic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 19859

S. Alvarez, M. Vera, C. A. Jerez and N. Guiliani

Laboratory of Molecular Microbiology and Biotechnology, Department of Biology, The Millennium Institute for Advanced Studies in Cell Biology and Biotechnology, University of Chile, Santiago, Chile. [cjerez@uchile.cl](mailto:cjerez@uchile.cl).

*Acidithiobacillus ferrooxidans* (former *Thiobacillus ferrooxidans*) is one of the main acidophilic chemolithotrophic bacteria involved in the bioleaching of metal sulfide ores. The biomining process is subject to varying environmental conditions, which induce changes in the bacterial physiological state and, consequently, in the bioprocess efficiency. Therefore, understanding the molecular mechanisms that *At. ferrooxidans* uses to respond and adapt to its environment is of a special interest. Recently, inorganic polyphosphate (polyP) has been implicated in the bacterial response to environmental changes and stress adaptation. PolyP is a linear polymer of many tens or hundreds of orthophosphate residues linked by phosphoanhydride bonds through the action of a polyphosphate kinase enzyme (PPK). There is a wide spread of polyP in various microorganisms and, frequently, it forms cytoplasmic granules in bacteria.

We have initiated the study of polyP metabolism in *At. ferrooxidans*. When cells were analyzed by transmission electron microscopy, we observed the presence of abundant polyP granules in the cytoplasm. We searched for an *in vitro* PPK activity by following the conversion of  $\gamma$ [<sup>33</sup>P]ATP into polyP. We found a PPK activity associated with the membrane protein fraction. The *ppk* gene was studied by reverse genetics. Based on the known PPK amino acid sequences and the available incomplete genomic sequence of *At. ferrooxidans* ATCC 23270 strain, we designed degenerate primers which were employed successfully for the isolation of the *ppk* gene by means of CODEHOP-PCR.

### 1. INTRODUCTION

*Acidithiobacillus ferrooxidans* is a chemolithoautotrophic acidophilic bacterium with great industrial importance due to its applications in biomining (1). The microorganisms are normally subjected to stressing conditions in their environment, which affects their physiological state such as temperature and pH changes and nutrient starvation, (2).

By employing two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE), we



have previously studied the response of *At. ferrooxidans* to the lack of Pi (3, 4) and the results obtained suggested that this microorganism may have a phosphate starvation response system similar to the Pho regulon of *Escherichia coli*.

This regulon is formed by a group of genes whose expression is induced by the absence of phosphate (Pi). The proteins induced allow the cell to scavenge traces of phosphate from the medium (5, 6). Part of this system is the storage of Pi as inorganic polyphosphate (polyP).

PolyP is a linear polymer of hundreds of orthophosphate residues linked by phosphoanhydride bonds. It is an ubiquitous molecule, having been found in all organisms examined. Several physiological functions have been attributed to polyP in addition of being a reservoir of phosphate: substitute for ATP, chelator of metals and stress response in the cell (7). The main enzyme involved in the biosynthesis of polyP is the polyphosphate kinase (PPK) that catalyzes the reversible conversion of the terminal phosphate of ATP into polyP. This enzyme has been purified from *E. coli* and its gene has been identified in several bacteria. These genes show a relatively high degree of sequence conservation (7).

In the present report, we present some conclusive evidence of the presence of polyP in *At. ferrooxidans*. These results were supported by the isolation and cloning of the *At. ferrooxidans ppk* gene and its overexpression in *E. coli*.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. Bacterial strains, growth conditions and cloning vectors

We used the *At. ferrooxidans* strains ATCC 19859 and ATCC 23270. Growth in ferrous iron was done at 30°C in modified 9K medium as described before (8). The *E. coli* strains (CF5802 *ppk ppx*, NR100, JM109, BL21(DE3)) were grown in Luria-Bertani (LB) medium (9) at 37°C.

We used the pGEM-T (Promega®) and pET22b (Novagen®) vectors to clone the different amplified DNA fragments and the *ppk* gene, respectively.

### 2.2. Electron microscopy

Cultures of *At. ferrooxidans* were collected and the cells were washed three times with dilute sulfuric acid (pH 1.5). Twenty microliters of cells suspended in this solution ( $OD_{600} = 0.25$ ) were placed on Formvar coated grids for 2 min. The excess of liquid was removed with a filter paper and the grids were air dried (10). For analysis, a transmission electron microscope (Philips Tencai 12) at 80 kV was used.

