

UCH-FC  
DOC-B  
D235  
C.1

**CLONAMIENTO, SECUENCIACIÓN Y EXPRESIÓN DE *lerI*,  
GEN DE *Leptospirillum ferrooxidans* CODIFICANTE PARA UNA PROTEÍNA  
TIPO RECEPTOR QUIMIOTÁCTICO**

Tesis

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al grado de

Doctor en Ciencias con mención en Biología

Facultad de Ciencias

por

**Mónica Andrea Delgado Vargas**

Julio, 1997



Director de Tesis: Dr. Carlos A. Jerez.

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE DOCTORADO

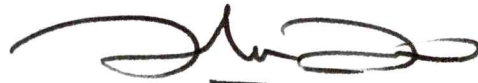
Se informa a la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Doctorado presentada por el candidato

**Mónica Andrea Delgado Vargas**

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Biología, en el exámen de Defensa de Tesis rendido el día 24, de Abril de 1997.

Director de Tesis:

Dr. Carlos Jerez G.



Codirector de Tesis:

Dr. Héctor Toledo A.



Comisión de Evaluación de la Tesis:

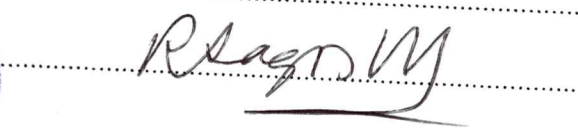
Dr. Davor Cotorás.



Dr. Romilio Espejo.

Dr. David Holmes.

Dra. Rosalba Lagos.



A quienes amo



## AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mis sinceros agradecimientos a todas las personas que de una u otra forma colaboraron conmigo en la realización de esta tesis.

Agradezco al Dr. Carlos Jerez por su guía, su apoyo y espíritu crítico.

A Héctor Toledo por su ayuda, su entrega intelectual y su amistad sincera.

A mi amigo José Rojas Z. por su trabajo y valiosa ayuda en el inicio de mi tesis.

A mis amigos Alberto García y Gloria Levicán, por su constante estímulo y por su valiosa amistad. A mis compañeros de laboratorio Ana María, Nicolás, Gonzalo, Michael y Patricia, por su colaboración y apoyo. A Juan Araos por preocuparse pacientemente de mantener el material del laboratorio y a Luisa López por su asistencia técnica.

Agradezco también a Víctor Pulgar, Patricio Rojas, Oriana Salazar y Osmán Vásquez, ya que siempre estuvieron dispuestos a ayudarme en diversas formas.

A José Mondaca por su paciencia y dedicación en la confección de los dibujos de esta tesis y a Héctor Muñoz por la obtención de las fotografías que aquí se presentan.

Agradezco al Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico, que con los proyectos 2950024 y 4950008 ayudó a financiar esta tesis.

Yo soy lo que es el profundo deseo que me impulsa  
Tal como es mi deseo es mi voluntad  
Tal como es mi voluntad son mis actos  
Tal como son mis actos es mi destino.

## ÍNDICE DE MATERIAS

ÍNDICE DE MATERIAS.....	v
LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE TABLAS.....	xv
LISTA DE ANEXOS.....	xvii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xviii
RESUMEN.....	xx
ABSTRACT.....	xxiii
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	
1.1. QUIMIOTAXIS.....	1
1.2. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES QUIMIOTÁCTICAS.....	3
1.3. RECEPTORES QUIMIOTÁCTICOS.....	8
1.4. BIOLIXIVIACIÓN DE MINERALES.....	17
1.5. QUIMIOTAXIS EN <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> .....	19

## **2. MATERIALES**

### **2.1. MATERIAL BIOLÓGICO**

#### **2.1.1. Cepas Bacterianas**

2.1.1.1. *Escherichia coli*.....21

2.1.1.2. *Leptospirillum ferrooxidans*.....22

2.1.2. Plasmidios.....22

2.2. MATERIAL NO BIOLÓGICO.....23

## **3. MÉTODOS**

### **3.1. MEDIOS DE CULTIVO**

3.1.1. Medio LB.....27

3.1.2. Medio Líquido Mackintosh Modificado.....27

3.1.3. Medio S30.....28

3.1.4. Medio Triptona.....28

### **3.2. SOLUCIONES**

3.2.1. Solución TE.....29

3.2.2. Solución I.....29

3.2.3. Solución II.....29

3.2.4. Solución III.....29

3.2.5. Solución de Muestra para DNA 6x.....29

3.2.6. Solución Desnaturalizante.....29

<b>3.2.7. Solución Neutralizante.....</b>	<b>29</b>
<b>3.2.8. Solución SSC 10x.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.9. Solución de Muestra para Proteínas 2x.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.10. Solución de Tinción.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.11. Solución de Desteñido.....</b>	<b>30</b>
<b>3.2.12. Solución Reveladora.....</b>	<b>30</b>

### **3.3. TAMPONES**

<b>3.3.1. Tampón TBE 0,5x.....</b>	<b>30</b>
<b>3.3.2. Tampón de Hibridación.....</b>	<b>31</b>
<b>3.3.3. Tampón 1.....</b>	<b>31</b>
<b>3.3.4. Tampón 2.....</b>	<b>31</b>
<b>3.3.5. Tampón de Competencia.....</b>	<b>31</b>
<b>3.3.6. Tampón de Electroforesis.....</b>	<b>31</b>
<b>3.3.7. Tampón de Transferencia.....</b>	<b>31</b>
<b>3.3.8. Tampón TBS.....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.9. Tampón A.....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.10. Tampón B.....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.11. Tampón C.....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.12. Tampón S30.....</b>	<b>32</b>
<b>3.3.13. Tampón de Inmunoprecipitación 4x.....</b>	<b>33</b>



<b>3.4. MEZCLAS</b>	
3.4.1. Mezcla de Preincubación.....	33
3.4.2. Mezcla A de Aminoácidos.....	33
3.4.3. Mezcla LM.....	33
3.4.4. Mezcla B de Aminoácidos.....	34
<b>3.5. CRECIMIENTO DE BACTERIAS</b>	
3.5.1. <i>Escherichia coli</i> .....	34
3.5.2. <i>Leptospirillum ferrooxidans</i> .....	35
<b>3.6. CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS.....</b>	<b>35</b>
<b>3.7. ENSAYO DE QUIMIOTAXIS.....</b>	<b>35</b>
<b>3.8. PREPARACIÓN DE DNA CROMOSOMAL.....</b>	<b>36</b>
<b>3.9. ESTIMACIÓN DE LA CANTIDAD DE DNA.....</b>	<b>38</b>
<b>3.10. PREPARACIÓN DE DNA PLASMIDIAL</b>	
3.10.1. Preparación en Pequeña Escala.....	38
3.10.2. Preparación en Gran Escala.....	39
<b>3.11. PURIFICACIÓN DE DNA PLASMIDIAL POR GRADIENTE</b>	
<b>DE CLORURO DE CESIO.....</b>	<b>40</b>
<b>3.12. DIGESTIÓN DE DNA CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN.....</b>	<b>42</b>
<b>3.13. ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA.....</b>	<b>42</b>
<b>3.14. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE</b>	
<b>DNA DESDE GELES DE AGAROSA.....</b>	<b>43</b>

<b>3.15. AMPLIFICACIÓN DE DNA POR LA REACCIÓN DE LA POLIMERASA EN CADENA.....</b>	<b>44</b>
<b>3.16. MARCACIÓN DE SONDAS CON DIGOXIGENINA UTILIZANDO PCR.....</b>	<b>45</b>
<b>3.17. HIBRIDACIÓN DEL TIPO "SOUTHERN-BLOT"</b>	
<b>3.17.1. Transferencia de DNA desde Geles de Agarosa hacia     Membranas de Nylon.....</b>	<b>46</b>
<b>3.17.2. Hibridación de DNA.....</b>	<b>47</b>
<b>3.17.3. Detección Inmunológica de DNA.....</b>	<b>48</b>
<b>3.18. CLONAMIENTO DE FRAGMENTOS DE DNA</b>	
<b>3.18.1. Digestión y Desfosforilación del Vector.....</b>	<b>49</b>
<b>3.18.2. Ligación del Vector con el Fragmento de DNA a Clonar.....</b>	<b>50</b>
<b>3.18.3. Preparación de Células Competentes.....</b>	<b>51</b>
<b>3.18.4. Transformación de Células Competentes.....</b>	<b>51</b>
<b>3.19. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS.....</b>	<b>52</b>
<b>3.20. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA Tar.....</b>	<b>53</b>
<b>3.21. ANÁLISIS INMUNOLÓGICO DEL TIPO "WESTERN-BLOT"</b>	
<b>3.21.1. Transferencia de Proteínas desde Geles de     Poliacrilamida-SDS hacia Membranas de Nitrocelulosa.....</b>	<b>54</b>

3.21.2. Detección Inmunológica de Proteínas.....	55
3.22. PREPARACIÓN DE MEMBRANAS TOTALES DE <i>E. coli</i> .....	56
3.23. PREPARACIÓN DE MEMBRANA CITOPASMÁTICA DE <i>E. coli</i> .....	57
3.24. EXPRESIÓN <i>in vitro</i> DE UN DNA Y SÍNTESIS DE LAS PROTEÍNAS CODIFICADAS.....	58
3.24.1. Preparación de un Extracto S30.....	58
3.24.2. Ensayo <i>in vitro</i> de Transcripción y Traducción Acopladas.....	60
3.25. INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS SINTETIZADAS <i>in vitro</i> .....	61
3.26. SECUENCIACIÓN DE DNA	
3.26.1. Desnaturalización del DNA.....	62
3.26.2. Reacción de Secuenciación.....	62
3.26.3. Electroforesis en Geles de Secuenciación.....	63
3.27. ANÁLISIS COMPUTACIONAL.....	64

#### 4. RESULTADOS

4.1. SUBCLONAMIENTO DE UN FRAGMENTO DE DNA DE <i>L. ferrooxidans</i> QUE ES HOMÓLOGO AL GEN <i>tar</i> DE <i>E. coli</i> .....	66
4.2. ENSAYO DE EXPRESIÓN <i>in vitro</i> DESDE UN DNA PLASMIDIAL	
4.2.1. Expresión <i>in vitro</i> de pNT201.....	67

4.2.2. Optimización del Ensayo de Expresión <i>in vitro</i> .....	69
4.3. EXPRESIÓN <i>in vitro</i> DE pLf13.....	74
4.4. REACTIVIDAD DE LAS PROTEÍNAS DE <i>L. ferrooxidans</i> SINTETIZADAS <i>in vitro</i> CON ANTICUERPOS ANTI Tar DE <i>E. coli</i> .....	77
4.5. EXPRESIÓN <i>in vivo</i> DE pLf13.....	80
4.6. SECUENCIACIÓN DEL FRAGMENTO DE DNA DE <i>L. ferrooxidans</i> CONTENIDO EN pLf13.....	85
4.7. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LA PROTEÍNA LcrI.....	93
4.8. COMPARACIÓN DE REGIONES HCD DE LcrI Y DE OTRAS MCPs.....	98
4.9. FRECUENCIA DE USO DE CODONES Y CONTENIDO G + C DEL DNA DE <i>L. ferrooxidans</i> .....	101
4.10. ENSAYO DE COMPLEMENTACIÓN DE QUIMIOTAXIS CON LcrI DE UNA CEPA DE <i>E. coli</i> QUE CARECE DE RECEPTORES QUIMIOTÁCTICOS.....	103
5. DISCUSIÓN.....	106
6. CONCLUSIONES.....	130
7. BIBLIOGRAFÍA.....	131

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Sistema de transducción de señales que media la quimiotaxis en <i>E. coli</i> .....	4
<b>Figura 2:</b>	Características estructurales de las moléculas MCPs.....	10
<b>Figura 3:</b>	Modelo de la estructura de homodímero del receptor Tar.....	13
<b>Figura 4:</b>	Construcción del plasmidio recombinante pLf13.....	68
<b>Figura 5:</b>	Expresión del plasmidio pNT201 en un sistema <i>in vitro</i> de transcripción/traducción acopladas.....	70
<b>Figura 6:</b>	Síntesis de Tar en función de cantidades crecientes de extracto S30 en el ensayo <i>in vitro</i> de transcripción/traducción acopladas.....	72

<b>Figura 7:</b>	Síntesis de Tar en función de cantidades crecientes de DNA templado en el ensayo <i>in vitro</i> de transcripción/traducción acopladas.....	73
<b>Figura 8:</b>	Expresión <i>in vitro</i> de plasmidios recombinantes que contienen DNA de <i>L. ferrooxidans</i> .....	75
<b>Figura 9:</b>	Inmunoprecipitación de las proteínas de <i>L. ferrooxidans</i> sintetizadas <i>in vitro</i> con anticuerpos contra Tar de <i>E. coli</i> .....	78
<b>Figura 10:</b>	Expresión <i>in vivo</i> de plasmidios recombinantes en <i>E. coli</i> .....	81
<b>Figura 11:</b>	Presencia de proteínas codificadas por pLf13 en membrana citoplasmática de <i>E. coli</i> .....	84
<b>Figura 12:</b>	Secuencia nucleotídica del inserto de 2.262 pb contenido en pLf13.....	87
<b>Figura 13:</b>	Perfil de hidrofiliidad de la proteína LcrI.....	94
<b>Figura 14:</b>	Alineamiento de las secuencias aminoacídicas de las proteínas LcrI y Tar.....	97

<b>Figura 15:</b>	Alineamiento de la región HCD de varias MCPs con la región homóloga de LcrI.....	100
<b>Figura 16:</b>	Quimiotaxis en placas de agar blando.....	105
<b>Figura 17:</b>	Perfiles de hidrofiliidad de varias MCPs y LcrI.....	115
<b>Figura 18:</b>	Comparación de las secuencias consensos de metilación con los posibles sitios de metilación de LcrI.....	123

## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b>	Porcentajes de identidades y similitudes entre LcrI y otras MCPs.....	96
<b>Tabla 2:</b>	Posibles dominios de LcrI y su comparación con los dominios de Tar.....	99
<b>Tabla 3:</b>	Frecuencia de uso de codones de <i>lcrI</i> .....	102
<b>Tabla 4:</b>	Promotores tipo sigma 70.....	107
<b>Tabla 5:</b>	Promotores tipo sigma 28.....	110
<b>Tabla 6:</b>	Punto isoelectrico de varias MCPs y de sus dominios periplasmáticos y citoplasmáticos.....	118



<b>Tabla 7:</b>	Porcentajes de identidades y similitudes entre el propuesto	
	dominio periplasmático de LcrI y el dominio periplasmático de	
	otras MCPs.....	120

## LISTA DE ANEXOS

- Anexo I:** Análisis de la secuencia de un fragmento de 2.262 pb de DNA  
de *L. ferrooxidans* mediante el programa BLAST.....143
- Anexo II:** Análisis de la secuencia de un fragmento de 2.262 pb de DNA  
de *L. ferrooxidans* mediante el programa FASTA.....162
- Anexo III:** Análisis de la secuencia de 577 aminoácidos de la proteína LcrI  
de *L. ferrooxidans* mediante el programa BEAUTY.....172

## LISTA DE ABREVIATURAS

3',5'-cAMP:	adenosina monofosfato cíclico.
ATP:	adenosina trifosfato.
BA:	albúmina de bovino.
CCW:	"counter clock wise" (sentido antihorario).
CIAP:	fosfatasa alcalina de intestino de ternero.
CTP:	citidina trifosfato.
CW:	"clock wise" (sentido horario).
dATP:	desoxiadenosina trifosfato.
dCTP:	desoxicitidina trifosfato.
ddATP:	didesoxiadenosina trifosfato.
ddCTP:	didesoxicitidina trifosfato.
ddGTP:	didesoxiguanosina trifosfato.
ddTTP:	didesoxitimidina trifosfato.
DEPC:	dietilpirocarbonato.
dGTP:	desoxiguanosina trifosfato.
ddNTPs:	2',3'-didesoxinucleósidos trifosfatos.
DTT:	ditiotreitól.
dTTP:	desoxitimidina trifosfato.
dUTP-Dig:	desoxiuridina trifosfato conjugada con digoxigenina.
EDTA:	ácido etilendiamino-tetraacético.
GTP:	guanosina trifosfato.
HCD:	"high conserved domain", (dominio altamente conservado).
IPTG:	isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido.
kpb:	kilo pares de bases.
LB:	medio Luria-Bertani.
MCP:	"methyl-accepting chemotaxis protein", (proteína de quimiotaxis aceptora de grupos metilo).
NBT:	nitroazul de tetrazolio.
pb:	pares de bases.
PCR:	reacción de la polimerasa en cadena.
PEG-6000:	polietilenglicol-6000.
PHMB:	ácido para-hidroximercuribenzoato.

PMSF:	fenilmetil-sulfonil fluoruro.
P <sub>tac</sub> :	promotor <i>tac</i> .
SDS:	lauril sulfato, sal sódica.
SSC:	solución salina/citrato.
TBS:	tampón tris/salino.
TEMED:	N,N,N',N'-tetra-metiletildiamina.
TM1:	región de transmembrana 1.
TM2:	región de transmembrana 2.
Tris-acetato:	tampón Tris ajustado a pH con ácido acético.
Tris-borato:	tampón Tris ajustado a pH con ácido bórico.
Tris-HCl:	tampón Tris ajustado a pH con HCl.
tRNA:	RNA de transferencia.
UTP:	uridina trifosfato.
X-Fosfato:	5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato, sal de toluidina.
X-Gal:	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-Galactósido.

## RESUMEN

La biolixiviación es un proceso biotecnológico que permite la solubilización de minerales por la acción oxidante de consorcios de microorganismos, en los que se consideran de gran importancia las bacterias acidofílicas quimiolitotróficas *Thiobacillus ferrooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans*. Ultimamente, ha aumentado el interés por *L. ferrooxidans* debido a algunas de sus propiedades bioquímicas.

*L. ferrooxidans* es una bacteria Gram negativa, móvil mediante un único flagelo polar, y que es capaz de adherirse al sustrato mineral. Se cree que en el reconocimiento específico del mineral por parte de la bacteria, podría estar participando un fenómeno quimiotáctico. Debido a esto, en nuestro laboratorio surgió gran interés por estudiar la quimiotaxis de este microorganismo.

Previamente demostramos que *L. ferrooxidans* presenta un comportamiento quimiotáctico que la acerca a  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$  y la aleja de aspartato. Además posee proteínas de membrana que son metiladas en respuesta al atrayente y desmetiladas en respuesta al repelente, tal y como ocurre con los receptores quimiotácticos de *E. coli* y de muchas otras bacterias (también algunos arquea). Estas proteínas se denominan "methyl-accepting chemotaxis proteins" (MCPs) y tienen una estructura de dos dominios hidrofílicos, uno

extramembranoso y uno citoplasmático, y dos dominios de transmembrana. Además, poseen una gran conservación en el dominio citoplasmático principalmente en las regiones en las que se encuentran los residuos de ácido glutámico metilables y en una región denominada HCD ("high conserved domain"), asociada a interacciones con las proteínas CheA y CheW, que participan en la transducción de la señal intracelular.

En la presente tesis se clonó y secuenció un fragmento de DNA de *L. ferrooxidans* de 2.262 pb que contiene un marco de lectura abierto para una proteína de 577 aminoácidos que presenta muchas características comunes con las MCPs descritas, por lo que este gen se denominó *lcrI* ("*Leptospirillum* chemotaxis receptor I"). El gen *lcrI* posee dos probables promotores traslapados, uno de tipo sigma 70 y uno de tipo sigma 28. El factor sigma 28 se ha descrito en varios microorganismos como el factor que dirige la transcripción de los genes relacionados con la síntesis del flagelo, con la motilidad y con la quimiotaxis, y las secuencias promotoras reconocidas por él son bastante conservadas en una diversidad de bacterias.

La proteína deducida de la secuencia del gen, LcrI, posee dos regiones hidrofóbicas que podrían corresponder a segmentos de transmembrana que determinen en la proteína un dominio periplasmático y otro citoplasmático. Además, el dominio de LcrI que proponemos como citoplasmático posee la región HCD, común a todas las MCPs, y posee también dos probables sitios de metilación.

Al estudiar la expresión *in vitro* del plasmidio que contiene el fragmento clonado de 2.262 pb, nuestros resultados mostraron la síntesis de una proteína que migró en geles de poliacrilamida-SDS como un polipéptido de 58 kDa y que fue inmunoprecipitada con

anticuerpos contra la MCP Tar de *E. coli*, lo que evidencia una comunidad antigénica. Encontramos además, que esta proteína de aproximadamente 58 kDa se expresó *in vivo* en células de *E. coli*, y se encontró en la membrana citoplasmática de ellas, sugiriendo fuertemente una localización del tipo propuesto para LcrI. La expresión *in vivo* de ésta proteína no fue dependiente de la presencia de un inductor del promotor *lac* del vector, por lo que se presume una funcionalidad de los promotores propuestos para el gen *lcrI* en *E. coli*. No fue posible demostrar la funcionalidad de la proteína de 58 kDa como un receptor quimiotáctico en *E. coli*, probablemente debido a que los compuestos ensayados no corresponden a los efectores reconocidos por ella, y a que el pH periplasmático de *E. coli* difiere en 3-4 unidades del pH ácido en que el dominio periplasmático de la proteína de *L. ferrooxidans* podría ser funcional.

Estos resultados muestran la primera secuencia de un gen codificante para una proteína que se describe en *L. ferrooxidans* y corresponde a una proteína tipo MCP. La existencia de esta proteína, que contiene la región HCD, sugiere que en esta bacteria también existen las proteínas CheW y CheA, que interactuarían con dicha región. Permanecen por demostrarse la expresión de LcrI *in vivo* en *L. ferrooxidans*, y su funcionalidad como receptor quimiotáctico metilable. Esto se facilitará cuando se cuente con una bacteria acidofílica carente de MCPs y transformable por plasmidios.

## ABSTRACT

The bioleaching of ores is a biotechnological process that allows the solubilization of metals by the oxidative action of microbial communities. Amongst these microorganisms, the chemolithotrophic and acidophilic bacteria *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans* are thought to play a major role in the process. A growing interest in *L. ferrooxidans* has been recently developed due to some of its biochemical properties.

*L. ferrooxidans* is a Gram negative bacterium, motile by means of a simple polar flagellum. This microorganism is capable of adhering to the ores and it is believed that chemotaxis plays an essential role in the specific recognition of the microorganism to the minerals.

Our laboratory became interested in the study of chemotaxis in *L. ferrooxidans*. We previously found that  $\text{Ni}^{2+}$  and  $\text{Fe}^{2+}$  are attractants and aspartate is a repellent for *L. ferrooxidans*. The microorganism also possesses membrane proteins which are methylated in response to attractants and demethylated in response to repellents, as it occurs in *E. coli* and other bacteria and also in some archaea. These proteins are known as methyl-accepting chemotaxis proteins (MCPs). The MCPs possess two hydrophobic domains, one in the



periplasmic space and the other in the cytoplasm, and two transmembrane domains. The cytoplasmic domain is highly conserved, mainly in the regions where the methylatable glutamic acids and in the high conserved domain (HCD). The HCD in MCPs interacts with the CheA and CheY proteins, which participate in the intracellular signal transductions.

In this thesis a 2,262 bp fragment from the *L. ferrooxidans* chromosomal DNA was cloned and sequenced. This fragment contained an open reading frame for a 577 amino acid protein with several MCPs characteristics, and therefore, we named this gene *lcrI* (*Leptospirillum* chemotaxis receptor I). The *lcrI* gene showed two putative overlapping promoters, one sigma 70-like promoter and a sigma 28-like promoter. The sigma 28 factor has been described in several microorganisms as directing the transcription of the genes related with the flagellum synthesis, motility and chemotaxis. The promoter sequence recognized by the sigma 28 factor is highly conserved in different motile bacteria.

The LcrI deduced protein contained two hydrophobic regions which could correspond to the two transmembrane regions presents in all the MCPs and that make them to possess a periplasmic and a cytoplasmic domains. We have proposed a cytoplasmic domain for LcrI, which contains the HCD region, present in all MCPs, and possess two probable methylation sites.

Our results of *in vitro* expression of the DNA plasmid containing the 2,262 bp fragment showed the synthesis of a 58 kDa protein which was immunoprecipitated by antibodies against the Tar protein from *E. coli*, confirming some degree of antigenic conservation. Also, this 58 kDa protein was expressed in *E. coli* and it was present in the cytoplasmic membrane. This strongly suggests that the location of LcrI is in the cell

membrane. Since the *in vivo* expression of this protein was not dependent of the *lac* promoter present in the plasmid vector, we proposed that the LcrI expression was under its own promoters. We could not determine a chemotactic receptor function for LcrI in *E. coli*. This was probably due to the lack of recognition of the common *E. coli* chemotactic effectors by LcrI. In addition, it is highly possible that the periplasmic pH of *E. coli* (which differs by 3-4 pH units from the *L. ferrooxidans* one) does not allow the right conformation for the LcrI periplasmatic domain, which in *L. ferrooxidans* is in a very acidic microenvironment.

Our results show the first sequence for a gene from *L. ferrooxidans* encoding a protein. This gene most likely corresponds to an *mcp* gene according to the LcrI protein characteristics. The existence in *L. ferrooxidans* of such a protein containing the HCD region suggests the presence of CheW and CheA proteins in this chemolithotrophic microorganism. It will be necessary to demonstrate LcrI expression and function as a chemotactic receptor in *L. ferrooxidans*. However, this is not currently possible due to the lack of MCP mutants and a genetic system in *L. ferrooxidans*.

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. QUIMIOTAXIS

Las bacterias tienen una considerable versatilidad metabólica y fisiológica que las capacita para sobrevivir y crecer en un amplio rango de condiciones ambientales. Es así como algunas bacterias responden a cambios en las concentraciones de ciertas sustancias químicas de su ambiente alterando su patrón de motilidad (Hess y col., 1987), lo que les permite alejarse de áreas que son más estresantes y acercarse a microambientes más favorables para el crecimiento y la reproducción (Amsler y col., 1993). Este fenómeno es conocido como "quimiotaxis".

La motilidad y quimiotaxis han sido ampliamente estudiadas en las enterobacterias *Escherichia coli* y *Salmonella typhimurium*. En ellas la motilidad depende de 5-10 flagelos arbitrariamente localizados en la superficie de la célula, un patrón llamado flagelación peritrica (Macnab, 1996). El flagelo es un organelo compuesto de un filamento helicoidal semirígido de 20 nm de diámetro y 5-10 µm de largo, y es manejado en su base por un motor rotatorio que se encuentra anclado en la superficie de la célula (Macnab, 1996). Cada

motor rota a unas 15.000 revoluciones por minuto (Eisenbach, 1996) y la energía para la rotación proviene directamente de una gradiente de protones de transmembrana que genera una fuerza protón-motriz (Eisenbach, 1990). Por cada revolución, se requiere el flujo de aproximadamente 1.000 protones (Eisenbach, 1996).

En un medio isotrópico, las bacterias tienen un desplazamiento azaroso en el espacio, por una alternación de períodos de "nado suave" (de aproximadamente 1 segundo) con períodos de "volteretas" (de aproximadamente 0,1 segundo) (Springer y Zanolari, 1984; Stock y Surette, 1996). El "nado suave" se produce cuando los filamentos flagelares rotan en sentido anti horario ("counter clock wise", CCW) formando un manajo propulsor termodinámicamente estable que empuja a la célula hacia adelante a velocidades de hasta 40 mm/seg (Lowe y col., 1987; Amsler y Matsumura, 1995). Cuando los filamentos rotan en sentido horario ("clock wise", CW), el manajo no es estable y se separan los filamentos causando una rápida detención del nado denominada "voltereta", luego de la cual se reselecciona azarosamente la dirección del próximo período de "nado suave" generándose así el desplazamiento azaroso (Amsler y Matsumura, 1995).

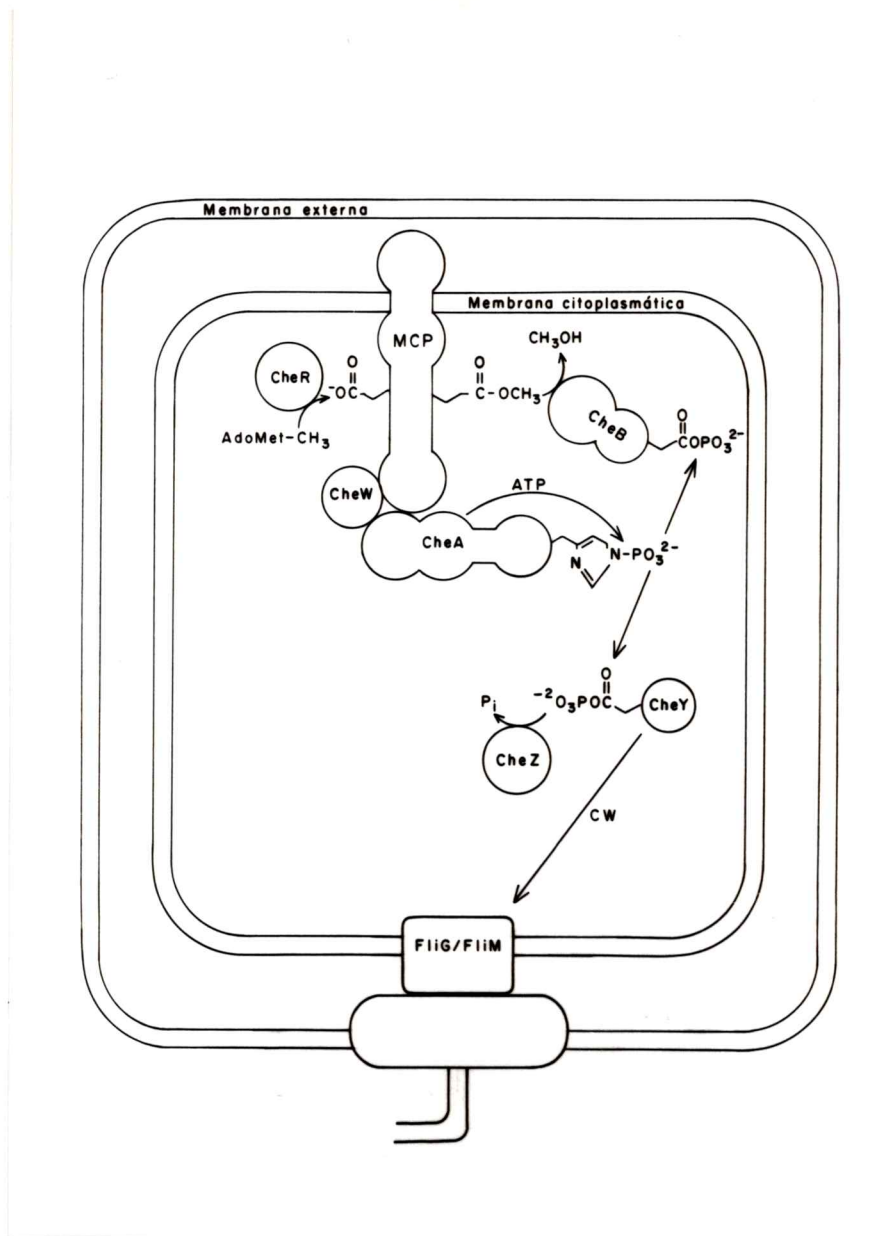
Cuando la bacteria se enfrenta a un aumento en la concentración de una sustancia atrayente, disminuye la frecuencia de "volteretas" lo que le permite acercarse al atrayente con "nado suave". En cambio, al enfrentar un aumento en la concentración de un repelente, aumenta la frecuencia de "volteretas" lo que hace que la bacteria se aleje del repelente (Stock y col., 1992). Estas respuestas son transientes, pudiendo durar desde unos pocos segundos hasta varios minutos, dependiendo del compuesto y de la magnitud de la

gradiente (Engström y Hazelbauer, 1980).

## 1.2. TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES QUIMIOTÁCTICAS

Para que una célula responda quimiotácticamente a los cambios en su ambiente, debe detectar compuestos específicos y cambios en su concentración, y luego debe transmitir esta información al motor flagelar para controlar la dirección de rotación del filamento. El sistema de quimiotaxis dependiente de metilación es el más conocido, y en él participan receptores quimiotácticos metilables que están en la membrana citoplasmática y seis proteínas solubles: CheA, CheW, CheY, CheZ, CheR y CheB (Amsler y Matsumura, 1995).

La vía de transducción de la señal quimiotáctica en el sistema dependiente de metilación se esquematiza en la Fig. 1. El receptor, junto con la proteína auxiliar CheW, controla la actividad de la quinasa de histidina CheA. Así, al unirse un repelente al receptor, el complejo terciario receptor/CheW/CheA se activa y por ello se aumenta la autofosforilación de CheA (Gegner y col., 1992). CheA-fosfato transfiere su grupo fosfato a CheY, y esto induce un cambio conformacional en CheY (Lowry y col., 1994) que le permite interactuar con el motor flagelar provocando una rotación CW del filamento flagelar (Gegner y col., 1992). Cuando se une un atrayente al receptor, se inhibe el complejo terciario activo y por ello no se produce la cascada de fosforilaciones disminuyendo así la



**Figura 1:** Sistema de transducción de señales que media la quimiotaxis en *E. coli*.

CheA es la quinasa regulada por interacción con el receptor ("methyl-accepting chemotaxis protein, MCP) y con CheW, que cede su grupo fosfato a CheY y a CheB. CheY-fosfato se une a componentes del motor flagelar para causar rotación del motor en el sentido horario (CW), lo que produce volteretas. CheZ facilita la desfosforilación de CheY-fosfato. CheB-fosfato cataliza la desmetilación de residuos metil glutámicos del receptor. CheR cataliza la metilesterificación de residuos glutámicos del receptor. Figura adaptada de Stock y col. (1992).

rotación del flagelo en el sentido CW, aumentando (proporcionalmente) la rotación en el sentido CCW (Hess y col., 1988; Oosawa y col., 1988; Borkovich y col., 1989; Stock y col., 1992). El sitio de unión de CheY-fosfato al motor flagelar es la proteína FliM y, aunque se ha sugerido que la interacción entre las proteínas flagelares FliG y FliM juega un rol crítico en el cambio de dirección de la rotación flagelar, aún se desconoce el mecanismo último por el cual se genera este cambio (Welch y col., 1993; Marykwas y Berg, 1996).

CheY-fosfato se hidroliza espontáneamente, liberando el grupo fosfato (Stock y col., 1992). Esta reacción está muy acelerada por la proteína CheZ y de este modo se controla que no existan períodos de "volteretas" demasiado prolongados, que serían contraproducentes para la célula (Hess y col., 1988; Eisenbach, 1996).

Además existe una regulación a nivel de receptores, conocida como adaptación o desensibilización. Esta consiste en una metilación de residuos de ácido glutámico del receptor por acción de la metil transferasa CheR (dependiente de S-adenosilmetionina), que genera glutamil carboximetil ésteres (Springer y Koshland Jr., 1977), y una desmetilación de los mismos por acción de la metil esterasa CheB que permite la liberación de metanol (Stock y Koshland Jr., 1978). En ausencia de un estímulo quimiotáctico, los receptores son continuamente metilados y desmetilados manteniendo un nivel basal de metilación (Amsler y Matsumura, 1995). La unión de un atrayente aumenta el nivel neto de metilación, fenómeno que se explica por inducción de un cambio conformacional en el receptor que expone mejor los sitios metilables y por una disminución de la actividad de CheB. Este aumento de metilación provoca un cambio en el umbral de respuesta al atrayente haciendo

que la célula vuelva a un comportamiento de preestímulo, requiriéndose una mayor concentración del atrayente para generar nuevamente una respuesta de aumento de períodos de "nado suave" (Stock y col., 1992; Amsler y Matsumura, 1995). En presencia de un repelente disminuye el nivel neto de metilación del receptor por un aumento de la actividad de CheB, lo que reduce la activación de CheA y hace que se requiera mayor concentración del repelente para generar nuevamente una respuesta de aumento de "volteretas" (Stock y col., 1992; Amsler y Matsumura, 1995). La actividad esterasa de la proteína CheB aumenta al ser fosforilada por CheA-fosfato, lo que hace que en presencia de un repelente la enzima sea hasta 30 veces más activa. Las variaciones en esta actividad de CheB son transientes, persistiendo sólo mientras el nivel de metilación está cambiando, pues cuando se logra un nuevo nivel de metilación adecuado al estímulo, CheB retorna a su actividad de preestímulo, manteniendo así el nuevo nivel de metilación en los receptores estimulados (Springer y Zanolari, 1984).

Las proteínas CheA y CheY/CheB son miembros de la familia de transductores de señales llamados "sistemas de dos componentes". Esta familia, que se constituye de unos 50 sistemas homólogos, incluye mecanismos que regulan la respuesta a una amplia variedad de estímulos ambientales, como captación de nitrógeno y fosfato, osmorregulación, regulación de oxígeno y esporulación, entre otros. Como existe una gran similitud en las secuencias y funciones bioquímicas entre los diferentes sensores de estos sistemas (las quinasas de histidina, tipo CheA) y también entre los reguladores de respuesta (los fosfoaceptores, tipo



CheY/CheB), puede existir un señalamiento cruzado de un sistema a otro, fenómeno denominado "cross-talk", generándose así un posible mecanismo de regulación global de la motilidad y la quimiotaxis (Amsler y col., 1993).

Los genes involucrados en la quimiotaxis son expresados coordinadamente con los genes de la síntesis flagelar (designados *flg*, *flh* y *fli*) y de rotación flagelar (designados *mot*). Todos ellos constituyen el regulón flagelar, que posee más de 40 genes en, a lo menos, 13 operones que se expresan en forma jerárquica. El primero en expresarse es el operón *flhDC*, cuya expresión es dependiente de la presencia de la proteína activadora de genes catabólicos y  $\epsilon$ -AMP (CAP- $\epsilon$ -AMP), y también de la presencia de las proteínas de respuesta al estrés térmico DnaK, DnaJ y GrpE (Amsler y col., 1993). Se cree además, que la acumulación intracelular de acetilfosfato a elevadas temperaturas y durante la fase de crecimiento exponencial temprana, causa una disminución de la expresión del operón *flhDC* y por ello sería parcialmente responsable de la disminución de la expresión flagelar en dichas condiciones (Prüß y Wolfe, 1994). Los productos génicos del operón *flhDC*, las proteínas FlhD y FlhC, son absolutamente necesarios para la expresión de los genes del segundo nivel, entre los que se encuentran los genes que permiten ensamblar el cuerpo basal y el gancho del flagelo, y el gen que codifica el factor sigma 28 (sigma F), que es indispensable para la expresión de los operones del tercer nivel (Arnosti y Chamberlin, 1989; Liu y Matsumura, 1995). El tercer nivel de expresión incluye el operón *mocha* que contiene los genes *motA*, *motB*, *cheA* y *cheW*; el operón *meche* que contiene los genes *tar*, *tap*, *cheR*, *cheB*, *cheY* y

*cheZ* (Mutoh y Simon, 1986); los genes *tsr* y *trg*, que codifican para receptores quimiotácticos; y algunos genes flagelares, incluyendo *fliC* que codifica a la proteína flagelina que es la que estructura el filamento flagelar (Amsler y col., 1993).

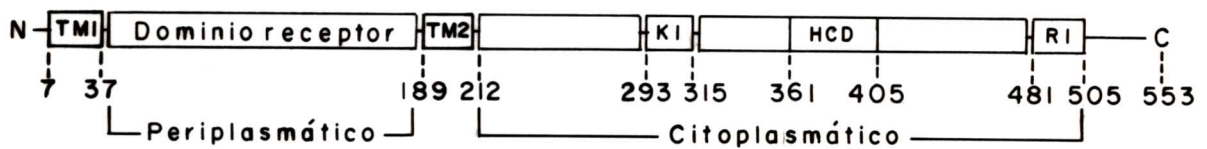
### 1.3. RECEPTORES QUIMIOTÁCTICOS

Los receptores quimiotácticos, también llamados transductores o proteínas de quimiotaxis aceptoras de grupos metilo ("methyl-accepting chemotaxis proteins", MCPs), constituyen un grupo de proteínas de transmembrana estructuralmente relacionadas, que reciben información desde el ambiente y la transducen en señales que convergen en los motores flagelares (Krikos y col., 1985) (Fig. 1).

Julius Adler inició el trabajo en quimiotaxis bacteriana en la década de los 60, mostrando que *E. coli* posee quimiorreceptores específicos para percibir sustancias químicas del ambiente (Adler, 1969). Hasta la fecha, en *E. coli* se han caracterizado cuatro receptores quimiotácticos: **Tar** ("taxis to aspartate and repellents") es el receptor para L-aspartato, para aminoácidos relacionados y para ácidos dicarboxílicos; también media taxis hacia maltosa vía interacción con la proteína periplasmática que une maltosa y taxis desde los repelentes  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Ni}^{2+}$ . **Tsr** ("taxis to serine and repellents") es el receptor para el atrayente L-serina y aminoácidos relacionados, y es responsable de la quimiotaxis desde un amplio rango de repelentes, incluyendo leucina, indol, y ácidos débiles; también está involucrado en la

termotaxis. **Trg** ("taxis to ribose and galactose") interactúa con las proteínas periplasmáticas que unen ribosa y galactosa para generar quimiotaxis hacia dichos azúcares. **Tap** ("taxis-associated protein") media la taxis hacia dipéptidos a través de una interacción con la proteína periplasmática que une dipéptidos (Dahl y col., 1989). Las cantidades relativas de los receptores Tar:Tsr:Trg:Tap son de 1:1:0,2:0,1 (Yamamoto y col., 1990).

Los cuatro receptores quimiotácticos son proteínas de un tamaño molecular cercano a los 60 kDa, y se componen de los mismos dominios estructurales (Fig. 2). El extremo amino terminal se asemeja al péptido señal de las proteínas exportadas pero no es removido de la proteína madura sino que corresponde a la primera región que se inserta en la membrana citoplasmática, se denomina transmembrana 1 (TM1) y posee una estructura de  $\alpha$ -hélice (Dahl y col., 1989; Pakula y Simon, 1992a). En el lado citoplasmático de la célula quedan los primeros 6 residuos de Tar, Tsr y Tap y los primeros 16 residuos de Trg, entre los que se encuentran aminoácidos cargados positivamente (Krikos y col., 1983; Bollinger y col., 1984; Kimbrough y Manoil, 1994). Luego de TM1, se extienden en el periplasma aproximadamente 160 residuos que forman el dominio receptor. A continuación está la segunda región de transmembrana, denominada TM2, que también posee una estructura de  $\alpha$ -hélice (Pakula y Simon, 1992a) y que parece actuar como una señal de detención de la transferencia a través de la membrana. Los últimos 300 o más aminoácidos se localizan en el citoplasma, y constituyen el dominio que genera las señales intracelulares hacia el flagelo y además contiene los residuos de ácido glutámico que son metilados y desmetilados durante la adaptación al estímulo quimiotáctico (Dahl y col., 1989). El dominio



**Figura 2:** Características estructurales de las moléculas MCPs.

Se representa la proteína Tar, pero todas las MCPs de *E. coli* poseen esencialmente la misma organización. N corresponde al extremo amino terminal de la proteína, TM1 a la primera región de transmembrana, el dominio receptor al dominio periplasmático, TM2 a la segunda región de transmembrana, KI y RI a las regiones de metilación, HCD a la región altamente conservada y C al extremo carboxilo terminal de la proteína. La figura está hecha a escala. Los números indican las posiciones de los residuos. Figura adaptada de Ames y Parkinson (1988).

citoplasmático es altamente conservado, particularmente en las regiones de metilación y en la región que señala (Dahl y col., 1989).

Las regiones llamadas K1 y R1 corresponden a péptidos trípticos del dominio citoplasmático en los que se encuentran los sitios de metilación (Kehry y Dahlquist, 1982; Terwilliger y col., 1983). En K1 existen 3 ó 4 sitios de metilación y en R1 existen 1 ó 2 sitios, dependiendo del receptor (Kehry y Dahlquist, 1982). Algunos de los residuos glutámicos que son metilados, son codificados como glutaminas y son desamidados a glutamato por la proteína CheB, que también posee actividad desamidasa (Sherris y Parkinson, 1981; Kehry y col., 1983).

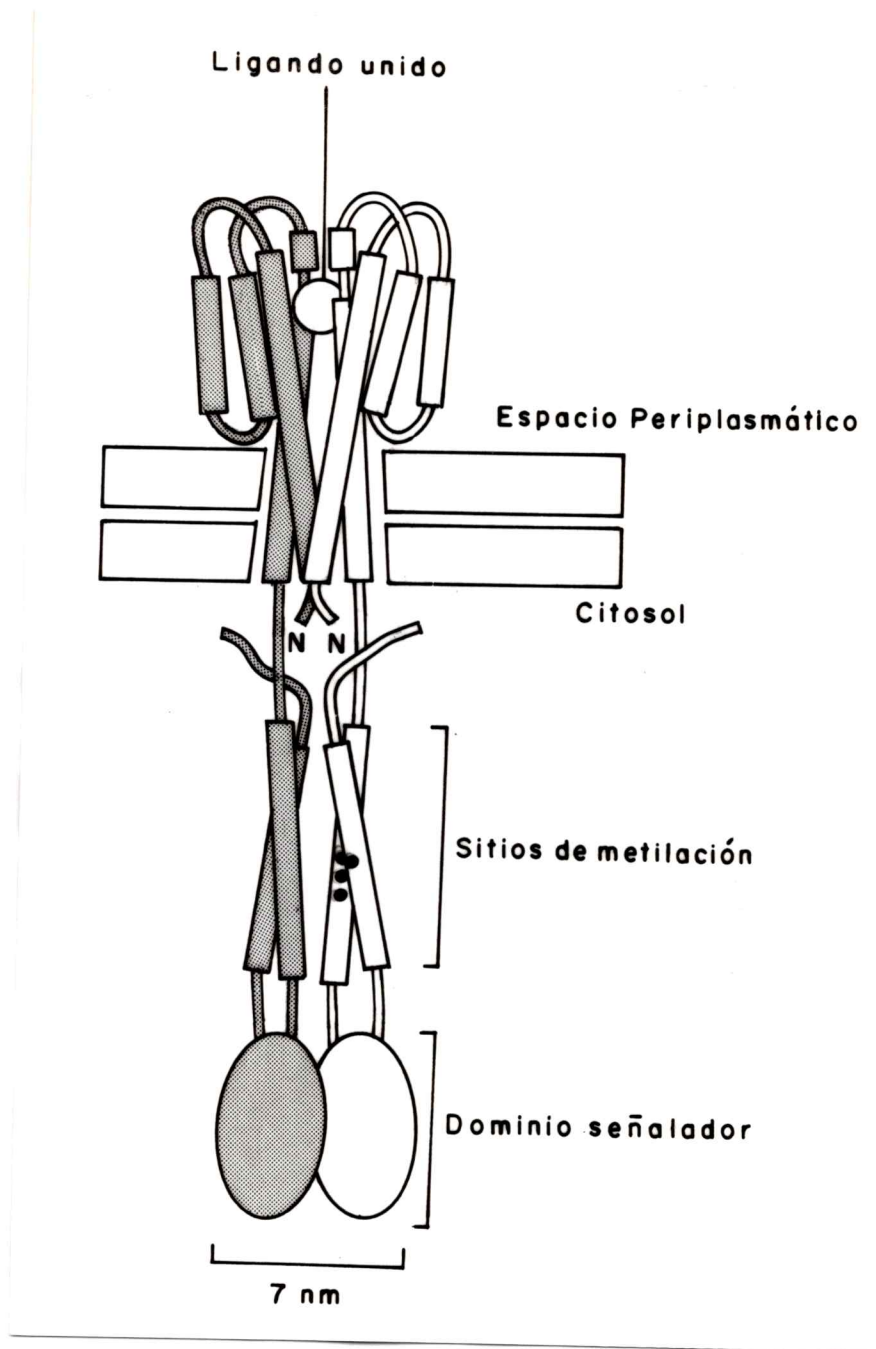
Las secuencias de K1 y R1 son similares y en ambas regiones se predice fuertemente una estructura de  $\alpha$ -hélice, que dejaría al menos a 3 de los sitios que se encuentran en K1 en la misma cara de la hélice (Krikos y col., 1983).

Entre los segmentos K1 y R1, se encuentra una región que es crítica en el proceso de generar señales (Mutoh y col., 1986; Slocum y col., 1987; Ames y Parkinson, 1988 y 1994). En el centro de esta región existe una zona de 45 aminoácidos altamente conservada en todas las MCPs conocidas (Krikos y col., 1985), que posee un 100 % de identidad entre Tar de *S. typhimurium* y Tar y Tsr de *E. coli* (Krikos y col., 1983; Russo y Koshland Jr., 1983). Esta región se ha denominado HCD ("high conserved domain") y se estima que es la parte del receptor que interactúa con CheA, CheW u otro componente del sistema de señalamiento flagelar (Liu y Parkinson, 1991).

Una comparación de las secuencias aminoacídicas de estos cuatro transductores determina que ellos están poco relacionados en sus dominios periplasmáticos, lo que concuerda con la función de estos dominios de detectar quimioestímulos diferentes (Krikos y col., 1983; Morgan y col., 1993).

Debido a la alta conservación de regiones en el dominio citoplasmático, un antisuero generado contra un transductor de *E. coli* reconoce a los otros tres receptores, aún si el inmunógeno es Trg que es el más distantemente relacionado de los cuatro (Engström y col., 1983; Bollinger y col., 1984; Morgan y col., 1993). Más aún, se ha demostrado que los dominios citoplasmáticos de Tar y Tsr son intercambiables permitiendo generar quimeras que son químicamente estables y quimiotácticamente competentes (Krikos y col., 1985).

Las MCPs se encuentran como dímeros estables en la membrana (Milligan y Koshland Jr., 1988). En base a la estructura tridimensional del dominio periplasmático del receptor Tar de *S. typhimurium* (Milburn y col., 1991) y a la existencia de evidencia genética y bioquímica que indica que ciertos residuos específicos se involucran en la unión de aspartato (Wolff y Parkinson, 1988; Lee e Imae, 1990; Mowbray y Koshland Jr., 1990), se determinó que en el dominio periplasmático existe una estructura de 4  $\alpha$ -hélices en cada monómero, y que el bolsillo que une aspartato se encuentra en la interfase de los dos monómeros (ver Fig. 3), a más de 60 Å de la superficie de la membrana, y está altamente cargado por la participación de 3 argininas. Estudios de entrecruzamiento químico de las dos subunidades en sus regiones de transmembrana han permitido identificar los residuos



**Figura 3:** Modelo de la estructura de homodímero del receptor Tar.

La estructura tridimensional del dominio extracelular se ha obtenido por difracción de rayos-X y la estructura de los dominios intracelulares se predicen de la secuencia aminoacídica. Un monómero se representa en blanco y el otro en gris. N representan los extremos amino-terminal de las proteínas. Los círculos negros en una de las moléculas representan los sitios de metilación. Figura adaptada de Alberts y col. (1994).

que están en estrecha proximidad en el dímero Tar de *E. coli*, y en base a ello se ha propuesto un modelo que extiende las  $\alpha$ -hélices periplasmáticas hacia las regiones de transmembrana y que permite una interacción muy cercana de las dos TM1 y localiza a las dos TM2 más periféricamente (Lynch y Koshland Jr., 1991; Pakula y Simon, 1992a). Es así como se ha propuesto el modelo presentado en la Fig. 3 para la estructura del receptor Tar de *E. coli* o de *S. typhimurium*.

Para el mecanismo de transducción de la señal se piensa que la unión del ligando causa un cambio conformacional en los dominios periplasmáticos del receptor y que este cambio es propagado por los 4 dominios de transmembrana hasta los dominios citoplasmáticos (Pakula y Simon, 1992a). En base a esto han surgido dos modelos: 1) en el modelo del "pistón" ocurriría un movimiento entre las dos hélices del dominio periplasmático en un monómero, generando una señal de transmembrana (Milligan y Koshland Jr., 1991; Pakula y Simon, 1992b); 2) en el modelo de "pivotes", pequeños movimientos entre los monómeros en el dominio periplasmático causarían desplazamientos relativos de los dominios citoplasmáticos (Milburn y col., 1991; Pakula y Simon, 1992b).

El mecanismo molecular por el cual la metilación controla el estado conformacional del receptor, se relaciona probablemente con interacciones entre K1 y R1 en el homodímero. Se propone que una repulsión electrostática entre las cadenas laterales de los residuos de glutamato causa una rotación de las hélices para maximizar la distancia entre estos grupos negativamente cargados, y que la metilación causada por la unión del atrayente disminuiría la densidad de carga y así permitiría que las hélices roten para estar más



cercanas una de la otra, favoreciendo la conformación del receptor que genera un aumento de la autofosforilación de CheA para lograr un estado de motilidad de preestímulo (Stock y col., 1992; Stock y Surette, 1996).

Investigaciones de los mecanismos tácticos en algunas otras bacterias han revelado muchos paralelos con los sistemas bien caracterizados de bacterias entéricas. Esto ha planteado la posibilidad de que los sistemas quimiotácticos de la mayoría, sino todas, las bacterias flageladas posean componentes que no sólo sean análogos en función sino también homólogos en estructura (Nowlin y col., 1985).

Las proteínas del tipo MCPs no están limitadas a *E. coli*, sino que están ampliamente distribuidas en una gran diversidad de especies microbianas como: *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter aerogene*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Spirochaeta auranti*, *Caulobacter crescentus*, *Bacillus subtilis*, *Rhodospirillum rubrum*, *Myxococcus xanthus*, *Rhizobium meliloti*, *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough; e incluso en los arquea *Halobacterium salinarium*, *Natronobacterium pharaonis* y *Haloarcula vallismortis* (Ullah y Ordal, 1981; Craven y Montie, 1983; Kathariou y Greenberg, 1983; Russo y Koshland Jr., 1983; Shaw y col., 1983; Lopes y Shapiro, 1984; Sockett y col., 1987; Alam y col., 1989; Dahl y col., 1989; Harwood, 1989; McBride y col., 1989; Dolla y col., 1992; McBride y col., 1992; Yao y Spudich, 1992; Yamamoto e Imae, 1993; Deckers y Voordouw, 1994; Hanlon y Ordal, 1994; Greck y col., 1995; Kuroda y col., 1995; Seidel y col., 1995; Deckers y Voordouw, 1996; Rudolph y col., 1996). Muchas de estas proteínas se

localizan en la membrana y son antigénicamente relacionadas a los receptores quimiotácticos descritos (Lopes y Shapiro, 1984; Nowlin y col., 1985; McCleary y col., 1990; Alam y Hazelbauer, 1991; Greck y col., 1995) y en algunos de estos casos también se ha demostrado su capacidad de metilarse y su rol en taxis (Morgan y col., 1993). Además, existen otras bacterias que poseen proteínas con reactividad cruzada con anticuerpos contra Trg de *E. coli*, lo que hace probable que también sean MCPs aún no descritas (Morgan y col., 1993).

Los genes secuenciados hasta la fecha, permiten reconocer una familia de proteínas tipo MCP que incluye: Tar, Tap, Tsr y Trg de *E. coli* (Krikos y col., 1983; Bollinger y col., 1984); Tar y Tcp de *S. typhimurium* (Russo y Koshland Jr., 1983; Yamamoto e Imae, 1993); Tas y Tse de *E. aerogenes* (Dahl y col., 1989); PctA de *P. aeruginosa* (Kuroda y col., 1995); McpA y McpB de *B. subtilis* (Hanlon y Ordal, 1994); FrzCD de *M. xanthus* (McBride y col., 1989); DcrA a DcrL de *D. vulgaris* Hildenborough (Dolla y col., 1992; Deckers y Voordouw, 1994 y 1996); HtrI, HtsIII, HtsIV, HtsV y HtsVI de *H. salinarium* (Yao y Spudich, 1992; Rudolph y col., 1996); pHtrII de *N. pharaonis* y vHtrII de *H. vallismortis* (Seidel y col., 1995).

#### 1.4. BIOLIXIVIACIÓN DE MINERALES

Chile es uno de los principales exportadores de cobre del mundo, con una producción superior a  $1 \times 10^6$  toneladas del metal al año. La reserva se estima en  $150 \times 10^6$  toneladas de cobre y el 31 % está contenido en minerales de baja ley, en los que la recuperación por la tecnología convencional no es rentable. Actualmente se está utilizando un método biotecnológico que permite el tratamiento de minerales de alta y baja ley, así como también permite recuperar metales desde los residuos de otros procesos. Este método no tradicional se denomina "biolixiviación" y consiste en la solubilización oxidativa de los minerales por la acción de microorganismos (Gentina y Acevedo, 1985).

La biolixiviación es un proceso biogeoquímico natural que ha ocurrido por siglos en minas de todo el mundo, pero el rol de los microorganismos sólo se reconoció hace unas pocas décadas cuando se aisló y estudió la bacteria *Thiobacillus ferrooxidans*. Este microorganismo obtiene su energía metabólica oxidando minerales reducidos, generando sulfatos solubles u óxidos, desde los cuales los metales pueden ser recuperados por procesos metalúrgicos convencionales (Gentina y Acevedo, 1985).

Actualmente, la mayoría de las operaciones comerciales de biolixiviación, son llevadas a cabo en ambientes mesofílicos por un consorcio en el que se han identificado las bacterias acidofílicas quimiolitotróficas *Thiobacillus ferrooxidans*, *Thiobacillus thiooxidans* y *Leptospirillum ferrooxidans* y bacterias acidofílicas heterotróficas del género *Acidiphilium* (Rawlings y Kusano, 1994). En los ambientes de biolixiviación también existe vida

eucariónica, restringida a algunas levaduras, mohos y protozoos, cuyo significado funcional en las operaciones biolixivantes no está claro (Johnson y Rang, 1993).

*T. ferrooxidans* y *L. ferrooxidans* son bacterias que oxidan hierro, y aunque sólo la primera es capaz de oxidar además compuestos reducidos de azufre, ambas bacterias crecen en pirita ( $\text{FeS}_2$ ) y la degradan eficientemente (Sugio y col., 1994). A pesar de existir muy pocos estudios dedicados a *L. ferrooxidans*, se ha demostrado que esta bacteria puede ser tan eficiente como *T. ferrooxidans* en las faenas de biolixiviación, e incluso en algunos casos parece preferirse debido a sus propiedades bioquímicas: la concentración inhibitoria de ion férrico es 10 veces mayor para *L. ferrooxidans* que para *T. ferrooxidans* y además, *L. ferrooxidans* tiene una mayor tolerancia al pH ácido (Sand y col., 1992).

*L. ferrooxidans* tiene la misma actividad oxidante de ion ferroso que *T. ferrooxidans* cuando crece en pirita o en un mineral sulfúrico complejo, por lo que ambas bacterias tendrían la misma participación en el mecanismo indirecto de biolixiviación, es decir vía generación de ion férrico (Sand y col., 1992).

La mayor parte de las bacterias participantes en el proceso de biolixiviación son mótils y se adhieren al mineral, y aparentemente *L. ferrooxidans* se adhiere más firmemente que *T. ferrooxidans* (Sand y col., 1992). En este proceso de acercamiento a un sustrato lixiviable, podría estar participando un fenómeno quimiotáctico que le permita a la bacteria sentirse atraída hacia el sustrato de adherencia. Los microorganismos serían capaces de reconocer sitios en la superficie del mineral (por ejemplo un sulfuro metálico), en los cuales procesos electroquímicos controlados probablemente causan una disolución

(generación de un ánodo y un cátodo debido a un desbalance de cargas, fallas de superficie, etc) y liberan los metales y tiosulfato, que podrían ser atrayentes quimiotácticos para las bacterias biolixiviantes. Por ello, el estudio de la quimiotaxis en este tipo de microorganismos y particularmente en *L. ferrooxidans* es muy importante, tanto desde el punto de vista básico como del aplicado.

### 1.5. QUIMIOTAXIS EN *Leptospirillum ferrooxidans*

En nuestro laboratorio, hemos estudiado la respuesta quimiotáctica de *L. ferrooxidans*, determinando que es atraído por los iones  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$  y es repelido por aspartato, respondiendo de manera opuesta a como lo hace *E. coli* frente a  $\text{Ni}^{2+}$  y a aspartato (Acuña y col., 1992). Además, se han observado bandas de proteínas de *L. ferrooxidans* que son metilables y cuya metilación aumenta en presencia del atrayente  $\text{Ni}^{2+}$  y disminuye en presencia del repelente aspartato (Acuña y col., 1986 y 1992). *In vitro*, extractos citoplasmáticos de *E. coli* son capaces de metilar estas proteínas de membrana de *L. ferrooxidans* aumentando la metilación en presencia de  $\text{Ni}^{2+}$  y disminuyéndola en presencia de aspartato, concordante con el comportamiento quimiotáctico de *L. ferrooxidans* frente a estos quimioefectores. Cuando se utilizan extractos citoplasmáticos de *E. coli* para metilar/desmetilar MCPs de *B. subtilis*, el patrón de metilación también está de acuerdo a lo que sucede en *B. subtilis in vivo*: ocurriendo un aumento del recambio de grupos metilo en

presencia de un atrayente y una disminución del recambio de grupos metilo en presencia de un repelente (Goldman y Ordal, 1984; Nettleton y Ordal, 1989). Estos dos casos son claros ejemplos de la conservación en el receptor de los sitios que interactúan con la metiltransferasa y con la metilesterasa, y que es el quimioefector el que afecta directamente la conformación de la MCP, haciendo a los sitios específicos más o menos susceptibles de ser metilados/desmetilados, según el caso.

Esta información, junto con la conservación de las MCPs en un amplio rango de microorganismos, nos sugirió la presencia en *L. ferrooxidans* de genes para MCPs homólogos a los de *E. coli*. Esto se evidenció al detectar hibridación del DNA cromosomal de *L. ferrooxidans* cepa Z2 con el gen *tar* de *E. coli* (Acuña y col., 1992; Rojas, 1992). Utilizando técnicas de Southern blot y de clonamiento, se logró clonar en el vector pUC18 un fragmento de aproximadamente 3,5 kb del DNA de *L. ferrooxidans* que hibrida con la sonda heteróloga (Acuña y col., 1992; Rojas, 1992; resultados no publicados de nuestro laboratorio obtenidos por José Rojas Z.).

Para continuar con estos estudios, la presente tesis se planteó como objetivo general la identificación y caracterización de algún gen que codifique un receptor quimiotáctico de *L. ferrooxidans*.

## 2. MATERIALES

### 2.1. MATERIAL BIOLÓGICO

#### 2.1.1. Cepas Bacterianas

##### 2.1.1.1. *Escherichia coli*

Se utilizaron varias cepas de *Escherichia coli*, cuyas características genotípicas son:

- D-10      *met, rel*. Cedida gentilmente por D. Hayes (Institut de Biologie Physico Chimique, Paris, France).
- DH5 $\alpha$       F<sup>-</sup>,  $\phi$ 80*lacZ*  $\Delta$ M15, *recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *hsdR17*, (*r<sub>K</sub><sup>-</sup>*, *m<sub>K</sub><sup>+</sup>*), *supE44*, *relA1*, *deoR*,  $\Delta$ (*lacZYA-argF*)U169 (Titus, 1991).
- HCB721       $\Delta$ (*cheA-cheY*) 1590::*XhoI* (*Tn5*),  $\Delta$ (*tsr*) 7021, *trg::Tn10* (Wolfe y col., 1988).  
Fue cedida gentilmente por el Dr. R. Bourret (California Institute of Technology, Pasadena, California, USA).

RP4372      *thr(am)1, leuB6, his-4, metF(am)159, eda-50, rpsL136, thi-1, ara-14, lacY1, mtl-1, xyl-5; tonA31, tsx78, recA, F', tsr<sub>518</sub>, Δ(tar-tap)5201* (Krikos y col., 1985; Wolfe y col., 1994).

### 2.1.1.2. *Leptospirillum ferrooxidans*

Se utilizó la cepa Z2, que fue cedida gentilmente por el Dr. A. Harrison Jr. (University of Missouri, Columbia, USA).

### 2.1.2. Plasmidios

Se utilizaron los plasmidios que se especifican a continuación:

pGEM-3Z      2.743 pb (Titus, 1991).

pUC18      2.690 pb (Yanisch-Perron y col., 1985).

pNT201      derivado de BR322, cuya construcción la describen Borkovich *et al.* (Borkovich y col., 1989). Posee Amp<sup>R</sup> y lleva el gen *tar* bajo el promotor P<sub>tac</sub>. Fue cedido gentilmente por el Dr. R. Bourret (California Institute of Technology, Pasadena, California, USA).

pLf3,5      recombinante generado durante el presente trabajo.



pLf13

recombinante generado durante el presente trabajo.

## 2.2. MATERIAL NO BIOLÓGICO

A continuación se presentan los compuestos utilizados y sus proveedores.

Ampicilina se obtuvo del Laboratorio Chile S.A.

Alcohol isoamílico,  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{FeCl}_3$  se obtuvieron de J. T. Baker Chemical Co., Phillipsburg, N. J.

Aceite mineral (para biología molecular), ácido maleico, adjuvante de Freund completo, adjuvante de Freund incompleto, albúmina de bovino, azul brillante de Coomassie R-250, azul de bromofenol, bromuro de etidio (para biología molecular),  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CH}_3\text{COOK}$ ,  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ , cloramfenicol,  $\text{CsCl}$ , DEPC, DTT, sal disódica de EDTA, fenol, D-(+)-glucosa, glicerol,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , L-ácido glutámico, L-ácido aspártico, L-alanina, L-arginina, L-asparragina, L-cisteína, L-histidina, L-leucina, L-metionina, L-prolina, L-serina, L-tirosina, L-treonina, L-triptofano, L-valina, lisozima, 2-mercaptoetanol,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , N-lauroil-sarcosinato de sodio, leupeptin, NBT, 1,10-fenantrolina, PEG-6.000, pepstatina A, persulfato de amonio, phytigel, sal

sódica de PHMB, PMSF, proteinasa K, ribonucleasa A, SDS sal sódica, Sigmacote, tetraciónato de potasio, tritón X-100, Tween 20 (polioxietilensorbitan monolaurato), X-Fosfato y X-Gal se obtuvieron de Sigma Chemicals Company, St. Louis, USA.

CaCl<sub>2</sub>x2H<sub>2</sub>O, CoCl<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O, cloroformo p.a., CH<sub>3</sub>COONa, citrato de sodio, CuSO<sub>4</sub>x5H<sub>2</sub>O, etanol absoluto p.a., FeSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O, FeCl<sub>3</sub>x6H<sub>2</sub>O, glicina, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, HCl fumante 37 %, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, KCl, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>x3H<sub>2</sub>O, L-isoleucina, metanol, MgCl<sub>2</sub>x6H<sub>2</sub>O, MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O, MnSO<sub>4</sub>xH<sub>2</sub>O, MnCl<sub>2</sub>x4H<sub>2</sub>O, NaCl, NaHCO<sub>3</sub>, NaOH, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>x2H<sub>2</sub>O, NiSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O, N,N-dimetilformamida, sacarosa, ZnSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O y ZnCl<sub>2</sub> se obtuvieron de E. Merck, Darmstadt, Germany.

Bacto triptona, Bacto extracto de levadura y agar BiTek™ se obtuvieron de Difco Laboratories, Detroit, USA.

Acrilamida (99.9 %), 4-Cloro-1-naftol, N,N'-metilen-bis-acrilamida, agarosa grado DNA (ultra pura), TEMED y urea se obtuvieron de Bio-Rad Laboratories, Richmond, USA.

Agarosa NuSieve GTG grado tecnología genética se obtuvo de FMC BioProducts, Rockland, USA.

Bolsas de diálisis de 12.000-14.000 Dalton de corte se obtuvieron de VWR Scientific Inc., Los Angeles, USA.

CH<sub>3</sub>COOH glacial se obtuvo de Riedel-de Haën, Seelze.

IPTG, ligasa del DNA de T4 (1U/μl) y tampón de ligasa 10x, kit de purificación de DNA "USBioclean MP", X-Gal y kit de secuenciación de DNA "Sequenase Version 2.0" se obtuvieron de United States Biochemical Corporation, Cleveland, USA.

Anticuerpos de burro anti IgG de conejo biotinilados, estreptavidina biotinilada conjugada a peroxidasa, membrana de nylon Hybond-N, solución Amplify y [α-<sup>35</sup>S]dATP (actividad específica de 1.000 Ci/mmol) se obtuvieron de Amersham Life Science, Buckinghamshire, England.

Tris ultra puro y membrana de nitrocelulosa se obtuvieron de Gibco BRL.

Papel 3MM se obtuvo de Whatman.

Películas de radiografía RX se obtuvieron de Fuji Photo Film Co., Ltd., Japan.

CIAP (1U/ $\mu$ l) y tampón de CIAP 10x, dATP 100 mM, dCTP 100 mM, dGTP 100 mM, DNA del fago lambda (0,55 mg/ml), dTTP 100 mM, DNA polimerasa Taq (5U/ $\mu$ l),  $MgCl_2$  (25 mM) y tampón de DNA polimerasa Taq 10x se obtuvieron de Promega, Madison, USA.

El kit no radiactivo de marcación y detección de DNA "DIG DNA" se obtuvo de Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany.

$[^{35}S]$ metionina 70 % /  $[^{35}S]$ cisteína 25 % (actividad específica de 1.190 Ci/mmol) se obtuvo de ARC Inc., St. Louis, USA.

### 3. MÉTODOS

#### 3.1. MEDIOS DE CULTIVO

##### 3.1.1. Medio LB

Contiene 1 % de Bacto triptona, 0,5 % de Bacto extracto de levadura y 0,5 % de NaCl. Se ajusta a pH 7,0 con NaOH y se esteriliza en autoclave a 20 libras/pulg<sup>2</sup> y a 120°C por 20 min (Titus, 1991).

##### 3.1.2. Medio Líquido Mackintosh Modificado

Se realizó según Mackintosh (1978) con modificaciones. El medio contiene por litro: 132 mg de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ; 27,2 mg de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 45,6 mg de  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 147 mg de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; 0,1 mg de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 0,07 mg de  $\text{ZnCl}_2$ ; 0,12 mg de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 0,031 mg de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ; 0,0852 mg de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y 30 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ .

El medio se prepara mezclando 900 ml de solución Mackintosh con 100 ml de solución concentrada de sulfato ferroso. La solución Mackintosh se prepara diluyendo 20 ml de solución Mackintosh concentrada con 880 ml de agua bidestilada, y se esteriliza en autoclave a 20 libras/pulg<sup>2</sup> y a 120° C por 20 min. La solución Mackintosh concentrada se

prepara mezclando 300 ml de solución D, con 200 ml de solución E y 500 ml de solución F, y se esteriliza de inmediato en autoclave. La solución D se prepara con 6,61 g de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  y 26,65 ml de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  en 300 ml de agua bidestilada. La solución E se prepara con 1,361 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  en 200 ml de agua bidestilada. La solución F se preparó con 1,27 g de  $\text{MgCl}_2 \cdot \text{xH}_2\text{O}$ ; 7,35 g de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y 50 ml de solución trazas en 500 ml de agua bidestilada. La solución trazas se preparó disolviendo por litro 100 mg de  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; 70 mg de  $\text{ZnCl}_2$ ; 120 mg de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ; 31 mg de  $\text{H}_3\text{BO}_3$  y 85,2 mg de  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; y luego se esteriliza por filtración. La solución concentrada de sulfato ferroso se preparó disolviendo 30 g de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  en 1 l de agua bidestilada, ajustando pH a 1,4 con  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y esterilizando por filtración.

### 3.1.3. Medio S30

Por litro contiene 56 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 378 g de  $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ; 10 g de Bacto extracto de levadura y 15 mg de tiamina. En el momento de usar se agregan 320 ml de solución autoclavada de glucosa al 25 % y 40 ml de solución autoclavada de  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$  0,1 M (Pratt, 1985).

### 3.1.4. Medio Triptona

Contiene 1 % de Bacto triptona y 0,5 % de NaCl (Tisa y Adler, 1995).

## **3.2. SOLUCIONES**

### **3.2.1. Solución TE**

Contiene EDTA 1 mM y Tris-HCl 10 mM, pH 8,0.

### **3.2.2. Solución I**

Contiene EDTA 10 mM; glucosa 50 mM y Tris-HCl 25 mM, pH 8,0.

### **3.2.3. Solución II**

Contiene NaOH 0,2 N y SDS 1 %.

### **3.2.4. Solución III**

Contiene 3 M con respecto al potasio y 5 M con respecto al acetato. Se prepara con 60 ml de  $\text{CH}_3\text{COOK}$  5 M; 11,5 ml de  $\text{CH}_3\text{COOH}$  glacial y 28,5 ml de agua bidestilada.

### **3.2.5. Solución de Muestra para DNA 6x**

Contiene azul de bromofenol 0,25 % y sacarosa 40 %.

### **3.2.6. Solución Desnaturalizante**

Contiene NaCl 1,5 M y NaOH 0,5 N.

### **3.2.7. Solución Neutralizante**

Contiene NaCl 1,5 M y Tris-HCl 1 M, pH 7,4.

### **3.2.8. Solución SSC 10x**

Contiene NaCl 1,5 M y citrato de sodio 0,15 M, pH 7,0.

### **3.2.9. Solución de Muestra para Proteínas 2x**

Contiene azul de bromofenol 0,002 %; SDS 4 %; glicerol 20 %; 2-mercaptoetanol 10 % y Tris-HCl 125 mM, pH 6,8.

### **3.2.10. Solución de Tinción**

Contiene azul brillante de Coomassie R-250 0,2 %; metanol 50 % y ácido acético 7 %.

### **3.2.11. Solución de Desteñido**

Contiene metanol 20 % y ácido acético 10%.

### **3.2.12. Solución Reveladora**

Contiene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,013 %; metanol 28 %; NaCl 107 mM y Tris-HCl 14 mM, pH 7,4.

## **3.3. TAMPONES**

### **3.3.1. Tampón TBE 0,5x**

Contiene EDTA 1 mM y Tris-borato 45 mM, pH 8,0.



### **3.3.2. Tampón de Hibridación**

Contiene N-lauril-sarcosinato de sodio 0,1 %; SDS 0,02 %, reactivo bloqueador proveniente del kit no radiactivo de marcación y detección de DNA "DIG DNA" al 1%; NaCl 0,75 M y citrato de sodio 75 mM, pH 7,0.

### **3.3.3. Tampón 1**

Contiene NaCl 0,15 M y ácido maleico 0,1 M, pH 7,5.

### **3.3.4. Tampón 2**

Contiene NaCl 100 mM; MgCl<sub>2</sub> 50 mM y Tris-HCl 100 mM, pH 9,5.

### **3.3.5. Tampón de Competencia**

Contiene CaCl<sub>2</sub> 100 mM; MgCl<sub>2</sub> 70 mM y CH<sub>3</sub>COONa 40 mM, pH 5,5.

### **3.3.6. Tampón de Electroforesis**

Contiene SDS 0,1 %; glicina 190 mM y Tris 25 mM, pH 8,8.

### **3.3.7. Tampón de Transferencia**

Contiene SDS 0,1 %; glicina 190 mM; metanol 20 % y Tris 25 mM, pH 8,8;

### 3.3.8. Tampón TBS

Contiene NaCl 150 mM y Tris-HCl 20 mM, pH 7,4.

### 3.3.9. Tampón A

Contiene glicerol 10 %; EDTA 5 mM; 1,10-fenantrolina 5 mM; PMSF 2 mM; sal sódica de PHMB 300  $\mu$ M; leupeptin 1  $\mu$ M; pepstatina A 1  $\mu$ M y fosfato de sodio 0,1 M, pH 7,2.

### 3.3.10. Tampón B

Contiene KCl 2 M; glicerol 10 %; EDTA 5 mM; 1,10-fenantrolina 3 mM; PMSF 1 mM; sal sódica de PHMB 100  $\mu$ M; leupeptin 1  $\mu$ M; pepstatina A 1  $\mu$ M y fosfato de sodio 50 mM, pH 7,2.

### 3.3.11. Tampón C

Contiene leupeptin 1  $\mu$ M, pepstatina A 1  $\mu$ M y Tris-HCl 50 mM, pH 7,2.

### 3.3.12. Tampón S30

Contiene  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$  14 mM;  $\text{CH}_3\text{COOK}$  60 mM; DTT 1 mM y Tris-acetato 10 mM, pH 8,2.

### 3.3.13. Tampón de Inmunoprecipitación 4x

Contiene Tritón X-100 4 %; NaCl 2 M y Tris-HCl 200 mM, pH 7,4.

## 3.4. MEZCLAS

### 3.4.1. Mezcla de Preincubación

Contiene Piruvato quinasa 6,7 U/ml;  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$  9,2 mM; ATP 13,2 mM; fosfoenol piruvato 84 mM; DTT 4,4 mM; mezcla A de aminoácidos 40  $\mu\text{M}$  y Tris-acetato 300 mM, pH 8,2.

### 3.4.2. Mezcla A de Aminoácidos

Contiene en mg por ml: 4,4 de alanina; 10,6 de arginina HCl; 6,6 de asparragina; 6,6 de ácido aspártico; 6 de cisteína; 7,4 de ácido glutámico; 7,4 de glutamina; 4,8 de glicina; 9,6 de histidina HCl; 6,6 de isoleucina; 6,6 de leucina; 9,2 de lisina; 7,4 de metionina; 6,2 de fenilalanina; 5,8 de prolina; 5,2 de serina; 6 de treonina; 10,2 de triptófano; 9 de tirosina y 5,8 de valina.

### 3.4.3. Mezcla LM

Contiene DTT 7 mM; ATP 4,9 mM; CTP 3,4 mM; GTP 3,4 mM; UTP 3,4 mM; fosfoenol piruvato 89,2 mM; mezcla B de aminoácidos 0,35 mM; PEG-6000 7,7 %; ácido folínico 138,5  $\mu\text{g/ml}$ ; 3',5'- $\gamma$ -AMP 2,6 mM; tRNA 669,2  $\mu\text{g/ml}$ ;  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  144 mM;

CH<sub>3</sub>COOK 288 mM; (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Ca 39 mM y Tris-acetato 226 mM, pH 8,2.

#### 3.4.4. Mezcla B de Aminoácidos

Contiene en mg por ml: 5 de alanina; 11,6 de arginina HCl; 7,2 de asparragina; 7,4 de ácido aspártico; 6,6 de cisteína; 8,2 de ácido glutámico; 8 de glutamina; 4,2 de glicina; 10,6 de histidina HCl; 7,2 de isoleucina; 7,2 de leucina; 10 de lisina; 6,8 de fenilalanina; 6,4 de prolina; 5,8 de serina; 6,6 de treonina; 11,2 de triptófano; 10 de tirosina y 6,4 de valina.

### 3.5. CRECIMIENTO DE BACTERIAS

#### 3.5.1. *Escherichia coli*

Las cepas de *E. coli* se crecieron con aproximadamente 180 rpm de agitación orbital a 37°C en medio líquido LB, salvo que se indique lo contrario.

El crecimiento en medio sólido se realizó en placas con medio LB adicionado con agar BiTek™ al 1,5 %.

Cuando se requirió seleccionar bacterias resistentes a ampicilina, el antibiótico se adicionó al medio en una concentración final de 100 µg/ml.

Las cepas se mantuvieron indefinidamente a -80°C en medio líquido LB con glicerol al 15%, o por varios meses como colonias aisladas en placas de LB a 4°C.

### **3.5.2. *Leptospirillum ferrooxidans***

*L. ferrooxidans* se creció con aproximadamente 130 rpm de agitación orbital a 30°C en medio líquido Mackintosh modificado (Mackintosh, 1978).

Para crecer gran cantidad de células, se inocularon 13 l del medio Mackintosh y se incubó a 30°C con aireación constante por medio de un burbujeador de aire. Se creció en estas condiciones por 5-6 días.

## **3.6. CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS**

Las bacterias se contaron bajo microscopio óptico de contraste de fases en una cámara de Petroff-Hausser. El número de bacterias contenidas en un recuadro grande de la cámara se multiplicó por un factor de  $1,25 \times 10^6$ , determinando el número de bacterias por ml. Cada determinación se hizo en triplicado para calcular un valor promedio.

## **3.7. ENSAYO DE QUIMIOTAXIS**

La capacidad quimiotáctica de las distintas cepas de *E. coli*, transformadas o no con plasmidios, se midió usando placas de agar blando. En este ensayo, las bacterias migran en respuesta a un gradiente de aminoácidos creado por el metabolismo, generando halos de

crecimiento (Tisa y Adler, 1995).

Se utilizaron placas de medio triptona/agar blando que contenían medio triptona adicionado con 0,3 % de agar BīTek™.

Las células se crecieron en medio triptona líquido (adicionado con ampicilina para crecer las cepas resistentes al antibiótico) hasta la mitad de la fase exponencial del crecimiento. Alícuotas de este cultivo (2 µl) se inocularon suavemente en la superficie del agar blando, en el centro de cada placa, como lo describen Wolfe y col. (1994). Luego, las placas se incubaron a 31°C en ambiente húmedo y el halo de crecimiento se midió a las 40 h. Cada ensayo se realizó en duplicado.

### 3.8. PREPARACIÓN DE DNA CROMOSOMAL

El DNA cromosomal se preparó en base al método descrito por Engström y col. (1983) con algunas modificaciones.

Las bacterias se crecieron en el medio adecuado (13 l para *L. ferrooxidans* y 1,5 l para *E. coli*) y luego se colectaron centrifugándolas a 10.000 x g, por 10 min en el caso de *E. coli* y por 30 min en el caso de *L. ferrooxidans*. La jarosita generada en el cultivo de *L. ferrooxidans* se eliminó centrifugando varias veces a 1.000 x g por 1 min y luego se lavaron las células tres veces con solución I para alcalinizarlas.

Las células se resuspendieron en 3 ml de la solución I, se agregó lisozima a una concentración final de 2 mg/ml y se incubó 45 min en hielo y luego 10 min a 37°C. Se agregó proteinasa K a una concentración final de 190 µg/ml y SDS a una concentración final de 0,125 %. Luego se incubó por 10 min a 37°C y la solución viscosa que se formó se incubó 30 min en hielo. Se agregaron 4,5 ml de solución TE y se extrajo el DNA con 1 volumen de mezcla fenol/cloroformo (1:1) para lo que se agitó el tubo por 30 min. Luego se centrifugó a 12.000 x g por 5 min para separar las dos fases, y se recuperó la fase acuosa (superior) que contiene el DNA. La extracción se realizó dos veces más, pero agitando sólo por 15 min antes de centrifugar. La fase acuosa resultante se transfirió a un tubo limpio y se agregó suficiente CH<sub>3</sub>COOK 5 M para dar una concentración final de 0,2 M. Se agregaron 2 volúmenes de etanol frío y se dejó precipitando toda la noche a -20°C. Luego se centrifugó a 19.000 x g por 10 min y el precipitado se resuspendió en 10 ml de solución TE. Se adicionó ribonucleasa A a una concentración final de 100 µg/ml y se incubó por 3 h a 37°C. Luego se realizaron dos extracciones del DNA con 1 volumen de fenol/cloroformo (1:1), agitando sólo por 5 min antes de centrifugar. La fase superior que lleva el DNA se transfirió a un tubo limpio y se agregó suficiente CH<sub>3</sub>COOK 5 M para dar una concentración final de 0,2 M. Se agregaron 2 volúmenes de etanol frío y se dejó precipitando toda la noche a -20°C. Luego se centrifugó a 19.000 x g por 10 min y el DNA genómico precipitado se resuspendió en 1 ml de solución TE. Se determinó la concentración del DNA como se describe más adelante, y se guardó a -20°C en alícuotas.

### **3.9. ESTIMACIÓN DE LA CANTIDAD DE DNA**

Se utilizó un método espectrofotométrico que mide la cantidad de irradiación ultravioleta absorbida por las bases (Sambrook y col., 1989). La lectura a 260 nm permite estimar la concentración de ácido nucleico en la muestra, considerando que una absorbancia de 1 corresponde a aproximadamente 50 µg/ml de DNA de doble hebra. La razón entre las lecturas a 260 y a 280 nm da una estimación de la pureza del ácido nucleico, pues preparaciones puras de DNA tienen un valor de  $A_{260}/A_{280}$  de 1,8. Si existe contaminación con proteínas o fenol, el valor de dicha razón es menor y no es posible hacer una exacta estimación de la cantidad del ácido nucleico.

### **3.10. PREPARACIÓN DE DNA PLASMIDIAL**

#### **3.10.1. Preparación en Pequeña Escala**

Para preparar rápidamente y en pequeña escala el DNA plasmidial, se utilizó el método de lisis alcalina detallado en Sambrook y col. (1989). Se creció por toda la noche una colonia en 5 ml de medio LB suplementado con ampicilina. Se colectaron las células centrifugándolas a 12.000 x g por 10 min a 4°C y el sobrenadante se removió por aspiración. Las bacterias se resuspendieron en 100 µl de solución I fría adicionada en el momento de usar con 0,5 mg de lisozima. La mezcla se incubó a 37°C por 20 min y luego se agregaron 200 µl de solución II recién preparada. Se mezcló invirtiendo el tubo 3-5 veces sin utilizar



vortex, y se incubó en hielo por 5 min. Después se agregaron 150  $\mu$ l de solución III fría, se mezcló suavemente por 10 segundos y se incubó en hielo por 5 min. Luego se centrifugó por 10 min a 17.000 x g a 4°C y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio y se realizó una extracción con fenol/cloroformo (1:1) agregando un volumen de dicha mezcla, agitando en vortex por 30 seg y centrifugando por 2 min a 12.000 x g a temperatura ambiente. A la fase acuosa (superior) se agregaron 2 volúmenes de etanol frío. Se mezcló agitando en vortex, y se incubó en hielo por 15 min. Se centrifugó a 17.000 x g por 10 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. El DNA precipitado se lavó con 1 ml de etanol 70% frío, se centrifugó a 17.000 x g por 10 min a 4°C y finalmente se resuspendió en 50  $\mu$ l de solución TE. Se adicionaron 2  $\mu$ l de ribonucleasa A (10 mg/ml) y se incubó a 37°C por 30 min. El DNA plasmidial así preparado se mantuvo a 4°C hasta ser utilizado.

### **3.10.2. Preparación en Gran Escala**

La preparación de DNA plasmidial en gran escala se realizó con modificaciones del protocolo descrito para la preparación en pequeña escala detallado en 3.10.1.

Una colonia se inoculó en 5 ml de medio LB suplementado con ampicilina y se incubó por toda la noche a 37°C. Luego, con este cultivo se inoculó 1 l de medio LB adicionado de ampicilina y se incubó agitando orbitalmente (aproximadamente a 180 rpm) por 5-6 h. En seguida, se agregó cloramfenicol a una concentración final de 170  $\mu$ g/ml y se continuó la incubación por toda la noche. Luego se colectaron las células centrifugando a 10.000 x g por 10 min, se resuspendieron en 20 ml de solución I y se agregaron 100 mg de

lisozima para dar una concentración final de 5 mg/ml. Se mezcló suavemente y se agregaron 40 ml de solución II recién preparada. Se mezcló suavemente y se incubó 10 min en hielo. Se agregaron 15 ml de solución III fría, se mezcló suavemente y luego se centrifugó por 30 min a 18.000 x g a 4°C. Al sobrenadante obtenido se agregaron 2 volúmenes de etanol 95% frío, se mezcló y se dejó en hielo por 10 min. Se centrifugó a 10.000 x g por 20 min a 4°C y el precipitado se resuspendió en 40 ml de solución TE. Se agregó suficiente  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  en polvo, para dar una concentración final de 2,5 M, se mezcló, se incubó en hielo por 10 min y se centrifugó a 10.000 x g por 15 min a 4°C. Luego de medir el volumen del sobrenadante recuperado que contenía el DNA, se agregaron 2 volúmenes de etanol 95 % frío, se mezcló y se incubó en hielo por 10 min. Se centrifugó a 10.000 x g por 15 min a 4°C y el líquido remanente sobre el DNA precipitado se dejó escurrir invirtiendo el tubo sobre un trozo de papel. Finalmente, el DNA se resuspendió en 8 ml de solución TE adicionada de 0,05 M de NaCl. El DNA plasmidial así preparado se guardó a 4°C hasta ser purificado por gradiente de cloruro de Cesio.

### **3.11. PURIFICACIÓN DE DNA PLASMIDIAL POR GRADIENTE DE CLORURO DE CESIO**

El DNA plasmidial preparado en gran escala fue purificado por gradiente de cloruro de Cesio, realizando algunas modificaciones al método descrito en Sambrook y col. (1989).

A 8 ml de DNA plasmidial en solución TE con NaCl 0,05 M, se agregaron 8 g de CsCl y 640 µl de solución de bromuro de etidio (10 mg/ml). Una vez disuelto el CsCl se sometió la mezcla a ultracentrifugación a 197.000 x g con el rotor T-875 en una ultracentrífuga Sorvall modelo OTD Combi, por 48 h a 14-17°C. Luego, las bandas de DNA plasmidial se identificaron iluminando el tubo con luz ultravioleta, y se extrajeron succionándolas con una pipeta Pasteur. Posteriormente, el bromuro de etidio se eliminó por extracción con alcohol isoamílico. Para ello se agregaron 2 volúmenes de alcohol isoamílico, se mezcló por inversión, y se centrifugó a 1.000 x g por 3 min a temperatura ambiente, descartando la fase orgánica (superior) que se vuelve rosada al llevar disuelto el bromuro de etidio. Estas extracciones se repitieron cuantas veces fue necesario para que la solución de DNA quedara totalmente incolora, lo que indica que se retiró totalmente el bromuro de etidio. Para remover el CsCl de la solución, ésta se dializó por 24 h en bolsas de diálisis con un tamaño de corte de 12.000-14.000 Daltons, contra 100 volúmenes de solución TE a 4°C. Luego, se precipitó el DNA agregando suficiente cantidad de CH<sub>3</sub>COONa para alcanzar una concentración final de 0,1 M y 2 volúmenes de etanol frío. Se incubó a -20°C por 1 h, se centrifugó a 10.000 x g por 15 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. El DNA precipitado se resuspendió en 2 ml de solución TE y se repitió la precipitación en presencia de CH<sub>3</sub>COONa 0,1 M. Finalmente, se centrifugó a 10.000 x g por 25 min a 4°C y se descartó el sobrenadante. El DNA plasmidial precipitado se secó al vacío, se resuspendió en 500 µl de solución TE, y se cuantificó midiendo su absorbancia a 260 nm como ya se describió. Este DNA plasmidial purificado se mantuvo estable por varios meses a 4°C.

### **3.12. DIGESTIÓN DE DNA CON ENZIMAS DE RESTRICCIÓN**

Las digestiones de DNA cromosomal o plasmidial se realizaron de acuerdo a lo indicado por los proveedores de cada enzima. Según el tipo de experimento a realizar, se digirieron entre 1 y 15  $\mu\text{g}$  de DNA en un volumen de reacción de 50 ó 100  $\mu\text{l}$ , que llevan 10% del tampón 10x indicado para cada enzima y 3-5 unidades de enzima por  $\mu\text{g}$  de DNA. Luego se incubó a 37°C, por toda la noche para asegurar una digestión completa. Para visualizar los productos generados por cada digestión enzimática, se realizó una separación electroforética en geles de agarosa.