### 2.3. PPK activity

PPK activity was determined in *At. ferrooxidans* cellular fractions as described by Ahn and Kornberg (11). A 250  $\mu$ l reaction mixture containing 50mM HEPES-KOH pH 7, 2 mM  $MgCl_2$ , and 1 mM [ $\gamma^{33}P$ ]-ATP (2,000 cpm/nmol), was incubated for 1 h at 37°C. [ $\gamma^{33}P$ ]-polyP synthesized was counted by liquid scintillation spectrometry after collection on Whatman GF/C glass fiber filters. One unit of enzyme was defined as the amount incorporating 1 pmol of phosphate into polyP per min at 37°C.

### 2.4. DNA manipulations

Standard procedures to manipulate *At. ferrooxidans* DNA were as described before

in our laboratory (8).

### 2.5. Primers and CODEHOP-PCR conditions

The oligonucleotide primers were purchased from Genset Corporation<sup>®</sup>. *Taq* (Promega<sup>®</sup>) and *Pwo* (Roche<sup>®</sup>) polymerases were used according to the manufacturer's recommendations. For the "consensus degenerate hybrid oligonucleotide primers-PCR" (CODEHOP-PCR) (12), two primers (PK12CH 5'-TCCAGGTTGCGGTGCATCMWRTCNGC-3' and PPK11CH 5'-GGAAGTGAAGGCCCGCTTYGAYGARSA-3') were defined from two BLOCKS of five PPK protein sequences isolated with the Block Maker program ([http://blocks.fhcrc.org/blocks/blockmkr/make\\_blocks.html](http://blocks.fhcrc.org/blocks/blockmkr/make_blocks.html)) (data not shown). The CODEHOP-PCR conditions were as follows: 3 min at 95°C, followed by 30 cycles at 95°C for 30s, 60°C for 30s, 72°C for 1 min 15 s, and then 3 min at 72°C.

### 2.6. Western immunoblotting

The total cell proteins separated by SDS-PAGE were electroblotted onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) Immobilon P (Millipore<sup>®</sup>) membrane as described by Towbin (13), by employing the Trans-Blot Cell System (BioRad<sup>®</sup>). For the antigen-antibody reaction, the membrane was treated with a serum against the *E. coli* PPK protein, as the primary antibody (1:1,000 dilution), and monoclonal anti-rabbit antibodies conjugated with peroxidase (Amersham<sup>®</sup>) as the secondary antibody (1:1,000 dilution).

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. PolyP Characterization

*At. ferrooxidans* cells grown in the standard medium containing phosphate were analysed by electron microscopy in a transmission mode as shown in Fig. 1. The presence of several spherical electron dense bodies was evident in a large number

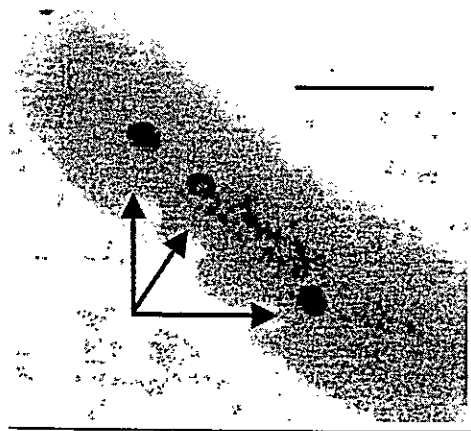


Figure 1. Electron micrograph of an unstained preparation of *A. ferrooxidans* cell. The arrow indicates the high electron dense polyP granules. Bar, 0.5  $\mu$ m.

of the cells.

These granules have been classically described as polyP accumulations (14). We have confirmed that the chemical nature of the granules corresponds to polyP by using the EDX procedure (manuscript in preparation). We therefore conclude that *At. ferrooxidans*, like many other prokaryotes including Bacteria (10, 15) and Archaea (Cardona et al., this volume) is able to synthesize and accumulate polyP.

### 3.2. Determination of PPK activity and immunological reaction with *E. coli* PPK antiserum

We searched for PPK activity in cell extracts of *At. ferrooxidans* in stationary phase. We detected a PPK activity associated with the cell membrane fraction. This activity was affected by the phosphate availability during growth, being greater when cells were grown in the presence of phosphate with a maximum at 0.18 mM phosphate (Fig. 2A). These results indicate that *At. ferrooxidans* contains a PPK-like activity.