### **3.13. ELECTROFORESIS DE DNA EN GELES DE AGAROSA**

Para visualizar DNA plasmidial o cromosomal, ya sea íntegro o digerido con enzimas de restricción, así como productos de amplificación por PCR, se utilizaron geles de agarosa. Los geles se prepararon en tampón TBE 0,5x y fueron: al 0,8 % de agarosa ultra pura para separar moléculas de 0,6 a 9 kpb; y al 2 % de agarosa NuSieve GTG más 0,5 % de agarosa ultra pura, para separar fragmentos más pequeños, de 60 a 1.000 pb, como los que se generaron en reacciones de amplificación por PCR. El tampón de electroforesis fue TBE 0,5x. La muestra de DNA se mezcló con una solución de muestra para DNA 6x, se colocó en el bolsillo del gel, y se aplicó una diferencia de potencial de 5 Volt/cm hasta que el

colorante indicador migró una distancia apropiada. El gel se sumergió por 1 h en una solución de bromuro de etidio 0,5 µg/ml y las bandas de DNA se visualizaron por la fluorescencia emitida al irradiar con luz ultravioleta (Sambrook y col., 1989).

### **3.14. EXTRACCIÓN Y PURIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE DNA DESDE GELES DE AGAROSA**

Para purificar fragmentos de DNA, generados ya sea por digestiones con enzimas de restricción o por amplificación por PCR, se empleó electroforesis en geles de agarosa. Después de someter los geles a tinción con bromuro de etidio, se identificó la banda o la región de bandas de interés y con una hoja de bisturí se cortó el trozo de agarosa que la contenía. Desde el trozo de agarosa, el DNA se purificó utilizando el kit de purificación de DNA "USBioclean MP", que permite recuperar aproximadamente un 80% del material de partida. Básicamente consiste en disolver la agarosa a 55°C en presencia de NaI 4 M. Luego se baja la temperatura a 0°C para que las moléculas de DNA se adhieran a una suspensión de bolitas de vidrio. Se lavan las bolitas de vidrio y finalmente se eluye el DNA adherido a ellas incubando a 55°C en presencia de agua bidestilada estéril. Los fragmentos de DNA así purificados se ligaron con un vector para generar plasmidios recombinantes, se utilizaron como templados en amplificaciones por PCR o se utilizaron como sondas en ensayos de hibridación.

### 3.15. AMPLIFICACIÓN DE DNA POR LA REACCIÓN DE LA POLIMERASA EN CADENA

Para amplificar un fragmento de DNA, se realizó la reacción de la polimerasa en cadena (PCR), utilizando oligonucleótidos de 18 meros como partidores de la reacción.

Cada reacción de amplificación contenía en un volumen final de 50  $\mu$ l, los siguientes componentes: como templado 2  $\mu$ g de DNA cromosomal ó 100 pg de DNA plasmidial o de un fragmento de DNA; 25 pmoles de cada uno de los dos partidores; 100  $\mu$ M de cada desoxinucleótido (dATP, dCTP, dGTP y dTTP); 2,5 mM de  $MgCl_2$ ; 0,25 unidades de DNA polimerasa taq; y 10 % del tampón de DNA polimerasa taq 10x. Sobre la mezcla de reacción se agregó una gota de aceite mineral, para evitar evaporación y se realizó la reacción de polimerización en un termociclador Perkin Elmer de acuerdo al siguiente protocolo:

- 1 ciclo de 10 min a 95°C para desnaturalizar el DNA.
- 30 ciclos de: 1 min a 94°C para desnaturalizar el DNA, 1 min a la temperatura de alineamiento, y 1 min a 72°C para permitir la polimerización.
- 1 ciclo de 10 min a 72°C para completar la elongación de todos los fragmentos.

La temperatura de alineamiento se definió empíricamente en un rango cercano a las  $T_m$  de los partidores, que se calcularon de la siguiente forma:

$$T_m = 2(A + T) + 4(G + C).$$

Luego de realizada la reacción, los tubos se mantuvieron a  $-20^{\circ}\text{C}$  por 30 min para congelar la solución y así eliminar el aceite mineral por succión. Para analizar los productos de la amplificación, se agregó suficiente tampón de muestra, y se realizó una separación electroforética en geles de agarosa al 2,5 %, como se describió anteriormente.

### **3.16. MARCACIÓN DE SONDAS CON DIGOXIGENINA UTILIZANDO PCR**

Las sondas marcadas con digoxigenina se prepararon amplificando un fragmento de DNA por PCR. Para ello se utilizaron dos partidores específicos en presencia de los cuatro desoxinucleótidos y de dUTP-Dig.

Cada reacción de amplificación se realizó como ya se describió, sólo que se utilizaron los desoxinucleótidos en las siguientes concentraciones: dATP 80  $\mu\text{M}$ , dCTP 80  $\mu\text{M}$ , dGTP 80  $\mu\text{M}$ , dTTP 52  $\mu\text{M}$  y dUTP-Digoxigenina 28  $\mu\text{M}$  (mezcla proveniente del kit no radiactivo de marcación y detección de DNA "DIG DNA").

Los fragmentos amplificados se separaron en geles de agarosa al 2,5 % y luego se purificó la banda de interés por el método ya descrito (utilizando el kit "USBioclean MP"). Se probó la marcación de la sonda aplicando 1  $\mu\text{l}$  de una serie de diluciones de ella (1/10, 1/100 y 1/1000) sobre un trozo de membrana de nylon. Luego, se fijó el DNA con luz ultravioleta y se realizó la detección inmunológica de los productos que contienen digoxigenina, del mismo modo como se describe en 3.17.3.

### **3.17. HIBRIDACIÓN DEL TIPO "SOUTHERN-BLOT"**

#### **3.17.1. Transferencia de DNA desde Geles de Agarosa hacia Membranas de Nylon**

Los fragmentos de DNA obtenidos por digestión con enzimas de restricción y separados electroforéticamente, se transfirieron a una membrana de nylon utilizando el método descrito por Southern (1975), y que comúnmente se denomina "Southern-blot". Para esto, el DNA fue desnaturalizado sumergiendo el gel de agarosa en solución desnaturalizante por 45 min con agitación constante, y luego fue neutralizado sumergiendo el gel por 45 min en solución neutralizante con agitación constante y con un cambio de solución a los 30 min.

Para montar el sistema de transferencia capilar, se colocó una placa Petri invertida sobre un recipiente que contenía solución SSC 10x y sobre la placa se ubicó un trozo de papel Whatman 3MM del ancho del gel y de un largo mucho mayor de manera que ambos extremos del papel quedaran sumergidos en la solución. Cuando este papel estuvo totalmente húmedo, sobre él se ubicó el gel de manera que la que fue su cara superior estuviera en directo contacto con el papel. Sobre el gel se ubicó una membrana de nylon (Hybond-N) del mismo tamaño, se eliminaron las burbujas y sobre la membrana se ubicaron dos trozos de papel 3MM del mismo tamaño. Se cubrió toda la superficie del recipiente con un plástico transparente, cortando con bisturí el espacio correspondiente al gel. Así, directamente sobre el gel estaba la membrana de nylon, los papeles 3MM y luego se colocaron servilletas de papel absorbente en cantidad suficiente para dar una altura de 5-8 cm. Sobre ellas se colocó un peso de aproximadamente 500 g. Este sistema permite que el



líquido del recipiente fluya por capilaridad a través del gel y de la membrana de nylon, y así los fragmentos de DNA desnaturalizados sean eluidos del gel y luego depositados en la membrana. Se mantuvo en estas condiciones por 15-24 h, reemplazando las servilletas cuando se encontraban húmedas. Al finalizar la transferencia, se volteó el gel con la membrana para marcar en esta las posiciones correspondientes a los pocillos del gel. La membrana se lavó con solución SSC 6x por 5 min para remover trozos de agarosa y luego se dejó secar sobre un trozo de papel 3MM por 30 min a temperatura ambiente.

Una vez seca la membrana, el DNA se fijó a ella irradiando con lámpara de luz ultravioleta (254 nm de longitud de onda) por 3 min a una distancia aproximada de 10 cm. La membrana de nylon con el DNA así fijado se guardó en una bolsa plástica a temperatura ambiente hasta realizar la hibridación.

### **3.17.2. Hibridación de DNA**

La hibridación del DNA fijado a la membrana de nylon se realizó como lo describe el kit no radiactivo de marcación y detección de DNA "DIG DNA". La membrana fue prehibridada por 6-12 h con el tampón de hibridación a la temperatura elegida para la hibridación. Esto se realizó dentro de una bolsa de plástico que se selló y se sumergió en un baño a temperatura. Luego se eliminó la solución y se agregaron 2-3 ml de solución de hibridación fresca conteniendo la sonda marcada que previamente fue desnaturalizada a 90°C por 10 min y enfriada en hielo por 5 min. Se selló la bolsa y se realizó la hibridación incubando por 12-24 h a la temperatura elegida.

Al finalizar la hibridación, la solución que contenía la sonda se retiró y se guardó a -20°C pues se puede reutilizar unas 5 veces. La membrana se lavó 2 veces con solución SSC 2x/SDS 0,1 % por 5 min a temperatura ambiente y luego 2 veces con solución SSC 0,1x/SDS 0,1 % por 15 min a la temperatura de hibridación. La membrana se secó y se guardó a temperatura ambiente o se sometió inmediatamente a la detección inmunológica.

### **3.17.3. Detección Inmunológica de DNA**

La detección inmunológica de la sonda marcada con dUTP-Digoxigenina hibridada a un DNA determinado, se realizó como se describe en el kit no radiactivo de marcación y detección "DIG DNA". La membrana ya hibridada se bloqueó incubando por 30 min con 1 % del reactivo bloqueador (proveniente del kit) en tampón 1, y luego se incubó por 2 h con el anticuerpo anti digoxigenina conjugado a peroxidasa diluído 1/5.000 en tampón 1 adicionado con 1 % del reactivo bloqueador. La membrana se lavó dos veces con tampón 1 por 15 min y una vez con tampón 2 por 2 min. Luego se incubó en la oscuridad con los sustratos de la enzima: NBT 338 µg/ml y X-fosfato 175 µg/ml en tampón 2. La reacción se detuvo lavando con solución TE cuando se observó una coloración adecuada en las regiones de hibridación, y la membrana se dejó secar en la oscuridad.

Para rehibridar una membrana con una sonda diferente o con la misma pero en distintas condiciones, primero se retiró el precipitado de color lavándola con N,N-dimetilformamida a 60°C hasta que desapareciera el color y luego se lavó vigorosamente con agua bidestilada estéril. Para eliminar la sonda que hibridó al DNA, se

incubó la membrana con una solución que contenía NaOH 0,2 N y SDS 0,1 % por 30 min a 37°C. Finalmente, la membrana se lavó con una solución SSC 2x por 5 min y estuvo lista para volver a ser hibridada.

### **3.18. CLONAMIENTO DE FRAGMENTOS DE DNA**

#### **3.18.1. Digestión y Desfosforilación del Vector**

La digestión y desfosforilación del vector se realizó como describe Titus (1991). Para generar extremos cohesivos compatibles con los extremos del fragmento de DNA que se desea clonar, el DNA del vector fue digerido con la misma enzima de restricción con que se obtuvo dicho fragmento. Para esto, se digirieron 10 µg del DNA plasmidial en un vol de 100 µl, como se describió anteriormente.

Luego el DNA se trató con la enzima CIAP para remover los grupos 5'-fosfato y así evitar la recircularización del vector durante la ligación. Para ello, al DNA digerido se agregaron 0,01 unidades de CIAP por pmol de extremo de DNA, 20 µl del tampón de CIAP 10x, y agua bidestilada hasta completar 200 µl de volumen. Se incubó a 37°C por 60 min y se detuvo la reacción agregando 2 µl de EDTA 0,5 M.

Debido a que la CIAP puede interferir con la eficiencia de ligación y de transformación, se la removió agregando 1 volumen de fenol/cloroformo (1:1), agitando en vortex por 1 min y luego centrifugando a 12.000 x g por 2 min. A la fase acuosa (superior) se agregó 1 volumen de cloroformo/alcohol isoamílico (24:1), se agitó en vortex por 1 min y

luego se centrifugó a 12.000 x g por 2 min. A la fase acuosa (superior) se agregaron 0,5 volúmenes de  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  7,5 M y 2 volúmenes de etanol, y se mantuvo a  $-20^\circ\text{C}$  por 2 h. Luego se centrifugó a 12.000 x g por 5 min, se descartó el sobrenadante, y el DNA precipitado se lavó con 1 ml de etanol 70 %, se secó brevemente en un desecador al vacío y finalmente se resuspendió en 45  $\mu\text{l}$  de agua bidestilada. La concentración del DNA se estimó por comparación de la intensidad de la banda fluorescente de la muestra con aquella de cantidades conocidas de DNA. Para ello se realizó una separación electroforética en geles de agarosa y visualización de fluorescencia mediante tinción con bromuro de etidio.

### **3.18.2. Ligación del Vector con el Fragmento de DNA a Clonar**

Las reacciones de ligación se realizaron según Titus (1991). En ellas se utilizó el vector preparado como se describe en 3.18.1. y el inserto como se describe en 3.14. Se buscó la óptima razón entre vector e inserto, para lo que se realizaron reacciones de ligación con distintas razones molares de ellos (1:1, 1:3 y 3:1). Cada reacción de ligación contenía 100 ng de DNA del vector, cantidad variable de DNA del inserto (según la razón utilizada), 1 unidad de la enzima ligasa de DNA de T4 y 1  $\mu\text{l}$  del tampón correspondiente 10x, en un volumen total de 10  $\mu\text{l}$  que se completó con agua bidestilada. Se incubó a  $4^\circ\text{C}$  por toda la noche y luego se utilizaron estas mezclas de ligación para realizar la transformación de células competentes.

### 3.18.3. Preparación de Células Competentes

La transformación de células con un plasmidio requiere hacer competentes a las células, es decir hacerlas aptas para ser transformadas con un DNA foráneo. Para realizar esto, se modificó un protocolo ya descrito (Titus, 1991) que consistió en cultivar toda la noche a 37°C las bacterias provenientes de una colonia de *E. coli* en 5 ml de medio LB. Luego se inoculó 500 µl de este cultivo sobre 50 ml de medio LB en un matraz que fue agitado vigorosamente a 37°C. Se controló el crecimiento leyendo  $A_{600}$  cada 30 min y cuando ésta llegó a 0,45-0,55 se retiró el matraz del baño y se mantuvo en hielo por 2 h. Luego se colectaron las células por centrifugación a 2.500 x g por 20 min a 4°C, y se resuspendieron en 3 ml de tampón de competencia frío preparado fresco y esterilizado por filtración. Luego se diluyeron a 50 ml con el mismo tampón frío y se mantuvieron 45 min en hielo. Se centrifugaron a 1.800 x g por 10 min a 4°C y se resuspendieron suavemente en 5 ml del mismo tampón frío. Las células competentes así preparadas se guardaron a 4°C y se utilizaron 24 h después, pues así se logra la mayor eficiencia de transformación.

### 3.18.4. Transformación de Células Competentes

Las reacciones de transformación se realizaron de acuerdo a Titus (1991) con modificaciones menores. Para ello, se incubaron 100 µl de células competentes (preparadas el día anterior) en presencia de 50 ng de DNA plasmidial por 30 min en hielo. Se sometieron a un estrés térmico de 42°C por 1 min para aumentar la eficiencia de transformación y luego se enfriaron en hielo por un min. Se agregaron 900 µl de medio LB y

se incubaron a 37°C por 1 h con agitación orbital (aproximadamente 180 rpm), para lograr la recuperación de las células. Luego se procedió a inocular 100 y 200 µl de cada mezcla de transformación, en placas de medio LB adicionado con ampicilina. Cuando se transformó la cepa DH5α con DNA proveniente de una reacción de ligación, las placas además contenían 0,5 mM de IPTG y 40 µg/ml de X-gal, para visualizar colonias blancas o azules según sea el plasmidio que llevan en su interior (transformación con un recombinante dará colonias blancas y transformación con un vector religado dará colonias azules). Las placas se incubaron en estufa a 37°C por toda la noche y luego las colonias de interés fueron repicadas en placas nuevas para mantenerlas aisladas.

### **3.19. ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA-SDS**

La electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS se desarrolló según lo descrito por Laemmli (1970). Se realizó el montaje en el sistema "Mini PROTEAN II Cell" (Bio-Rad), preparando un gel separador de poliacrilamida al 10 % y un gel concentrador de poliacrilamida al 5 %. Las muestras de proteínas se mezclaron con igual volumen de tampón de muestra de proteínas 2x y fueron hervidas durante 5 min. Se utilizó el tampón de electroforesis y se aplicaron 100 Volt hasta que el colorante indicador de la migración llegó al borde inferior del gel. Los geles fueron teñidos y destañados con solución de tinción y con

solución de desteñido, respectivamente, o fueron directamente transferidos a una membrana de nitrocelulosa, como se describe en 3.21.1.

Para visualizar proteínas radiactivas, luego de teñir y desteñir el gel, este se sumergió por 30 min en solución Amplify (Amersham), se secó con calor y al vacío, y se expuso a una película de Rayos X por 2 a 30 días, dependiendo del tipo de experimento.

### **3.20. PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES CONTRA Tar**

La obtención de anticuerpos policlonales de conejo contra la proteína Tar de *E. coli* se realizó de manera semejante a como lo describen Mutoh y col. (1986). Para esto fue necesario crecer en 1 l de medio LB la cepa de *E. coli* HCB721 transformada con el plasmidio pNT201 e inducir la expresión de la proteína Tar, que está bajo el control de  $P_{lac}$ , agregando IPTG 1 mM en mitad de la fase logarítmica del crecimiento (Sambrook y col., 1989). Luego se prepararon membranas totales y las proteínas se separaron electroforéticamente en geles de poliacrilamida-SDS al 10 %. La banda correspondiente a la proteína Tar sobreexpresada se cortó desde varios geles estimando juntar aproximadamente 100  $\mu$ g de la proteína. Los trozos disgregados de poliacrilamida que contenían la proteína Tar se mezclaron con 2 ml de adjuvante de Freund completo y se inyectaron vía subcutánea a un conejo New Zealand hembra. A los 60 días se mezclaron otros 100  $\mu$ g de proteína Tar con 2 ml de adjuvante de Freund incompleto, y se volvió a inyectar el conejo vía

subcutánea. A los 17 días de la última inyección se sangró el conejo por la oreja, obteniéndose 36 ml de sangre desde la cual se obtuvo el suero inmune que fue mantenido a -20°C.

Previo a la primera inyección con antígeno, se extrajo sangre al conejo para obtener el suero preinmune.

Tanto el suero inmune como el preinmune fueron preabsorbidos con células de *E. coli* cepa HCB721 para eliminar la reacción cruzada con cualquier otra proteína que no sea Tar. La preabsorción se realizó como lo describieron Devasia y col. (1993), incubando  $10^9$  células de la cepa HCB721 con 500 µl del suero por 3 h a 37°C, y luego removiendo las células por 20 min de centrifugación a 10.000 x g. Esto se realizó tres veces para asegurar una completa preabsorción.

### **3.21. ANÁLISIS INMUNOLÓGICO DEL TIPO "WESTERN-BLOT"**

#### **3.21.1. Transferencia de Proteínas desde Geles de Poliacrilamida-SDS hacia Membranas de Nitrocelulosa**

La transferencia se realizó como lo describe Towbin y col. (1979). Para ello, las proteínas fueron separadas electroforéticamente en un gel de poliacrilamida-SDS como ya se describió, y luego fueron transferidas a una membrana de Nitrocelulosa mediante el sistema "Trans-Blot Cell" (Bio-Rad) utilizando el tampón de transferencia. Se aplicó una corriente constante de 600 mA durante 48 min. La eficiencia de la transferencia de proteínas



fue confirmada utilizando marcadores de peso molecular preteñidos, y tiñendo el gel después de la electrotransferencia.

### **3.21.2. Detección Inmunológica de Proteínas**

La membrana de nitrocelulosa conteniendo las proteínas transferidas, se incubó por toda la noche a 4°C con 5 % de leche descremada en tampón TBS. Luego se lavó 2 veces por 15 min cada vez con TBS y se incubó por 2 h a temperatura ambiente con suero policlonal de conejo anti Tar (o preimmune) diluído 1/100 en TBS conteniendo 1 % de albúmina de bovino (TBS/BA). Se lavó la membrana 3 veces por 10 min cada vez, con TBS conteniendo 0,05 % de Tween 20. Se incubó por 1 h a temperatura ambiente con anticuerpos de burro anti IgG de conejo biotinizados diluídos 1/500 en TBS/BA. Se repitieron los tres lavados de la membrana y se incubó por 1 h a temperatura ambiente con estreptavidina biotinizada conjugada a peroxidasa, diluída 1/500 en TBS/BA. Se volvió a lavar la membrana tres veces como ya se describió, y la presencia del complejo "primer anticuerpo/segundo anticuerpo/ peroxidasa" se detectó incubando con 4-Cloro-1-naftol (0,4 mg del colorante por ml en solución reveladora) en la oscuridad hasta visualizar las bandas de reacción.

### 3.22. PREPARACIÓN DE MEMBRANAS TOTALES DE *E. coli*

La preparación de membranas totales de *E. coli* se desarrolló realizando modificaciones menores del protocolo descrito por Foster y col. (1985).

Células de *E. coli* se crecieron en 1 l de medio LB durante 8 h, se centrifugaron a 10.000 x g por 15 min, y luego se congelaron en un volumen equivalente de tampón A. Previo a la ruptura de las células por sonicación, se agregaron 2 volúmenes de tampón A frío, y luego se sonicaron durante 6 min, en intervalos de 30 seg, usando un sonicador Ultrasonic Homogenizer Cole-Parmer Instrument Co. a una potencia del 50 %. Las células no rotas se separaron por dos centrifugaciones secuenciales a una velocidad baja de 10.000 x g por 15 min. Luego, el sobrenadante se centrifugó a 50.000 x g por 1 h a 4°C usando el rotor T-875 en una ultracentrífuga Sorvall modelo OTD Combi. Las membranas sedimentadas se lavaron dos veces con tampón B y una vez con tampón C. Finalmente, el sedimento de membranas se resuspendió en 1 ml de tampón C, y se guardó congelado a -20°C.

Todas las etapas se realizaron entre 0-4°C.

### 3.23. PREPARACIÓN DE MEMBRANA CITOPASMÁTICA DE *E. coli*

La preparación de membrana citoplasmática de *E. coli* se realizó por una modificación del método descrito por Booth y Curtiss (1977).

Se crecieron las células de *E. coli* en 1 l de medio LB durante 8 h, se centrifugaron a 10.000 x g por 15 min, y se resuspendieron 100 mg de células en 800 ml de sacarosa 250 mM/Tris-HCl 33 mM, pH 8,0. Se agregaron 50 µg de lisozima en 200 µl de EDTA 10 mM/Tris-HCl 33 mM, pH 8,4 y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Se agregaron 4 volúmenes de agua fría (a 4°C), se agitó hasta mezclar bien y se sonicó 6 veces por 30 seg cada vez con un sonicador Ultrasonic Homogenizer Cole-Parmer Instrument Co. a una potencia del 50 %. Las células no rotas se separaron con una centrifugación a 10.000 x g por 5 min. El lisado claro se ultracentrifugó a 100.000 x g por 2 h a 4°C usando el rotor T-875 en una ultracentrífuga Sorvall modelo OTD Combi. El sedimento, correspondiente a membranas totales, fue lavado resuspendiéndolo en 500 µl de agua fría (a 4°C) y volviendo a centrifugar a 100.000 x g por 2 h a 4°C. Para solubilizar la membrana citoplasmática (Osorio y col., 1993), el sedimento se incubó por 1 h a 37°C con N-lauroil-sarcosinato de sodio al 2 % (600 µl por cada 100 mg de células originales). Se repitió la ultracentrifugación a 100.000 x g por 2 h a 4°C y el sobrenadante, correspondiente a la membrana interna, se guardó en alícuotas a -20°C hasta ser utilizado.

### 3.24. EXPRESIÓN *in vitro* DE UN DNA Y SÍNTESIS DE LAS PROTEÍNAS CODIFICADAS

En el estudio de la expresión *in vitro*, se utilizó un sistema libre de células que permite la transcripción y traducción acopladas, realizando modificaciones menores del método desarrollado por Zubay (1973). Para ello se preparó un extracto crudo de *E. coli*, denominado extracto S30, que contiene las enzimas y factores necesarios para la transcripción y la traducción, pero que debe ser suplementado con aminoácidos, sistemas regeneradores de energía y ciertos cofactores.

#### 3.24.1. Preparación de un Extracto S30

Con un cultivo de *E. coli* cepa D-10 de toda la noche, se inocularon 4 l de medio S30 de manera de iniciar el cultivo con una  $A_{450}$  de 0,07. Se incubó a 37°C con agitación vigorosa y cuando el cultivo alcanzó una  $A_{450}$  de 1,2 se colectaron las células centrifugándolas a 10.000 x g por 15 min a 4°C. Se lavaron 3 veces con 500 ml de tampón S30 adicionado con 2-mercaptoetanol a una concentración final de 0,05 %. Se estimó el peso húmedo de células y se guardaron a -20°C.

El día de la preparación del extracto S30, se descongelaron las células durante 1 h a 4°C y se resuspendieron lentamente en tampón S30 adicionado con 2-mercaptoetanol a una concentración final de 0,005 % (usando 100 ml de tampón por cada 10 g de células). Se centrifugó a 16.000 x g por 30 min a 4°C, se pesaron las células y se resuspendieron

cuidadosamente en tampón S30 (63,5 ml de tampón por cada 50 g de células). Estas células resuspendidas se introdujeron en la celda de French, previamente enfriada a 4°C, y se sometieron a una presión de 8.400 p.s.i. El lisado se recibió a 0°C y por cada ml de éste se agregaron 10 µl de DTT 0,1 M. Se centrifugó inmediatamente a 30.000 x g por 30 min a 4°C. Se transfirieron las  $\frac{4}{5}$  partes superiores del sobrenadante a un tubo fresco y se volvió a centrifugar a 30.000 x g por 30 min a 4°C. Se tomaron nuevamente las  $\frac{4}{5}$  partes superiores del sobrenadante y por cada 25 ml de éste se agregaron 7,5 ml de mezcla de preincubación. Se cubrió el tubo con papel de aluminio, se incubó con agitación suave en un baño a 37°C por 80 min y luego el contenido del tubo se colocó en bolsas de diálisis tratadas y se dializó contra 50 volúmenes de tampón S30 a 4°C, cambiando el tampón tres veces cada 45 min. Finalmente, se centrifugó el extracto a 4.000 x g por 10 min a 4°C y el sobrenadante, que corresponde al "extracto S30", se alicuotó y se mantuvo a -20°C.

Para inactivar toda actividad ribonucleasa, se utilizó agua tratada con DEPC en la preparación de todas las soluciones, y para enjuagar todo el material de vidrio, tubos de plástico y celda de French utilizados. El tratamiento del agua se realizó agregando lentamente 1 ml de DEPC a 1 l de agua bidestilada, agitando por 1 h (en campana de extracción) y luego autoclavando a 20 libras/pulg<sup>2</sup> y a 120°C por 20 min.

Las bolsas de diálisis se hirvieron por 20 min en una solución de NaHCO<sub>3</sub> 0,1 M/ EDTA 10 mM, se descartó la solución y se repitió el procedimiento cuantas veces fuera necesario para que la solución no se volviera de color café. Luego se lavaron exhaustivamente en agua tratada con DEPC.

### 3.24.2. Ensayo *in vitro* de Transcripción y Traducción Acopladas

Para realizar el ensayo se utilizó DNA plasmidial purificado por gradiente de CsCl, y una mezcla de [<sup>35</sup>S]metionina/[<sup>35</sup>S]cisteína para obtener productos polipeptídicos radiactivos.

El ensayo se realizó de acuerdo a un protocolo básico descrito por Pratt (1985), que consiste en mezclar DNA plasmidial, 2 µl de [<sup>35</sup>S]metionina 70%/ [<sup>35</sup>S]cisteína 25 % (actividad específica de 1.190 Ci/mmol, 10 mCi/ml), 10 a 15 mM de (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>Mg y 7,5 µl de mezcla LM, completando 25 µl de volumen final con Tris-acetato 2,2 M pH 8,2. A esta mezcla se le dió un pulso de centrifugación de 15 seg para asegurar que todos los componentes se encontraran en el fondo del tubo, se preincubó por 5 min a 37°C y se agregaron 5 µl de extracto S30 (28 mg de proteínas/ml) mezclando suavemente con la punta de la micropipeta. Se continuó la incubación a 37°C por 1 h y a cada tubo se le agregaron 10 µl de L-metionina (8 mg/ml) no radiactiva precalentada a 37°C, se mezcló bien y se continuó la incubación a 37°C por 5 min para completar la síntesis de los polipéptidos marcados. Las mezclas de reacción se congelaron a -20°C hasta ser sometidas a una separación electroforética en geles de poliacrilamida-SDS y autorradiografía, o a una reacción de inmunoprecipitación con un suero adecuado seguida de separación electroforética y autorradiografía.

En cada ensayo se incluyó un control sin DNA.

### 3.25. INMUNOPRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS SINTETIZADAS *in vitro*

La inmunoprecipitación se realizó básicamente como lo describen Jerez y Weissbach (1980). Para ello se mezclaron 50  $\mu$ l de mezcla de reacción de un ensayo de síntesis *in vitro* (descrita en 3.24.2.) con 100  $\mu$ l de suero policlonal de conejo anti Tar (o preimmune) en tampón de inmunoprecipitación 1x, en un volumen final de 300  $\mu$ l. Esta mezcla se incubó a 37°C por 4 h y luego a 4°C durante toda la noche. Se centrifugó a 17.300 x g por 10 min a 4°C y los inmunoprecipitados se lavaron 3 veces con 200  $\mu$ l de tampón de inmunoprecipitación 1x. Finalmente, el inmunoprecipitado se solubilizó en 8  $\mu$ l de tampón de muestra de proteínas 1x, se hirvió por 5 min y se sometió a una electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS como ya se describió.

### 3.26. SECUENCIACIÓN DE DNA

La secuenciación del DNA se realizó mediante el método de terminación de cadenas descrito por Sanger y col. (1977), utilizando el kit de secuenciación "Sequenasa Version 2.0".

### 3.26.1. Desnaturalización del DNA

Debido a que se utilizó un DNA plasmidial de doble hebra como templado, fue necesario realizar una etapa de desnaturalización previa al alineamiento con el partidor.

Aproximadamente 2  $\mu\text{g}$  de DNA purificado por gradiente de CsCl fueron desnaturalizados con NaOH 0,18 M, en 44  $\mu\text{l}$  de volumen total, durante 5 min a temperatura ambiente. Luego el DNA se neutralizó agregando 4  $\mu\text{l}$  de  $\text{CH}_3\text{COONH}_4$  2 M a pH 4,5 y mezclando bien. El DNA se precipitó con 97  $\mu\text{l}$  de etanol frío, manteniendo a  $-20^\circ\text{C}$  por 30 min. Se centrifugó a 17.000 x g por 15 min a  $4^\circ\text{C}$ , y el DNA precipitado se lavó con 1 ml de etanol 80 % frío. Se volvió a centrifugar, y finalmente el DNA se secó al vacío durante 20 min. Este DNA así preparado se utilizó de inmediato en el alineamiento con el partidor o se congeló a  $-20^\circ\text{C}$  por un período no mayor a 15 días.

### 3.26.2. Reacción de Secuenciación

La reacción de secuenciación se realizó básicamente como se describe en el kit "Sequenase Version 2.0".

Para el alineamiento con el partidor, se resuspendió el DNA desnaturalizado en 3  $\mu\text{l}$  de agua, y se agregaron 2  $\mu\text{l}$  del tampón de sequenasa 5x y 5  $\mu\text{l}$  del partidor (10 ng/ $\mu\text{l}$ ). Se calentó en baño a  $70-75^\circ\text{C}$  por 2 min, y se dejó enfriar lentamente hasta que la temperatura llegara a  $37^\circ\text{C}$  (aproximadamente 30 min). Los tubos se centrifugaron brevemente y se mantuvieron en hielo hasta ser utilizados en la marcación.



Para la reacción de marcación, al DNA alineado con el partidor se agregó 1  $\mu$ l de DTT 0,1 M, 2  $\mu$ l de mezcla de marcación diluída 1/5, 1  $\mu$ l de [ $\alpha$ - $^{35}$ S]dATP (actividad específica de 1.000 Ci/mmol, 10 mCi/ml) y 1  $\mu$ l de agua tridestilada estéril. Cuando se quiso identificar una secuencia cercana al partidor, se reemplazó el agua por tampón Mn proveniente del kit. Luego se agregaron 2  $\mu$ l de "Sequenase Version 2.0" diluída (5 Unidades), se mezcló bien y se incubó a temperatura ambiente por 10 min.

Durante la marcación se prepararon los 4 tubos en los que luego se realizó la reacción de terminación de cadenas. Para ello, se colocaron 2,5  $\mu$ l de mezcla de terminación ddA en el tubo marcado con A. Se repitió lo mismo en los otros tres tubos marcados con C, G y T, con las mezclas de terminación ddC, ddG y ddT, respectivamente. Estos tubos se incubaron a 37°C y, una vez terminada la reacción de marcación, se agregaron 3,5  $\mu$ l de la mezcla de marcación a cada uno de los 4 tubos de terminación y se incubó a 37°C por otros 10 min. La reacción se detuvo agregando 4  $\mu$ l de la solución STOP a cada tubo.

Los tubos se guardaron a -20°C hasta ser aplicados en el gel de secuenciación.

### **3.26.3. Electroforesis en Geles de Secuenciación**

Se prepararon geles de poliacrilamida al 5,7 %, bisacrilamida al 0,3 % y urea 7 M, en el sistema "Sequi-Gen Sequencing Cell" (BioRad). El gel se recorrió a 1700 Volt por 30 min utilizando TBE 1x como tampón de la electroforesis, y luego se aplicaron 3,5  $\mu$ l de cada una de las cuatro reacciones de terminación previamente calentadas a 85°C por 5 min y enfriadas en hielo. La electroforesis se corrió por tiempos variables desde 1,5 hasta 6 h

dependiendo de si la región de la secuencia que se desea reconocer está cercana o lejana del partidor utilizado. Posteriormente el gel se secó con calor y al vacío y se expuso a una película de Rayos X durante 2-5 días.

### 3.27. ANÁLISIS COMPUTACIONAL

Las secuencias nucleotídica y proteica fueron analizadas por el programa PC-GENE, utilizando los programas COD\_PROK (Kolaskar y Reddy, 1985), TRANSL, SIGNAL (Staden, 1984), QSEARCH, HAIRPIN (Tinoco Jr. y col., 1973), ANTIGEN (Hopp y Woods, 1981), CHARGPRO, CLUSTAL (Higgins y Sharp, 1989) y GARNIER (Garnier y col., 1978). Las comparaciones con bases de datos se realizaron utilizando el programa BLAST vía Internet en la dirección <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST/nph-blast?Jform=0>> (Altschul y col., 1990), el programa FASTA vía correo electrónico en la dirección <FASTA@ebi.ac.uk> (Pearson y Lipman, 1988) y el programa BEAUTY vía Internet en la dirección <<http://dot.imgen.bcm.tmc.edu:9331/seq-search/protein-search.html>> (Worley y col., 1995). Las predicciones de regiones de transmembrana se realizaron vía Internet utilizando el programa TMPRED en la dirección <[http://ulrec3.unil.ch/software/TMPRED\\_form.html](http://ulrec3.unil.ch/software/TMPRED_form.html)> (Hofmann y Stoffel, 1993). Las frecuencias de uso de codones y los porcentajes de G + C se obtuvieron vía Internet en la dirección <<http://www.dna.affrc.go.jp/~nakamura/codon.html>> (Nakamura y col., 1997). Las secuencias de rRNA de 16S de *L.*

*ferrooxidans* se obtuvieron vía Internet en la dirección <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/htbin-post/Entrez/query?db=n>>.

## 4. RESULTADOS

### 4.1. SUBCLONAMIENTO DE UN FRAGMENTO DE DNA DE *L. ferrooxidans* QUE ES HOMÓLOGO AL GEN *tar* DE *E. coli*

Con el propósito de identificar en el DNA de *L. ferrooxidans* algún gen que sea homólogo a los genes de receptores quimiotácticos descritos, se realizó un subclonamiento después de digerir el DNA del plasmidio recombinante pLf3,5 con la enzima de restricción *EcoRI*. Esto nos permitiría trabajar con un fragmento de DNA de menor tamaño y al mismo tiempo su clonamiento en las dos orientaciones posibles. Los productos de esta digestión fueron de aproximadamente 3,9 y 2,3 kb (resultados no mostrados), siendo el fragmento pequeño el que conservó la hibridación con la sonda de 719 pb y que también hibridó con una sonda de menor tamaño más específica, correspondiente a 87 pb del gen *tar* de *E. coli* que codifican 27 aminoácidos de la región HCD que son idénticos en las proteínas Tap, Tar y Tsr de *E. coli* y Tar de *S. typhimurium* (Krikos y col., 1983; Russo y Koshland Jr., 1983). Los fragmentos obtenidos en esta digestión con *EcoRI*, determinan que aparentemente ocurrió digestión en el sitio *EcoRI* de la región de policlonamiento del vector y en un sitio

*EcoRI* interno del DNA de *L. ferrooxidans*, por lo que el fragmento de 2,3 kb debe contener la región de policlonamiento del vector pUC18 desde el sitio *HindIII* hasta el sitio *EcoRI* (Fig. 4).

El fragmento *EcoRI/EcoRI* de 2,3 kb fue subclonado en el vector pGEM-3Z, obteniéndose un recombinante que denominamos pLf13. La orientación del inserto en este nuevo recombinante es la que se muestra en la Fig. 4, ya que al digerir el plasmidio con la enzima *HindIII* se generaron un fragmento de 2,3 kb y otro de 2,7 kb (resultados no mostrados), lo que indica que en pLf13 existe un sitio de restricción *HindIII* en cada extremo del fragmento de DNA de *L. ferrooxidans*.

Así, los vectores pLf3,5 y pLf13 poseen el inserto de DNA de *L. ferrooxidans* en orientaciones opuestas. Esto permitirá expresar bajo el promotor *lac* las dos hebras del DNA de *L. ferrooxidans* clonado.

## 4.2. ENSAYO DE EXPRESIÓN *in vitro* DESDE UN DNA PLASMIDIAL

### 4.2.1. Expresión *in vitro* de pNT201

Una manera de observar las proteínas sintetizadas a partir de un determinado DNA, es utilizar dicho DNA como templado en un ensayo *in vitro* de transcripción/traducción acopladas (Pratt, 1985). Si se utiliza [<sup>35</sup>S]metionina se obtienen productos radiactivos que pueden reconocerse por su migración electroforética en geles de poliacrilamida-SDS y posterior autorradiografía.

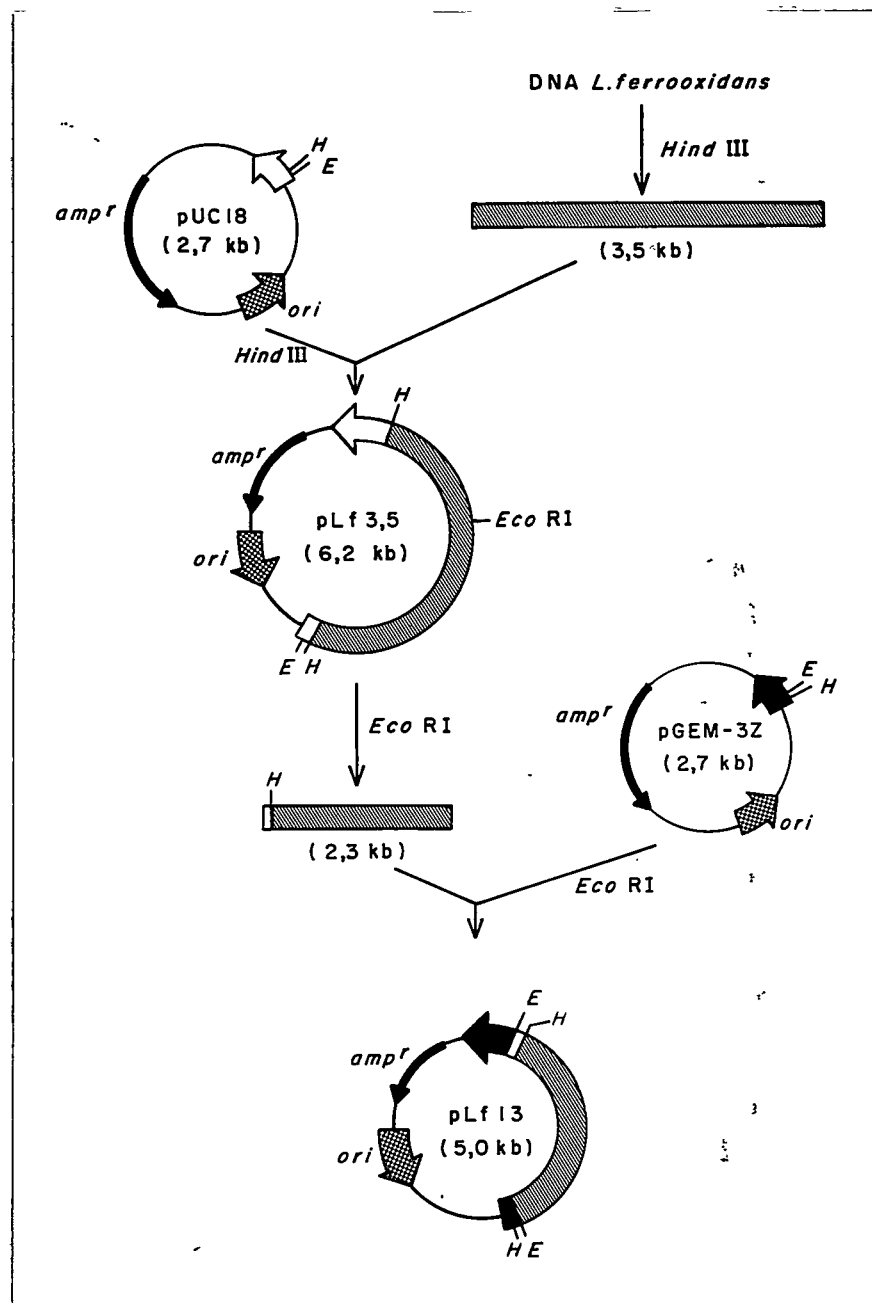


Figura 4: Construcción del plasmidio recombinante pLf13.

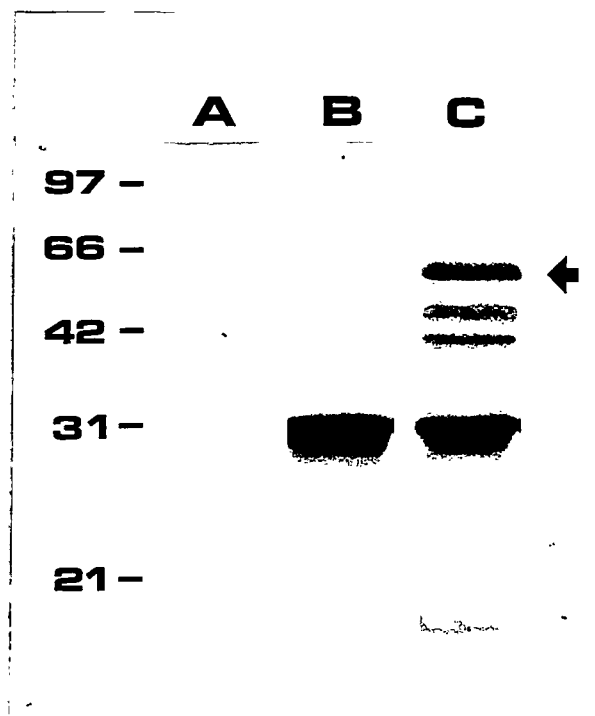
Los detalles de la construcción se comentan en el texto. La flecha gruesa achurada representa el origen de replicación plasmidial. Las flechas gruesas (blanca y negra) representan el gen *lacZ* (se utilizan blanco y negro para diferenciar los sitios de policlonamiento provenientes de pUC18 y de pGEM-3Z). La flecha delgada negra corresponde al gen de resistencia a ampicilina. La barra achurada corresponde al fragmento de DNA de *L. ferrooxidans*. *E* y *H* representan sitios de corte para las enzimas *Eco*RI e *Hind*III, respectivamente. La pequeña región que existe entre un sitio *Eco*RI y un sitio *Hind*III corresponde a la región de policlonamiento.

Según nuestro conocimiento, hasta la fecha no se había expresado ningún receptor quimiotáctico *in vitro* con este sistema. Por ello se procedió a realizar la expresión *in vitro* del plasmidio pNT201, que lleva el gen *tar* bajo el control del promotor  $P_{tac}$  (Delgado y col., 1995). En la Fig. 5 se observa que desde este plasmidio se expresó *in vitro* una proteína de aproximadamente 60 kDa que corresponde a Tar de *E. coli* (carril C, flecha). También se expresó una proteína de aproximadamente 30 kDa correspondiente a  $\beta$ -lactamasa. Todas las otras bandas de pesos moleculares menores que 60 kDa pueden corresponder a productos de síntesis incompleta de Tar o a productos de degradación de ella. Esta última alternativa se ve apoyada por el hecho que membranas de células de *E. coli* que llevan sobreexpresada la proteína Tar, presentan las mismas bandas de tamaños moleculares menores de 60 kDa que reaccionan con anticuerpos anti Tar en ensayos de "Western-blot" (no se muestra).

El ensayo realizado en ausencia de DNA no mostró síntesis de polipéptidos radiactivos, asegurando que el sistema responde exclusivamente al DNA agregado (carril A).

#### 4.2.2. Optimización del Ensayo de Expresión *in vitro*

El ensayo de síntesis *in vitro* debe ser optimizado de acuerdo al extracto S30 que se obtiene, pues no todas las preparaciones generan las mismas condiciones óptimas para realizar la reacción (Pratt, 1985). Como ya se demostró que ocurre expresión desde el DNA del plasmidio pNT201, éste se utilizó como templado y el nivel de síntesis de la proteína



**Figura 5:** Expresión del plasmidio pNT201 en un sistema *in vitro* de transcripción/traducción acopladas.

Las proteínas se sintetizaron y marcaron con [ $^{35}$ S]metionina *in vitro*, como se describe en Materiales y Métodos. El ensayo se realizó en (A) ausencia de DNA o en presencia de 3  $\mu$ g de DNA de (B) pGEM-3Z o de (C) pNT201. Los productos sintetizados se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y luego se realizó una autorradiografía. A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular en kilodaltons. La flecha indica la proteína Tar.



Tar fue el indicador del rendimiento del sistema.

En la Fig. 6 se muestra cómo aumenta la síntesis de Tar en función de cantidades crecientes de extracto S30 en el ensayo, hasta lograr un máximo que no varía al aumentar la cantidad de extracto. Este máximo se logró con 7  $\mu$ l de extracto S30 (200  $\mu$ g de proteínas de extracto) en 30  $\mu$ l de mezcla de reacción (carril E). Todos los ensayos posteriores se realizaron con esta cantidad para asegurar la mayor síntesis de proteína.

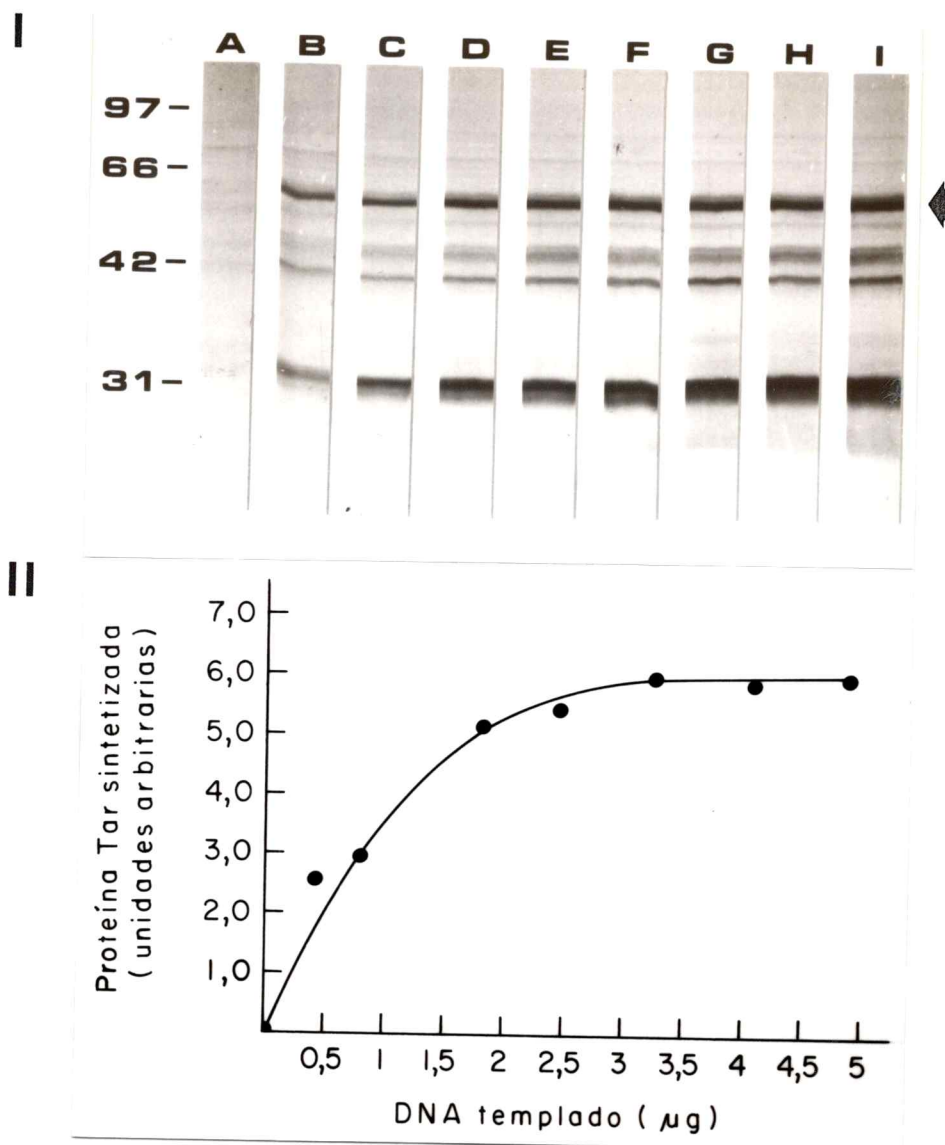
La concentración óptima de  $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Mg}$  en la mezcla de reacción, también se determinó observando el nivel de síntesis de Tar. Pratt describe que el óptimo se encuentra en el rango de 10 a 15 mM (Pratt, 1985), y en nuestro ensayo resultó ser 13 mM (no se muestra). Mayores y menores concentraciones de acetato de magnesio generaron una menor síntesis de Tar, por lo que 13 mM fue la concentración óptima utilizada para la realización de los siguientes ensayos.

Ya que este sistema determina la síntesis *in vitro* de polipéptidos en forma estrictamente dependiente del DNA, se estudió la influencia de la concentración del DNA templado en la cantidad de proteína sintetizada. La Fig. 7 muestra que con 3  $\mu$ g de DNA templado (pNT201) en los 30  $\mu$ l de mezcla de reacción se logra la máxima síntesis de la proteína Tar con este sistema. Así, aunque el máximo logrado con pNT201 puede no corresponder exactamente a lo que se logre con otros plasmidios, como un primer acercamiento se utilizaron 3  $\mu$ g de DNA templado en los siguientes ensayos.



**Figura 6:** Síntesis de Tar en función de cantidades crecientes de extracto S30 en el ensayo *in vitro* de transcripción/traducción acopladas.

Las proteínas se sintetizaron y marcaron con [ $^{35}\text{S}$ ]metionina *in vitro*, como se describe en Materiales y Métodos, utilizando volúmenes crecientes de extracto S30 (28  $\mu\text{g}$  de proteína/ $\mu\text{l}$ ): (B) 4  $\mu\text{l}$ ; (C) 5  $\mu\text{l}$ ; (D) 6  $\mu\text{l}$ ; (E) 7  $\mu\text{l}$  o (A y F) 8  $\mu\text{l}$ . La reacción se realizó en (A) ausencia de DNA y en (B a F) presencia de 3  $\mu\text{g}$  de DNA de pNT201. Los productos sintetizados se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y luego se realizó una autorradiografía. A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular en kilodaltons. La flecha indica la proteína Tar.



**Figura 7:** Síntesis de Tar en función de cantidades crecientes de DNA templado en el ensayo *in vitro* de transcripción/traducción acopladas.

**I)** Las proteínas se sintetizaron y marcaron con [<sup>35</sup>S]metionina *in vitro*, como se describe en Materiales y Métodos, en (A) ausencia de DNA o en presencia de cantidades crecientes de DNA de pNT201: (B) 0,4 µg; (C) 0,8 µg; (D) 1,6 µg; (E) 2,4 µg; (F) 3,2 µg; (G) 4,0 µg; (H) 4,8 µg ó (I) 5,6 µg. Los productos sintetizados se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS seguido de autorradiografía. A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular en kilodaltos. La flecha indica la proteína Tar.

**II)** Cuantificación de la proteína Tar sintetizada en función de la cantidad de DNA de pNT201 en el ensayo. Se determinó la cantidad de proteína Tar sintetizada en la Fig. 7 I, en unidades arbitrarias, empleando un programa computacional de procesamiento de imágenes que midió la intensidad de las bandas correspondientes a Tar.

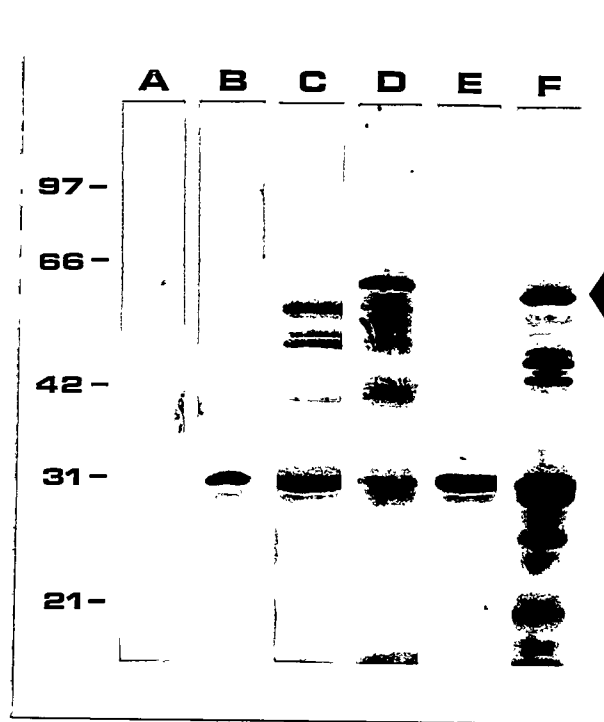
Se estudió el tiempo de reacción, desde 5 hasta 70 min, lográndose la mayor síntesis de Tar con 50 min de incubación. Mayores tiempos de reacción mantienen constante el nivel de Tar sintetizado, lo que demuestra que el sistema en 50 min responde al máximo de síntesis posible en las condiciones utilizadas. Todos los ensayos posteriores se realizaron con este tiempo de reacción, luego se adicionó metionina no radiactiva y se incubó por 5 min para concluir la síntesis de polipéptidos radiactivos.

Estos estudios preliminares de expresión *in vitro* de un DNA permitieron enfrentar los siguientes experimentos en las condiciones determinadas como óptimas para lograr la máxima síntesis de proteínas.

#### 4.3. EXPRESIÓN *in vitro* DE pLf13

Para determinar si los fragmentos de DNA de *L. ferrooxidans* contenidos en los recombinantes pLf3,5 y pLf13 poseen algún gen y por ello codifican alguna proteína, se utilizaron dichos plasmidios recombinantes como DNA templados en el sistema de expresión *in vitro* (Delgado y col., 1995).

Como se observa en la Fig. 8 (carril C), pLf13 expresó al menos cuatro polipéptidos cuyas migraciones en el gel corresponden a productos de 58, 51, 39 y 30 kDa. La síntesis de los tres polipéptidos de mayor peso molecular se debió exclusivamente a la presencia del



**Figura 8:** Expresión *in vitro* de plasmidios recombinantes que contienen DNA de *L. ferrooxidans*.

Las proteínas se sintetizaron y marcaron con [<sup>35</sup>S]metionina *in vitro*, como se describe en Materiales y Métodos, en (A) ausencia de DNA o en presencia de 3 µg de cada uno de los siguientes DNAs: (B) pGEM-3Z; (C) pLf13; (D) pLf3,5; (E) pUC18 o (F) pNT201. Los productos sintetizados se separaron por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS seguido de autorradiografía. A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular en kilodaltons. La flecha indica la proteína Tar.

DNA de *L. ferrooxidans*, pues el vector pGEM-3Z sólo expresó el polipéptido de 30 kDa que corresponde la proteína  $\beta$ -lactamasa (carril B). El polipéptido de 58 kDa podría ser el producto final de un gen de *L. ferrooxidans* contenido en el fragmento clonado y, por estar en el rango de peso molecular descrito para las proteínas MCPs, podría corresponder a una proteína de este tipo. De ser así, los productos de mayor migración en el gel podrían ser generados por síntesis incompleta del polipéptido de 58 kDa o por degradación de éste, como se mencionó que podría ocurrir al expresar una proteína en este sistema.

Al utilizar el recombinante pLf3,5 como DNA templado en el ensayo de expresión *in vitro*, se sintetizaron productos que coincidieron en migración con los polipéptidos generados desde pLf13 y, además, se sintetizó una proteína de aproximadamente 62 kDa (Fig. 8, carril D). Esta proteína de 62 kDa podría generar al polipéptido de 58 kDa o ser un producto codificado por otro marco de lectura contenido en el fragmento de 3,5 kb. Más adelante (Fig. 12), al conocerse la secuencia del fragmento de DNA de 2,3 kb contenido en el recombinante pLf13 se determinó que en este plasmidio existe la porción final de un ORF de *L. ferrooxidans* (ORF1) que podría estar completo en el recombinante pLf3,5 y así generaría un polipéptido que migra en geles de poliacrilamida-SDS como una proteína de 62 kDa.

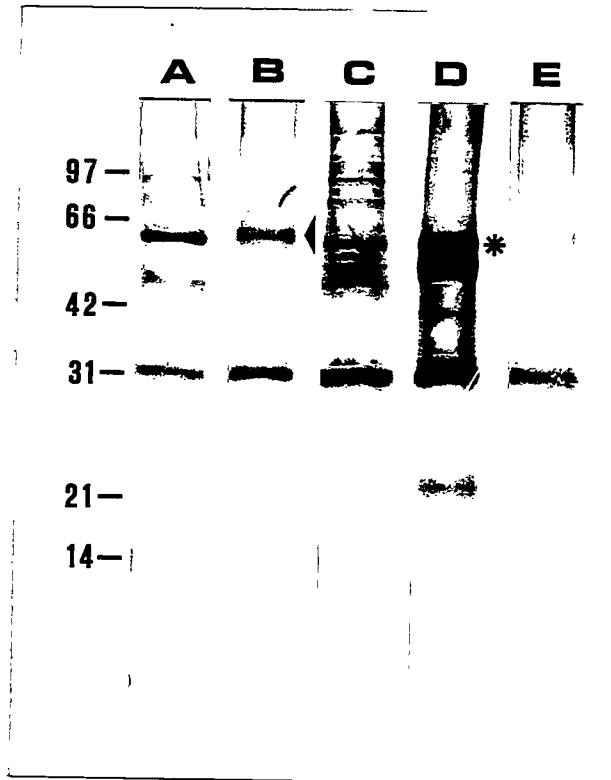
La síntesis de los mismos polipéptidos de 58, 51 y 39 kDa, desde pLf3,5 y desde pLf13, hace pensar que su expresión no está gobernada por el promotor *lac* del vector sino que probablemente responde a un promotor interno del DNA de *L. ferrooxidans* que funciona con igual eficiencia en ambas orientaciones con respecto al  $P_{lac}$ .

Tanto para pLf3,5 como para pLf13, resultó ser óptimo utilizar 3 µg de DNA templado en el ensayo de síntesis *in vitro*.

#### **4.4. REACTIVIDAD DE LAS PROTEÍNAS DE *L. ferrooxidans* SINTETIZADAS *in vitro* CON ANTICUERPOS ANTI Tar DE *E. coli***

Como se ha demostrado que las MCPs se relacionan antigénicamente entre sí y que por ello poseen reactividad cruzada con anticuerpos específicos generados contra una de ellas (Nowlin y col., 1985; Alam y Hazelbauer, 1991; Morgan y col., 1993), se investigó si las proteínas de *L. ferrooxidans* sintetizadas *in vitro* tienen la capacidad de reaccionar con anticuerpos contra Tar de *E. coli*. Para ello, se procedió primeramente a preparar dichos anticuerpos como se describe en Materiales y Métodos. Los anticuerpos anti Tar presentaron una pequeña reacción cruzada con proteínas de células de *E. coli* cepa HCB721 (que carecen de receptores quimiotácticos), por lo que se realizó la preabsorción del suero con dichas células. Con esto se logró un suero policlonal anti Tar muy específico, que en ensayos de "Western-blot" reacciona con la cepa HCB721 sólo cuando ella está transformada con el plasmidio pNT201 (que expresa la proteína Tar de *E. coli*).

Se utilizaron estos anticuerpos anti Tar para inmunoprecipitar los polipéptidos radiactivos sintetizados *in vitro* desde los distintos plasmidios estudiados. Como se muestra en la Fig. 9, los productos inmunoprecipitados corresponden a la proteína Tar de *E. coli*



**Figura 9:** Inmunoprecipitación de las proteínas de *L. ferrooxidans* sintetizadas *in vitro* con anticuerpos contra Tar de *E. coli*.

Las proteínas se sintetizaron y marcaron con [ $^{35}\text{S}$ ]metionina *in vitro* como en la Figura 8 pero en presencia de 3  $\mu\text{g}$  de DNA de (A y B) pNT201 o de (C, D y E). Los productos sintetizados se inmunoprecipitaron con (B y D) suero anti Tar de *E. coli* o con (E) suero preinmune, como se describe en Materiales y Métodos. Los productos inmunoprecipitados se separaron por electroforesis en gels de poliacrilamida-SDS seguido de autorradiografía. A la izquierda se muestran los marcadores de peso molecular en kilodaltons. La punta de flecha indica la proteína Tar inmunoprecipitada y el asterisco indica la proteína de 58 kDa de *L. ferrooxidans* inmunoprecipitada.



(carril B, punta de flecha) y al polipéptido de 58 kDa expresado por el plasmidio recombinante pLf13 (carril D, asterisco). Esto demuestra que la proteína de 58 kDa presenta comunidad antigénica con Tar y por ello sugiere fuertemente que corresponde a un receptor quimiotáctico de *L. ferrooxidans*. El polipéptido de 58 kDa sintetizado desde el recombinante pLf3,5 también fue inmunoprecipitado con el suero anti Tar, pero no se inmunoprecipitó la proteína de 62 kDa (no se muestra). Esto demuestra que la proteína de 58 kDa no deriva de la de 62 kDa y que, por lo tanto, ambos son productos originados independientemente desde distintos marcos de lectura.

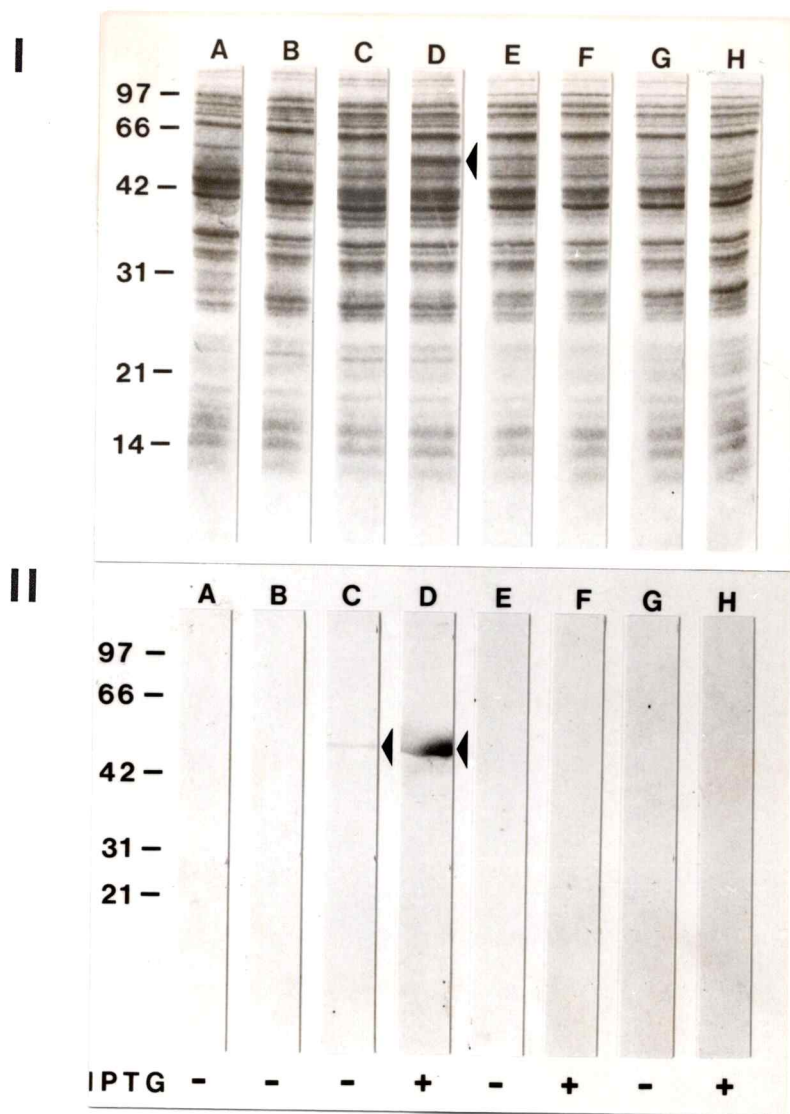
La casi imperceptible inmunoprecipitación de los polipéptidos menores de 60 kDa sintetizados *in vitro* desde el plasmidio pNT201 (Fig. 9, carril B), puede significar que estos polipéptidos no retienen los principales determinantes antigénicos de la molécula Tar o que los ellos están menos expuestos y por ello generan menos interacción con los anticuerpos.

Se destaca que el polipéptido de 51 kDa sintetizado *in vitro* desde el plasmidio pLf13 se inmunoprecipitó tanto o más que el polipéptido de 58 kDa (Fig. 9, carril D), aún siendo una banda que aparece menos intensa entre los productos de síntesis (carril C). Puede ocurrir que durante el ensayo de inmunoprecipitación exista una mayor degradación del polipéptido de 58 kDa y así se aumenta la cantidad relativa del polipéptido de 51 kDa. Alternativamente, el polipéptido de 51 kDa puede estar exponiendo un mayor número de determinantes antigénicos y por ello generar una mayor reacción con los anticuerpos.

También, se observa inmunoprecipitación de la proteína  $\beta$ -lactamasa, pero no es una reactividad específica del suero inmune ya que el suero preinmune también la posee. Esto podría deberse a que el conejo utilizado para obtener los anticuerpos hubiera tenido algún contacto previo con microorganismos que secretan  $\beta$ -lactamasa y que por ello el suero preinmune presenta anticuerpos contra esta proteína (Fig. 9, carril E). Esta posibilidad se minimizó al realizar un ensayo de "Western-blot" revelado con el mismo suero preinmune, que mostró que las cepas de *E. coli* que llevan plasmidios que expresan  $\beta$ -lactamasa no presentan una banda cercana a 30 kDa que reaccione con el suero (no se muestra). Entonces, alternativamente, puede que la proteína  $\beta$ -lactamasa coprecipite sólo porque las condiciones del ensayo de inmunoprecipitación así lo favorecen sin que medie su reconocimiento por anticuerpos específicos.

#### 4.5. EXPRESIÓN *in vivo* DE pLf13

Como ya se demostró que los plasmidios pLf13 y pLf3,5 expresan *in vitro* una proteína de 58 kDa que presenta reacción cruzada con los anticuerpos anti Tar, se analizó la capacidad de estos plasmidios para expresar el polipéptido *in vivo* en una cepa de *E. coli* que carece de receptores quimiotácticos (cepa RP4372). Para ello, se analizaron las proteínas totales de la cepa RP4372 y de la misma cepa transformada con los plasmidios recombinantes pLf13 (Fig. 10, carriles E y F) y pLf3,5 (no se muestra). Ya que *in vitro* la



**Figura 10:** Expresión *in vivo* de plasmidios recombinantes en *E. coli*.

Células de *E. coli* se crecieron por 4 h en (D, F y H) presencia y en (A, B, C, E, G) ausencia de 1 mM IPTG agregado a partir de la mitad de la fase logarítmica de crecimiento (indicado por + y -). Se cosecharon las células y luego de disolver sus componentes, se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS. Cada carril contiene 25  $\mu$ g de células (peso húmedo) de cada una de las siguientes cepas: (A) DH5 $\alpha$ ; (B) RP4372; (C y D) RP4372 transformada con pNT201; (E y F) RP4372 transformada con pLf13 y (G y H) RP4372 transformada con pGEM-3Z.

**I)** Tinción con azul de Coomassie.

**II)** "Western-blot" de un gel equivalente al que se muestra en I, revelado con suero policlonal anti Tar de *E. coli* (dilución 1/100) según se describe en Materiales y Métodos. Las puntas de flecha indican la proteína Tar.

expresión fue independiente del promotor *lac* del vector (Fig. 8, carriles C y D), para probar si *in vivo* se conserva esta independencia se estudiaron células crecidas en condiciones de inducción y de no inducción con IPTG.

En la Fig. 10,I se observa que todas las transformantes presentaron básicamente el mismo patrón de proteínas totales teñidas con azul de Coomassie, excepto la que lleva el plasmidio pNT201 que presenta una banda extra de 60 kDa correspondiente a la proteína Tar. Esta banda se observa muy inducida en presencia de IPTG (carril D, punta de flecha) y es imperceptible sin inducción (carril C).

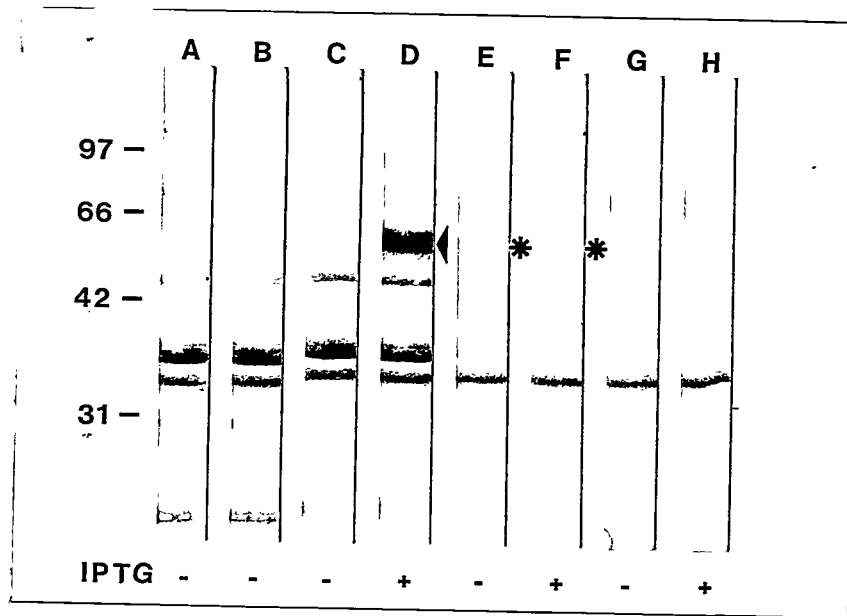
La cepa transformada con pLf13 no evidenció la aparición de una nueva banda de proteína, ya sea con o sin inducción con IPTG (carriles E y F, respectivamente). Células transformadas con el recombinante que lleva el inserto en la orientación inversa (pLf3,5) presentaron el mismo patrón de proteínas totales, independiente de la inducción con IPTG (no se muestra). Esto nos hizo pensar que la expresión *in vivo* de polipéptidos de *L. ferrooxidans* en *E. coli* es inexistente o que es muy baja e independiente del promotor *lac*.

Como *in vitro* existe expresión desde los plasmidios pLf13 y pLf3,5 utilizando toda la maquinaria transcripcional y traduccional de *E. coli*, nos pareció válido suponer que en *E. coli* podría existir expresión *in vivo* pero a un nivel tan bajo que no sea detectada en las condiciones utilizadas. Por ello, para aumentar la sensibilidad de la detección, las mismas muestras se sometieron a un ensayo de "Western-blot" revelado con anticuerpos contra Tar. En la Fig. 10,II se observa que no fue posible detectar una banda de reacción con los anticuerpos en las proteínas de la cepa transformada con el plasmidio pLf13 (carriles E y F),

tampoco en las transformantes con pLf3,5 (no se muestra) ni en la cepa DH5 $\alpha$  de *E. coli* que presenta niveles normales de receptores quimiotácticos (carril A). Sólo se pudo detectar una banda de reacción en las células que llevan el plasmidio multicopia pNT201 (carril C, punta de flecha), que se hace muy intensa en condiciones de inducción del P<sub>lac</sub> con IPTG (carril D, punta de flecha). La no detección de una banda de reacción entre las proteínas de la cepa de *E. coli* que lleva niveles normales de MCPs (carril A), demuestra que la sensibilidad de este ensayo es aún muy baja, probablemente debido al bajo título del suero, y por tanto no se descarta que exista expresión de la proteína de *L. ferrooxidans* en *E. coli*, sobre todo considerando que se desea observar una reacción entre una proteína de *L. ferrooxidans* y un anticuerpo heterólogo.

Si la proteína de 58 kDa de *L. ferrooxidans* corresponde a un receptor quimiotáctico, debe insertarse en la membrana citoplasmática, y aunque se exprese en bajos niveles en *E. coli* probablemente también pueda insertarse en la membrana citoplasmática de esta bacteria. Para comprobar esta posibilidad, se prepararon membranas citoplasmáticas de la cepa RP4372 de *E. coli* y de la misma cepa transformada con los distintos plasmidios. Nuevamente las células fueron crecidas en condiciones de inducción y de no inducción con IPTG. La Fig. 11 muestra como control la presencia de la proteína Tar en preparaciones de membrana citoplasmática de células de *E. coli* que llevan el plasmidio pNT201 (carril D, punta de flecha).

También se observa la aparición de una banda de 58 kDa en las membranas citoplasmáticas de las células transformadas con el recombinante pLf13 (carriles E y F,



**Figura 11:** Presencia de proteínas codificadas por pLf13 en membrana citoplasmática de *E. coli*.

*E. coli* se creció por 4 h en (D, F y H) presencia o en (A, B, C, E, G) ausencia de 1 mM IPTG agregado a partir de la mitad de la fase logarítmica de crecimiento (indicado por+ y -). Se prepararon membranas citoplasmáticas de estas células, de acuerdo a lo descrito en Materiales y Métodos. Las proteínas de membrana se separaron realizando electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y posterior tinción con azul de Coomassie. Cada carril contiene membranas provenientes de 165  $\mu$ g (peso húmedo) de cada una de las siguientes cepas: (A) DH5 $\alpha$ ; (B) RP4372; (C y D) RP4372 transformada con pNT201; (E y F) RP4372 transformada con pLf13 y (G y H) RP4372 transformada con pGEM-3Z. La punta de flecha indica la proteína Tar de *E. coli* y los asteriscos indican la proteína de 58 kDa presente en membrana citoplasmática cuando *E. coli* se transforma con pLf13.

asteriscos). Esta banda también está presente en las membranas de transformantes con pLf3,5 (no se muestra) y está ausente en los controles de células transformadas sólo con el vector pGEM-3Z (carriles G y H) ó pUC18 (no se muestra), lo que concuerda con la síntesis proteica realizada *in vitro* (Fig. 8). Es importante destacar que el nivel de expresión de esta proteína de 58 kDa fue el mismo en presencia o en ausencia de IPTG, y en ambas orientaciones del inserto con respecto al promotor *lac*, por lo que la transcripción del gen de *L. ferrooxidans* en células de *E. coli* no está siendo gobernada por el P<sub>lac</sub> del vector sino que probablemente está bajo el control de algún promotor de *L. ferrooxidans* contenido en el inserto de DNA de 2,3 kb.

Con estas muestras de membranas citoplasmáticas también se realizó un ensayo de "Western-blot" revelado con el suero policlonal anti Tar (no se muestra), y nuevamente no se observó reacción con las MCPs de la cepa DH5 $\alpha$  ni con la proteína de 58 kDa de *L. ferrooxidans*, probablemente debido también al bajo título del suero.

#### **4.6. SECUENCIACIÓN DEL FRAGMENTO DE DNA DE *L. ferrooxidans* CONTENIDO EN pLf13**

Considerando que el plasmidio pLf13 contiene el fragmento de DNA de *L. ferrooxidans* necesario para expresar la proteína de 58 kDa, se quiso determinar la información contenida en dicho fragmento de 2,3 kb. Para ello, fue secuenciado como se

describe en Materiales y Métodos, comenzando con los partidores T7 y SP6 que permitieron secuenciar desde ambos extremos del inserto en direcciones convergentes, y se continuó avanzando en cada hebra con oligonucleótidos sintéticos de 18-20 meros construídos cada vez en base a la última porción de la secuencia leída. De esta manera, cada partidor permitió avanzar entre 300 y 350 bases, pero el siguiente partidor se diseñó de manera tal de cubrir las últimas 60 bases, por lo que se utilizaron aproximadamente 9 partidores para cada hebra. Este procedimiento permitió secuenciar ambas hebras para así lograr una mayor certeza que la secuencia obtenida es la correcta.

La secuenciación confirmó que existe una región de policlonamiento en cada extremo del inserto, como ya se comentó y se mostró en la Fig. 4.

La secuencia completa del fragmento de DNA de *L. ferrooxidans* clonado en pLf13, desde el sitio de restricción *EcoRI* hasta el sitio *HindIII*, sin considerar las regiones de policlonamiento, se muestra en la Fig. 12. Esta secuencia de 2.262 pb se analizó con los programas TRANSL y COD\_PROK de PC-GENE y se logró identificar tres marcos de lectura abiertos leídos en dirección 5'→3'.

El primer marco de lectura (ORF1) se encuentra incompleto en su extremo 5' porque está interrumpido por el sitio de restricción *EcoRI*, codifica para los 108 últimos aminoácidos de una proteína y termina con el codón de término TAG en los nucleótidos 327-329 (Fig. 12). Este gen tendría un posible terminador de la transcripción independiente de Rho, cuyas secuencias invertidas repetidas están en los nucleótidos 364 a 368 y 381 a 385 y se continúan por una cola de poli-U (Fig. 12, subrayado en negro). La estructura



**Figura 12:** Secuencia nucleotídica del inserto de 2.262 pb contenido en pLf13.

La secuencia nucleotídica comienza con el sitio *EcoRI* y termina con el sitio *HindIII* (ver Fig. 4). En color azul y subrayada se indica una posible región promotora para sigma 70 (-35 desde el nucleótido 196 al 201 y -10 desde el nucleótido 218 al 223) y en color rojo y subrayada se indica una posible región promotora para sigma 28 (-35 desde el nucleótido 206 al 209 y -10 desde el nucleótido 231 a 238). En color verde y subrayadas se muestran posibles sitios de unión al ribosoma (nucleótidos 397 a 404 para ORF2 o *LcrI* y nucleótidos 2.156 a 2.163 para ORF3). Debajo de la secuencia nucleotídica se muestra la secuencia de aminoácidos predicha para el ORF1 (desde el nucleótido 3 hasta el 326), para el ORF2 o *LcrI* (desde el nucleótido 412 hasta el 2.142) y para el ORF3 (desde el nucleótido 2.169 hasta el 2.261). En negro se subrayan las secuencias invertidas repetidas (CGGAC/GTCCG) de un posible terminador de transcripción (nucleótidos 364 a 368 y 381 a 385).

ORF1	
GAATTC AATATTCGGTCATGCAGAATCTCCTGTCTCATTTCAGTTTCGACCCCAAACGTCTC	60
I Q Y S V M Q N L L S H S V R P Q T S	19
CGACCAGGATGGTCAAAGAATTATCGTCCTATTTCCCTTCCATACACAAGAAAACCGGTT	120
P T R M V K E L S S Y F L P I H K K T G	39
CATCCGTCCTGATCGGAGCCCTATCTTTTCGACAGGAGCTCATATATCTTTTACCAAAC	180
S S V L I G A L S F R Q E L I Y L L P K	59
AATTAATAATAATTTTGGATCAATTAAAAGAAAAAATCAATGCTCGAACTCGGCAAGG	240
Q L I I I F D Q F K R K K S M L E S G K	79
ACAGACTTTCAACGTGCAAGAAGACCGCCTTTCACCCCTGCTTTTTCATCTAAGGGTTT	300
D R L S T C K K T A F H P L L F H L R V	99
TTTCTCTCCCGACCGATAGAGCAATGTAGTCGAACAAATTCACCGACCGGTTCTCTTTC	360
F S L P T D R A M --	108
	LcrI
CTCCGGACGCCAGGAACCGATCCGATTTTCCGAGAAAGAAAGGATGATCATGACCTCC	420
	M T S
	3
TAAAGATCCATCATTCTCCGCAACGTTACATGGTCGGATCGGTCATCGTTCTGACCACG	480
L R S I I L R N V Y M V G S V I V L T T	23
TTCATGTCTCTCTGGACGGCTCACCGGGTCTCCGTCCAGTCAGTGGAAGTCCAGAAGACC	540
F M S L W T A H R V S V Q S V E V Q K T	43
ATGCAACTTCTGGCCAGCCTCCAGTCCGTCGAGTCATCGCTCATCAAGATCGACTCCAGT	600
M Q L L A S L Q S V E S S L I K I D S S	63
CTCCTCGACCTGGAGGTGAACGGGGGCTCGGGAGATGAGATCATCCGGGAGTTTCGACCGT	660
L L D L E V N G G S G D E I I R E F D R	83
GTTCTGGCGGTCGATCCGAAGTCCATGATTGTCAAAAGCGGTGTTCTTCAGTCCAAGGGG	720
V L A V D P K S M I V K S G V L Q S K G	103
ATGCTGAAGTTCATCAAGATCATGAAAGACCGGCACGCTCGCTCCAGATGATCGCTTCC	780
M L K F I K I M K D R H A R S Q M I A S	123
GTCCGCAACCAGGCCACGCTGATCCGCAAGGAATGGGCTGGCGCCCGGTTCAATGAGATC	840
V R N Q A T L I R K E W A G A R F N E I	143
GAGCAGAAGCAGGCCCTTCCCTCAAGAACCTGCAGTATCTCGTTTTTCGAATCCCGTATC	900
E Q K Q A L S L K N L Q Y L V F E S R I	163
ATGGCAGGAATTGCCGGCATCCTGGCCGTCGGCATGCTGATCCTTTTATATTTCCGGATG	960
M A G I A G I L A V G M L I L L Y F R M	183
GATCGTTGTGCGGATCATCTTCGCAATGGCCGACAACATCCAGGCGGTCGCCACCTTC	1020
D R L S D H L R Q L A D N I Q A V A T F	203

CAGTCCAGGGGACTCGAATATGCCCCGAAACGATAGAAGAAAAAGCATCTACAACGCC Q S R G L E Y A P E T I E E K S I Y N A	1080 223
ACCAAGGCCCTTGAGAATCTTTTTACCACCATCACCACCTCGATGACCCACAACGGCGTG T K A L E N L F T T I T T S M T H N G V	1140 243
GTAGTGGTAAACGCCGATCTGAAAAGCGGAAAAGAAGGCAACGAAATCCTCTATGTCAGC V V V N A D L K S G K E G N E I L Y V S	1200 263
CCTTCCCTGATCGAGATCCTGCTCCCTGTAAAGAAGGAAGTCCAGGAGAGGTTCCGGAGTG P S L I E I L L P V K K E V Q E R F G V	1260 283
GACATCAACCGTCTGGTCCGGACATCCATCCACCGTTTTACGAAACATCCGGATCGCATC D I N R L V G T S I H R F H E H P D R I	1320 303
CGGGAAATTCTTGAAGAATAAAACCACTCGAAGTGCGGCAGAACATGGAAACCCAGATC R E I L R R I K P L E V R Q N M E T Q I	1380 323
GGGAACTATTTCTTGGCTCCACATCGTCCATGATACCCGACTCGGAAGGAAAACCTCTC G N Y F L G S T S S M I P D S E G K P L	1440 343
TTGTACATGGCGACCTTCTACGAAACCACCTCCATGAAAAATCTCCAGAAAGTGGCGGAA L Y M A T F Y E T T S M K N L Q K V A E	1500 363
GAGCGAAAGACCCGTGCCCTTTCGACCGTCCGGTTCAGCTCGACGGTTTCACTCAGGCCTGG E R K T R A L S T V G Q L D G F T Q A W	1560 383
GAGTCCCTCCTGTCGACGCTCAAACAAGTGTTCGGCACCAGCGTCGAAATGAGCAAGACC E S L L S T L K Q V F G T S V E M S K T	620 403
ATGGGAGGCATGCAGGGAACGGTTCAGTTCGGCTCTGGAAACGGTCACATCCATGGACAAG M G G M Q G T V S S A L E T V T S M D K	1680 423
ACCGCTTACAGATGCGTACGGTTCATGGAAAAAACAAGAAGCGGTCATCGAAATCGTC T A S Q M R T V M E K N K E A V I E I V	1740 443
ACCGTCGTCTCGAAAGTCGGAGACGTCGCGGCCAGACCAACCTTCTCGCGCTCAACGCC T V V S K V G D V A A Q T N L L A L N A	1800 463
GCCATCGAAGCCGCTCGTGCGGGAGAACACGGACGGGGTTTTGCGGTCGTGCGGGACGAA A I E A A R A G E H G R G F A V V G D E	1860 483
GTCCGGAACTTGTCGAACAGGTCCGCATCCTGGTTCAGAGCATCCAGGAGAAAATGGAT V R N L S E Q V R I L V Q S I Q E K M D	1920 503
CAGGTTTCGACCGTACGACAAAACGCCACGAACACATTGACTCGTTCGCTTCCGTCGTC Q V S T V T T N A T N T F D S F A S V V	1980 523
GAAGACGTCACGACCCACATCCGGGAGATCGGCCAGGAAATGAACCAGCTCCTCGACGGA E D V T T H I R E I G Q E M N Q L L D G	2040 543

GTGAAAAAATGGGGAGCACCGTTTCCTCGACCGAGCAGACCGCTTCCCGAACCGGAACG 2100  
V K K M G S T V S S T E Q T A S R T G T 563

GCTCTCCAGCAAGTCAAGAACGAGTTTCAGGCGCTGATTCCTGAATATTCCGCTTIGAG 2160  
A L Q Q V K N E F Q A L I S - 577

ORF2

CGGAGAGGGTGATCTACTTTCCCGGGCGGGCCACCACCACCGATTTCGTTACCATTGGCAA 2220  
V I Y F P G R A T T T D S L P L A 17

ACGAGAGGATCGTGGACGAAAAACCGATTTCCGAAAAAGCTT 2226  
N E R I V D E K P I S E K A 31

secundaria formada por esta propuesta secuencia terminadora, según el programa HAIRPIN de PC-GENE, tendría un  $\Delta G^\circ$  de -6,6 kcal/mol, lo que indica que su formación está energéticamente favorecida.

El segundo marco de lectura (ORF2) está completo, se inicia con el codón ATG en los nucleótidos 412-414 y se termina con el codón de término TGA ubicado en los nucleótidos 2.143 - 2.145 (Fig. 12). El codón de inicio de traducción está precedido por una secuencia AAAGAAAG (posiciones -15 a -8 con respecto al primer ATG) que podría corresponder a un sitio de unión al ribosoma, pues presenta cierta similitud con el consenso para la secuencia de Shine-Dalgarno de *E. coli* TAAGGAGG (Shine y Dalgarno, 1974).

El programa QSEARCH de PC-GENE ayudó a identificar río arriba del ORF2 un posible promotor tipo sigma 70, que tendría una región -35 en los nucleótidos 196 a 201 (TTGATC) separada por 16 nucleótidos de su región -10, que ocuparía los nucleótidos 218 a 223 (ATCAAT). Debido a que en *E. coli* existe un factor sigma específico para los genes de motilidad y quimiotaxis, denominado sigma 28 (Arnosti y Chamberlin, 1989; Liu y Matsumura, 1995), y que los promotores regulados por él poseen secuencias de consenso particulares (Kutsukake y col., 1990), con el programa QSEARCH de PC-GENE se buscó un sitio promotor para este factor sigma determinándose un posible promotor de este tipo cuya región -35 estaría en los nucleótidos 206 a 209 (TAAA) y su región -10 estaría un poco más distante de lo esperado, en los nucleótidos 231 a 238 (TCCGGCAA). Esto estaría involucrando al producto del ORF2 en síntesis de flagelo, en motilidad o en quimiotaxis.

No se localizó un sitio de término de la transcripción en los 117 nucleótidos secuenciados río abajo del ORF2. Más aún, separado por 23 nucleótidos se encuentra el tercer marco de lectura abierto (ORF3) que comienza con el codón GTG en los nucleótidos 2.169-2.171 y que está interrumpido en su extremo 3' por el sitio de restricción *Hind*III en el cual termina el inserto (Fig. 12). Este ORF3 codifica para 31 residuos aminoacídicos y está precedido por la secuencia TTGAGCGG (posiciones -13 a -6 con respecto al primer GTG) que podría actuar como sitio de unión al ribosoma porque presenta cierta similitud con la secuencia de consenso para la región de Shine-Dalgarno de *E. coli* (Shine y Dalgarno, 1974).