The degree of conservation observed in a multiple alignment of PPK amino acid sequences from several microorganisms (data not shown) suggested the possibility of an immunological cross-reaction of the *At. ferrooxidans* PPK-like protein with an heterologous antiserum against a bacterial PPK. The total proteins from *At. ferrooxidans* were analysed by western blotting using an antiserum against *E. coli* PPK protein as shown in Fig. 2B. The antiserum gave a strong reaction with *E. coli* PPK (band of approximately 70 kDa in lane 3) and a weaker reaction with a protein band of 70 kDa in the *At. ferrooxidans* sample (lane 1). It also gave strong non-specific cross-reaction(s) against *E. coli* small polypeptide(s) (lanes 2 and 3) which have not been analysed. These results also suggest the presence of a PPK-like protein in *At. ferrooxidans*. To confirm the existence of a PPK-like protein, we isolated the

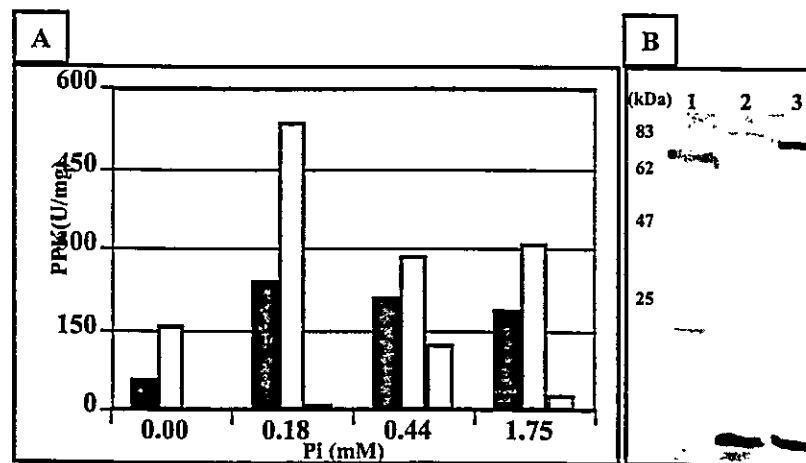


Figure 2. PPK Activity and immunological reaction of *At. ferrooxidans* cell extracts. A, The PPK activity was measured in total (■), membrane (▣) and soluble (□) fraction proteins from *At. ferrooxidans* grown under the phosphate concentration indicated. B, The total proteins from *At. ferrooxidans* (1), *E. coli* CF5802 *ppk ppx* (2) and *E. coli* NR100 (3) were separated by SDS-PAGE followed by western blotting with an antiserum against *E. coli* PPK. The putative *At. ferrooxidans* PPK-like protein is indicated by a filled dot.

corresponding *ppk* gene by reverse genetics.

### 3.3 Isolation of the *At. ferrooxidans* *ppk* gene

The first strategy that we used to isolate the *At. ferrooxidans* *ppk* gene was DOP-PCR which allowed us to amplify a DNA fragment that was cloned and sequenced. Its sequence was analysed by BlastX program against the database sequences. However, this DNA fragment revealed no similarity with the known *ppk* genes but presented a significant similarity with an ABC transport system from *Bordetella pertussis* (data not shown).

As a second strategy, more specific to isolate distantly-related sequences, we used the CODEHOP-PCR technique that overcomes the problems of both degenerate and consensus methods for primer design (13).

The consensus degenerate oligonucleotide primers (see Materials and Methods) allowed us to amplify a 644 bp DNA fragment which was cloned and sequenced. The BlastN and BlastX sequence analysis programs revealed a nucleotide sequence with 44.2% of identity with the *E. coli* *ppk* gene and codifying for an amino acid sequence with 50% of similarity with an internal region of the PPK protein from *E. coli* (Fig. 3).