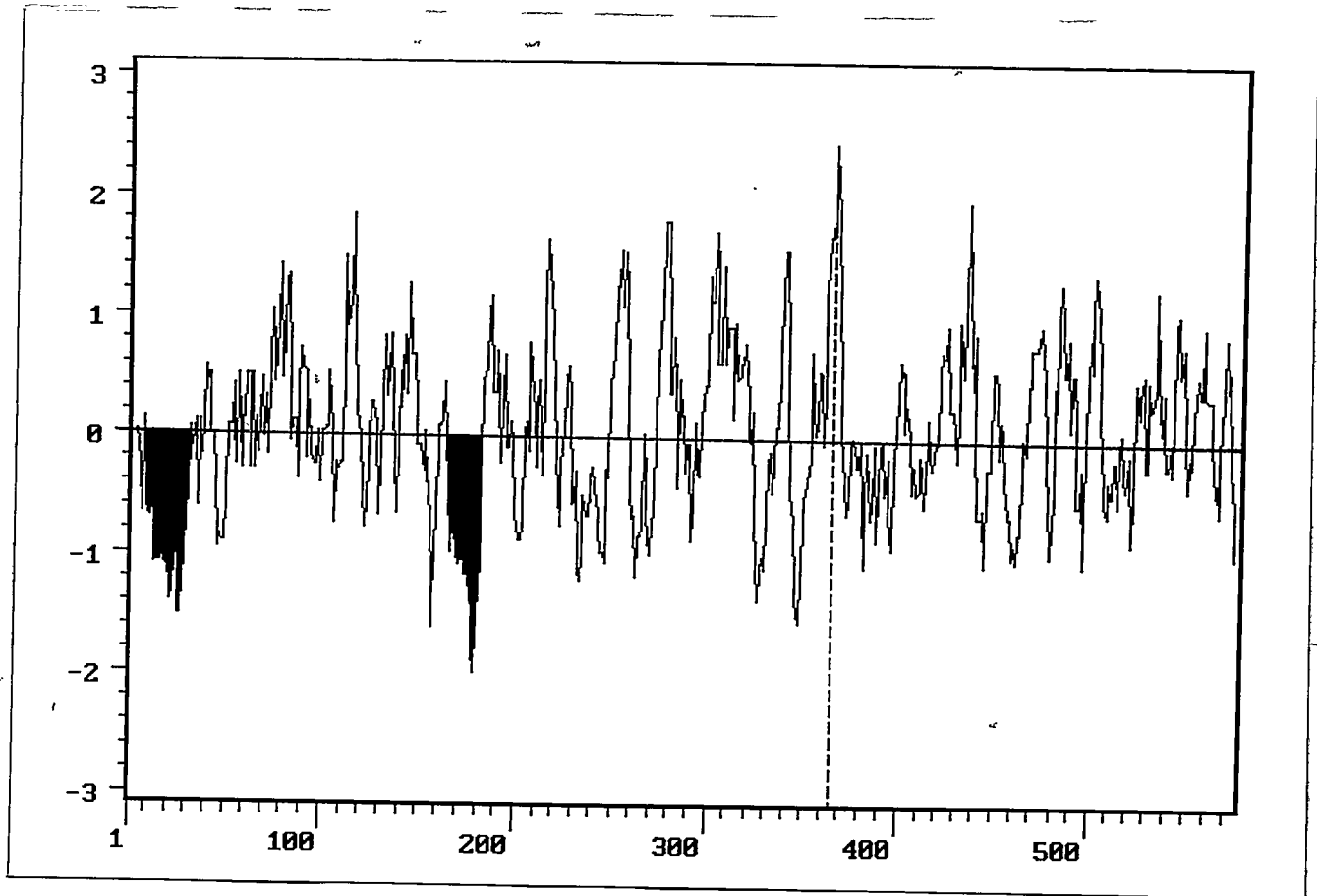
La secuencia nucleotídica de 2.262 pb, fue además comparada con bases de datos utilizando los programas BLAST y FASTA (Anexos I y II). Los resultados de estos análisis determinaron que en la secuencia estudiada existe un segmento, comprendido entre los nucleótidos 1.700 y 1.880 (correspondiente al ORF2), que tiene alta similitud con la región codificante para HCD de genes *mcp* de distintos microorganismos. Esta zona de similitud, incluye la región de hibridación con la sonda de 87 pb utilizada, que comprendería de los nucleótidos 1.759 al 1.844 (región subrayada en los Anexos I y II). Debido a estas similitudes, se postuló que el ORF2 correspondería a un gen del tipo *mcp* y por ello se lo denominó *lcrI* (“*Leptospirillum chemotaxis receptor I*”) y la proteína deducida se denominó LcrI.

Además, la secuencia aminoacídica de cada uno de los tres ORFs fue analizada con el programa BEAUTY, que es un post procesador del BLAST que permite reconocer similitud de regiones con dominios o sitios de proteínas ya conocidas. Los ORFs 1 y 3 no revelaron muy buena similitud con alguna proteína conocida, siendo los mejores alineamientos con regiones muy pequeñas de proteínas muy diversas. El ORF2 presentó la más alta similitud con una proteína MCP (HtrI de *Halobacterium salinarium*), reconociéndose regiones similares a los dominios TM2 y HCD descritos para dicha MCP, con 56 y 50 % de identidad, respectivamente (Anexo III).

#### 4.7. ANÁLISIS DE LA SECUENCIA DE LA PROTEÍNA LcrI

La proteína LcrI, deducida de la secuencia nucleotídica del gen *lcrI*, tiene 577 aminoácidos y un peso molecular de 63.957 Da. Las MCPs poseen entre 512 y 668 residuos, con algunas excepciones como la proteína DcrH de *D. vulgaris* Hildenborough que posee 959 aminoácidos (Deckers y Voordouw, 1996), por lo que el tamaño molecular de LcrI estaría dentro del rango del de las MCPs descritas.

Utilizando el programa ANTIGEN de PC-GENE, se determinó que la secuencia aminoacídica de LcrI presenta un perfil de hidrofiliidad que indica dos regiones altamente hidrofóbicas (Fig. 13), que coinciden con las regiones que el programa TMPred predice como estructuras  $\alpha$ -hélice de transmembrana. Estas corresponderían a una primera región



**Figura 13:** Perfil de hidrofiliidad de la proteína LcrI.

El perfil de hidrofiliidad se obtuvo con el programa ANTIGEN de PC-GENE. El eje vertical mide las unidades de hidrofiliidad (-3 a +3) según Hopp y Woods (1981), siendo hidrofóbicas las regiones bajo cero. La escala horizontal representa el número de residuos aminoacídicos de la proteína. Las regiones en negro corresponden a las zonas hidrofóbicas, posiblemente asociadas a membrana.



de transmembrana (TM1) desde el residuo 8 al 26 y a una segunda región de transmembrana (TM2) desde el residuo 164 al 180. Según esta predicción, los residuos 1 al 7 y 181 a 577 estarían en el lado interno de la membrana citoplasmática (en el citoplasma) y los residuos 27 a 163 estarían en el lado externo de ella (periplasma). Esto determinaría para LcrI un dominio periplasmático muy básico, con un punto isoelectrico (pI) calculado por el programa CHARGPRO de PC-GENE de 10,43.

Con el programa CLUSTAL incluido en PC-GENE, se realizó un alineamiento de la secuencia de LcrI con las secuencias de varias MCPs, resultando porcentajes de identidades y similitudes que se muestran en la Tabla 1. Las proteínas Tcp de *S. typhimurium* y Tar de *E. coli* presentan las mayores identidades de aminoácidos con LcrI, pero como la proteína Tar ha sido la más estudiada y se tienen bien identificados sus sitios de metilación, se la eligió para comparar la distribución de sus dominios con los posibles dominios de LcrI. El alineamiento de estas dos secuencias proteicas se muestra en la Fig. 14. El probable dominio periplasmático de LcrI (residuo 27 al 163) es 14 residuos más pequeño que el correspondiente dominio de Tar (residuo 38 al 188) y ellos poseen un 12 % de identidad y un 55,4 % de similitud. El probable dominio citoplasmático de LcrI (residuo 181 al 577) es 56 aminoácidos más largo que el correspondiente de Tar (residuo 213 al 553), y ellos presentan un 13,3 % de identidad y un 62 % de similitud. En este posible dominio citoplasmático de LcrI se encuentra una región de 45 aminoácidos (residuo 444 al 488) que presenta un 66,7 % de identidad y un 96,5 % de similitud con la región HCD de Tar

**Tabla 1:** Porcentajes de identidades y similitudes entre LcrI y otras MCPs.

<b>Bacteria</b>	<b>MCP</b>	<b>%Identidad</b>	<b>% Similitud</b>
<i>L. ferrooxidans</i>	LcrI	100	100
<i>E. coli</i>	Tar	18,5	56,4
<i>E. coli</i>	Tap	17,9	56,7
<i>E. coli</i>	Tsr	18,1	55,6
<i>E. coli</i>	Trg	17,9	59,8
<i>S. typhimurium</i>	Tcp	19,3	57,6
<i>E. aerogenes</i>	Tas	17,5	59,3
<i>E. aerogenes</i>	Tse	17,4	56,7
<i>P. aeruginosa</i>	PctA	17,0	63,0
<i>D. vulgaris</i>	DcrA	18,4	61,3
<i>D. vulgaris</i>	DcrH	15,4	44,9
<i>B. subtilis</i>	McpA	16,4	61,4
<i>B. subtilis</i>	McpB	18,2	62,5

Los porcentajes de identidad y similitud (calculado en base a sustituciones conservativas) se obtuvieron con el programa CLUSTAL de PC-GENE.



(residuo 361 al 405). Los distintos dominios de Tar y posibles dominios de LcrI, con sus porcentajes de identidad y similitud, se muestran en la Tabla 2.

En el dominio citoplasmático propuesto para LcrI no se detectaron regiones similares a K1 ni a R1 de las MCPs de enterobacterias. Sin embargo, en base a una pequeña secuencia consenso de 9 residuos, descrita para los sitios de metilación en MCPs de *E. coli*, *B. subtilis* y propuesta para DcrH de *D. vulgaris* Hildenborough (Deckers y Voordouw, 1996), se determinaron posibles sitios de metilación de LcrI en los residuos Glu217 y Gln556 (Fig. 14).

#### 4.8. COMPARACIÓN DE REGIONES HCD DE LcrI Y DE OTRAS MCPs

La región HCD corresponde a la región más conservada de las MCPs, cuyo rol propuesto sería interactuar con CheA y con CheW. La región HCD de LcrI, además de poseer la mayor identidad con la misma región de Tar, posee también alto grado de identidad y similitud con la región HCD de todas las proteínas pertenecientes a la familia de MCPs. En la Fig. 15 se muestra el alineamiento de dicha región de LcrI con la correspondiente región de otras 20 MCPs pertenecientes a microorganismos tan diversos como las bacterias *E. coli*, *S. typhimurium*, *E. aerogenes*, *P. aeruginosa*, *B. subtilis*, *D. vulgaris* Hildenborough y *M. xanthus*, y como los archea *H. salinarium*, *H. vallismortis* y *N. pharaonis*. Los porcentajes de identidad y de similitud entre LcrI y cada una de las otras

**Tabla 2:** Posibles dominios de LcrI y su comparación con los dominios de Tar.

<b>Región *</b>	<b>Tar (residuos)</b>	<b>LcrI (residuos)</b>	<b>%Identidad</b>	<b>% Similitud</b>
Transmembrana 1	7-37	8-26	16,1	41,9
Transmembrana 2	189-212	164-180	37,5	50,0
Periplasmática	38-188	27-163	12,0	55,4
Citoplasmática	213-553	181-577	13,3	62,0
HCD	361-405	444-488	66,7	95,6

Los porcentajes de identidad y similitud se obtuvieron con el programa CLUSTAL de PC-GENE.

\* Región de la proteína correspondiente.

		% I	% S
LcrI	TVVSKVGDVAAQTNLLALNAAIEAARAGE----HGRGFVAVGDEVRLS	100	100
Tar	DIISVIDGIAFQTNILALNAAVEAARAGE----QGRGFVAVGDEVRLA	66.7	95.6
Tap	DIISVIDGIAFQTNILALNAAVEAARAGE----QGRGFVAVGDEVRLA	66.7	95.6
Tsr	DIISVIDGIAFQTNILALNAAVEAARAGE----QGRGFVAVGDEVRLA	66.7	95.6
Tcp	DITSVIDGIAFQTNILALNAAVEAARAGE----QGRGFVAVGDEVRTLA	64.4	95.5
Tas	AITSVIDGIAFQTNILALNAAVEAARAGE----QGRGFVAVGDEVANLA	64.4	85.3
Tse	DITGVIDGIAFQTNILALNAAVEAARAGE----QGRAFAVVAGEVRNLA	62.2	93.3
PctA	QILEVIKGISEQTNLLALNAAIEAARAGE----AGRGFVAVGDEVRLA	68.9	91.1
MCPA	NILRVINGIADQTNLLALNAAIEAARAGE----AGRGFVAVGDEVRLA	64.4	95.5
DcrA	RVIEVINEIADQTNLLALNAAIEAARAGD----AGRGFALVADDEVKLA	66.7	93.4
DcrH	KVMSVISDIAQTNLLALNAAIEAARAGD----AGRGFVAVGDEVKLA	73.3	95.5
DcrI	AIMGVIQDIAQTNLLALNAAIEAARAGD----AGRGFVAVGDEVKLA	71.1	95.5
Trg	EITAVINSIAFQTNILALNAAVEAAR-GE----QGRGFVAVGSEVRLA	60.0	93.3
HtrI	DIVDVITDIDGEQTNMLALNASIEAARAGN--ADGDGFVAVGDEVKDLA	55.3	91.5
Htp5	DIAELISDIAEQTNMLALNANIEAARAGSGDGSNGDGFVAVGDEVKELA	55.1	87.8
Htp3	EVVDVITGIAEQTNMLGLNASIEAARAGE----EGEGFVAVGAEVKAIV	60.0	93.3
Htp4	EIVDLISDIAEQTNMLALNANIEAARADK----SGDGFVAVGDEVKDLA	60.0	93.3
Htp6	TIVAAITDIAEQTNMLALNANIEAARADQ----DGDGFVAVGDEVKDLA	62.2	95.5
vHtrII	EIVGVITSIVEQTNMLALNASIEAAHADG----DGEFVAVGDEIKGLA	51.1	95.5
pHtrII	EVSEMIADIAEQTNILALNASIEAARADG----NSEGFVAVGDEVKALA	57.8	95.6
FrzCD	TVVEVIDEIAIDRSDLLALNAAIEAGSAGEA----GKGFVAVGAEVRLA	51.1	95.5

● ●●● \*●●●● \*●●●● ● ●●●● \*● \*

**Figura 15:** Alineamiento de la región HCD de varias MCPs con la región homóloga de LcrI.

El alineamiento se realizó con el programa CLUSTAL de PC-GENE. Las secuencias de 45 aminoácidos de la región HCD de las MCPs corresponden a: Tar, Tap, Tsr y Trg de *E. coli* (Krikos y col., 1983; Bollinger y col., 1984); Tas y Tse de *E. aerogenes* (Dahl y col., 1989); Tcp de *S. typhimurium* (Yamamoto e Imae, 1993) PctA de *P. aeruginosa* (Kuroda y col., 1995); DcrA, DcrH y DcrI de *D. vulgaris* Hildenborough (Dolla y col., 1992; Deckers y Voordouw, 1994); McpA de *B. subtilis* (Hanlon y Ordal, 1994); FrzCD de *M. xanthus* (McBride y col., 1989); HtrI, Htp3, Htp4, Htp5 y Htp6 de *H. salinarium* (Yao y Spudich, 1992; Rudolph y col., 1996); vHtrII de *H. vallismortis* y pHtrII de *N. pharaonis* (Seidel y col., 1995). En rojo se muestran los aminoácidos idénticos a LcrI. Las estrellas (\*) indican los residuos conservados en todas las MCPs analizadas y los puntos (●) indican los residuos conservados en más de 17 de las 21 MCPs, incluyendo LcrI. A la derecha se muestran los porcentajes de identidad (% I) y de similitud (% S) con la región de LcrI.

MCPs, en la región mencionada, fueron superiores al 51 % y al 85 %, respectivamente, llegando en los mejores casos a un 73,3 % de identidad (con DcrH de *D. vulgaris* Hildenborough) y a un 95,6 % de similitud (con Tap, Tar y Tsr de *E. coli* y con pHtrII del arqueón *N. pharaonis*).

Se realizó una predicción de estructura secundaria de la región HCD de LcrI, con el programa GARNIER utilizado por PC-GENE, resultando 3 posibles estructuras de  $\alpha$ -hélice en la región: una del residuo 453 al 473, y las otras dos son más pequeñas y se ubican del residuo 482 al 490 y del 494 al 502.

#### **4.9. FRECUENCIA DE USO DE CODONES Y CONTENIDO G + C DEL DNA DE *L. ferrooxidans***

Se puede obtener información adicional a partir de la primera secuencia descrita de un gen de *L. ferrooxidans* que codifica para una proteína, y ésta es la frecuencia de uso de codones del microorganismo. Si bien un solo gen no es suficiente para obtener una media estadística, es un primer acercamiento y puede indicar ciertas tendencias útiles para trabajos posteriores con oligonucleótidos degenerados. La Tabla 3 muestra la frecuencia de uso de codones de *Thiobacillus ferrooxidans* y de *E. coli*, comparada con la frecuencia que se deduce para *L. ferrooxidans* desde el gen *lcrI*. Para 10 aminoácidos el codón más usado es el mismo en *L. ferrooxidans* que en *T. ferrooxidans*, en cambio para 7 aminoácidos el codón

Tabla 3: Frecuencia de uso de codones de *lcrI*.

Aminoácido	Codón	<i>L. ferrooxidans</i>	<i>T. ferrooxidans</i>	<i>E. coli</i>
Alanina	GCA	2	12	22
	GCC	48	44	26
	GCG	25	33	33
	GCU	25	11	19
Arginina	AGA	6	3	6
	AGG	6	5	3
	CGA	10	6	6
	CGC	25	39	37
	CGG	31	25	10
	CGU	22	22	38
Asparagina	AAC	87	58	54
	AAU	13	42	46
Ácido aspártico	GAC	67	51	39
	GAU	33	49	61
Cisteína	UGC	0	64	55
	UGU	0	36	45
Glutamina	CAA	12	26	32
	CAG	88	74	68
Ácido glutámico	GAA	64	49	68
	GAG	36	51	32
Glicina	GGA	41	11	12
	GGC	29	46	39
	GGG	18	16	14
	GGU	12	27	35
Histidina	CAC	78	55	45
	CAU	22	45	55
Isoleucina	AUA	8	8	10
	AUC	80	63	42
	AUU	12	29	48
Leucina	CUA	0	3	4
	CUC	39	20	10
	CUG	30	49	50
	CUU	20	8	11
	UUA	4	3	13
	UUG	7	17	12
Lisina	AAA	50	35	74
	AAG	50	65	26
Metionina	AUG	100	100	100
Fenilalanina	UUC	72	63	45
	UUU	28	37	55
Prolina	CCA	12	13	20
	CCC	12	68	11
	CCG	38	36	52
	CCU	38	13	17
Serina	AGC	0	25	25
	AGU	0	14	15
	UCA	7	6	13
	UCC	60	28	16
	UCG	31	18	14
	UCU	2	9	17
Treonina	ACA	11	7	15
	ACC	60	54	42
	ACG	27	29	24
	ACU	2	10	19
Triptofano	UGG	100	100	100
Tirosina	UAC	44	50	44
	UAU	56	50	56
Valina	GUA	6	12	17
	GUC	63	30	20
	GUG	17	46	35
	GUU	15	12	28



más usado en *L. ferrooxidans* coincide con el más usado en *E. coli*. Así, en general la frecuencia de uso de codones de *lcrI* es más parecida a la de *T. ferrooxidans* que a la de *E. coli*.

Además, en *lcrI* la tercera posición de los codones presentó una mayor utilización de las bases G (42,2 %) y C (30,1 %), la segunda posición de las bases T (33,2 %) y A (29,4 %), y la primera posición de las bases G (33,2 %) y A (31 %), lo que revela un alto uso de G + C en la tercera posición.

El fragmento de 2.262 pb de DNA de *L. ferrooxidans* secuenciado tiene un contenido de G + C del 52,7 %.

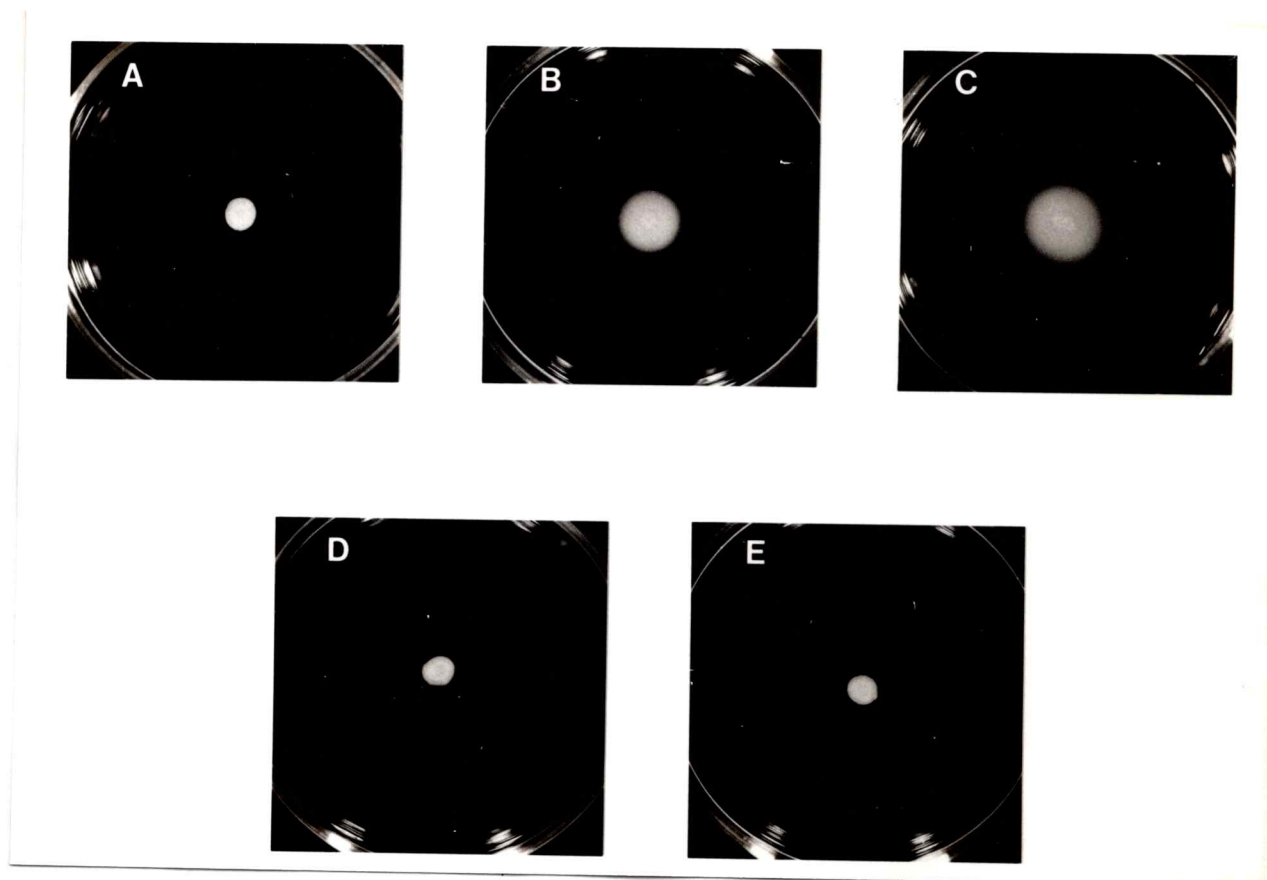
#### **4.10. ENSAYO DE COMPLEMENTACIÓN DE QUIMIOTAXIS CON *LcrI* DE UNA CEPA DE *E. coli* QUE CARECE DE RECEPTORES QUIMIOTÁCTICOS**

La cepa RP4372 de *E. coli*, posee alteraciones de su genoma que la hacen carecer de receptores quimiotácticos, pero posee todas las proteínas Che que le permitirían recuperar sus funciones quimiotácticas si presentara MCPs funcionales. Considerando esto, se utilizó esta cepa para estudiar la recuperación de quimiotaxis al expresar la proteína de 58 kDa de *L. ferrooxidans* desde el plasmidio recombinante pLf13.

Se realizó el ensayo de quimiotaxis en placas con medio triptona en agar blando, en las que las bacterias se inoculan sobre el agar en un punto central de la placa y se incuban a

30°C para luego medir el diámetro del halo de crecimiento, pues al consumirse las sustancias nutritivas se van generando radialmente gradientes de concentración que podrían ser señales atrayentes. La Fig. 16 muestra cómo la cepa de *E. coli* que carece de receptores quimiotácticos muestra un diámetro de halo muy pequeño, de 8 mm (A), demostrando su ineficiencia para migrar en un gradiente de nutrientes. La cepa DH5 $\alpha$ , que posee niveles normales de MCPs, presentó un diámetro de halo de 15 mm (B), lo que revela su comportamiento quimiotáctico eficiente. La cepa RP4372, transformada con el plásmido multicopia pNT201 que expresa altos niveles de la proteína Tar, presentó el mayor halo de crecimiento (C), evidenciando que la sobreexpresión de un receptor quimiotáctico funcional hace más eficiente a la bacteria en la migración hacia una mayor concentración radial de la sustancia atrayente, que en el caso del receptor Tar es aspartato.

La cepa RP4372 de *E. coli*, transformada con el plásmido que expresa la proteína tipo MCP de *L. ferrooxidans*, presentó igual comportamiento que la cepa no transformada (D y A). Obviamente el control de la cepa RP4372 transformada con el vector pGEM-3Z presentó igualmente un comportamiento no quimiotáctico hacia las sustancias del medio triptona para las cuales *E. coli* genera gradientes de concentración (E).



**Figura 16:** Quimiotaxis en placas de agar blando.

Se realizó el ensayo como se describe en Materiales y Métodos, en placas de agar blando con medio triptona, incubando por 40 h a 30°C. Las cepas de *E. coli* inoculadas en el centro de las placas fueron: (A) RP4372; (B) DH5 $\alpha$ ; (C) RP4372/pNT201; (D) RP4372/pLf13 y (E) RP4372/pGEM-3Z.

## 5. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente trabajo revelan que la bacteria acidofílica quimiolitotrófica *L. ferrooxidans* posee un gen que codifica para una proteína perteneciente a la familia de las MCPs, proteína que denominamos LcrI (*Leptospirillum* chemotaxis receptor I). El gen *lcrI* es el primer gen codificante para una proteína que se describe para este microorganismo.

En base al análisis de similitud con secuencias promotoras de *E. coli*, se determinó que el gen *lcrI* posee dos posibles promotores: uno tipo sigma 70 y otro tipo sigma 28 (Fig. 12). La región -35 del posible promotor tipo sigma 70 (TTGATC) posee 4 nucleótidos idénticos al consenso de *E. coli* (TTGACA) y la región -10 (ATCAA) posee 2 nucleótidos idénticos al consenso de *E. coli* (TATAA). En la Tabla 4 se muestra la secuencia consenso para el promotor tipo sigma 70 de *E. coli* comparada con el posible promotor tipo sigma 70 del gen *lcrI* de *L. ferrooxidans*.

**Tabla 4:** Promotores tipo sigma 70.

Tipo de promotor *	Región -35	Separación **	Región -10
Consenso tipo sigma 70 de <i>E. coli</i>	TTGACA	17	TATAA
Posible tipo sigma 70 de <i>lcrI</i>	TTGATC	16	ATCAA

\* La secuencia consenso de *E. coli* proviene de Kutsukake y col. (1990) y el posible promotor de *lcrI* de *L. ferrooxidans* proviene de este estudio. Con color se destacan los nucleótidos que difieren del consenso.

\*\* Se refiere a la cantidad de nucleótidos que separan la región -10 de la región -35.

El factor sigma 28 de *E. coli* reconoce genes involucrados en la síntesis del flagelo, en motilidad y en quimiotaxis (Arnosti y Chamberlin, 1989; Liu y Matsumura, 1995), por lo que la presencia de promotores del tipo sigma 28 plantea de antemano la posibilidad que el gen correspondiente esté participando en alguno de los procesos mencionados. Debido a esto, el hallazgo de un promotor tipo sigma 28 en el gen *lcrI* apoya fuertemente la participación de la proteína LcrI en quimiotaxis. *L. ferrooxidans* podría contar con un factor tipo sigma 28, pues se han descrito factores de este tipo con alto grado de conservación de secuencia aminoacídica en otras bacterias Gram negativas y en *B. subtilis*. Además, las secuencias promotoras que estos factores reconocen son muy similares al consenso de *E. coli*, principalmente en la región -35. De hecho, factores sigma 28 de un microorganismo son funcionales en promotores tipo sigma 28 de otro microorganismo (Arnosti y Chamberlin, 1989; Helmann, 1991; Chen y Helmann, 1992; Starnbach y Lory, 1992). Además, en otras bacterias e incluso en un arqueón, se describen genes codificantes de flagelina que poseen un elemento tipo promotor sigma 28 muy similar al descrito en *E. coli*, lo que revela la gran conservación del sistema regulador de la expresión de genes involucrados en motilidad y quimiotaxis (Helmann, 1991).

El posible promotor tipo sigma 28 de *lcrI* posee una región -35 (TAAA) idéntica al consenso de promotores de este tipo en diversas bacterias (Kutsukake y col., 1990; Helmann, 1991), y una región -10 (TCCGGCAA) con 5 nucleótidos idénticos al consenso. La separación entre estas dos regiones resultó ser de 21 nucleótidos (ver Fig. 12), difiriendo de la separación de 15 nucleótidos que existe entre -35 y -10 de los promotores tipo sigma

28 descritos (Tabla 5). Esto podría dar cuenta de la probable existencia en *L. ferrooxidans* de un factor sigma tipo sigma 28 que reconoce secuencias similares a las descritas en otras bacterias pero separadas por un mayor número de nucleótidos. Alternativamente, la secuencia CTCGAATC (nucleótidos 225 a 232), por estar a 15 nucleótidos de la propuesta región -35, podría actuar como región -10 aunque sea un poco menos similar al consenso. En *Rhizobium meliloti* se describen promotores tipo sigma 28 en genes relacionados con síntesis del flagelo, cuyas regiones -10 poseen igualmente poca identidad al consenso descrito y aún así son activos en transcripción (ver Tabla 5) (Helmann, 1991).

En *E. coli* los genes de MCPs y de proteínas Che poseen promotores tipo sigma 28 y no poseen promotores tipo sigma 70 (Helmann y Chamberlin, 1987; Arnosti y Chamberlin, 1989; Liu y Matsumura, 1995), de manera que estos genes sólo son expresados cuando la célula ha activado la síntesis del factor sigma 28, que ocurre en la fase exponencial tardía del crecimiento de un cultivo de laboratorio, es decir, cuando las condiciones nutricionales y de toxicidad se vuelven adversas para la bacteria y por ello se hacen necesarios sistemas de quimiotaxis y motilidad. Particularmente interesante es que *lcrI* presente traslapados dos posibles promotores, uno para sigma 70 y otro para sigma 28. Del mismo modo, los genes *dcrA* y *dcrH* que codifican para MCPs de la bacteria quimiolitotrófica anaerobia *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, poseen río arriba de su primer codón ATG un posible promotor sigma 70 que está traslapado con un posible promotor sigma 28 (Dolla y col., 1992; Deckers y Voordouw, 1996). Podemos especular que estas bacterias quimiolitotróficas, que viven en ambientes muy particulares, requieren los dos tipos de

**Tabla 5:** Promotores tipo sigma 28.

Bacteria	Gen *	Región -35	Separación **	Región -10
<i>L. ferrooxidans</i>	<i>lcrI</i>	TAAA	21	TCCGGCAA
Consenso		TAAA	15	GCCGATAA
<i>E. coli</i>	<i>fliC</i>	TAAA	15	GACGATAA
<i>E. coli</i>	<i>fliD</i>	TAAA	15	ACCGATAA
<i>E. coli</i>	<i>motA</i>	TAAA	15	GCCGATAT
<i>E. coli</i>	<i>tar</i>	TAAA	15	GCCGATAA
<i>E. coli</i>	<i>tsr</i>	TAAA	15	GCCGAAA
<i>E. coli</i>	<i>trg</i>	TAAG	15	GCCGATGA
<i>E. coli</i>	<i>hag</i>	TAAA	15	GACGATAA
<i>S. typhimurium</i>	<i>fliA</i>	TGTA	15	GCCGATAA
<i>S. typhimurium</i>	<i>tar</i>	TAAA	15	GCCGATAA
<i>E. aerogenes</i>	<i>tse</i>	TAAA	15	GCCGATAA
<i>R. meliloti</i>	<i>flaB</i>	TAAC	18	GCCCATCG

\* La secuencia consenso, los promotores de los genes *fliC*, *fliD*, *motA*, *tar*, *tsr* y *trg* de *E. coli*, y de los genes *fliA* y *tar* de *S. typhimurium* provienen de Kutsukake y col. (1990); el promotor del gen *hag* (codifica la flagelina) proviene de Helmann y Chamberlin (1987); el promotor de *tse* de *E. aerogenes* y el de *flaB* de *R. meliloti* provienen de Helmann (1991) y el posible promotor de *lcrI* de *L. ferrooxidans* proviene de este estudio. Con color se destacan los nucleótidos que difieren del consenso.

\*\* Se refiere a la cantidad de nucleótidos que separan la región -10 de la región -35.



promotores para expresar las proteínas involucradas en quimiotaxis. Esto les permitiría mantener un nivel basal de expresión de genes de quimiotaxis durante todo su ciclo de vida, utilizando promotores reconocibles por el factor sigma 70, y les permitiría aumentar la expresión utilizando promotores reconocibles por factor sigma 28 cuando se encuentren en situaciones más desfavorables nutricionalmente.

La funcionalidad en *E. coli* de uno o los dos promotores propuestos para *lcrI* quedó manifiesta cuando, al utilizar toda la maquinaria transcripcional y traduccional de *E. coli*, se expresó *in vitro* una proteína de 58 kDa, tanto desde el recombinante pLf13 como desde el recombinante pLf3,5 (Fig. 8). Ambos plasmidios recombinantes llevan el inserto de DNA de *L. ferrooxidans* en orientaciones opuestas con respecto al promotor *lac* del vector, y como el nivel de expresión es prácticamente el mismo, se deduce que dicha expresión es independiente del promotor *lac* del vector y que, por lo tanto, es gobernada por su o sus propios promotores.

Aunque la proteína LcrI tiene un peso molecular calculado de 64 kDa, por poseer regiones muy básicas, podría migrar en geles de poliacrilamida-SDS como una proteína de menor tamaño. Se ha descrito una migración anormal para las proteínas acídicas del arqueón *H. salinarium*, incluyendo la MCP denominada HtrI, que poseen una migración electroforética menor a la esperada por su tamaño molecular (Yao y Spudich, 1992). Así, se podría explicar que la proteína LcrI migra un poco más de lo esperado por la basicidad de su dominio periplasmático, sin descartar la posibilidad que exista algún tipo de procesamiento

que disminuya el tamaño molecular de la proteína.

La idea que el polipéptido de 58 kDa sintetizado *in vitro* corresponde al producto del gen *lcrI* se ve fuertemente apoyada ya que no ocurre su síntesis al utilizar el DNA del vector pGEM-3Z (que no posee el inserto) como templado en el ensayo de expresión *in vitro* (Fig. 8, carril B). Además, la proteína de 58 kDa es inmunoprecipitada con anticuerpos contra la proteína Tar de *E. coli* (Fig. 9), lo que revela la existencia de comunidad antigénica entre ella y el receptor Tar. Este fenómeno de reactividad inmunológica cruzada es común en las MCPs de muy diversos microorganismos y revela la conservación de regiones determinantes en su funcionalidad como receptor y/o transductor (Nowlin y col., 1985; Alam y Hazelbauer, 1991; Morgan y col., 1993).

Células de *E. coli* transformadas con el recombinante pLf13 también expresaron un polipéptido de 58 kDa (Fig. 11). Esta expresión fue independiente de la inducción con IPTG, por lo que *in vivo* en *E. coli* tampoco estaría bajo el control del  $P_{lac}$  del vector sino que estaría bajo el control de alguno de los promotores propuestos para *lcrI*.

La síntesis de este polipéptido, tanto *in vitro* como *in vivo*, sugiere además que el propuesto sitio de unión al ribosoma del gen *lcrI* (AAAGAAAG) podría estar funcionando en *E. coli*.

El bajo nivel de expresión *in vivo* en *E. coli* de esta proteína de 58 kDa podría deberse a que ocurre algún fenómeno que no ocurre *in vitro*, como sería una disminuída traducción porque el sitio de unión al ribosoma no sea tan eficiente, lo que *in vitro* puede ser

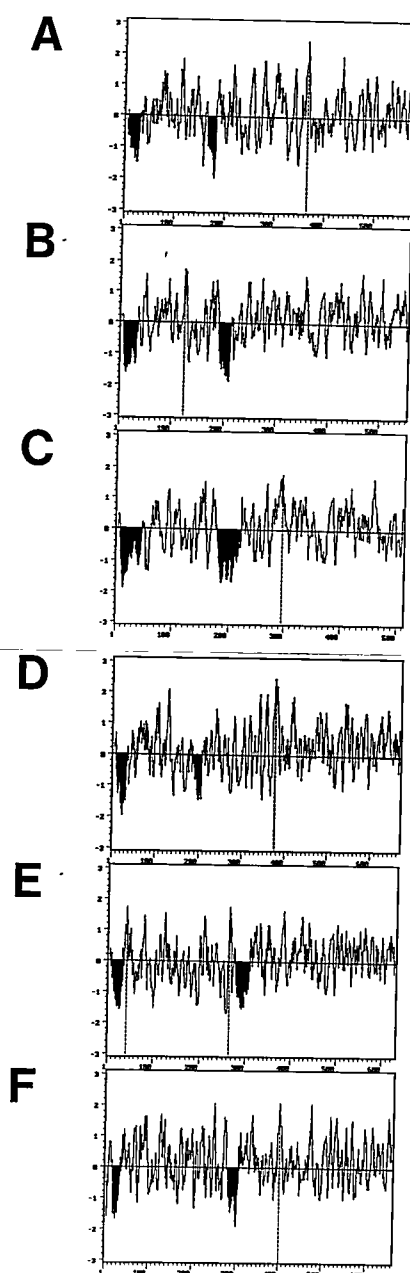
superado por una óptima concentración de Magnesio (Pratt, 1985). También puede estar ocurriendo *in vivo* una terminación de la transcripción aumentada en el propuesto terminador (ubicado río abajo de los posibles promotores tipo sigma 70 y tipo sigma 28), lo que además explicaría que a pesar de tener un promotor *lac* río arriba del primer ATG, no se produzca una mayor síntesis de la proteína. *In vivo* en *L. ferrooxidans*, podría existir un mecanismo de regulación de la expresión del gen *lcrI* similar al de terminación/antiterminación de los genes de aminoacil t-RNA sintetasas de algunas bacterias (Grundy y Henkin, 1994), de modo que cuando se requiera sintetizar la MCP se forme alguna estructura antiterminadora en el mensajero que permita continuar la transcripción río abajo del terminador.

Río abajo de la región codificante del gen *lcrI* no se encontró una secuencia invertida repetida que podría representar un terminador de la transcripción independiente del factor Rho, indicando que podría existir terminación dependiente de Rho o que las secuencias invertidas repetidas podrían estar río abajo del sitio de clonamiento *HindIII* (Fig. 12). Otra alternativa es que no exista término de la transcripción inmediatamente después del gen *lcrI* y que exista un mensajero policistrónico que incuya al gen *lcrI* y al potencial ORF3. Este ORF3 se encuentra incompleto en el fragmento clonado, por lo que el polipéptido que se codifica es de un tamaño indeterminado cuyos primeros 30 aminoácidos son insuficientes para reconocer si existe identidad con las MCPs, pues la conservación de las MCPs se encuentra en el extremo carboxilo terminal. Aún así, no se descarta que esta

proteína pueda corresponder a otro receptor quimiotáctico de *L. ferrooxidans*, ya que en *E. coli* y en *E. aerogenes* se describen mensajeros policistrónicos que codifican para dos MCPs (Krikos y col., 1983; Dahl y col., 1989).

El ORF1 que se encuentra incompleto en pLf13 podría estar completo en el recombinante pLf3,5. Si fuera así, podría corresponder a la proteína que se expresa *in vitro* desde pLf3,5 y que migra en geles de poliacrilamida-SDS como una banda de 62 kDa (Fig. 8, carril D).

La proteína deducida LcrI posee dos regiones hidrofóbicas (Fig. 13) que se encuentran en posiciones comparables a las regiones hidrofóbicas de transmembrana de la mayoría de las MCPs conocidas (Fig. 17). La primera región hidrofóbica podría ser parte de una secuencia señal, pues la región N terminal está positivamente cargada por un residuo básico y luego le sigue un segmento de residuos no cargados y principalmente hidrofóbicos, lo que es característico de las secuencias señal descritas en bacterias (Michaelis y Beckwith, 1982). Esto permite especular que la proteína LcrI podría insertarse en la membrana citoplasmática a través de sus dos regiones hidrofóbicas y hace suponer que ella funcionaría de manera similar a las MCPs de *E. coli*, con un dominio periplasmático que le permitiría actuar como receptor y uno citoplasmático que actuaría como transductor. Se han descrito muy pocas MCPs que se escapan de este patrón general, difiriendo de las MCPs clásicas por carecer de un dominio periplasmático y por recibir el estímulo de una forma distinta. Una de



**Figura 17:** Perfiles de hidrofiliidad de varias MCPs y LcrI.

El eje vertical mide las unidades de hidrofiliidad (-3 a +3) según Hopp y Woods (1981), siendo hidrofóbicas las regiones bajo cero. Las regiones en negro corresponden a las zonas hidrofóbicas de: (A) LcrI, (B) Tar de *E. coli*, (C) Tas de *E. aerogenes*, (D) DcrA de *D. vulgaris* Hildenborough, (E) PctA de *P. aeruginosa* y (F) McpB de *B. subtilis*.

ellas es HtrI del arqueón *H. salinarium*, que participa sólo como transductor de una señal fototáctica. HtrI carece de un dominio extramembranoso que una ligando y sólo posee dos regiones hidrofóbicas muy cercanas entre sí, mediante las que se inserta en la membrana dejando un dominio citoplasmático más extendido que las MCPs conocidas (Spudich, 1993), a través del cual interactúa con el receptor de membrana SRI que percibe una señal luminosa (Yao y Spudich, 1992). Otro caso se refiere a la proteína FrzCD de *M. xanthus*, que participa en una vía de transducción de señal análoga a la quimiotáctica de enterobacterias, pero lo hace como proteína soluble en el citoplasma pues carece de regiones hidrofóbicas (McBride y col., 1989; Zusman y McBride, 1991). *M. xanthus* no posee motilidad flagelar sino motilidad por "gliding".

La proteína de 58 kDa de *L. ferrooxidans* expresada *in vivo* en *E. coli* desde el plasmidio pLf13, se observó en fracciones de membranas citoplasmáticas (Fig. 11), lo que indica que esta proteína posee al menos una región de transmembrana que le permitiría dicha inserción. Esto aporta otra evidencia respecto a la identidad de este polipéptido de 58 kDa con la proteína MCP denominada LcrI. El hecho que la proteína expresada desde pLf13 *in vitro* y la expresada desde el mismo plasmidio *in vivo* en *E. coli* e insertada en membrana aparezcan migrando como polipéptidos de aparentemente el mismo tamaño molecular, puede estar reflejando que la secuencia señal de LcrI no se corta de la proteína luego de su inserción en membrana, al igual que ocurre con las MCPs de *E. coli* (Dahl y col, 1989) y con HtrI de *H. salinarium* (Yao y Spudich, 1992). Sin embargo, esto requiere un mayor

análisis porque puede existir una pequeña diferencia en la migración que no sea fácilmente detectable.

Suponiendo que las regiones de transmembrana de LcrI corresponden a las propuestas (TM1 del residuo 8 al 26 y TM2 del residuo 164 al 180) y que estas regiones se insertan en membrana del mismo modo que las MCPs de enterobacterias, existiría entonces en LcrI un extremo amino terminal citoplasmático de 7 aminoácidos con un residuo positivamente cargado, comparable a los 6 a 16 residuos del extremo amino terminal citoplasmático de las MCPs de *E. coli* entre los que se encuentran 2 a 4 residuos cargados que actuarían como una señal de detención de la transferencia a través de la membrana (Dahl y col., 1989). El dominio periplasmático de LcrI tendría 14 residuos menos que el mismo de Tar y estaría expuesto al pH ácido del periplasma de *L. ferrooxidans*. Este posible dominio periplasmático de LcrI, posee un punto isoelectrico de 10,43 que es bastante elevado con respecto al del correspondiente dominio de Tar o de las otras MCPs, salvo el del mismo dominio de la proteína Tas que posee un pI excepcionalmente alto (Tabla 6). El alto punto isoelectrico de esta porción de LcrI podría permitirle adquirir su estructura funcional en un medio tan ácido como el medio en que vive la bacteria acidofílica *L. ferrooxidans*. El dominio de LcrI postulado como citoplasmático posee un pI similar al del dominio correspondiente de otras MCPs (Tabla 6), concordante con el similar pH que existiría intracelularmente en *L. ferrooxidans* y en las otras bacterias.

**Tabla 6:** Punto isoeléctrico de varias MCPs y de sus dominios periplasmáticos y citoplasmáticos.

<b>MCP</b>	<b>pI de la MCP</b>	<b>pI del dominio periplasmático</b>	<b>pI del dominio citoplasmático</b>
LcrI	7,86	10,43	5,54
Tar	5,29	7,65	4,75
Tap	5,47	5,71	5,06
Tsr	4,94	7,49	4,44
Trg	6,09	9,49	5,10
Tcp	4,57	4,35	4,54
Tas	5,72	10,51	4,49
Tse	4,96	6,78	4,57
PctA	4,99	5,21	4,66
DcrA	4,70	5,36	4,50
DcrH	5,55	8,92	5,10
McpA	4,95	7,66	4,34
McpB	5,04	8,70	4,46

Los pI se obtuvieron con el programa CHARGPRO de PC-GENE.



En general, los dominios periplasmáticos de las MCPs presentan poca identidad entre ellos, debido a su función de interactuar específicamente con distintos ligandos. El propuesto dominio periplasmático de LcrI posee también poca identidad con los descritos (Tabla 7), siendo un poco mayores las similitudes con el receptor para serina de *E. aerogenes*, Tse (17,4 % de identidad), y con el receptor para citrato de *S. typhimurium*, Tcp (16,1 % de identidad). Se postula que Tse y Tcp interactúan con el grupo  $\alpha$ -carboxilo de su ligando del mismo modo como Tar interactúa con el grupo  $\alpha$ -carboxilo de aspartato (Milburn y col., 1991; Stock y col., 1992), es decir a través de un bolsillo cargado positivamente, formado por Arg<sup>64</sup>, Arg<sup>69</sup> y Arg<sup>73</sup> en Tse y por Arg<sup>63</sup>, Arg<sup>68</sup> y Arg<sup>72</sup> en Tcp (Dahl y col., 1989; Yamamoto e Imae, 1993). En LcrI no se encuentran residuos arginina en estas posiciones, pero existen Arg<sup>79</sup> y Arg<sup>83</sup> que de algún modo podrían formar parte del propuesto bolsillo. Por otro lado, debido al medio ácido en que se encontraría la porción periplasmática de LcrI, puede que la unión del grupo  $\alpha$ -carboxilo del ligando sea muy distinta a la que ocurre en las MCPs que son funcionales a pHs cercanos a la neutralidad. Incluso, una MCP de *P. aeruginosa*, PctA, a pesar de ser un receptor quimiotáctico para varios aminoácidos y de ser funcional a un pH neutro, no posee los residuos arginina mencionados y por ello debe reconocer aminoácidos de un modo diferente a como lo hacen las MCPs de enterobacterias (Kuroda y col., 1995). No se descarta que LcrI pueda ser un receptor que no reconoce aspartato ni otros aminoácidos, por lo que no requiera unir el grupo  $\alpha$ -carboxilo de ellos.

**Tabla 7:** Porcentajes de identidades y similitudes entre el propuesto dominio periplasmático de LcrI y el dominio periplasmático de otras MCPs.

<b>Bacteria</b>	<b>MCP</b>	<b>% Identidad</b>	<b>% Similitud</b>
<i>L. ferrooxidans</i>	LcrI	100	100
<i>E. coli</i>	Tar	12,0	55,4
<i>E. coli</i>	Tap	12,5	56,3
<i>E. coli</i>	Tsr	13,1	54,8
<i>E. coli</i>	Trg	12,3	58,8
<i>S. typhimurium</i>	Tcp	16,1	55,6
<i>E. aerogenes</i>	Tas	13,0	52,8
<i>E. aerogenes</i>	Tse	17,4	51,7
<i>P. aeruginosa</i>	PctA	12,2	42,0
<i>D. vulgaris</i>	DcrA	13,8	56,9
<i>D. vulgaris</i>	DcrH	8,7	26,3
<i>B. subtilis</i>	McpA	11,9	43,2
<i>B. subtilis</i>	McpB	12,6	40,1

Los porcentajes de identidad y similitud se obtuvieron con el programa CLUSTAL de PC-GENE.

Curiosamente, Tcp además de ser receptor para citrato, también responde positivamente a complejos formados por citrato y metales como  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$  y  $Zn^{2+}$  (Yamamoto e Imae, 1993). No se sabe de qué manera interactúan estos tipos de ligandos con Tcp, pero si LcrI responde a  $Ni^{2+}$  podría interactuar con el catión de un modo similar a como lo hace Tcp.

No se sabe si LcrI es un receptor que reconoce  $Ni^{2+}$  o  $Fe^{2+}$ , pero sin conocer las estructuras secundaria y terciaria del dominio periplasmático de LcrI es muy difícil proponer sitios para unión de estos metales. En general, los sitios de unión a metales se componen por varios residuos de la proteína dispersos a lo largo de la estructura primaria, que producen un efecto cooperativo porque las afinidades de cada grupo individualmente son demasiado bajas. Consecuentemente, el sitio de unión a un metal no puede ser identificado como una unidad discreta (Regan, 1993). Existe una MCP que posee una secuencia consenso para unión del grupo hemo, en la que participan cisteínas e histidinas (Fu y col., 1994), pero unión de este tipo se descarta en LcrI por la ausencia de residuos cisteína.

La falta de complementación de quimiotaxis de una cepa de *E. coli* que carece de MCPs, por el gen *lcrI* tiene diversas posibles explicaciones. Siendo el pH del espacio periplasmático de *E. coli* muy distinto al pH ácido que posee el periplasma de *L. ferrooxidans*, LcrI en la membrana de *E. coli* podría adoptar una conformación muy distinta de su conformación nativa y por ello no ser funcional. Además, el ensayo de quimiotaxis utilizado permite detectar solamente respuestas quimiotácticas positivas y, como aspartato

no es un atrayente sino un repelente para *L. ferrooxidans*, probablemente las otras sustancias contenidas en el medio triptona (y para las cuales *E. coli* establece gradientes de concentración) tampoco son sustancias atrayentes para *L. ferrooxidans*. Aún, si hubiera allí alguna sustancia atrayente para *L. ferrooxidans* puede que no sea reconocida específicamente por LcrI sino por alguna otra MCP de la bacteria que aún no esté descrita. De este modo, puede que el ligando para LcrI no se encuentre en el medio triptona y que por ello no se observe complementación de quimiotaxis con esta proteína de *L. ferrooxidans*. Finalmente, puede que el bajo nivel de expresión de LcrI en *E. coli* no sea suficiente para complementar la función de receptor y transductor de una señal quimiotáctica. De este modo, se podría intentar expresar un mayor nivel de LcrI en *E. coli* y posteriormente realizar ensayos de complementación funcional.

Aunque no se detectan regiones similares a K1 y R1 en el propuesto dominio citoplasmático de LcrI, en él se reconocen dos probables sitios de metilación según la secuencia consenso de 9 residuos. Estos sitios están ubicados en las posiciones relativas en que se encuentran K1 y R1 en las MCPs, es decir uno antes y otro después de la región HCD (residuos Glu-217 y Gln-556) (Fig. 12). En la Fig. 18 se comparan los propuestos sitios de metilación para LcrI de *L. ferrooxidans* con las secuencias consensos de metilación de las MCPs de *E. coli* y *B. subtilis* y con los propuestos sitios de metilación para DcrA y DcrH de *D. vulgaris* (Krikos y col., 1983; Hanlon y Ordal, 1994; Deckers y Voordouw, 1996). Debido a que el probable residuo metilable de LcrI de la posición 556 es glutamina, se

MCPs de <i>E. coli</i>	A/S	X	X	E/Q	<b>Q/E</b>	X	A/S/T	A	S/A/T
MCPs de <i>B. subtilis</i>	A/S	S/T	X	E/Q	<b>E/Q</b>	X	S/L/T	A/S/D	X
DcrA de <i>D. vulgaris</i>	A	S	E	Q	<b>Q</b>	S	S	S	T
DcrH de <i>D. vulgaris</i>	A	S	D	Q	<b>Q</b>	A	A	A	A
LcrI de <i>L. ferrooxidans</i>	E	T	I	E	<b>E</b>	K	S	I	Y
	S	S	T	E	<b>Q</b>	T	A	S	R

**Figura 18:** Comparación de las secuencias consensos de metilación con los probables sitios de metilación de LcrI.

Los probables sitios de metilación de LcrI en un contexto de 9 aminoácidos (residuos 213 a 221 y 552 a 560), se comparan con las secuencias consenso de metilación de MCPs de *E. coli* (Krikos y col., 1983) y de *B. subtilis* (Hanlon y Ordal, 1994) y con los probables sitios de metilación de DcrA y DcrH de *D. vulgaris* Hildenborough (Deckers y Voordouw, 1996). En negritas se indican los residuos metilables y los que se proponen como tales, que en LcrI corresponden a los residuos 217 y 556.

propone que también en *L. ferrooxidans* podría existir una actividad desamidasa que transforme esta glutamina en ácido glutámico. En nuestro laboratorio, previamente se demostró que las actividades metiltransferasa y metilesterasa de *E. coli* actúan sobre proteínas de membrana de *L. ferrooxidans* del mismo modo como lo hace un extracto citoplasmático de *L. ferrooxidans*, aumentando su metilación en presencia de atrayente y disminuyéndola en presencia de repelente (Acuña y col., 1992), por lo que es probable que en *L. ferrooxidans* existan enzimas análogas a CheR y CheB. De ser así, la proteína de *L. ferrooxidans* análoga a CheB podría tener las actividades de metil esterasa y de desamidasa, del mismo modo que la proteína CheB de *E. coli* posee ambas actividades (Sherris y Parkinson, 1981; Kehry y col., 1983).

También ocurre *in vivo* e *in vitro* una funcionalidad heteróloga de las metiltransferasa y metilesterasa de *B. subtilis* y *E. coli*, sobre las MCPs. Sin embargo, las proteínas McpA y McpB, receptores quimiotácticos de *B. subtilis*, tampoco poseen regiones similares a K1 y a R1 de las MCPs entéricas, y en ellas se predijeron sitios de metilación sólo en base a la secuencia consenso de 9 residuos, como ocurre con LcrI (Fig. 18). Esto hace especular que las estructuras secundaria y terciaria globales de la región son suficientemente similares entre las MCPs de *E. coli* y de *B. subtilis* para hacer que los sitios de metilación predichos se encuentren en posiciones adecuadas para que las enzimas mencionadas actúen (Hanlon y Ordal, 1994). Esto avala que los propuestos sitios de metilación del dominio citoplasmático de LcrI, puedan corresponder a los sitios eficientemente metilados por las enzimas de *E. coli*.

Otros probables sitios de metilación en LcrI, que no responden al consenso de 9 residuos, podrían ser los residuos Glu-279, Glu-364, Gln-490, Glu-500, Glu-536 y Gln-567 (Fig. 12), por encontrarse en la segunda posición de los pares Glu-Glu, Glu-Gln, Gln-Glu o Gln-Gln que es una característica de la metilación en MCPs.

En estudios previos, se determinaron proteínas metilables en la membrana de *L. ferrooxidans* en un rango de tamaño molecular de 55 a 80 kDa (según migración en geles de poliacrilamida-SDS) (Acuña y col., 1986 y 1992). Entre estas bandas, las de 80 kDa aumentaron su metilación en presencia de  $\text{Ni}^{2+}$  o  $\text{Fe}^{2+}$  y la disminuyeron en presencia de aspartato. Debido a que LcrI tiene una migración en geles de poliacrilamida-SDS como una proteína de 58 kDa, puede no ser la MCP que responde a aspartato,  $\text{Ni}^{2+}$  y/o  $\text{Fe}^{2+}$ , sino que responda a algún otro quimioefector aún no identificado. Aún así, la proteína LcrI podría actuar como el receptor quimiotáctico de *L. ferrooxidans* que responde a  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y/o aspartato, si al ser expresada en *L. ferrooxidans* migrara como una banda de 80 kDa debido a modificaciones postraduccionales, dimerización o unión de un componente adicional resistente al SDS y a los agentes reductores de la electroforesis.

Se postula que la región HCD de las MCPs interactúa con CheA y CheW, determinando la formación de un complejo activo o de uno inactivo que transduce al interior de la célula una señal repelente o atrayente, respectivamente. La importancia de este dominio es sustentada por su alta conservación en transductores de microorganismos muy diversos (Fig. 15). La presencia de este dominio conservado en LcrI, indirectamente

determina la actividad transductora de la proteína y hace sospechar la existencia en *L. ferrooxidans* de proteínas con funciones análogas a CheA y a CheW que interactuarían con HCD.

Un análisis de la secuencia aminoacídica de LcrI con el programa GARNIER que predice estructura secundaria, arrojó una predicción de tres estructuras de  $\alpha$ -hélices en la región HCD. La primera hélice tiene una extensión de 21 residuos (residuos 453 a 473) y se corresponde con una hélice que en la mayoría de las MCPs comienza 6 residuos después y termina en el mismo punto. Separada por 8 aminoácidos están la segunda y la tercera  $\alpha$ -hélices, separadas entre sí por 3 aminoácidos. En la mayoría de las MCPs, en lugar de estas dos hélices se encuentra una sola de 19 residuos. Esto indica que tanto la conservación de estructuras de  $\alpha$ -hélices como la conservación de aminoácidos en la región HCD, permitirían conformar el sitio que hace funcionales a las MCPs en la transducción de señales al interior de la célula.

El contenido G + C de un 52,7 % del fragmento de 2.262 pb del DNA de *L. ferrooxidans*, se corresponde muy bien con el 47,2 a 58,8 % de G + C deducido en base a los rRNA 16S de *L. ferrooxidans* que se han secuenciado. Por esto, llama la atención el alto contenido de G + C de un 72,3 % que existe en la tercera base de los codones del gen *lcrI* aquí descrito.

*T. ferrooxidans* presenta un 69,4 % de probabilidad de encontrar una base G ó C en la tercera posición de sus codones, lo que es concordante con su alto contenido G + C, que



varía entre un 55 y un 65 % en el DNA de la mayoría de las cepas de *T. ferrooxidans* (Holt y col., 1994). *E. coli* también posee concordancia entre un 51,22 % de G + C en su DNA y un 54,51 % de G o C en la tercera posición de los códones.

No es sorprendente sospechar que en la bacteria quimiolitotrófica *L. ferrooxidans* existan más de una proteína tipo MCP, pues comúnmente ocurre que un microorganismo posee más de una. Además, considerando las condiciones de vida de este microorganismo, en medio ácido con requerimiento de ión ferroso y en presencia de otros metales, el poseer un grupo de MCPs para percibir distintas sustancias de su entorno puede ser una ventaja adaptativa muy importante para él. Esto es avalado por el hecho que además de la banda clonada de 3,5 kb del DNA de *L. ferrooxidans*, una banda de mayor tamaño molecular también hibridó con la sonda correspondiente a una porción del gen *tar* de *E. coli* (Rojas, 1992). Digestiones del DNA cromosomal de *L. ferrooxidans* con otras enzimas de restricción (Rojas, 1992), también generaron más de una banda de hibridización indicando la posibilidad de que exista más de un gen de MCP en el cromosoma de esta bacteria.

Otra bacteria quimiolitotrófica, *D. vulgaris*, posee aproximadamente 16 genes que codifican proteínas del tipo MCP. Esto puede haber surgido como un sistema de quimiotaxis alerta para compensar las limitaciones desde el punto de vista metabólico que posee esta bacteria al compararla con *E. coli* (Deckers y Voordouw, 1996).

La gran familia de proteínas tipo MCPs se compone de más de 40 miembros, considerando a LcrI que aquí describimos.

Esta familia, incluye otras proteínas cuya función aún es desconocida, como TlpA y TlpB de *B. subtilis* (Hanlon y Ordal, 1994). No se ha detectado la participación de estas dos proteínas en quimiotaxis hacia algunas sustancias estudiadas, ni se ha detectado un efecto en el patrón de proteínas metilables *in vivo* cuando se han mutado los genes *tlpA* y *tlpB*. Sin embargo, esto puede deberse a que TlpA y TlpB no son metiladas, a que son metiladas a muy bajo nivel, a que son pobremente expresadas (como Trg de *E. coli*), o a que existe sólo una ausencia de metilación aparente por la presencia de otras bandas metiladas en la misma posición en el gel (Hanlon y Ordal, 1994). Por esto, a pesar de no demostrarlo, no se puede descartar que TlpA y TlpB funcionen como receptores quimiotácticos o como transductorés de algún otro proceso.

Tcp1 es una proteína tipo MCP de *Vibrio cholerae* que participa en regulación de síntesis de pili y en regulación de la respuesta quimiotáctica (Harkey y col., 1994). AcfB de la misma bacteria también es del tipo MCP y de algún modo participa en regulación de la motilidad (Everiss y col., 1994). Ellas actuarían como transductores respondiendo a alguna señal ambiental para aumentar o disminuir la motilidad, facilitándole así a la bacteria la búsqueda de otro nicho o la colonización, respectivamente.

PilJ de *P. aeruginosa* es una proteína tipo MCP pero carece de probables sitios de metilación. PilJ participa de alguna manera en la motilidad del tipo "twitching", que es un modo de translocación superficial independiente de flagelo (Darzins, 1994).

Esto significa que proteínas tipo MCP están ampliamente distribuidas en procariontes de muy diversos orígenes filogenéticos, y cumplen funciones principalmente asociadas a recepción y transducción de una señal quimiotáctica. También participan como receptores y trasductores de potencial redox (Fu y col., 1994) y como transductores de señales fototácticas (Spudich, 1993). Participan de algún modo en tipos de motilidad en las que no participa el flagelo, como es el "gliding" en *M. xanthus* (McBride y col., 1989; Zusman y McBride, 1991) y el "twitching" en *P. aeruginosa* (Darzins, 1994), y participan de un modo desconocido regulando la quimiotaxis en respuesta a señales ambientales (Everiss y col., 1994; Harkey y col., 1994).

Se espera que los estudios realizados en esta tesis contribuyan en un futuro a comprender mejor los mecanismos de adaptación y adherencia de los microorganismos móviles que participan en la biolixiviación de minerales.

## 6. CONCLUSIONES

1. *L. ferrooxidans* posee un gen denominado *lcrI*, que codifica para un probable receptor de quimiotaxis. Este es el primer gen codificante para una proteína que se describe en esta bacteria.
  
2. El gen *lcrI* posee dos posibles promotores: uno para sigma 70 y otro para sigma 28. Ya que se obtuvo expresión en *E. coli*, probablemente uno o ambos son funcionales en ella.
  
3. La proteína LcrI, pertenece a la familia de las MCPs debido a que:
  - posee un tamaño molecular apropiado
  - tiene dos regiones hidrofóbicas en posiciones equivalentes a las de MCPs.
  - posee una región HCD en el propuesto dominio citoplasmático
  - presenta, al menos, dos probables sitios de metilación
  - presenta comunidad antigénica con la MCP Tar de *E. coli*
  - al expresarse en *E. coli* se localiza en la membrana citoplasmática.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

Acuña, J., I. Peirano y C. Jerez. 1986. *In vivo* and *in vitro* methylation of proteins from chemolithotrophic microorganisms: a possible role in chemotaxis. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **8**: 309-317.

Acuña, J., J. Rojas, A. Amaro, H. Toledo y C. Jerez. 1992. Chemotaxis of *Leptospirillum ferrooxidans* and other acidophilic chemolithotrophs: comparison with the *Escherichia coli* chemosensory system. *FEMS Microbiol. Lett.* **96**: 37-42.

Adler, J. 1969. Chemoreceptors in bacteria. *Science* **166**: 1588-1597.

Alam, M., M. Lebert, D. Oesterhelt y G. Hazelbauer. 1989. Methyl-accepting taxis proteins in *Halobacterium halobium*. *EMBO J.* **8**: 631-639.

Alam, M y G. Hazelbauer. 1991. Structural feature of methyl-accepting taxis proteins conserved between archaeobacteria and eubacteria revealed by antigenic cross-reaction. *J. Bacteriol.* **173**: 5837-5842.

Alberts, B., D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts y J. Watson (eds.), 1994, *Molecular Biology of the Cell*. pp 775. Garland Publishing, Inc., New York, USA.

Altschul, S., W. Gish, W. Miller, E. Myer y D. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.

Ames, P. y J. Parkinson. 1988. Transmembrane signaling by bacterial chemoreceptors: *E. coli* transducers with locked signal output. *Cell* **55**: 817-826.

Ames, P. y J. Parkinson. 1994. Constitutively signaling fragments of Tsr, the *Escherichia coli* serine chemoreceptor. *J. Bacteriol.* **176**: 6340-6348.

- Amsler, Ch., M. Cho y P. Matsumura. 1993. Multiple factors underlying the maximum motility of *Escherichia coli* as cultures enter post-exponential growth. *J. Bacteriol.* **175**: 6238-6244.
- Amsler, Ch. y P. Matsumura. 1995. Chemotactic signal in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. En J. Hoch y T. Silhavy (eds.), Two-component signal transduction. pp 89-103. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Arnosti, D. y M. Chamberlin. 1989. Secondary  $\sigma$  factor controls transcription of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 830-834.
- Bollinger, J., Ch. Park, S. Harayama y G. Hazelbauer. 1984. Structure of the Trg protein: homologies with and differences from other sensory transducers of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 3287-3291.
- Booth, B. y N. Curtiss. 1977. Separation of the cytoplasmic and outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* PAO.1. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **74**: 1168-1176.
- Borkovich, K., N. Kaplan, J. Hess y M. Simon. 1989. Transmembrane signal transduction in bacterial chemotaxis involves ligand-dependent of phosphate group transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 1208-1212.
- Chen, Y. y J. Helmann. 1992. Restoration of motility to an *Escherichia coli* *fliA* flagellar mutant by a *Bacillus subtilis*  $\sigma$  factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 5123-5127.
- Craven, R., y T. Montie. 1983. Chemotaxis of *Pseudomonas aeruginosa*: involvement of methylation. *J. Bacteriol.* **154**: 780-786.
- Dahl, M., W. Boos y M. Manson. 1989. Evolution of chemotactic-signal transducers in enteric bacteria. *J. Bacteriol.* **171**: 2361-2371.
- Darzens, A. 1994. Characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* gene cluster involved in pilus biosynthesis and twitching motility: sequence similarity to the chemotaxis proteins of enterics and the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*. *Mol. Microbiol.* **11**: 137-153.
- Deckers, H. y G. Voordouw. 1994. Identification of a large family of genes for putative chemoreceptor proteins in an ordered library of the *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough genome. *J. Bacteriol.* **176**: 351-358.

Deckers, H. y G. Voordouw. 1996. The *dcr* gene family of *Desulfovibrio*: implications from the sequence of *dcrH* y phylogenetic comparison with other *mcp* genes. *Antonie van Leeuwenhoek* **70**: 21-29.

Delgado, M., C. A. Jerez y H. Toledo. 1995. *In vitro* expression of a *Leptospirillum ferrooxidans* gene homologous to the *tar* chemotactic receptor gene from *Escherichia coli*. En C. A. Jerez, T. Vargas, H. Toledo y J. Wiertz (eds.), *Biohydrometallurgical Processing*, Volume II, pp 119-128. Chile.

Devasia, P., K. Natarajan, D. Sathyanarayana y G. Ramanya Rao. 1993. Surface chemistry of *Thiobacillus ferrooxidans* relevant to adhesion on mineral surfaces. *Appl. Env. Microbiol.* **59**: 4051-4055.

Dolla, A., R. Fu, M. Brumlik y G. Voordouw. 1992. Nucleotide sequence of *dcrA*, a *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough chemoreceptor gene, and its expression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**: 1726-1733.

Eisenbach, M. 1990. Functions of the flagellar modes of rotation in bacterial motility and chemotaxis. *Mol. Microbiol.* **4**: 161-167.

Eisenbach, M. 1996. Control of bacterial chemotaxis. *Mol. Microbiol.* **20**: 903-910.

Engström, P y G. Hazelbauer. 1980. Multiple methylation of methyl-accepting chemotaxis proteins during adaptation of *E. coli* to chemical stimuli. *Cell* **20**: 165-171.

Engström, P., D. Nowlin, J. Bollinger, N. Magnuson y G. Hazelbauer. 1983. Limited homology between Trg and the other transducer proteins of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **156**: 1268-1274.

Everiss, K., K. Hughes, M. Kovach y K. Peterson. 1994. The *Vibrio cholerae acfB* colonization determinant encodes an inner membrane protein that is related to a family of signal-transducing proteins. *Infect. Immun.* **62**: 3289-3298.

Foster, D., S. Mowbray, B. Jap y D. Koshly Jr. 1985. Purification and characterization of the aspartate chemoreceptor. *J. Biol. Chem.* **260**: 11706-11710.

Fu, R., J. Wall y G. Voordouw. 1994. DcrA, a c-type heme-containing methyl-accepting protein from *Desulfovibrio vulgaris* Hildenborough, senses the oxygen concentration or redox potential of the environment. *J. Bacteriol.* **176**: 344-350.

Garnier, J., D. Osguthorpe y B. Robson. 1978. Analysis of the accuracy and implications of simple methods for predicting the secondary structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* **120**: 97-120.

Gegner, J., D. Graham, A. Roth y F. Dahlquist. 1992. Assembly of an MCP receptor, CheW, and kinase CheA complex in the bacterial chemotaxis signal transduction pathway. *Cell* **70**: 975-982.

Gentina, J. y F. Acevedo. 1985. Microbial ore leaching in developing countries. *Trends in Biotechnol.* **3**: 86-89.

Goldman, D. y G. Ordal. 1984. *In vitro* methylation and demethylation of methyl-accepting chemotaxis proteins in *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **23**: 2600-2606.

Greck, M., J. Platzer, V. Sourjik y R. Schmitt. 1995. Analysis of a chemotaxis operon in *Rhizobium meliloti*. *Mol. Microbiol.* **15**: 989-1000.

Grundy, F. y T. Henkin. 1994. Conservation of a transcription antitermination mechanism in aminoacyl-tRNA synthetase and amino acid biosynthesis genes in Gram-positive bacteria. *J. Mol. Biol.* **235**: 798-804.

Hanlon, D. y G. Ordal. 1994. Cloning and characterization of genes encoding methyl-accepting chemotaxis proteins of *Bacillus subtilis*. *J. Biol. Chem.* **269**: 14038-14046.

Harkey, C., K. Everiss y K. Peterson. 1994. The *Vibrio cholerae* toxin-coregulated-pilus gene *tcpI* encodes a homolog of methyl-accepting chemotaxis proteins. *Infect. Immun.* **62**: 2669-2678.

Harwood, C. 1989. A methyl-accepting protein is involved in benzoate taxis in *Pseudomonas putida*. *J. Bacteriol.* **171**: 4603-4608.

Helmann, J. y M. Chamberlin. 1987. DNA sequence analysis suggests that expression of flagellar and chemotaxis genes in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* is controlled by an alternative  $\sigma$  factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 6422-6424.

Helmann, J. 1991. Alternative sigma factors and the regulation of flagellar gene expression. *Mol. Microbiol.* **5**: 2875-2882.

Hess, J., K. Oosawa, P. Matsumura y M. Simon. 1987. Protein phosphorylation is involved in bacterial chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 7609-7613.



- Hess, F., K. Oosawa, N. Kaplan y M. Simon. 1988. Phosphorylation of three proteins in the signaling pathway of bacterial chemotaxis. *Cell* **53**: 79-87.
- Higgins, D. y P. Sharp. 1989. Fast and sensitive multiple sequence alignments on a microcomputer. *Comput. Appl. Biosci.* **5**: 151-153.
- Hofmann, K. y W. Stoffel. 1993. TMBASE-A database of membrane spanning protein segments. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **374**: 166-
- Holt, J., N. Krieg, P. Sneath, J. Staley y S. J. Williams (eds.). 1994. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams & Wilkins, Maryly, USA.
- Hopp, T. y K. Woods. 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci USA.* **78**: 3824-3828.
- Jerez, C. y H. Weissbach. 1980. Methylation of newly synthesized ribosomal protein L11 in a DNA-directed *in vitro* system. *J. Biol. Chem.* **255**: 8706-8710.
- Johnson, B. y L. Rang. 1993. Effects of acidophilic protozoa on populations of metal-mobilizing bacteria during the leaching of pyritic coal. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1417-1423.
- Kathariou, S. y E. Greenberg. 1983. Chemoattractants elicit methylation of specific polypeptides in *Spirochaeta aurantia*. *J. Bacteriol.* **156**: 95-100.
- Kehry, M. y F. Dahlquist. 1982. The methyl-accepting chemotaxis proteins of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **257**: 10378-10386.
- Kehry, M., M. Bond, M. Hunkapiller y F. Dahlquist. 1983. Enzymatic deamidation of methyl-accepting chemotaxis proteins in *Escherichia coli* catalyzed by the *cheB* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 3599-3603.
- Kimbrough, T. y C. Manoil. 1994. Role of small cytoplasmic domain in the establishment of serine chemoreceptor membrane topology. *J. Bacteriol.* **176**: 7118-7120.
- Kolaskar, A. y B. Reddy. 1985. A method to locate protein coding sequences in DNA of prokaryotic system. *Nucl. Acids Res.* **13**: 185-194.
- Krikos, A., N. Mutoh, A. Boyd y M. Simon. 1983. Sensory transducers of *E. coli* are composed of discrete structural and functional domains. *Cell* **33**: 615-622.

- Krikos, A., M. Conley, A. Boyd, H. Berg y M. Simon. 1985. Chimeric chemosensory transducers of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **82**: 1326-1330.
- Kuroda, A., T. Kumano K. Taguchi, T. Nikata, J. Kato y H. Ohtake. 1995. Molecular cloning and characterization of a chemotactic transducer gene in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Bacteriol. **177**: 7019-7025.
- Kutsukake, K., Y. Ohya y T. Iino. 1990. Transcriptional analysis of the flagellar regulon of *Salmonella typhimurium*. J. Bacteriol. **172**: 741-747.
- Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**: 680-685.
- Lee, L. e Y. Imae. 1990. Role of threonine residue 154 in ligand recognition of the Tar chemoreceptor in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **172**: 377-382.
- Liu, J. y J. Parkinson. 1991. Genetic evidence for interaction between the CheW and Tsr proteins during chemoreceptor signaling by *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **173**: 4941-4951.
- Liu, X. y P. Matsumura. 1995. An alternative sigma factor controls transcription of flagellar class-III operons in *Escherichia coli*: gene sequence, overproduction, purification and characterization. Gene **164**: 81-84.
- Lopes, S. y L. Shapiro. 1984. Differential expression and positioning of chemotaxis methylation proteins in *Caulobacter*. J. Mol. Biol. **178**: 551-568.
- Lowe, G., M. Meister y H. Berg. 1987. Rapid rotation of flagellar bundles in swimming bacteria. Nature **325**: 637-640.
- Lowry, D., A Roth, P. Rupert, F. Dahlquist, F. Moy, P. Domaille y P. Matsumura. 1994. Signal transduction in chemotaxis. J. Biol. Chem. **269**: 26358-26362.
- Lynch, B. y D. Koshland Jr. 1991. Disulfide cross-linking studies of the transmembrane regions of the aspartate sensory receptor of *Escherichia coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 10402-10406.
- Mackintosh, M. 1978. Nitrogen fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Gen. Microbiol. **105**: 215-218.

- Macnab, R. 1996. Flagella y motility. *En* F. Neidhardt, R. Curtiss III, J. Ingraham, E. Lin, K. Low, B. Magasanik, W. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter y H. Umbarger (eds.), *Escherichia coli* y *Salmonella*: cellular y molecular biology. pp 123-145. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Marykwas, D. y H. Berg. 1996. A mutational analysis of the interaction between FliG and FliM, two components of the flagellar motor of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **178**: 1289-1294.
- McBride, M., R. Weinberg y D. Zusman. 1989. "Frizzy" aggregation genes of the gliding bacterium *Myxococcus xanthus* show sequence similarities to the chemotaxis genes of enteric bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 424-428.
- McBride, M., T. Köhler y D. Zusman. 1992. Methylation of FrzCD, a methyl-accepting taxis protein of *Myxococcus xanthus*, is correlated with factors affecting cell behavior. *J. Bacteriol.* **174**: 4246-4257.
- Michaelis, S. y J. Beckwith. 1982. Mechanism of incorporation of cell envelope proteins in *Escherichia coli*. *Ann. Rev. Microbiol.* **36**: 435-465.
- Milburn, M., G. Privé, D. Milligan, W. Scott, J. Yeh, J. Jancarik, D. Koshland Jr. y S-H. Kim. 1991. Three-dimensional structures of the ligand-binding domain of the bacterial aspartate receptor with and without a ligand. *Science* **254**: 1342-1347.
- Milligan, D. y D. Koshland Jr. 1988. Site-directed cross-linking. Establishing the dimeric structure of the aspartate receptor of bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **263**: 6268-6275.
- Milligan, D. y D. Koshland Jr. 1991. Intrasubunit signal transduction by the aspartate chemoreceptor. *Science* **254**: 1651-1654.
- Morgan, D., J. Baumgartner y G. Hazelbauer. 1993. Proteins antigenically related to methyl-accepting chemotaxis proteins of *Escherichia coli* detected in a wide range of bacterial species. *J. Bacteriol.* **175**: 133-140.
- Mowbray, S. y D. Koshland Jr. 1990. Mutations in the aspartate receptor of *Escherichia coli* which affect aspartate binding. *J. Biol. Chem.* **265**: 15638-15643.
- Mutoh, N. y M. Simon. 1986. Nucleotide sequence corresponding to five chemotaxis genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **165**: 161-166.

- Mutoh, N., K. Oosawa y M. Simon. 1986. Characterization of *Escherichia coli* chemotaxis receptor mutants with null phenotypes. *J. Bacteriol.* **167**: 992-998.
- Nakamura, Y., T. Gojobori y T. Ikemura. 1997. Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases. *Nucl. Acids Res.* **25**: 244-245.
- Nettleton, D. y G. Ordal. 1989. Functional homology of chemotactic methylesterases from *Bacillus subtilis* y *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**: 120-123.
- Nowlin, D., D. Nettleton, G. Ordal y G. Hazelbauer. 1985. Chemotactic transducer proteins of *Escherichia coli* exhibit homology with methyl-accepting proteins from distantly related bacteria. *J. Bacteriol.* **163**: 262-266.
- Oosawa, K., J. Hess y M. Simon. 1988. Mutants defective in bacterial chemotaxis show modified protein phosphorylation. *Cell* **53**: 89-96.
- Osorio, G., P. Varela, R. Arredondo, M. Seeger, A. Amaro y C. A. Jerez. 1993. Changes in global gene expression of *Thiobacillus ferrooxidans* when grown on elementary sulphur. *En* A. Torma, M. Apel y C. Brierley (eds.), Proceedings of an International Biohydrometallurgy Symposium, Volume II. pp 565-575. Wyoming, USA.
- Pakula, A. y M. Simon. 1992a. Determination of transmembrane protein structure by disulfide cross-linking: the *Escherichia coli* Tar receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**: 4144-4148.
- Pakula, A. y M. Simon. 1992b. Pivots or pistons?. *Nature* **355**: 496-497.
- Pearson, W. y D. Lipman. 1988. Improved tools for biological sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 2444-2448.
- Pratt, J. 1985. Coupled transcription-translation in prokaryotic cell-free system. *En* Transcription y translation. A practical approach. pp 179-209. B. Hames y S. Higgins (eds.), IRL Press Limited, Oxford, England.
- Prüß, B. y A. Wolfe. 1994. Regulation of acetyl phosphate synthesis and degradation, and the control of flagellar expression in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **12**: 973-984.
- Rawlings, D. y T. Kusano. 1994. Molecular genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol. Rev.* **58**: 39-55.
- Regan, L. 1993. The design of metal-binding sites in proteins. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **22**: 257-281.

- Rojas, J. 1992. Identificación de genes quimiotácticos en bacterias quimiolitotróficas. Tesis para optar al título de Bioquímico, Universidad de Chile.
- Rudolph, J., B. Nordmann, K. Storch, H. Gruenberg, K. Rodewald y D. Oesterhelt. 1996. A family of halobacterial transducer proteins. *FEMS Microbiol Lett* **139**: 161-168.
- Russo, A. y D. Koshland Jr. 1983. Separation of signal transduction and adaptation functions of the aspartate receptor in bacterial sensing. *Science* **220**: 1016-1020.
- Sambrook, J., E. Fritsch y T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*. Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sand, W., K. Rohde, B. Sobotke y C. Zenneck. 1992. Evaluation of *Leptospirillum ferrooxidans* for leaching. *Appl. Env. Microbiol.* **58**: 85-92.
- Sanger, F., S. Nicklen y A. Coulson. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- Seidel, R., B. Scharf, M. Gautel, K. Kleine, D. Oesterhelt y M. Engelhard. 1995. The primary structure of sensory rhodopsin II: a member of an additional retinal protein subgroup is coexpressed with its transducer, the halobacterial transducer of rhodopsin II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 3036-3040.
- Shaw, P., S. Lopes, K. Sweeney, B. Ely y L. Shapiro. 1983. Methylation involved in chemotaxis is regulated during *Caulobacter* differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 5261-5265.
- Sherris, D. y J. Parkinson. 1981. Posttranslational processing of methyl-accepting chemotaxis proteins in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78**: 6051-6055.
- Shine, J. y L. Dalgarno. 1974. The 3'-terminal sequence of *Escherichia coli* 16S ribosomal RNA: complementarity to nonsense triplets y ribosoma binding sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**: 1342-1346.
- Slocum, M., N. Halden y J. Parkinson. 1987. Hybrid *Escherichia coli* sensory transducers with altered stimulus detection and signaling properties. *J. Bacteriol.* **169**: 2938-2944.
- Sockett, R., J. Armitage y M. Evans. 1987. Methylation-independent and methylation-dependent chemotaxis in *Rhodobacter sphaeroides* y *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* **169**: 5808-5814.

- Southern, E. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517.
- Springer, W. y D. Koshland Jr. 1977. Identification of a protein methyltransferase as the *cheR* gene product in the bacterial sensing system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 533-537.
- Springer, M. y B. Zanolari. 1984. Sensory transduction in *Escherichia coli*: regulation of the demethylation rate by the CheA protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**: 5061-5065.
- Spudich, J. 1993. Color sensing in the *Archaea*: a eukaryotic-like receptor coupled to a prokaryotic transducer. *J. Bacteriol.* **175**: 7755-7761.
- Staden, R. 1984. Computer methods to locate signals in nucleic acid sequences. *Nucl. Acids Res.* **12**: 505-519.
- Starnbach, M. y S. Lory. 1992. The *fliA* (*rpoF*) gene of *Pseudomonas aeruginosa* encodes an alternative sigma factor required for flagellin synthesis. *Mol. Microbiol.* **6**: 459-469.
- Stock, J. y D. Koshland Jr. 1978. A protein involved in bacterial sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**: 3659-3663.
- Stock, J., M. Surette, W. McCleary y A. Stock. 1992. Signal transduction in bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **267**: 19753-19756.
- Stock, J. y M. Surette. 1996. Chemotaxis. *En F. Neidhardt, R. Curtiss III, J. Ingraham, E. Lin, K. Low, B. Magasanik, W. Reznikoff, M. Riley, M. Schaechter y H. Umberger (eds.), Escherichia coli y Salmonella: cellular and biology.* pp 1103-1129. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- Sugio, T., S. Uemura, I. Makino, K. Iwahori, T. Tano y R. Blake II. 1994. Sensitivity of Iron-oxidizing bacteria, *Thiobacillus ferrooxidans* and *Leptospirillum ferrooxidans*, to bisulfite ion. *Appl. Env. Microbiol.* **60**: 722-725.
- Terwilliger, T., E. Bogonez, E. Wang y D. Koshland Jr. 1983. Sites of methyl esterification on the aspartate receptor involved in bacterial chemotaxis. *J. Biol. Chem.* **258**: 9608-9611.
- Tinoco, I. Jr., P. Borer, B. Dengler, M. Levine, O. Uhlenbeck, D. Crothers y J. Bralla. 1973. Improved estimation of secondary structure in ribonucleic acids. *Nat. New Biol.* **264**: 40-41.

- Tisa, L. y J. Adler. 1995. Chemotactic properties of *Escherichia coli* mutants having abnormal  $\text{Ca}^{2+}$  content. *J. Bacteriol.* **177**: 7112-7118.
- Titus, D. 1991. Promega protocols and applications guide. Second Edition. Promega Corporation, USA.
- Towbin, H., T. Staehelin y J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**: 4350-4354.
- Ullah, A. y G. Ordal. 1981. *In vivo* and *in vitro* chemotactic methylation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **145**: 958-965.
- Welch, M., K. Oosawa, S. Aizawa y M. Eisenbach. 1993. Phosphorylation-dependent binding of a signal molecule to the flagellar switch of bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 8787-8791.
- Wolfe, A., P. Conley y H. Berg. 1988. Acetyladenylate plays a role in controlling the direction of flagellar rotation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 6711-6715.
- Wolfe, A., B. McNamara y R. Stewart. 1994. The short form of CheA couples chemoreception to CheA phosphorylation. *J. Bacteriol.* **176**: 4483-4491.
- Wolff, C. y J. Parkinson. 1988. Aspartate taxis mutants of the *Escherichia coli* Tar chemoreceptor. *J. Bacteriol.* **170**: 4509-4515.
- Worley, K., B. Wiese y R. Smith. 1995. BEAUTY: An enhanced BLAST-based search tool that integrates multiple biological information resources into sequence similarity search results. *Genome Research* **5**: 173-184.
- Yamamoto, K., R. Macnab e Y. Imae. 1990. Repellent response functions of the Trg and Tap chemoreceptors of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **172**: 383-388.
- Yamamoto, K. e Y. Imae. 1993. Cloning and characterization of the *Salmonella typhimurium*-specific chemoreceptor Tcp for taxis to citrate and from phenol. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 217-221.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira y J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.

Yao, V. y J. Spudich. 1992. Primary structure of an archaeobacterial transducer, a methyl-accepting protein associated with sensory rhodopsin I. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **89**: 11915-11919.

Zubay, G. 1973. *In vitro* synthesis of protein in microbial systems. Annu. Rev. Genet. **7**: 267-287.

Zusman, D. y M. McBride. 1991. Sensory transduction in the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*. Mol. Microbiol. **5**: 2323-2329.



**Anexo I:** Análisis de la secuencia de un fragmento de 2.262 pb de DNA de *L. ferrooxidans* mediante el programa BLAST.

**NCBI** **BLAST Search Results** **Entrez ?**

BLASTN 1.4.9MP [26-March-1996] [Build 14:27:07 Apr 1 1996]

**Reference:** Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, and David J. Lipman (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-10.

**Notice:** this program and its default parameter settings are optimized to find nearly identical sequences rapidly. To identify weak similarities encoded in nucleic acid, use BLASTX, TBLASTN or TBLASTX.

**Query=** 2.262 pb  
(2262 letters)

**Database:** Non-redundant GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences  
331,983 sequences; 504,522,517 total letters.