At 19859	1	NNERMAERIEEVGVQVAVGVVNEKRVHAKMILILRIEDGRLVGHIGTGN
Pa 8830	1	-NIQLASRIQQAGAVVILGVVGERTHAKRMILIRIEDGEARRVAHIGTGN
Ec 10798	1	-NIHWAKRIITEAGVHVILSAPGLRIHAKRFLISRIENGEVVRVAHIGTGN
At 19859	51	VHPRNARRYWDLSEITADNPDIITADINDIEMETGMCNAPQLRCLIQSEFT
Pa 8830	50	VHAGNARIYWDYSEITADVAICEDPHKHSNQLIGMGTILRMKRLHAPFT
Ec 10798	50	ENEKTAARIYWDYSEITADARITNEVRRVSNFLENPVRPVTFFDYLLVSPQN
At 19859	101	MFQGHQEAIDTEIRHGSKGR---ITVRYNAFVEPDILRALYRASQAGVEH
Pa 8830	100	LKKNIILEMONREAAQAALGQPAHIMAKVNSLADPKVIRALYKASQAGVRE
Ec 10798	100	SRRLDYEMVDREIANAQQGLPSGITLKIINLVKGLVDRLYAASSGVPV
At 19859	148	DLVVRGACALRPGTIPGVSDHILRVRSTVGRHHESRYVYEGNMGHPRLWISS
Pa 8830	150	DLVVRGMCCLRPGTIPGVSHNLEVRSTVGRHHESRYVYELNGGDEKRYLSS
Ec 10798	150	DLVVRGMCSLIENLEGLSDNIRALSIYDRMLLESDRVYIENGGDKKRYLSS

Figure 3. Multiple alignment of an internal region from different sequences of PPK proteins. The analysis was done with the ClustalW (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu:9331/multi-align/multi-align.html>) and Boxshade ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)) programs. *At*, *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 19859; *Pa*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 8830; *Ec*, *E. coli* ATCC 10798 (K-12). Black boxes, 100% Identity. Gray boxes, 75% identity or 100% similarity.

We used this coding DNA fragment from *At. ferrooxidans* labeled with digoxigenin as a probe in a Southern experiment to compare the macro-physical organization of two *At. ferrooxidans* strains: ATCC 19859 and ATCC 23270. According to the restriction enzymes that we used, both strains possessed only one copy of *ppk* gene and the same organization in the *ppk* gene region (Fig. 4). In addition, the nucleotide

sequence of the *ppk* gene fragment from ATCC 19859 is quite similar to that of ATCC 23270 (more than 99.9% identity). After we determined the carboxyl-end coding region of the *ppk* gene by inverse-PCR, we used the available ATCC 23270 genome

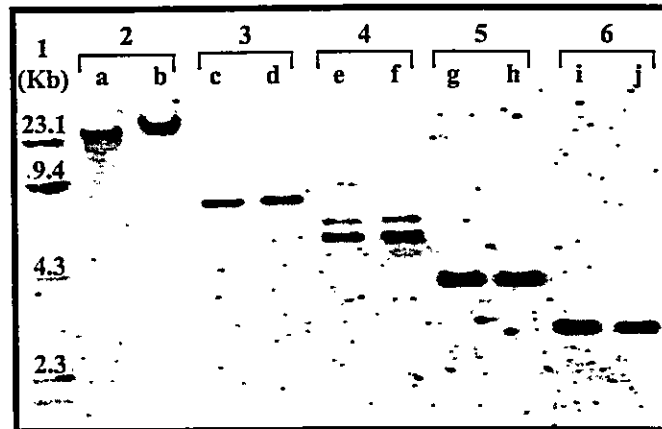


Figure 4. Macro-physical analysis of the *At. ferrooxidans ppk* gene region. The genomic DNA from *At. ferrooxidans* ATCC 19859 (a, c, e, g, i) and ATCC 23270 (b, d, f, h, j) strains were digested with different restriction enzymes (3, *Nru*I; 4, *Nco*I; 5, *Sma*I; 6, *Pst*I) or non-digested (2). 1, DNA markers *λ*/*Hind*III labelled with digoxigenin (Roche®).

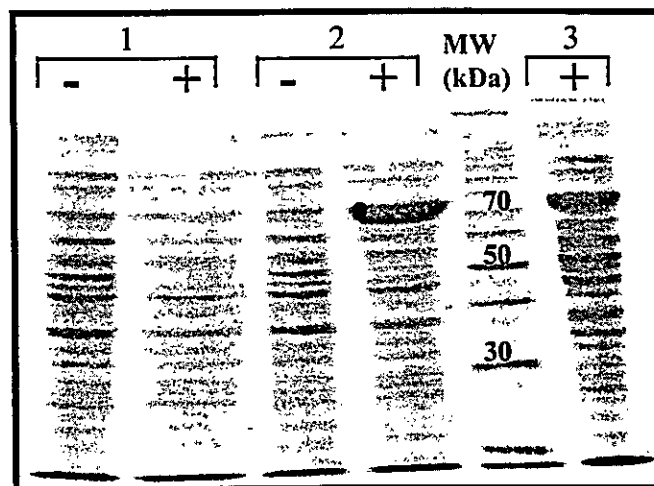


Figure 5. Expression of the *ppk* gene from *At. ferrooxidans* in *E. coli*. The *E. coli* BL21(DE3) cells transformed by pET22b without insert (1) or with the *ppk* gene (2) and the *E. coli* NR100 cells (3) were grown for 2 h in the presence (+) or in the absence (-) of 1 mM IPTG. The total cell proteins were separated by SDS-PAGE and stained with Coomassie Blue. The filled dot indicates the overexpressed PPK-like protein from *At. ferrooxidans*.