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	High Score	Smallest Sum P(N)	Probability N
<u>gb L26016 DVUDCRG</u>	Desulfovibrio vulgaris chemorecept...	375	1.3e-20 1
<u>gb L26014 DVUDCRE</u>	Desulfovibrio vulgaris chemorecept...	362	9.4e-20 1
<u>gb L26012 DVUDCRC</u>	Desulfovibrio vulgaris chemorecept...	363	1.3e-19 1
<u>dbj D50642 PSEPCTA</u>	Pseudomonas aeruginosa pctA gene f...	361	6.1e-19 1
<u>gb M81168 DVURBORUB</u>	Desulfovibrio vulgaris chemorecept...	359	9.3e-19 1
<u>gb L26015 DVUDCRF</u>	Desulfovibrio vulgaris chemorecept...	348	1.4e-18 1
<u>gb U30319 DVU30319</u>	Desulfovibrio vulgaris chemorecept...	335	9.3e-17 1
<u>gb L26013 DVUDCRD</u>	Desulfovibrio vulgaris chemorecept...	325	1.4e-16 1
<u>gb L48927 RCAMCPAB</u>	Rhodobacter capsulatus methyl-acce...	316	3.6e-15 1
<u>gb U75436 HSU75436</u>	Halobacterium salinarium transduce...	314	5.0e-15 1
<u>gb U71215 DVU71215</u>	Desulfovibrio vulgaris nigerythrin...	312	7.6e-15 1
<u>emb X66502 CCMCPA</u>	C. crescentus mcpA gene	309	1.4e-14 1
<u>gb U13166 RMU13166</u>	Rhizobium meliloti RU11001 a chemo...	296	1.7e-13 1
<u>gb U74668 HSU74668</u>	Halobacterium salinarium soluble t...	294	2.3e-13 1
<u>gb U60011 ATU60011</u>	Agrobacterium tumefaciens plasmid ...	293	3.0e-13 1
<u>gb AE000072 RZAE000072</u>	Rhizobium sp. NGR234 plasmid pNGR2...	293	3.1e-13 1
<u>emb Y14084 BSY14084</u>	B.subtilis chromosomal DNA, region...	293	3.1e-13 1
<u>gb J01809 STYTAR</u>	s.typhimurium aspartate receptor (...)	290	5.1e-13 1
<u>emb X16945 VCHLYB</u>	Vibrio cholerae hlyB gene for haem...	283	2.0e-12 1
<u>emb Y00557 VCHLYA</u>	Vibrio cholerae DNA for hlyA, hlyB...	283	2.1e-12 1
<u>emb V00373 ECTSRX</u>	E. coli gene tsr coding for the se...	276	7.4e-12 1
<u>gb J01718 ECOTSR</u>	E.coli tsr gene coding for methyl-...	276	7.4e-12 1
<u>gb AE000506 ECAE000506</u>	Escherichia coli from bases 458405...	276	8.0e-12 1
<u>emb X86707 RSMCPAGE</u>	R.sphaeroides mcpA gene	271	2.0e-11 1
<u>gb U81828 RLU81828</u>	Rhizobium leguminosarum methylatio...	269	2.9e-11 1
<u>emb Y13711 HPMACPHOM</u>	Helicobacter pylori methyl-accepti...	258	2.3e-10 1
<u>gb J01705 ECOICHE2</u>	E.coli tar and tap genes coding fo...	255	4.3e-10 1
<u>gb AE000282 ECAE000282</u>	Escherichia coli from bases 196428...	255	4.5e-10 1
<u>dbj D90830 D90830</u>	E.coli genomic DNA, Kohara clone #...	255	4.5e-10 1
<u>dbj D90831 D90831</u>	E.coli genomic DNA, Kohara clone #...	255	4.5e-10 1
<u>dbj D64006 SYCSLLLH</u>	Synechocystis sp. PCC6803 complete...	254	5.5e-10 1
<u>gb U14003 ECOUW93</u>	Escherichia coli K-12 chromosomal ...	276	1.9e-09 2
<u>gb U32375 AVU32375</u>	Agrobacterium vitis plasmid pTrAB3...	255	3.4e-09 2
<u>gb U96487 DSU96487</u>	Desulfurococcus sp. SY V-ATPase pr...	243	4.5e-09 1
<u>emb X95589 HSHTPIVAV</u>	H.salinarium htpIV and htpV gene	231	4.4e-08 1
<u>emb Y09534 RLSPRLVCP</u>	R.leguminosarum Symbiosis Plasmid ...	230	5.3e-08 1
<u>gb U123040 RTJ23040</u>	Rhizobium leguminosarum hv. viciae...	230	5.3e-08 1

<u>gb U53365 HSU53365</u>	Halobacterium salinarium transduce...	<u>228</u>	7.6e-08	1
<u>gb L26021 DVUDCRL</u>	Desulfovibrio vulgaris chemorecept...	<u>218</u>	2.0e-07	1
<u>gb L26020 DVUDCRK</u>	Desulfovibrio vulgaris chemorecept...	<u>213</u>	5.2e-07	1
<u>gb U56999 TPU56999</u>	Treponema pallidum methyl-acceptin...	<u>209</u>	3.0e-06	1
<u>gb L26019 DVUDCRJ</u>	Desulfovibrio vulgaris chemorecept...	<u>162</u>	0.012	1
<u>emb Z27239 HPHAPG</u>	H.pylori HAP gene for haemagglutin...	<u>136</u>	0.97	1
<u>emb Z77165 MTCY78</u>	Mycobacterium tuberculosis cosmid ...	<u>134</u>	0.996	1
<u>dbj D86984 D86984</u>	Human mRNA for KIAA0231 gene, part...	<u>133</u>	0.998	1

gb|L26016|DVUDCRG Desulfovibrio vulgaris chemoreceptor (dcrG) gene,  
 partial cds.  
 Length = 282

Plus Strand HSPs:

Score = 375 (103.6 bits), Expect = 1.3e-20, P = 1.3e-20  
 Identities = 95/120 (79%), Positives = 95/120 (79%), Strand = Plus / Plus

Query: 1762 GACGTCGCGGCCAGACCAACCTTCTCGCGCTCAACGCCGCCATCGAAGCCGCTCGTGCG 1821  
 ||| |||| | ||||||||| | ||||||||||||||||||||| || || |||  
 Sbjct: 55 GACATCGCCGACCAGACCAACCTGCTGGCGCTCAACGCCGCCATCGAAGCCGCGCGGGCG 114

Query: 1822 GGAGAACACGGACGGGGTTTTGCGGGTTCGTCGGGGACGAAGTCCGGAACCTTGTCCGAACAG 1881  
 || ||| |||| |||| | | |||||| | |||| | || | ||| ||  
 Sbjct: 115 GGTGAAGCCGGAAGGGGATTCGCCGTCGTCGCGGACGAGGTTTCGCAAGCTTGCCGAGAAG 174

gb|L26014|DVUDCRE Desulfovibrio vulgaris chemoreceptor (dcrE) gene,  
 partial cds.  
 Length = 234

Plus Strand HSPs:

Score = 362 (100.0 bits), Expect = 9.4e-20, P = 9.4e-20  
 Identities = 112/163 (68%), Positives = 112/163 (68%), Strand = Plus / Plus

Query: 1719 AGAAGCGGTCATCGAAATCGTCACCGTCGTCTCGAAAGTCGGAGACGTCGCGGGCCCAGAC 1778  
 ||| || | | ||| | | ||| |||| | || | || | |||||  
 Sbjct: 12 AGACGCCATCGGTCAGATCATGTCTCATCTCGGACATCGCCGACANCGCCGACCAGAC 71

Query: 1779 CAACCTTCTCGCGCTCAACGCCGCCATCGAAGCCGCTCGTGCGGGAGAACACGGACGGGG 1838  
 ||||| || ||||||||||||||||||||| || || || || |||| | || |||  
 Sbjct: 72 CAACCTGCTGGCGCTCAACGCCGCCATCGAGGCTGCACGGGCCGGAGAGGCTGGCCGCGG 131

Query: 1839 TTTTCGCGGTTCGTCGGGGACGAAGTCCGGAACCTTGTCCGAACAG 1881  
 || || |||| |||| | || || | |||| ||  
 Sbjct: 132 CTTTCGNNCTGTCGCCGACGAGGTGCGCAAGCTCGCCGAAAAG 174

gb|L26012|DVUDCRC Desulfovibrio vulgaris chemoreceptor (dcrC) gene,  
 partial cds.  
 Length = 270

Plus Strand HSPs:

Score = 363 (100.3 bits), Expect = 1.3e-19, P = 1.3e-19  
 Identities = 93/120 (77%), Positives = 93/120 (77%), Strand = Plus / Plus







Identities = 88/120 (73%), Positives = 88/120 (73%), Strand = Minus / Plus

Query: 1881 CTGTTCCGACAAGTTCGGACTTCGTCCCCGACGACCGCAAACCCCGTCCGTGTTCTCC 1822
Sbjct: 2339 CTTTTAGCGAGCTTCGGCACTTCGTCTGCCACCACCGCAAACCCCGGCCAGCATCACC 2398
Query: 1821 CGCACGAGCGGCTTCGATGGCGGCGTTGAGCGCGAGAAGGTTGGTCTGGGCCGCGACGTC 1762
Sbjct: 2399 GGCACGGGCAGCCTCGATGGCCGCGTTGAGCGCCAGCAGATTCGTCTGGTCAGCTATATC 2458

emb|X66502|CCMCPA C. crescentus mcpA gene
Length = 3169

Plus Strand HSPs:

Score = 309 (85.4 bits), Expect = 1.4e-14, P = 1.4e-14
Identities = 89/123 (72%), Positives = 89/123 (72%), Strand = Plus / Plus

Query: 1757 TCGGAGACGTTCGCGGCCAGACCAACCTTCTCGCGCTCAACGCCGCCATCGAAGCCGCTC 1816
Sbjct: 2272 TCGACGAAATCGCCTTCCAGACCAACCTTCTGGCCCTGAACGCAGGCGTCAAGCCGCC 2331
Query: 1817 GTGCGGGGAGAACACGGACGGGGTTTTGCGGTCGTCGGGGACGAAGTCCGGAACCTTGTCGG 1876
Sbjct: 2332 GGGCGGGCGAGGCGGGCCGCGGCTTCGCGGTCGTCGCTCAGGAAGTCCGGGCCCTGGCC 2391
Query: 1877 AAC 1879
Sbjct: 2392 AGC 2394

gb|U13166|RMU13166 Rhizobium meliloti RU11001 a chemotaxis operon ORF1,
ORF2, (CheY1), (CheA), (CheW), (CheR), (CheB), (CheY2) and ORF9,
complete cds.
Length = 9857

Plus Strand HSPs:

Score = 296 (81.8 bits), Expect = 1.7e-13, P = 1.7e-13
Identities = 118/195 (60%), Positives = 118/195 (60%), Strand = Plus / Plus

Query: 1671 CATGGACAAGACCGCTTACAGATGCGTACGGTCATGGNNNNNNNCAAAGAAGCGGTCAT 1730
Sbjct: 2746 CAGCGCGAGATCGCCGGGACGGGATCTCGGCCATGGCGGACATCGAGGCTTCTGCCGA 2805
Query: 1731 CGAAATCGTCACCGTCTCGAAAGTCGGAGACGTCGCGGCCAGACCAACCTTCTCGC 1790
Sbjct: 2806 GAAAATCGGTCAGATCATCGGCGTGATCGACGAGATCGCCTTCCAGACCAATCTCCTGGC 2865
Query: 1791 GCTCAACGCCGCCATCGAAGCCGCTCGTGGGGAGAACACGGACGGGGTTTTGCGGTCGT 1850
Sbjct: 2866 CCTCAATGCGGGCATCGAAGCCGCACGGGCCGGCGAAAGCGGCCGCGGTTTCGCGGTCGT 2925
Query: 1851 CGGGGACGAAGTCCG 1865
Sbjct: 2926 CGCACAGGAGGTGCG 2940

gb|U74668|HSU74668 Halobacterium salinarium soluble transducer protein





Query: 1868 FTCCGGACTTCGTCCCCGACGACCGCAAACCCCGTCCGTGTTCTCCCGCACGAGCGGCT 1809  
 | ||| || || | | |||| | | ||||| | || | | || | | || | |  
 Sbjct: 3986 TCCCGCACCTCCTGCGCGACCACGGCAAACCTTTGCCGGCCTCGCCGGCGCGCGCCGCC 4045

Query: 1808 TCGATGGCGGCGTTGAGCGCGAGAAGGTTGGTCTGGGCCGCGACGTCTCCGACTTTCGAG 1749  
 ||||| | ||||| ||||| || || ||| ||||| ||||| |||| | || | |  
 Sbjct: 4046 TCGATGCCCGCGTTGAGCGCCAGCAGATTGATCTGGAATGCGATGTCGTGATGACCTCG 4105

Query: 1748 ACGACGGTGACGATTTTCGATGACCGCTTCTTTGNNNNNNNCCATGACCGTA 1698  
 | || | | |||| | | || | | | | |||| | || |  
 Sbjct: 4106 ATGATGTGGCCGATATGGCTGGAGGCGGCCTCAATCCGCCCATGGCCGCA 4156

emb|Y14084|BSY14084 B.subtilis chromosomal DNA, region 78-80 degrees:  
 aprE to comK  
 Length = 12,556

Minus Strand HSPs:

Score = 293 (81.0 bits), Expect = 3.1e-13, P = 3.1e-13  
 Identities = 97/145 (66%), Positives = 97/145 (66%), Strand = Minus / Plus

Query: 1877 TCGGACAAGTTCCGGACTTCGTCCCCGACGACCGCAAACCCCGTCCGTGTTCTCCCGCA 1818  
 || || | |||| | |||| | | |||| | |||| | | ||||| |||| | ||  
 Sbjct: 7321 TCAGAAAGCTTCCGCACTTCATTTGCCACGACAGCAAAGCCTTTGCCGTGTTCTCCGGCG 7380

Query: 1817 CGAGCGGCTTCGATGGCGGCGTTGAGCGCGAGAAGGTTGGTCTGGGCCGCGACGTCTCCG 1758  
 || |||| ||| || | || ||||| ||||| || || | || | || |  
 Sbjct: 7381 CGGGCGGATTCAATAGATGCATGAGCGAGAGAAGGTTTGTGTTTTCAGCTATGCCTGTG 7440

Query: 1757 ACTTTCGAGACGACGGTGACGATTT 1733  
 || | || || | | ||||  
 Sbjct: 7441 ACGATGCCGAAGATTTTTTCAATTT 7465

gb|J01809|STYTAR s.typhimurium aspartate receptor (tar) gene.  
 Length = 1922

Plus Strand HSPs:

Score = 290 (80.1 bits), Expect = 5.1e-13, P = 5.1e-13  
 Identities = 78/103 (75%), Positives = 78/103 (75%), Strand = Plus / Plus

Query: 1773 CCAGACCAACCTTCTCGCGCTCAACGCCCATCGAAGCCGCTCGTGCGGGAGAACACGG 1832  
 ||||| || |||| | |||| | |||| | | |||| | || | ||||| || ||  
 Sbjct: 1351 CCAGACTAACATTCTGGCGCTGAACGCGCGGTAGAAGCGGCGCGCGGGAGAGCAGGG 1410

Query: 1833 ACGGGGTTTTGCGGTCGTGCGGGACGAAGTCCGGAAC TTGTCC 1875  
 || ||||| ||||| || | || || || || || || || ||  
 Sbjct: 1411 GCGCGGTTTTGCGGTCGTGCGAGGCGAGGTGCGTAATCTGGCC 1453

emb|X16945|VCHLYB Vibrio cholerae hlyB gene for haemolysin releasing protein  
 Length = 2915

Plus Strand HSPs:

Score = 283 (78.2 bits), Expect = 2.0e-12, P = 2.0e-12  
 Identities = 75/98 (76%), Positives = 75/98 (76%), Strand = Plus / Plus







Query: 1868 TTCCGGACTTCGTCCCCGACGACCGCAAACCCCGTCCGTGTTCTCCCGCACGAGCGGCT 1809  
 || || ||||| | | || ||||| || || || ||||| || ||||| |||  
 Sbjct: 3521 TTGCGCACTTCACCTGCCACTACCGCAAACACGCCCTGCTCTCCGGCGGAGCCGCT 3580

Query: 1808 TCGATGGCGGCGTTGAGCGCGAGAAGGTTGGTCTGG 1773  
 || | || || || || || || ||||| ||||| |||||  
 Sbjct: 3581 TCCACTGCCGCATTCAGGGCCAGAATATTGGTCTGG 3616

dbj|D90830|D90830 E.coli genomic DNA, Kohara clone #338(42.1-42.5 min.)  
 Length = 18,071

Minus Strand HSPs:

Score = 255 (70.5 bits), Expect = 4.5e-10, P = 4.5e-10  
 Identities = 71/96 (73%), Positives = 71/96 (73%), Strand = Minus / Plus

Query: 1868 TTCCGGACTTCGTCCCCGACGACCGCAAACCCCGTCCGTGTTCTCCCGCACGAGCGGCT 1809  
 || || ||||| | | || ||||| || || || ||||| || ||||| |||  
 Sbjct: 14150 TTGCGCACTTCACCTGCCACTACCGCAAACACGCCCTGCTCTCCGGCGGAGCCGCT 14209

Query: 1808 TCGATGGCGGCGTTGAGCGCGAGAAGGTTGGTCTGG 1773  
 || | || || || || || || ||||| ||||| |||||  
 Sbjct: 14210 TCCACTGCCGCATTCAGGGCCAGAATATTGGTCTGG 14245

dbj|D90831|D90831 E.coli genomic DNA, Kohara clone #339(42.4-42.8 min.)  
 Length = 19,031

Minus Strand HSPs:

Score = 255 (70.5 bits), Expect = 4.5e-10, P = 4.5e-10  
 Identities = 71/96 (73%), Positives = 71/96 (73%), Strand = Minus / Plus

Query: 1868 TTCCGGACTTCGTCCCCGACGACCGCAAACCCCGTCCGTGTTCTCCCGCACGAGCGGCT 1809  
 || || ||||| | | || ||||| || || || ||||| || ||||| |||  
 Sbjct: 1100 TTGCGCACTTCACCTGCCACTACCGCAAACACGCCCTGCTCTCCGGCGGAGCCGCT 1159

Query: 1808 TCGATGGCGGCGTTGAGCGCGAGAAGGTTGGTCTGG 1773  
 || | || || || || || || ||||| ||||| |||||  
 Sbjct: 1160 TCCACTGCCGCATTCAGGGCCAGAATATTGGTCTGG 1195

dbj|D64006|SYCSLLH Synechocystis sp. PCC6803 complete genome, 25/27,  
 3138604-3270709  
 Length = 132,106

Minus Strand HSPs:

Score = 254 (70.2 bits), Expect = 5.5e-10, P = 5.5e-10  
 Identities = 78/112 (69%), Positives = 78/112 (69%), Strand = Minus / Plus

Query: 1871 AAGTCCGGACTTCGTCCCCGACGACCGCAAACCCCGTCCGTGTTCTCCCGCACGAGCG 1812  
 || ||||| ||||| || | ||||| ||| ||||| || | || || || || || ||  
 Sbjct: 10021 AACTCCGCACTTCGTCTGCAATTACCGAAAAGCCCCGCCCTCTCCCGAGCCCGGGCC 10080

Query: 1811 GCTTCGATGGCGGCGTTGAGCGCGAGAAGGTTGGTCTGGGCCGCGACGTCTC 1760  
 ||||| ||||| || || || || || | || | ||||| ||||| || | ||  
 Sbjct: 10081 GCTTCAATGGACGCCTTCAGGGCCAACAGATGGGTCTGGGCCGAAATGTGTC 10132



Sbjct: 250 GGGCGGGCGAGGCTGGGAAAGGGTTTGCGGTCGTCGCGCAGGAAGTCAGGGAACTAGCCC 309  
 Query: 1877 AAC 1879  
 Sbjct: 310 AGC 312

Score = 84 (23.2 bits), Expect = 3.4e-09, Sum P(2) = 3.4e-09  
 Identities = 32/51 (62%), Positives = 32/51 (62%), Strand = Plus / Plus

Query: 1903 ATCCAGGAGAAAATGGATCAGGTTTCGACCGTCACGACAAACGCCACGAAC 1953  
 Sbjct: 8316 ATCAAGCCAACGAAGTGCACGCCTACGCCGTCACGACAAAAGCCCGGATC 8366

gb|U96487|DSU96487 Desulfurococcus sp. SY V-ATPase proteolipid gene,  
 partial cds, and V-ATPase E, C, G, A, and D subunit genes, complete cds  
 Length = 8391

Plus Strand HSPs:

Score = 243 (67.1 bits), Expect = 4.5e-09, P = 4.5e-09  
 Identities = 79/117 (67%), Positives = 79/117 (67%), Strand = Plus / Plus

Query: 1764 CGTCGCGGCCAGACCAACCTTCTCGCGCTCAACGCCGCCATCGAAGCCGCTCGTGCGGG 1823  
 Sbjct: 7457 CGTGGCGAAGCAGACCAACCTCGTTGCCCTGAACGCCTCGATAGAGGCCGCGAGAGCCGG 7516

Query: 1824 AGAACACGGACGGGGTTTTGCGGTCGTCGGGGACGAAGTCCGGAACTTGTCCGAACA 1880  
 Sbjct: 7517 GGAAGCGGGAAGGGGCTTCGCGGTTGTTGCCGATGAGATTCGAAAGATGGCCGTTCA 7573

emb|X95589|HSHTPIVAV H.salinarium htpIV and htpV gene  
 Length = 4287

Minus Strand HSPs:

Score = 231 (63.8 bits), Expect = 4.4e-08, P = 4.4e-08  
 Identities = 103/174 (59%), Positives = 103/174 (59%), Strand = Minus / Plus

Query: 1902 GCTCTGAACCAGGATGCGGACCTGTTCCGACAAGTTCGGACTTCGTCCCCGACGACCGC 1843  
 Sbjct: 3008 GCGCTGGCTCTCGGTGGCCAGCTCTTTGACCTCGTCGGCGACCACGGCGAAGCCGTCCCC 3067

Query: 1842 AAAACCCCGTCCGTGTTCTCCCGCACGAGCGGCTTCGATGGCGGCGTTGAGCGCGAGAAG 1783  
 Sbjct: 3068 GTTGCTACCGCCGCCGATCCCGCACGAGCGGCTTCGATGTTGGCGTTCAACGCCAGCAT 3127

Query: 1782 GTTGGTCTGGGCCGCGACGTCTCCGACTTTCGAGACGACGGTGACGATTTTCGAT 1729  
 Sbjct: 3128 GTTCGTCTGCTCGGCCGATGTCGCTGATGAGCTCCGCGATGTCGTCGATCTCGGT 3181

emb|Y09534|RLSPRLVCP R.leguminosarum Symbiosis Plasmid DNA, rlvCP gene  
 Length = 3696

Plus Strand HSPs:

Score = 230 (63.6 bits), Expect = 5.3e-08, P = 5.3e-08

Identities = 90/145 (62%), Positives = 90/145 (62%), Strand = Plus / Plus

Query: 1735 ATCGTCACCGTCGTCTCGAAAGTCGGAGACGTCGCGGCCAGACCAACCTTCTCGCGCTC 1794  
 ||| || | ||| | ||| || |||| | ||||| ||||| |||||  
 Sbjct: 1796 ATCTCCAGTATTGTCGGGGTCATCGACGAAATCGCGTTTCAGACCAATCTTCTGGCGCTC 1855  
 Query: 1795 AACGCCGCCATCGAAGCCGCTCGTGCGGGAGAACACGGACGGGGTTTTGCGGTTCGTCGGG 1854  
 ||||| | | |||| | | | | | | | | | ||| |||| | | | | |  
 Sbjct: 1856 AACGCAGGCGTCGAGGCGGCACGATCCGGCGAGGCAGGAAAAGGTTTCGCAGTGGTTGCC 1915  
 Query: 1855 GACGAAGTCCGGAACCTTGTCCGAAC 1879  
 | ||| || ||| | | | |||  
 Sbjct: 1916 CAGGAGGTGCGGGAGCTTGCTCAAC 1940

gb|U23040|RLU23040 Rhizobium leguminosarum bv. viciae putative  
 glycerol-3-phosphate transport protein (ugpC) gene, partial cds,  
 and chemoreceptor protein (mcpA), putative  
 2-hydroxychromene-2-carboxylate isomerase, and putative alcohol  
 dehydro...  
 Length = 3931

Plus Strand HSPs:

Score = 230 (63.6 bits), Expect = 5.3e-08, P = 5.3e-08  
 Identities = 90/145 (62%), Positives = 90/145 (62%), Strand = Plus / Plus

Query: 1735 ATCGTCACCGTCGTCTCGAAAGTCGGAGACGTCGCGGCCAGACCAACCTTCTCGCGCTC 1794  
 ||| || | ||| | ||| || |||| | ||||| ||||| |||||  
 Sbjct: 1797 ATCTCCAGTATTGTCGGGGTCATCGACGAAATCGCGTTTCAGACCAATCTTCTGGCGCTC 1856  
 Query: 1795 AACGCCGCCATCGAAGCCGCTCGTGCGGGAGAACACGGACGGGGTTTTGCGGTTCGTCGGG 1854  
 ||||| | | |||| | | | | | | | | | ||| |||| | | | | |  
 Sbjct: 1857 AACGCAGGCGTCGAGGCGGCACGATCCGGCGAGGCAGGAAAAGGTTTCGCAGTGGTTGCC 1916  
 Query: 1855 GACGAAGTCCGGAACCTTGTCCGAAC 1879  
 | ||| || ||| | | | |||  
 Sbjct: 1917 CAGGAGGTGCGGGAGCTTGCTCAAC 1941

gb|U53365|HSU53365 Halobacterium salinarium transducer HtI protein  
 (HtI) gene, complete cds  
 Length = 2317

Plus Strand HSPs:

Score = 228 (63.0 bits), Expect = 7.6e-08, P = 7.6e-08  
 Identities = 68/96 (70%), Positives = 68/96 (70%), Strand = Plus / Plus

Query: 1729 ATCGAAATCGTCACCGTCGTCTCGAAAGTCGGAGACGTCGCGGCCAGACCAACCTTCTC 1788  
 | ||| |||| | | ||| | || | ||| |||| | ||||| ||| | ||  
 Sbjct: 1665 ACCGAGATCGACGACATCGCGGAGCTCATCAGCGACATCGCCGAGCAGACGAACATGCTG 1724  
 Query: 1789 GCGCTCAACGCCGCCATCGAAGCCGCTCGTGCGGGA 1824  
 ||| | ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||  
 Sbjct: 1725 GCGTTGAACGCCAACATCGAAGCCGCTCGTGCGGGA 1760

gb|L26021|DVUDCRL Desulfovibrio vulgaris chemoreceptor (dcrL) gene,  
 partial cds.



Length = 186

Plus Strand HSPs:

Score = 218 (60.2 bits), Expect = 2.0e-07, P = 2.0e-07  
Identities = 58/76 (76%), Positives = 58/76 (76%), Strand = Plus / Plus

Query: 1804 ATCGAAGCCGCTCGTGCGGGAGAACACGGACGGGGTTTTGCGGTCGTCGGGGACGAAGTC 1863  
|| ||||| || ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||  
Sbjct: 1 ATTGAAGCCGCACGCGCGGGCGAGAGTGGACGAGGTTTTGCGGTGGTCGCGGACGAGGTG 60  
Query: 1864 CGGAACTTGTCCGAAC 1879  
|| || | |||||  
Sbjct: 61 CGCAAGCTTGCCGAAC 76

gb|L26020|DVUDCRK Desulfovibrio vulgaris chemoreceptor (dcrK) gene,  
partial cds.  
Length = 180

Plus Strand HSPs:

Score = 213 (58.9 bits), Expect = 5.2e-07, P = 5.2e-07  
Identities = 61/84 (72%), Positives = 61/84 (72%), Strand = Plus / Plus

Query: 1798 GCCGCCATCGAAGCCGCTCGTGCGGGAGAACACGGACGGGGTTTTGCGGTCGTCGGGGAC 1857  
||||| ||||| || ||||| || ||||| || ||||| || ||||| || ||||| ||  
Sbjct: 1 GCCGCCATCGAAGCGGCCCGTGCGGGCGAGGCGGGACGAGGGTTCGCCGTTGTCGAGAG 60  
Query: 1858 GAAGTCCGGAACCTGTCCGAACAG 1881  
|| || || || | ||||| ||  
Sbjct: 61 GAGGTGCGCAAGCTTGCCGAAAAG 84

gb|U56999|TPU56999 Treponema pallidum methyl-accepting chemotaxis  
protein (mcp-1) gene, complete cds, and potential regulatory  
molecule (pfoS/R) gene, partial cds.  
Length = 4320

Plus Strand HSPs:

Score = 209 (57.8 bits), Expect = 3.0e-06, P = 3.0e-06  
Identities = 77/121 (63%), Positives = 77/121 (63%), Strand = Plus / Plus

Query: 1756 GTCGGAGACGTCGCGGCCCAGACCAACCTTCTCGCGCTCAACGCCGCCATCGAAGCCGCT 1815  
|| | ||| | | | ||||| || ||||| || ||||| || ||||| || ||||| ||  
Sbjct: 2801 GTGGTAGATATTTTCAGGACGGACGAATTTACTTGCAATGAACGCAGCGATTGAGGCTGCA 2860  
Query: 1816 CGTGCGGGGAGAACACGGACGGGGTTTTGCGGTCGTCGGGGACGAAGTCCGGAACCTGTCC 1875  
| ||| || || ||||| ||||| ||||| || ||||| ||||| ||||| ||||| ||  
Sbjct: 2861 CATGCAGGTGACGCAGGACGCGGTTTTGCGGTGGTAGCGGGGAAATCCGCTCCCTGGCA 2920  
Query: 1876 G 1876  
|  
Sbjct: 2921 G 2921

gb|L26019|DVUDCRJ Desulfovibrio vulgaris chemoreceptor (dcrJ) gene,  
partial cds.  
Length = 162

Plus Strand HSPs:

Score = 162 (44.8 bits), Expect = 0.012, P = 0.012
Identities = 46/66 (69%), Positives = 46/66 (69%), Strand = Plus / Plus

Query: 1816 CGTGC GGGAGAACACGGACGGGGTTTTGCGGTCGTCGGGGACGAAGTCCGGAAC TTGTCC 1875
Sbjct: 1 CGTGCN GNGANGCCGGACGNGGCTTCGCNNTCGTCGCCGACCAGGTGCGCAAAC TGGCC 60
Query: 1876 GAACAG 1881
Sbjct: 61 GAAAAG 66

emb|Z27239|HPHAPG H.pylori HAP gene for haemagglutinin/protease
Length = 1459

Minus Strand HSPs:

Score = 136 (37.6 bits), Expect = 3.5, P = 0.97
Identities = 36/47 (76%), Positives = 36/47 (76%), Strand = Minus / Plus

Query: 1865 CGGACTTCGTCCCCGACGACCGCAAACCCCGTCCGTGTTCTCCCGC 1819
Sbjct: 1067 CCGACTTCATCGGCAACCACCGCAAACCCGCTCCTTGATCAACCGC 1113

emb|Z77165|MTCY78 Mycobacterium tuberculosis cosmid Y78.
Length = 35,112

Plus Strand HSPs:

Score = 134 (37.0 bits), Expect = 5.4, P = 1.0
Identities = 42/61 (68%), Positives = 42/61 (68%), Strand = Plus / Plus

Query: 654 CGACCGTGTCTGGCGGTCGATCCGAAGTCCATGATTGTCAAAGCGGTGTTCTTCAGTC 713
Sbjct: 21621 CGCCCATGCTCTGGCGGTCGATCTGCAGGCCAGGCATGGCGATATGGACGTCTATCAGTC 21680
Query: 714 C 714
Sbjct: 21681 C 21681

dbj|D86984|D86984 Human mRNA for KIAA0231 gene, partial cds
Length = 6248

Plus Strand HSPs:

Score = 133 (36.8 bits), Expect = 6.5, P = 1.0
Identities = 49/77 (63%), Positives = 49/77 (63%), Strand = Plus / Plus

Query: 1037 AATATGCCCCGAAACGATAGAAGAAAAAGCATCTACAACGCCACCAAGGCCCTTGAGA 1096
Sbjct: 50 AATATTCTTTGAGCGGTTAAGAGAAAAAGCAACTACAGTGACATCCCTGATGTCAAGA 109
Query: 1097 ATCTTTTTACCACCATC 1113
Sbjct: 110 ATGACTTTGCCTTCATC 126

Parameters:

V=100  
 B=50  
 H=0  
 P=4

-ctxfactor=2.00  
 E=10

Query	Strand	MatID	Matrix name	----- Lambda	As Used K	----- H	----- Lambda	Computed K	----- H
+1	0	+5,-4		0.192	0.173	0.357	same	same	same
-1	0	+5,-4		0.192	0.173	0.357	same	same	same

Query	Strand	MatID	Length	Eff.Length	E	S	W	T	X	E2	S2
+1	0		2262	2241	10.	128	11	0	73	0.024	82
-1	0		2262	2241	10.	128	11	0	73	0.024	82

Statistics:

Query	Strand	MatID	Expected High Score	Observed High Score	HSPs Reportable	HSPs Reported
+1	0		135 (37.3 bits)	375 (103.6 bits)	39	39
-1	0		135 (37.3 bits)	312 (86.2 bits)	12	12

Query	Strand	MatID	Neighborhd Words	Word Hits	Excluded Hits	Failed Extensions	Successful Extensions	Overlaps Excluded
+1	0		2213	282337	22514	255145	4678	2
-1	0		2213	270081	21721	244228	4132	0

Database: Non-redundant GenBank+EMBL+DDBJ+PDB sequences

Release date: July 6, 1997  
 Posted date: 4:41 AM EDT Jul 6, 1997  
 # of letters in database: 504,522,517  
 # of sequences in database: 331,983  
 # of database sequences satisfying E: 45  
 No. of states in DFA: 254 (254 KB)  
 Total size of DFA: 305 KB (320 KB)  
 Time to generate neighborhood: 0.01u 0.00s 0.01t Real: 00:00:00  
 No. of processors used: 4  
 Time to search database: 15.47u 0.72s 16.19t Real: 00:00:05  
 Total cpu time: 15.53u 0.74s 16.27t Real: 00:00:05

**Anexo II:** Análisis de la secuencia de un fragmento de 2.262 pb de DNA de  
*L. ferrooxidans* mediante el programa FASTA.

>Return-Path: FASTA@ebi.ac.uk  
 Date: Sat, 05 Jul 1997 00:42:55 +0000  
 From: FastA@ebi.ac.uk  
 Subject: L.f  
 Sender: EMBL FASTA Server <FASTA@ebi.ac.uk>  
 To: mdelgado@canela.med.uchile.cl  
 FASTA searches a protein or DNA sequence data bank  
 version 3.0t76 March 25, 1997  
 Please cite:  
 W.R. Pearson & D.J. Lipman PNAS (1988) 85:2444-2448

21009880.seq: 2262 nt  
 >L.f.  
 vs EMBL All library

995665321 residues in 1472371 sequences  
 statistics extrapolated from 50000 to 1473129 sequences  
 Expectation fit:  $\rho(\ln(x)) = 7.3034 \pm 0.000434$ ;  $\mu = 9.7589 \pm 0.030$ ;  
 $\text{mean\_var} = 128.0813 \pm 22.721$

FASTA (3.06 Sept, 1996) function (optimized, DNA matrix) ktup: 6  
 join: 73, opt: 58, gap-pen: -16/ -4, width: 16 reg.-scaled  
 Scan time: 79.730

The best scores are:

		initn	initl	opt	z-sc	E(1473129)
DVDCRG	7/95L26016 Desulfovibrio vulgaris c ( 282)	318	318	375	336.3	2e-11
DVDCRC	7/95L26012 Desulfovibrio vulgaris c ( 270)	312	312	366	328.6	5.5e-11
DVDCRE	7/95L26014 Desulfovibrio vulgaris c ( 234)	162	162	366	329.6	5.6e-11
PAPCTA	4/96D50642 Pseudomonas aeruginosa D (2157)	333	333	361	310.8	6.7e-11
DVRBORUB	3/92M81168 Desulfovibrio vulgaris (3264)	329	329	360	307.3	7e-11
DVDCRF	7/95L26015 Desulfovibrio vulgaris c ( 225)	297	297	360	324.5	1.1e-10
DVDCRI	7/95L26018 Desulfovibrio vulgaris c ( 270)	291	291	351	315.4	3e-10
HSU75436	11/96U75436 Halobacterium salinar (1700)	138	138	334	288.5	1.5e-09
DV30319	3/97U30319 Desulfovibrio vulgaris (3663)	252	252	324	274.7	4.1e-09
CCMCPA	crescentus mcpA gene. 7/92X66502 C. (3169)	292	292	324	275.6	4.2e-09
DVDCRD	7/95L26013 Desulfovibrio vulgaris c ( 219)	249	249	327	295.5	4.7e-09
EACHEW	3/92M26411 Enterobacter aerogenes, (5015)	294	294	320	269.1	6.1e-09
RCMCPAB	8/96L48927 Rhodobacter capsulatus (5186)	274	274	319	268.0	6.7e-09
NPSOHTII	Z35086 N.pharaonis sopII and htrI (3058)	290	290	318	270.6	8.3e-09
NPSOHTII	Z35086 N.pharaonis sopII and htrI (3058)	290	290	318	270.6	8.3e-09
CTSNTTRND	L04736 Clostridium thermocellum ( 1960)	195	195	316	271.7	1.1e-08
RM13166	2/96U13166 Rhizobium meliloti RU11 (9857)	273	273	306	252.4	2.6e-08

HSU74668	5/97U74668	Halobacterium salinari	(1480)	237	237	294	254.0	1.4e-07
PAPILHIJ	7/95L22036	Pseudomonas aeruginosa	(3224)	192	192	292	247.3	1.6e-07
RSMCPAGE	X86707	R.sphaeroides mcpA gene. 5	(3069)	208	208	291	246.7	1.8e-07
STTAR	J01809	s.typhimurium aspartate recep	(1922)	124	124	290	248.8	2.1e-07
ECCHE2	J01705	E.coli tar and tap genes cod	(3465)	234	234	288	243.3	2.4e-07
VCHLYA	6/97Y00557	Vibrio cholerae DNA for	(11162)	253	253	283	231.3	3.5e-07
VCHLYB	9/93X16945	Vibrio cholerae hlyB gen	(2915)	253	253	283	240.0	4.4e-07
ECUW93	U14003	Escherichia coli K-12 chromo	(72727)	268	215	276	213.0	5.6e-07
ECUW93	U14003	Escherichia coli K-12 chromo	(56674)	215	215	276	214.6	5.8e-07
ECAE506	1/97Ae000506	Escherichia coli from	(10256)	268	215	276	225.7	7.8e-07
ECTSR	J01718	E.coli tsr gene coding for me	(1789)	215	215	276	236.9	1.1e-06
ECTSRX		coli gene tsr coding for the serine	(1788)	215	215	276	236.9	1.1e-06
HSU62676	9/96U62676	Halobacterium salinari	(3100)	126	126	269	227.2	2.1e-06
AV32375	. . 7/97U32375	Agrobacterium vitis	(11928)	93	93	264	214.1	3e-06
AV32375	. . 9/96U32375	Agrobacterium vitis	(11327)	93	93	264	214.4	3e-06
RL23040		viciae putative glycerol-3-phospha	(3931)	112	112	261	218.6	5.1e-06
RLSPRLVCP	Y09534	R.leguminosarum Symbiosis	(3696)	112	112	261	219.0	5.1e-06
STTCPHEM	3/93L06029	Salmonella typhimurium	(1840)	228	228	262	224.4	5.1e-06
DSU96487	SY V-ATPase	proteolipid gene, par	(8391)	90	90	255	208.4	8.8e-06
ECG	K02073	E.coli Trg sensory transducer p	(1729)	234	234	257	220.4	9.2e-06
HSU75439	11/96U75439	Halobacterium salinar	(2498)	118	118	256	217.1	9.6e-06
HSHTPIVAV	X95589	H.salinarium htpIV and ht	(4287)	118	118	247	205.7	2.4e-05
RSAE96	NGR234	plasmid pNGR234a from bases	(11237)	214	214	234	188.0	9e-05
BSMCPGEN	X97385	B.subtilis mcpC gene. 4/9	(3135)	79	79	233	195.3	0.00013
HSU53365	10/96U53365	Halobacterium salinar	(2317)	132	132	228	192.8	0.00023
DVDCRL	3/94L26021	Desulfovibrio vulgaris c	( 186)	212	212	218	200.3	0.0011
DVDCRK	7/95L26020	Desulfovibrio vulgaris c	( 180)	112	112	213	196.1	0.002
TMPMRFDNA	X85171	T.maritima por, mcpII, rf	(5728)	138	138	185	149.0	0.026
CEUC50F2	1/97U80445	Caenorhabditis elegans	(29214)	78	78	169	124.4	0.12
HSAB2390	7/97Ab002390	Human mRNA for KIAA0	(5435)	105	105	164	130.8	0.28
DVDCRJ	7/95L26019	Desulfovibrio vulgaris c	( 162)	89	89	168	157.0	0.33
ATU43652	12/96U43652	Arabidopsis thaliana	(4868)	141	81	160	128.0	0.46
CET12C9	10/96U41104	Caenorhabditis elegans	(28436)	90	90	157	113.9	0.47

>>DVDCRG 7/95L26016 Desulfovibrio vulgaris chemoreceptor (282 nt)  
 initn: 318 init1: 318 opt: 375 Z-score: 336.3 expect() 2e-11  
 79.167% identity in 120 nt overlap

	1740	1750	1760	1770	1780	1790
L.f.	GAAATCGTACCGTCGTCGAAAGTCGGAGACGTCGGGCCAGACCAACCTTCTCGCG					
	::: ::: : :::::::::::::: :: :::					
DVDCRG	TCCATCGGGCAGATCATGAACGTCATCTCCGACATCGCCGACCAGACCAACCTGCTGGCG					
	30	40	50	60	70	80

```

          1800      1810      1820      1830      1840      1850
L.f.      CTCAACGCCGCCATCGAAGCCGCTCGTGCGGGAGAACACGGACGGGGTTTTGCGGTCGTC
          :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::
DVDCRG    CTCAACGCCGCCATCGAAGCGGCGCGGGGCGGGTGAAGCCGGAAGGGGATTCGCCGTCGTC
          90       100       110       120       130       140

```

```

          1860      1870      1880      1890      1900      1910
L.f.      GGGGACGAAGTCCGGAAGTTGTCCGAACAGGTCCGCATCCTGGTTTCAGAGCATCCAGGAG
          : :: :: :: :: : :: ::
DVDCRG    GCGGACGAGGTTGCAAGCTTGCAGAGAAGACCATGAATGCCACGCAAGAGGTGCCCGCT
          150      160      170      180      190      200

```

>>DVDCRC 7/95L26012 *Desulfovibrio vulgaris* chemoreceptor (270 nt)  
 initn: 312 init1: 312 opt: 366 Z-score: 328.6 expect() 5.5e-11  
 77.500% identity in 120 nt overlap

```

          1740      1750      1760      1770      1780      1790
L.f.      GAAATCGTCACCGTCGTCTCGAAAGTCGGAGACGTCGCGGCCAGACCAACCTTCTCGCG
          :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::
DVDCRC    GCCATCGGGCATGTTCATGAACGTCAFCACGACATCGCCGACCAGACCAACCTGCTGGCC
          30       40       50       60       70       80

```

```

          1800      1810      1820      1830      1840      1850
L.f.      CTCAACGCCGCCATCGAAGCCGCTCGTGCGGGAGAACACGGACGGGGTTTTGCGGTCGTC
          :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: :: ::
DVDCRC    CTCAACGCCGCCATCGAAGCGGCCCCGTGCGGGTGANGCGGGACGGGGCTTCGCNNTCGTG
          90       100      110      120      130      140

```

```

          1860      1870      1880      1890      1900      1910
L.f.      GGGGACGAAGTCCGGAAGTTGTCCGAACAGGTCCGCATCCTGGTTTCAGAGCATCCAGGAG
          : :: :: :: :: :: : :: :: ::
DVDCRC    GCCGATGAAGTCCGCAAGCTTGCAGAAAAGACCATGGGTGCGACCAAGGAGGTGGGCGAC
          150      160      170      180      190      200

```

>>DVDCRE 7/95L26014 *Desulfovibrio vulgaris* chemoreceptor (234 nt)  
 initn: 162 init1: 162 opt: 366 Z-score: 329.6 expect() 5.6e-11  
 68.421% identity in 171 nt overlap

```

          1690      1700      1710      1720      1730      1740
L.f.      GCTTCACAGATGCGGTACGGTCATGGAAAAAACAAGAAGCGGTCATCG---AAATCGTC
          :: : : :: : :: :: : :: ::
DVDCRE    TCCAAGAGGGCAGACGCCATCGGTCAGATCATG
          10       20       30

```

```

          1750      1760      1770      1780      1790      1800
L.f.      ACCGTCGTCTCGAAAGTCGGAGACGTCGCGGCCAGACCAACCTTCTCGCGCTCAACGCC
          :  ::  ::::  :  ::  ::  ::  :  ::::::::::::::  ::  ::::::::::::::
DVMCRE    TCTGTTCATCTCGGACATCGCCGACANCGCCGACCAGACCAACCTGCTGGCGCTCAACGCC
          40        50        60        70        80        90

```

```

          1810      1820      1830      1840      1850      1860
L.f.      GCCATCGAAGCCGCTCGTGCGGGAGAACACGGACGGGGTTTTGCGGTTCGTCGGGGACGAA
          ::::::::::  ::  ::  ::  ::  ::::  ::  ::  ::  ::  ::  ::::  ::::
DVMCRE    GCCATCGAGGCTGCACGGGCCGAGAGGCTGGCCGCGGCTTCGCNNTGTCGCCGACGAG
          100       110       120       130       140       150

```

```

          1870      1880      1890      1900      1910      1920
L.f.      GTCCGGAACCTTGTCCGAACAGGTCCGCATCCTGGTTCAGAGCATCCAGGAGAAAATGGAT
          ::  ::  ::  :  ::::  ::
DVMCRE    GTGCGCAAGCTCGCCGAAAAGACCATGAACGCCACCAAGGAAGTGGATTCCGCCATACGG
          160       170       180       190       200       210

```

>>PAPCTA 4/96D50642 Pseudomonas aeruginosa DNA for transd (2157 nt)  
 initn: 333 initl: 333 opt: 361 Z-score: 310.8 expect() 6.7e-11  
 68.902% identity in 164 nt overlap

```

          1740      1750      1760      1770      1780      1790
L.f.      GAAATCGTACCGTCTCGTCTCGAAAGTCGGAGACGTCGCGGCCAGACCAACCTTCTCGCG
          :  ::  ::  :  :  ::::::::::::::  ::::
PAPCTA    AACATCGGCCAGATCCTCGAAGTGATCAAGGCATCTCCGAGCAGACCAACCTGCTCGCC
1500      1510      1520      1530      1540      1550

```

```

          1800      1810      1820      1830      1840      1850
L.f.      CTCAACGCCGCCATCGAAGCCGCTCGTGCGGGAGAACACGGACGGGGTTTTGCGGTTCGTC
          ::::::::::::::  ::  ::  ::  ::  ::::  ::  ::  ::  ::  ::  ::
PAPCTA    CTCAACGCCGCCATCGAAGCCGCGCGCCGCGGAGGCCGGACGCGGCTTCGCAGTGGTC
1560      1570      1580      1590      1600      1610

```

```

          1860      1870      1880      1890      1900      1910
L.f.      GGGGACGAAGTCCGGAACCTTGTCCGAACAGGTCCGCATCCTGGTTCAGAGCATCCAGGAG
          :  ::::  ::  ::  ::  ::  ::  :  ::  ::  ::  ::  ::  ::
PAPCTA    GCCGACGAGGTGCGCAACCTGGCCCATCGCGCCAGGAGTCGGCCAGCAGATCCAGAAG
1620      1630      1640      1650      1660      1670

```







```

      1890      1900      1910      1920      1930      1940
L.f.      CGCATCCTGGTTTCAGAGCATCCAGGAGAAAATGGATCAGGTTTCGACCGTCACGACAAAC

DVCRI      ATGAACGCCACGCGCGAGGTCGGCGACGTGCGTGCCATACAGGACGGCACCCGCGCCAGT
      180      190      200      210      220      230

```

```

>>HSU75436 11/96U75436 Halobacterium salinarium transduce (1700 nt)
initn: 138 initl: 138 opt: 334 Z-score: 288.5 expect() 1.5e-09
64.039% identity in 203 nt overlap

```

```

      1700      1710      1720      1730      1740      1750
L.f.      ATGCGTACGGTCATGGAAAAAACAAGAAGCGGTCATCGAAATCGTCACCGTCGTCTCG
      :: : : :::: : : :::: : : :
HSU754      GCGGGCGTCGAACAGCTCGGCGAGCGCGCCGCCGACGTGGAATCAGTGACCGCGCT---G
      1010      1020      1030      1040      1050

```

```

      1760      1770      1780      1790      1800      1810
L.f.      AAAGTCGGAGACGTGCGGGCCAGACCAACCTTCTCGCGCTCAACGCCGCCATCGAAGCC
      : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
HSU754      A---TCGACGACATCGCCGAGCAGACGAACATGCTGGCGCTGAACCGCTCCATCGAGGCC
      1060      1070      1080      1090      1100      1110

```

```

      1820      1830      1840      1850      1860      1870
L.f.      GCTCGTGCGGGAGAACACGGACGGGTTTTCGCGTTCGCGGGACGAAGTCCGGAACCTG
      :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
HSU754      GCCCGCGCCGGGGAGGCGGGCGAGGGGTTTTCGCGTTCGCGCCGACGAGGTCAAGGCCCTC
      1120      1130      1140      1150      1160      1170

```

```

      1880      1890      1900      1910      1920      1930
L.f.      TCCGAACAGGTCCGCATCCTGGTTTCAGAGCATCCAGGAGAAAATGGATCAGGTTTCGACC
      :::: : : :::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
HSU754      GCCGAGGAGTCCC GCGAGCAGTCCACGCGCTCGAGGAGCTCGTTCGAGCAGATGCGAGCG
      1180      1190      1200      1210      1220      1230

```

```

      1940      1950      1960      1970      1980      1990
L.f.      GTCACGACAAACGCCACGAACACATTCGACTCGTTCGCTTCCGTCGTCGAAGACGTCACG
HSU754      GAGACCGAGGAGACGGTCGACCAGTTGGACGAGGTCAACCAGCCATCGGCGAGGGCGTC
      1240      1250      1260      1270      1280      1290

```

>>DV30319 3/97U30319 *Desulfovibrio vulgaris* chemoreceptor (3663 nt)  
 initn: 252 init1: 252 opt: 324 Z-score: 274.7 expect() 4.1e-09  
 66.667% identity in 162 nt overlap

```

    1690      1700      1710      1720      1730      1740
L.f.      CAGATGCGTACGGTTCATGGAAAAAACAAGAAGCGGTTCATCGAAATCGTCACCGTCGTC
          :::: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
DV3031    CGCCTCAACACCGCCATGGCCCCCTCGGTGAAGAGGCCGACAGCATCGGCAAGGTCATG
          2190      2200      2210      2220      2230      2240
  
```

```

    1750      1760      1770      1780      1790      1800
L.f.      TCGAAAGTCGGAGACGTCGCGGCCAGACCAACCTTCTCGCGCTCAACGCCCATCGAA
          :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
DV3031    TCCGTTCATCTCCGACATCGCCGACCAGACCAACCTGCTGGCCCTCAACGCAGCCATCGAG
          2250      2260      2270      2280      2290      2300
  
```

```

    1810      1820      1830      1840      1850      1860
L.f.      GCCGCTCGTGGGGAGAACACGGACGGGGTTTTGCGGTTCGTCGGGGACGAAGTCCGGAAC
          :: : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
DV3031    GCGGCAAGGGCGGGGGACGCCGGGCGGGTTCGCCGTGGTGGCCGACGAAGTCCGCAA
          2310      2320      2330      2340      2350      2360
  
```

```

    1870      1880      1890      1900      1910      1920
L.f.      TTGTCCGAACAGGTCCGCATCCTGGTTCAGAGCATCCAGGAGAAAATGGATCAGGTTTCG
          : : : : : :
DV3031    CTCGCAGAGAAGACCATGCAGGCGACAGGCGAGGTCGGCAGTCCCGTCACGCGCATAACAG
          2370      2380      2390      2400      2410      2420
  
```

>>CCMCPA *crescentus* mcpA gene. 7/92X66502 C. (3169 nt)  
 initn: 292 init1: 292 opt: 324 Z-score: 275.6 expect() 4.2e-09  
 65.608% identity in 189 nt overlap

```

    1670      1680      1690      1700      1710      1720
L.f.      CCATGGACAAGACCGCTTCACAGATGCGTACGGTTCATGGAAAAAACAAGAAGCGGTC-
          :: : : : : : : : : : : : : : : : :
CCMCPA    ATAGCGGTCAGGTCGTGCACCAGGCGAGTCTCGGCCATGGGCGAGATC-GAGAAGAGCTCG
          2190      2200      2210      2220      2230      2240
  
```

```

    1730      1740      1750      1760      1770      1780
L.f.      ATCGAAATCGTCACCGTCGTCTCGAAAGTCGGAGACGTCGCGGCCAGACCAACCTTCTC
          : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : : :
CCMCPA    GGCCAGATCAGCCAGATCATCGGGTTCATCGACGAAATCGCCTTCAGACCAACCTTCTC
          2250      2260      2270      2280      2290      2300
  
```

```

1790      1800      1810      1820      1830      1840
L.f.      GCGCTCAACGCCGCCATCGAAGCCGCTCGTGCGGGAGAACACGGACGGGGTTTTGCGGTC
          :: :: ::::: : : ::::: : : ::::: : : ::::: : : :::::
CCMCPA    GCCCTGAACGCAGGCGTTCGAAGCCGCCCGGGCGGGCGAGGCGGGCCGGGCTTCGCGGTC
          2310      2320      2330      2340      2350      2360

1850      1860      1870      1880      1890      1900
L.f.      GTCGGGGACGAAGTCCGGAAC TTGTCCGAAACAGGTCCGCATCCTGGTTCAGAGCATCCAG
          :::: : ::::: : : : : : : : : : : :
CCMCPA    GTCGCTCAGGAAGTCCGGGCCCTGGCCCAGC-GCTCGGCCGAGGCCCAAGGAGATCAA
          2370      2380      2390      2400      2410      2420

1910      1920      1930      1940      1950      1960
L.f.      GAGAAAATGGATCAGGTTTCGACCGTCACGACAAACGCCACGAACACATTCGACTCGTTC
CCMCPA    GGCTCTGATCTCCAGCTCGACCCAGCAGGT CAGCCAAGGCGTGAGCCTGGTGGGTCAAAC
          2430      2440      2450      2460      2470      2480

```

2262 residues in 1 query sequences  
995665321 residues in 1472371 library sequences  
Tcomplib (4 proc)[version 3.0t76 March 25, 1997]  
start: Sat Jul 5 00:37:18 1997 done: Sat Jul 5 00:41:27 1997  
Scan time: 79.730 Display time: 0.090

Function used was FASTA

**Anexo III:** Análisis de la secuencia de 577 aminoácidos de la proteína LcrI de *L. ferrooxidans* mediante el programa BEAUTY.

# BLASTP+BEAUTY Search Results

BLAST search performed using the National Center for Biotechnology Information's **BLAST WWW Server**.

BEAUTY post-processing provided by the **Human Genome Center, Baylor College of Medicine**.

**BEAUTY Reference:** Kim C. Worley, Brent A. Wiese, and Randall F. Smith (1995). **BEAUTY:** an enhanced BLAST-based search tool that integrates multiple biological information resources into sequence similarity search results. *Genome Research* 5: 173-184.

**BLASTP 1.4.9MP** [26-March-1996] [Build 14:27:01 Apr 1 1996]

**Reference:** Altschul, Stephen F., Warren Gish, Webb Miller, Eugene W. Myers, and David J. Lipman (1990). Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215:403-10.

Query= LcrI (577 letters)

**EchoFilter:**

```
>lcl|LcrI
MTSLRSIIILRNVMVGSVIVLTTFMSLWTAHRVSVQSVQKTMQLLASLQSVEXXXXXX
XXXXXXXXXEVNGGSGDEIIREFDRVLAVDPKSMIVKSGVLQSKGMLKFIKIMKDRHARSQM
IASVRNQTALIRKEWAGARFNEIEQKQALS LKNLQYLVFESRIMAGIAGILAVGMLILLY
FRMDRLSDHLRQLADNIQAVATFQSRGLEYAPETIEEKSIYNATKALENLFTTITTSMT
NGVVVNADLKSGKEGNEILYVSPSLIEILLPVKKEVQERFGVDINRLVGTSHIRFHEHP
DRIREILRRIKPLEVRQNMETQIGNYFLGSTSSMIPDSEGKPLLYMATFYETTSMKNLQK
VAEERKTRALSTVGQLDGFTQAWESLLSTLKQVFGTSVEMSKTMGGMQGTVSSALETVTS
MDKTASQMR TVMEKNXXXXXXXXXXXXXXXXXAQTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXV
GDEVRLSEQVRIXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXEDVTTHIREIGQEMNQL
LDGVKKMGSTVSSTEQTASRTGTALQOVKNEFQALIS
```

**Database:** Non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+SPupdate+PIR 265,580 sequences; 75,207,389 total letters.

Sequences producing High-scoring Segment Pairs:	High Score	Smallest Sum Probability P(N)	N
<u>gi 462366 sp P</u> SENSORY RHODOPSIN I TRANSDUCER (HTR-I)	60	0.013	4
<u>gi 462365 sp P</u> SENSORY RHODOPSIN I TRANSDUCER (HTR-I)	49	0.094	4
<u>gi 555515</u> (M58577) calpactin I (annexin II) heavy ch...	78	0.13	1
<u>gi 479430 pir </u> hypothetical protein - Wolinella succinoge...	47	0.43	2
<u>gi 113953 sp P</u> ANNEXIN II TYPE II (LIPOCORTIN II) (CALPAC...	73	0.52	1
<u>gi 1527137</u> (U62676) phototaxis transducer II [Halobac...	52	0.73	4
<u>gi 2213624</u> (AC000103) F21J9.16 [Arabidopsis thaliana]	52	0.91	3
<u>gi 806524 gnl </u> (D32137) oviduct-specific glycoprotein (MO...	60	0.95	2
<u>gi 1100874</u> (U39068) AcfB [Vibrio cholerae]	58	0.97	4
<u>gi 1170416 sp </u> SENSORY RHODOPSIN II TRANSDUCER (HTR-II)	48	0.99	3
<u>gi 729201 sp Q</u> PUTATIVE SENSORY TRANSDUCER PROTEIN	55	0.997	3
<u>gi 1352653 sp </u> P115 PROTEIN >gi 150165 (M34956) 115 kDa	57	0.9994	2
<u>gi 99066 pir  </u> P1:15 protein - Mycoplasma hyorhinis (SGC3)	57	0.9994	2
<u>gi 431739</u> (L25660) accessory colonization factor [Vi...	58	0.9997	4





Score = 60 (27.2 bits), Expect = 0.013, Sum P(4) = 0.013  
Identities = 11/45 (24%), Positives = 24/45 (53%)

Query: 524 EDVTTTHIREIGQEMNQLLDGVKMGSTVSSTEQTASRTGTALQQV 568  
E HIR I +++++ + + + T S +T T T++++V  
Sbjct: 414 ESTLLHIRTIADESEVNSIDEIQRRTTSEQAETVQSTATSVERV 458

Score = 46 (20.8 bits), Expect = 0.013, Sum P(4) = 0.013  
Identities = 9/16 (56%), Positives = 13/16 (81%)

Query: 161 SRIMAGIAGILAVGML 176  
S I+AGIAG+L +G +  
Sbjct: 37 STIVAGIAGLLTLGSI 52

Score = 44 (19.9 bits), Expect = 0.013, Sum P(4) = 0.013  
Identities = 8/58 (13%), Positives = 26/58 (44%)

Query: 376 LDGFTQAWESLLSTLKQVFGTSVEMSKTMGGMQGTVSSALETVTSMDKTASQMRTVME 433  
+D ++ + ++ + MS+T ++ + +E V+ ++ + RT ++  
Sbjct: 194 MDDLQATVRTVTVADEIEAKTERMSETSADIEASAGDTVEAVSKIESQPNDQRTELD 251

Score = 41 (18.6 bits), Expect = 0.031, Sum P(4) = 0.031  
Identities = 9/69 (13%), Positives = 33/69 (47%)

Query: 354 SMKNLQKVAEERKTRALSTVGQLDGFQAWESLLSTLKQVFGTSVEMSKTMGGMQGTVSS 413  
++ ++ +++T S + + + E + +T+ + S +++ + + S  
Sbjct: 235 AVSKIESQPNDQRTELDSAADDVQVVSASAEIEAATIDDLARSEDVATASDAARDSSKS 294

Query: 414 ALETVTSMD 422  
AL+ ++S++  
Sbjct: 295 ALDEMSSIE 303

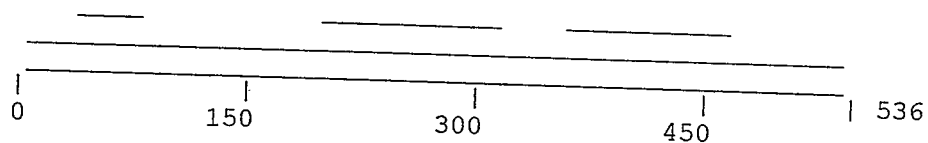
Score = 39 (17.7 bits), Expect = 0.013, Sum P(4) = 0.013  
Identities = 7/14 (50%), Positives = 12/14 (85%)

Query: 479 VVGDEVRLNLEQVR 492  
VV DEV++L+E+ +  
Sbjct: 362 VVADEVKDLAEETQ 375

**PIR** gi|462365|sp|P33741|HTRI\_HALHA SENSORY RHODOPSIN I TRANSDUCER (HTR-I)  
(METHYL-ACCEPTING PHOTOTAXIS PROTEIN I) (MPP-I)  
>gi|421715|pir||A47190 methyl-accepting transducer HtrI -  
Halobacterium halobium >gi|305352 (L05603) sensory rhodopsin I  
transducer [Halobacterium halobium]  
Length = 536

Local hits (HSPs):  
Annotated Domains:

Database sequence:



Annotated Domains:

<u>Entrez</u>	Domain: CYTOPLASMIC.	
<u>Entrez</u>	Transmembrane region	2..14
<u>Entrez</u>	Domain: EXTRACELLULAR.	15..29
<u>Entrez</u>	Transmembrane region	30..39
<u>Entrez</u>	Domain: CYTOPLASMIC.	40..55
<u>Entrez</u>	methylation site	56..536
		266

<u>Entrez</u>	methylation site	
<u>Entrez</u>	methylation site	273
<u>Entrez</u>	methylation site	280
<u>Entrez</u>	methylation site	464
<u>PROSITE</u>	methylation site	473
	AA_TRNA_LIGASE_II_2: Aminoacyl-transfer	452..461

Score = 49 (22.2 bits), Expect = 0.098, Sum P(4) = 0.094  
Identities = 9/58 (15%), Positives = 27/58 (46%)

Query: 376 LDGFTQAWESLLSTLKQVFGTSMVEMSKTMGGMQGTVSSALETVTSMDKTASQMRTVME 433  
+D ++ + ++ + MS+T ++ + +E V+ ++ A+ RT ++  
Sbjct: 194 MDDLQATVRTVTTVADEIEAKTERMSETSADIEASAGDTVEAVSKIESQANDQRTELD 251

Score = 48 (21.7 bits), Expect = 0.098, Sum P(4) = 0.094  
Identities = 10/45 (22%), Positives = 22/45 (48%)

Query: 524 EDVTTHIREIGQEMNQLLDGVKMGSTVSSSTEQTASRTGTALQQV 568  
E IR I + ++. + ++ T S +T T T+++V  
Sbjct: 414 ESTLRDIRTIADSI AEVSNSIDEIQRTTSEQAETVQSTATSVERV 458

Score = 46 (20.8 bits), Expect = 0.098, Sum P(4) = 0.094  
Identities = 9/16 (56%), Positives = 13/16 (81%)

Query: 161 SRIMAGIAGILAVGML 176  
S I+AGIAG+L +G +  
Sbjct: 37 STIVAGIAGLLTLGSI 52

Score = 46 (20.8 bits), Expect = 0.23, Sum P(4) = 0.21  
Identities = 10/69 (14%), Positives = 34/69 (49%)

Query: 354 SMKNLQKVAEERKTRALSTVGQLDGFTQAWESLLSTLKQVFGTSMVEMSKTMGGMQGTVSS 413  
++ ++ A +++T S + + + E + +T+ + S +++ + + S  
Sbjct: 235 AVSKIESQANDQRTELDSAADDVQOVSAEIEIAATIDDLASRSEDVATASDAARDSSKS 294

Query: 414 ALETVTSM 422  
AL+ ++S++  
Sbjct: 295 ALDEMSSIE 303

Score = 41 (18.6 bits), Expect = 0.71, Sum P(4) = 0.51  
Identities = 11/52 (21%), Positives = 20/52 (38%)

Query: 524 EDVTTHIREIGQEMNQLLDGVKMGSTVSSSTEQTASRTGTALQQVKNEFQAL 575  
E VT ++ + Q V+ TV ST + ++ +V N +  
Sbjct: 386 EKVT AQTEDVTASIQQTRTRVESGSETVESTLRDIRTIADSI AEVSNSIDEI 437

Score = 39 (17.7 bits), Expect = 0.098, Sum P(4) = 0.094  
Identities = 7/14 (50%), Positives = 12/14 (85%)

Query: 479 VVGDEVRLSEQVR 492  
VV DEV++L+E+ +  
Sbjct: 362 VVADEVKDLAETQ 375

Score = 37 (16.8 bits), Expect = 2.9, Sum P(4) = 0.94  
Identities = 9/23 (39%), Positives = 13/23 (56%)

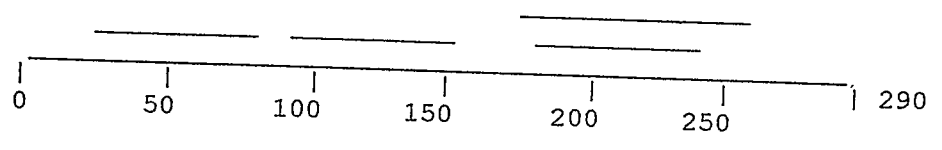
Query: 413 SALETVTSMDKTASQMRTVMEKN 435  
+A ETV S+ + A+Q V N  
Sbjct: 53 NAAETVASIKEIAAQTERVANGN 75



gi|555515 (M58577) calpactin I (annexin II) heavy chain [Xenopus lae  
Length = 290

Local hits (HSPs):  
Annotated Domains:

Database sequence:



Annotated Domains:

PROSITE  
PROSITE  
PROSITE

ANNEXIN: Annexins repeated domain signat 25..77  
ANNEXIN: Annexins repeated domain signat 97..149  
ANNEXIN: Annexins repeated domain signat 182..234

Score = 78 (35.3 bits), Expect = 0.14, P = 0.13  
Identities = 15/78 (19%), Positives = 36/78 (46%)

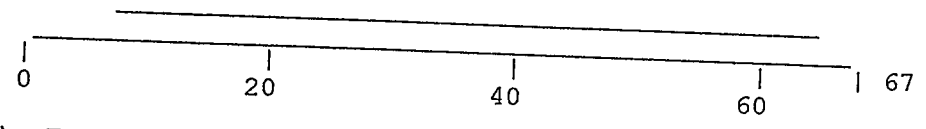
Query: 279 ERFGVDINRLVGTSIHRFHEHPDRIREILRRIKPLEVRQNMETQIGNYFLGSTSSMIPDS 338  
+R G D+ + + R H H ++ E + P ++ + ++ ++ + S+++  
Sbjct: 179 KRKGTDVTKWITIMTERSHPHLQKVFERYKSYSPYDIEERIKKEVKGDLENAFSNLVQCI 238  
Query: 339 EGKPLLYMATFYETTSMK 356  
+ KPL + YE+ K  
Sbjct: 239 QNKPLYFADRLYESMKGK 256



gi|479430|pir||S33854 hypothetical protein - Wolinella succinogenes  
Length = 67

Local hits (HSPs):

Database sequence:



Score = 47 (21.3 bits), Expect = 0.55, Sum P(2) = 0.43  
Identities = 8/20 (40%), Positives = 14/20 (70%)

Query: 298 EHPDRIREILRRIKPLEVRQ 317  
+ PDR++ I R +K LE ++  
Sbjct: 9 KEPDRVQAIRRAVKELEAQE 28

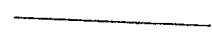
Score = 34 (15.4 bits), Expect = 0.55, Sum P(2) = 0.43  
Identities = 9/36 (25%), Positives = 17/36 (47%)

Query: . 343 LLYMATFYETTSMKNLQKVAEERKTRALSTVGQLDG 378  
LL + E + QK+ + + LS +G++ G  
Sbjct: 30 LLLILGKGDEAEQIIGSQKIPMKDRETVLSALGEIRG 65



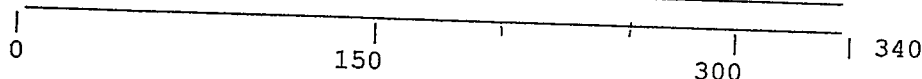
gi|113953|sp|P24801|ANX2\_XENLA ANNEXIN II TYPE II (LIPOCORTIN II) (C  
HEAVY CHAIN) (CHROMOBINDIN 8) (P36) (PROTEIN I) (PLACENTAL  
ANTICOAGULANT PROTEIN IV) (PAP-IV) >gi|214008 (M58575) calpactin I  
(annexin II) heavy chain [Xenopus laevis] >gi|214010 (M58576)  
calpactin I (annexin II) heavy chain [Xenopus laevis]  
Length = 340

Local hits (HSPs):



Annotated Domains:

Database sequence:



Annotated Domains:

<u>Entrez</u>	Domain: P10 BINDING SITE.	2..25
<u>Entrez</u>	Repetitive region: ANNEXIN.	43..103
<u>Entrez</u>	Repetitive region: ANNEXIN.	115..175
<u>Entrez</u>	Repetitive region: ANNEXIN.	200..260
<u>Entrez</u>	Repetitive region: ANNEXIN.	275..335
<u>PRINTS</u>	phosphorylation site: (BY PKC).	27
<u>PRINTS</u>	ANNEXINII1: Annexin type II motif I - 2	2..14
<u>PRINTS</u>	ANNEXIN1: Annexins motif I - 8	47..69
<u>PRINTS</u>	ANNEXINII2: Annexin type II motif II - 2	47..69
<u>PRINTS</u>	ANNEXIN2: Annexins motif II - 8	87..103
<u>PRINTS</u>	ANNEXINII3: Annexin type II motif III -	87..103
<u>PRINTS</u>	ANNEXIN3: Annexins motif III - 8	114..135
<u>PRINTS</u>	ANNEXINII4: Annexin type II motif IV - 2	114..135
<u>PRINTS</u>	ANNEXIN4: Annexins motif IV - 8	198..224
<u>PRINTS</u>	ANNEXINII5: Annexin type V - 2	198..224
<u>PRINTS</u>	ANNEXINII6: Annexin type II motif VI - 2	254..261
<u>PRINTS</u>	ANNEXIN5: Annexins motif V - 8	278..298
<u>PRINTS</u>	ANNEXINII7: Annexin type II motif VII -	278..298
<u>PRINTS</u>	ANNEXIN6: Annexins motif VI - 8	306..321
<u>PRINTS</u>	ANNEXIN7: Annexins motif VII - 8	322..335
<u>BLOCKS</u>	ANNEXINII8: Annexin type II motif VIII -	322..335
<u>BLOCKS</u>	ANNEXIN: Annexins repeat proteins domain	42..94
<u>BLOCKS</u>	ANNEXIN: Annexins repeat proteins domain	99..153
<u>BLOCKS</u>	ANNEXIN: Annexins repeat proteins domain	186..230
<u>PROSITE</u>	ANNEXIN: Annexins repeat proteins domain	256..309
<u>PROSITE</u>	ANNEXIN: Annexins repeated domain signat	51..103
<u>PROSITE</u>	ANNEXIN: Annexins repeated domain signat	123..175
<u>PROSITE</u>	ANNEXIN: Annexins repeated domain signat	208..260
<u>PROSITE</u>	ANNEXIN: Annexins repeated domain signat	283..335

Score = 73 (33.1 bits), Expect = 0.73, P = 0.52  
 Identities = 14/78 (17%), Positives = 36/78 (46%)

Query: 279 ERFGVDINRLVGTSHRFHEHPDRIEILRRIKPLEVRQNMETQIGNYFLGSTSSMIPDS 338  
 +R G D+ + + R H H ++ E + P ++ +++ ++ + +++

Sbjct: 205 KRKGTDVTKWITIMTERSHPLQKVFERYKSYSPYDIEESIKKEVKGDLENAFLNLVQCI 264

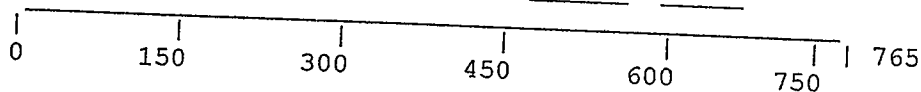
Query: 339 EGKPLLYMATFYETTSMK 356  
 + KPL + YE+ K

Sbjct: 265 QNKPLYFADRLYESMKGK 282

**ERS** gi|1527137 (U62676) phototaxis transducer II [Halobacterium salinarum]  
 Length = 765

Local hits (HSPs):

Database sequence:



Score = 52 (23.6 bits), Expect = 1.3, Sum P(4) = 0.73  
 Identities = 14/82 (17%), Positives = 35/82 (42%)

Query: 352 TISMKNLQKVAERKTRALSTVGQLDGFTQAWESLLSTLKQVFGTSVEMSKTMGGMQGTV 411  
 +T++ + A E+ R G++D + + E + T+ + T+ + + + +  
 Sbjct: 482 STAVDEISDGATEQTDRLHEVAGEVDDLSASAEVAETVASLADTAGQAASAVDDGRQAT 541

Query: 412 SSALETVTSMDKTASQMRVME 433  
 A+ET+ + A M+  
 Sbjct: 542 EDAVETMDDVADDAEAAAADAMD 563

Score = 50 (22.7 bits), Expect = 1.3, Sum P(4) = 0.73  
 Identities = 11/45 (24%), Positives = 21/45 (46%)

Query: 524 EDVTTTHIREIGQEMNQLLDGVKKMGSTVSSSTEQTASRTGTALQQV 568  
 ED+ + + + +++ + D ++ TVS T TAL V  
 Sbjct: 626 EDIESRLLALQGQVSDVADEMRRATSDTVSDGRATVGDAAATALDDV 670

Score = 40 (18.1 bits), Expect = 1.3, Sum P(4) = 0.73  
 Identities = 8/14 (57%), Positives = 11/14 (78%)

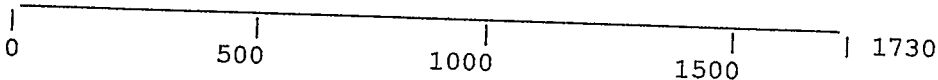
Query: 479 VVGDEVRLNLSQVR 492  
 VV DEV+ L+E+ R  
 Sbjct: 609 VVADEVKTLAEESR 622

Score = 35 (15.9 bits), Expect = 1.3, Sum P(4) = 0.73  
 Identities = 8/17 (47%), Positives = 10/17 (58%)

Query: 330 STSSMIPDSEGKPLLYM 346  
 S S IP + K L+YM  
 Sbjct: 171 SVLSPIPGTTDKALIYM 187

**ERS** gi|2213624 (AC000103) F21J9.16 [Arabidopsis thaliana]  
 Length = 1730

Local hits (HSPs):

Database sequence: 

Score = 52 (23.6 bits), Expect = 2.4, Sum P(3) = 0.91  
 Identities = 10/42 (23%), Positives = 21/42 (50%)

Query: 529 HIREIGQEMNQLLDGVKKMGSTVSSSTEQTASRTGTALQQVKN 570  
 H+ E Q + +L +K +T+ E T + T ++ ++N  
 Sbjct: 1326 HVSECAQRIKELSSAAEKACATLKLFFETTNNAAATVIRDMEN 1367

Score = 51 (23.1 bits), Expect = 2.4, Sum P(3) = 0.91  
 Identities = 11/36 (30%), Positives = 23/36 (63%)

Query: 357 NLQKVAERKTRALSTVGQLDGFTQAWESLLSTLKQ 392  
 +L+K+AE + R + +GF+ + ++L++TL Q  
 Sbjct: 1200 SLRKMAGEVRLRNKTLNENFEGFSTSIDTLIATIMQ 1235

Score = 46 (20.8 bits), Expect = 2.4, Sum P(3) = 0.91  
 Identities = 11/35 (31%), Positives = 19/35 (54%)

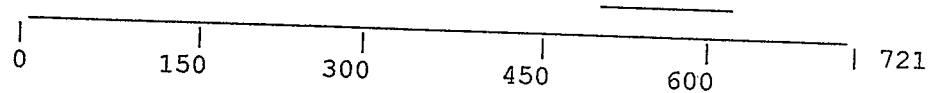
Query: 68 EVNGGSGDEIIREFDRVLAVDPKSMIVKSGVLQSK 102  
 E+ G SG+ + + + +D M++K G L SK  
 Sbjct: 1089 ELAGSSGNSQSKSLEIITHLDNLQMLLKDGGGLISK 1123

**ERS** gi|806524|gnl|PID|d1007438 (D32137) oviduct-specific glycoprotein (M

precursor [Mus musculus]  
Length = 721

Local hits (HSPs):

Database sequence:



Score = 60 (27.2 bits), Expect = 2.9, Sum P(2) = 0.95  
Identities = 12/49 (24%), Positives = 26/49 (53%)

Query: 378 GFTQAWESLLSTLKQVFGTSVEMSKTMGGMQGTVSSALETVTSMDKTAS 426  
G ++A + T+ ++ + +SKT G+ T + +T+T + KT +  
Sbjct: 512 GVSKATAGISKTIPEISKATAGVSKTTTGVSKTTTGISKTITGVSKTTT 560

Score = 48 (21.7 bits), Expect = 2.9, Sum P(2) = 0.95  
Identities = 13/41 (31%), Positives = 21/41 (51%)

Query: 527 TTHIREIGQEMNQLLDGVKKMGSTVSSTEQTASRTGTALQQ 567  
TT I + +++ GV K+ + VS T S+T T + Q  
Sbjct: 559 TTGISKTTTGISKTTTGVSKITTTGVSKTTTGISKTTTGISQ 599

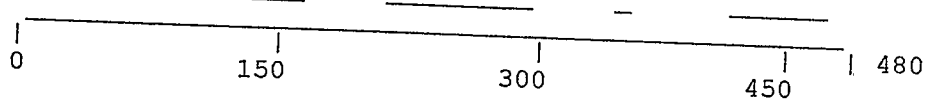
Score = 44 (19.9 bits), Expect = 9.6, Sum P(2) = 1.0  
Identities = 11/45 (24%), Positives = 22/45 (48%)

Query: 527 TTHIREIGQEMNQLLDGVKKMGSTVSSTEQTASRTGTALQQVKNE 571  
TT I + ++++ GV K + +S T S+T T + + +  
Sbjct: 566 TTGISKTTTGVSKITTTGVSKTTTGISKTTTGISQTTTGISKTTTD 610

**EBERS** gi|1100874 (U39068) AcfB [Vibrio cholerae]  
Length = 480

Local hits (HSPs):

Database sequence:



Score = 58 (26.3 bits), Expect = 3.3, Sum P(4) = 0.96  
Identities = 14/78 (17%), Positives = 35/78 (44%)

Query: 359 QKVAEERKTRALSTVGQLDGFQAWESLLSTLKQVFGTSVEMSKTMGGMQGTVSSALETV 418  
Q++ E + +LD + +++T Q+ + E S+ + G V+ + V  
Sbjct: 220 QELVEVCNNSVMDQYRELDMLASSMNEMVATSNQIAQITSEASEITSKINGQVNEGVGAV 279

Query: 419 TSMDKTASQMRTVMEKNK 436  
+S+ ++ + ++K K  
Sbjct: 280 SSVTESVGNLVEKLDKTK 297

Score = 42 (19.0 bits), Expect = 3.3, Sum P(4) = 0.96  
Identities = 10/52 (19%), Positives = 20/52 (38%)

Query: 525 DVTHIREIGQEMNQLLDGVKKMGSTVSSTEQTASRTGTALQQVKNEFQALI 576  
D+T + E + + + + ++ T S G + Q +ALI  
Sbjct: 417 DITNQVATAAYEQSHVSEEINSNSISIKDKADTLSSLGNKISQQAYSQKALI 468

Score = 34 (15.4 bits), Expect = 3.3, Sum P(4) = 0.96  
Identities = 7/10 (70%), Positives = 9/10 (90%)

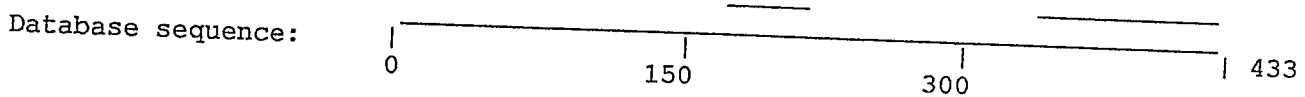
Query: 479 VVGDEVRNLS 488  
VV DEVR+L+  
Sbjct: 347 VVADEVRSLSA 356

Score = 34 (15.4 bits), Expect = 3.3, Sum P(4) = 0.96  
Identities = 11/28 (39%), Positives = 13/28 (46%)

Query: 168 AGILAVGMLILLYFRMDRLSDHLRQLAD 195  
A ILA +L F M + L QL D  
Sbjct: 133 AVILASVFFAILLFTMRMLKPLHQLTD 160

**PIR** gi|1170416|sp|P42258|HTR2\_HALVA SENSORY RHODOPSIN II TRANSDUCER (HTR  
(METHYL-ACCEPTING PHOTOTAXIS PROTEIN II) (MPP-II)  
>gi|1364151|pir||S55296 sensory rhodopsin II transducer protein -  
Haloarcula vallismortis (fragment) >gi|516322 (Z35308) transducer  
of sensory rhodopsin II [Haloarcula vallismortis]  
Length = 433

Local hits (HSPs):



Score = 48 (21.7 bits), Expect = 4.2, Sum P(3) = 0.98  
Identities = 13/39 (33%), Positives = 19/39 (48%)

Query: 185 RLSDLRQLADNIQAVATFQSRGLEYAPETIEEKSIYNA 223  
+++ +Q+AD Q+ A G E A E I E S A  
Sbjct: 175 QVASSAQVADTSQSAAKVGEDGREAAQEALAEMSAIEA 213

Score = 45 (20.4 bits), Expect = 4.2, Sum P(3) = 0.98  
Identities = 10/52 (19%), Positives = 23/52 (44%)

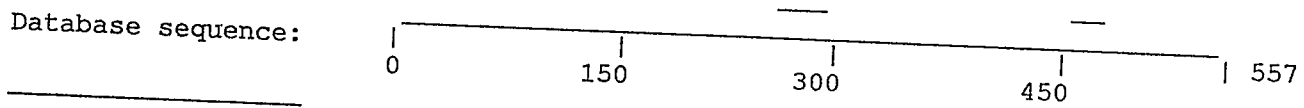
Query: 353 TSMKNLQKVAEERKTRALSTVGLDGFQAWESLLSTLKQVFGTSVEMSKTM 404  
T ++ + + EE+ A +G +D T + + V G + + S ++  
Sbjct: 339 TGIQEIDRATEEQARTAQDVMGTIDDLTTISQQTATEADTVAGAAQDQSASI 390

Score = 44 (19.9 bits), Expect = 4.2, Sum P(3) = 0.98  
Identities = 10/35 (28%), Positives = 17/35 (48%)

Query: 525 DVTTHIREIGQEMNQLLDGVKMGSTVSSTEQTAS 559  
D T +R+ ++ LLD S + T+ TA+  
Sbjct: 395 DSATELRQRADDLESLLDRFTVENSAGTGT DSTAA 429

**PIR** gi|729201|sp|Q02929|CPS\_CLOTM PUTATIVE SENSORY TRANSDUCER PROTEIN  
>gi|477735|pir||B47704 probable sensory transducer protein -  
Clostridium thermocellum >gi|144913 (L04736) sensory transducer  
protein [Clostridium thermocellum]  
Length = 557

Local hits (HSPs):  
Annotated Domains:



Annotated Domains:

<u>Entrez</u>	methylation site	274
<u>Entrez</u>	modified site: DEAMIDATION AND METHYLATI	281
<u>Entrez</u>	methylation site	463
<u>Entrez</u>	methylation site	472

PROSITE

HTH\_LYSR\_FAMILY: Bacterial regulatory pr 261..286

Score = 55 (24.9 bits), Expect = 5.7, Sum P(3) = 1.0
Identities = 10/45 (22%), Positives = 24/45 (53%)

Query: 524 EDVTTHIREIGQEMNQLLDGVKKGSTVSSSTEQTASRTGTALQQV 568
E+ T RE + +N++++G+ K + V+ ++ A+ Q+
Sbjct: 399 ENGTKIARETAEALNKIVEGISKAAATLVNDIAVASNEQAAAITQI 443

Score = 45 (20.4 bits), Expect = 5.7, Sum P(3) = 1.0
Identities = 20/105 (19%), Positives = 31/105 (29%)

Query: 384 ELLSTLKQVEFGTSVEMSKTMGGMQGTVSSALETVTSMDKTASQMRVTMEKNKXXXXXXXXX 443
E L ++L+QV + +K A +K ++M ME+
Sbjct: 273 EELTASLEQVANQTQLSAKANANQANELAEVAKNNAEQGNKQMAEMLNAMEEINNSSSNIS 332

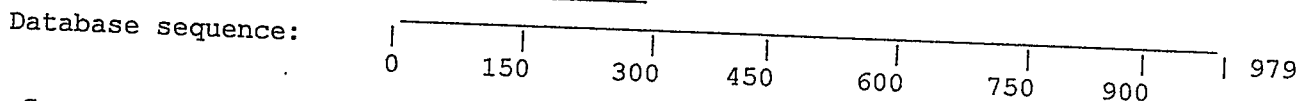
Query: 444 XXXXXXXXXXXXAQTXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXVVGDEVRLNLS 488
QT VV +EVRNL+
Sbjct: 333 RIIKVIDEIAFQTNILALNAAVEAARAGQHKGKFAVVAEEVRNLA 377

Score = 38 (17.2 bits), Expect = 5.7, Sum P(3) = 1.0
Identities = 10/49 (20%), Positives = 25/49 (51%)

Query: 255 EGNELLYVSPSLIEILLPVKKEVQERFGVDINRLVGTSIHRFHEHPDRI 303
E ++ + +++ +++ V + GV I+R++ I + E DR+
Sbjct: 115 ENKQVASTASTVMIVVIFVGILIAIALGVFISRIISKPIGQMVVEAADRL 163

ERS gi|1352653|sp|P41508|P115\_MYCHR P115 PROTEIN >gi|150165 (M34956).115
protein [Mycoplasma hyorhinitis]
Length = 979

Local hits (HSPs):



Score = 57 (25.8 bits), Expect = 7.3, Sum P(2) = 1.0
Identities = 11/30 (36%), Positives = 18/30 (60%)

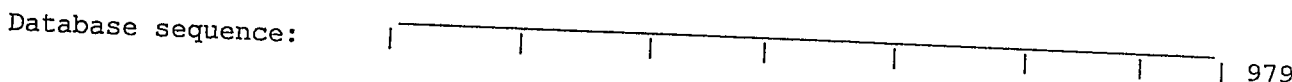
Query: 407 MQGTVSSALETVTSMDKTASQMRVTMEKNK 436
+QG + V S+DK AS+ + +EK+K
Sbjct: 192 LQGAIKELERQVNSLDKQASKAKIYLEKSK 221

Score = 49 (22.2 bits), Expect = 7.3, Sum P(2) = 1.0
Identities = 10/51 (19%), Positives = 27/51 (52%)

Query: 525 DVTTHIREIGQEMNQLLDGVKKGSTVSSSTEQTASRTGTALQQVKNFQAL 575
++ T + E+ Q+ N L ++ S++S T + +++Q++ ++ L
Sbjct: 244 NLNTSLLEVEQQRNDLELNIQTYESSISQTVHFKTEVESSIQBITSKLDNL 294

ERS gi|99066|pir||JQ0894 P115 protein - Mycoplasma hyorhinitis (SGC3)
Length = 979

Local hits (HSPs):
Annotated Domains:





0 150 300 450 600 750 900

Annotated Domains:

Entrez  
PROSITE


region: nucleotide-binding motif 32..39  
ATP\_GTP\_A: ATP/GTP-binding site motif A 32..39

Score = 57 (25.8 bits), Expect = 7.3, Sum P(2) = 1.0  
Identities = 11/30 (36%), Positives = 18/30 (60%)

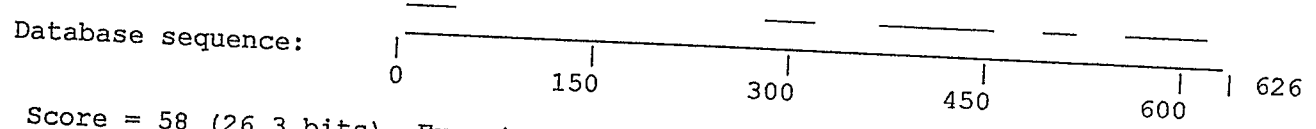
Query: 407 MQGTVSSALETVTSMDKTASQMRTVMEKNK 436  
+QG + V S+DK AS+ + +EK+K  
Sbjct: 192 LQGAIKELERQVNSLDKQASKAKIYLEKSK 221

Score = 49 (22.2 bits), Expect = 7.3, Sum P(2) = 1.0  
Identities = 10/51 (19%), Positives = 27/51 (52%)

Query: 525 DVTTTHIREIGQEMNQLLDGVKKMGSTVSSSTEQTASRTGTALQQVKNEFQAL 575  
++ T + E+ Q+ N L ++ S++S T + +++Q++ ++ L  
Sbjct: 244 NLNTSLLVEVEQQRNDLELNIQTYESSISQTVHFKTEVESSIQEITSKLDNL 294

 gi|431739 (L25660) accessory colonization factor [Vibrio cholerae]  
Length = 626

Local hits (HSPs):



Score = 58 (26.3 bits), Expect = 8.2, Sum P(4) = 1.0  
Identities = 14/78 (17%), Positives = 35/78 (44%)

Query: 359 QKVAEERKTRALSTVGQLDGFQAWESLLSTLKQVFGTSVEMSKTMGGMQGTVSSALETV 418  
Q++ E + +LD + +++T Q+ + E S+ + G V+ + V  
Sbjct: 366 QELVEVCNNSVMDQYRELDMLASSMNEMVATSNQIAQITSEASEITSKINGQVNEGVGAV 425

Query: 419 TSMDKTASQMRTVMEKNK 436  
+S+ ++ + ++K K  
Sbjct: 426 SSVTESVGNLVEKLDKTK 443

Score = 42 (19.0 bits), Expect = 8.2, Sum P(4) = 1.0  
Identities = 10/52 (19%), Positives = 20/52 (38%)

Query: 525 DVTTTHIREIGQEMNQLLDGVKKMGSTVSSSTEQTASRTGTALQQVKNEFQALI 576  
D+T + E + + + + ++ T S G + Q +ALI  
Sbjct: 563 DITNQVATAAYEQSHVSEEINSNSISIKDKADTLSSLGNKISQQAYSQKALI 614

Score = 34 (15.4 bits), Expect = 8.2, Sum P(4) = 1.0  
Identities = 7/10 (70%), Positives = 9/10 (90%)

Query: 479 VVGDEVRNLS 488  
VV DEVR+L+  
Sbjct: 493 VVADEVRS LA 502

Score = 34 (15.4 bits), Expect = 8.2, Sum P(4) = 1.0  
Identities = 11/28 (39%), Positives = 13/28 (46%)

Query: 168 AGILAVGMLLILLYFRMDRLSDHLRQLAD 195  
A ILA +L F M + L QL D

Sbjct: 279 AVILASVFFAILLFTMRLMLKPLHQLTD 306

Score = 34 (15.4 bits), Expect = 8.2, Sum P(4) = 1.0  
Identities = 8/32 (25%), Positives = 16/32 (50%)

Query: 159 FESRIMAGIAGILAVGMLLILLYFRMDRLSDHL 190  
F +++ I+ IL YF+M +++L

Sbjct: 3 FSIKLLMIFTSIITISSILTYFQMHTNEYL 34

Parameters:

- gi
- filter=xnu+seg
- echofilter
- V=50
- B=50
- sort\_by\_pvalue
- P=4
- ctxfactor=1.00
- E=10

Query Frame	MatID	Matrix name	----- Lambda	As Used K	----- H	----- Lambda	Computed K	----- H
+0	0	BLOSUM62	0.314	0.129	0.337	same	same	same

Query Frame	MatID	Length	Eff.Length	E	S	W	T	X	E2	S2
+0	0	577	495	10.	66	3	10	23	0.21	34

Statistics:

Query Frame	MatID	Expected High Score	Observed High Score	HSPs Reportable	HSPs Reported
+0	0	70 (31.7 bits)	78 (35.3 bits)	45	45

Query Frame	MatID	Neighborhd Words	Word Hits	Excluded Hits	Failed Extensions	Successful Extensions	Overlaps Excluded
+0	0	14417	110822856	25531324	85194360	97172	217

Database: Non-redundant GenBank CDS translations+PDB+SwissProt+SPupdate+PIR  
 Release date: June 29, 1997  
 Posted date: 4:50 AM EDT Jun 29, 1997  
 # of letters in database: 74,905,049  
 # of sequences in database: 264,160  
 # of database sequences satisfying E: 14  
 No. of states in DFA: 568 (56 KB)  
 Total size of DFA: 199 KB (256 KB)  
 Time to generate neighborhood: 0.02u 0.01s 0.03t Real: 00:00:00  
 No. of processors used: 4  
 Time to search database: 188.71u 0.64s 189.35t Real: 00:00:48

Annotated Domains Database: June 13, 1997  
 Release Date: June 23, 1997