sequence to amplify and clone the entire *ppk* gene from ATCC 19859.

#### 3.4 Cloning and expression of the *ppk* gene from *A. ferrooxidans* in *E. coli*

The PPKNH2*MscI* and PPKCOOH*XhoI* oligonucleotide primers allowed us to amplify and clone the entire *ppk* gene from ATCC 19859 in frame with the *pelB* peptide leader and the His-Tag sequences of the pET22b expression vector (Novagen®).

The recombinant plasmid was transformed into *E. coli* BL21(DE3) strain in which the T7 RNA polymerase gene is under an IPTG-inducible lacUV5 promoter. Upon IPTG induction, one band with the expected size for PPK was overproduced (Fig. 5).

Further studies such as measurement of PPK activity and N-terminal end sequencing of the recombinant protein are in progress to confirm the identity of the overexpressed polypeptide and its localization in *E. coli* cells (soluble or membrane bound).

#### 4. CONCLUSION

We have isolated by CODEHOP-PCR a gene which encodes for a predicted polypeptide of 79 kDa. This polypeptide has a high degree of similarity with known PPK proteins.

Interestingly, the analysis of the *At. ferrooxidans* chromosomal *ppk* gene region and the identification of a putative Pho regulon by genomic analysis (Vera et al., this volume) revealed no genetic linkage between both regions. Moreover, it is puzzling why the *ppx* gene belongs to this putative Pho regulon while the *ppk* gene does not.

Obviously, further studies will be necessary to understand the polyP metabolism and its genetic regulation in this acidophilic microorganism.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Prof. A. Kornberg who kindly provided us with the *E. coli* strains (CF5802 *ppk ppx*, NR100) and the serum against *E. coli* PPK.

This research was supported by grants FONDECYT 1000-679, ICGEB (Proj.CRP/CHI00-04, contract 01/001) and ICM P99-031-F.

#### REFERENCES

1. D. E. Rawlings (eds.) Biomining: theory, microbes and industrial process. Springer-Verlag, Berlin, Germany (1997).
2. A. M. Amaro, D. Chamarro, M. Seeger, R. Arredondo, I. Peirano and C. A. Jerez, J. Bacteriol., 173 (1991) 910.
3. M. Seeger, C. A. Jerez and A. M. Amaro, FEMS Microbiol. Lett., 98 (1992) 29.
4. M. Seeger and C. A. Jerez, J. Geomicrobiol., 10 (1992) 227.
5. K. Makino, H. Shinagawa and A. Nakata, J. Biol. Chem., 184 (1985) 231.

6. N. N. Rao and A. Torriani, *Mol. Microbiol.*, 4 (1990) 1083.
7. A. Kornberg, N. N. Rao and D. Ault-Riché, *Annu. Rev. Biochem.*, 68 (1999) 89.
8. N. Guiliani and C. A. Jerez, *Appl. Environ. Microbiol.*, 66 (2000) 2318.
9. J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis (eds.), *Molecular cloning; a laboratory manual*, Cold Spring Harbor, N. Y. (1989).
10. H. Gonzalez and T. E. Jensen, *Microbios*, 93 (1998) 179.
11. K. Ahn and A. Kornberg *J. Biol. Chem.*, 265 (1990) 1734.
12. T. M. Rose, E. R. Schultz, J. G. Henikoff, S. Pietrokovski, C. M. McCallum and S. Henikoff, *Nucleic Acid Res.*, 20 (1998) 1628.
13. H. Towbin, T. Staehelin and J. Gordon, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 76 (1979) 4350.
14. H. G. Wood and J. E. Clark, *A. Rev. Biochem.*, 57 (1988), 235.
15. N. Ogawa, C.-M. Tzeng, C. D. Fraley and A. Kornberg, *J. Bacteriol.*, 182 (2000) 6687.