

Universidad de Chile
Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

**“Caracterización de una tiosulfato azufre transferasa
(rodanasa) del microorganismo quimiolitotrófico
Acidithiobacillus ferrooxidans”**

José Antonio Ponce Barrera

Memoria entregada para optar al título profesional de Bioquímico

Patrocinante

Dr. Davor Cotoras.
Depto. de Bioquímica y Biología Molecular
Fac. de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Universidad de Chile

Director de Memoria

Dr. Carlos A. Jerez
Lab. Microbiología Molecular y Biotecnología
Fac. de Ciencias
Universidad de Chile

Santiago, Octubre 2007.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer sinceramente al Dr. Carlos Jerez, director de esta tesis, por su acertada dirección y facilidades brindadas en la ejecución de la presente investigación.

A mis compañeros de laboratorio: Dr. Nicolás Guilliani, Francisco Chávez, Francisco Remonsellez, Álvaro Orell, Mario Vera, Felipe Gordillo, Simon Beard, Carolina Farah, Álvaro Banderas, Susana Valenzuela, Fernando Pagliai, Claudio Navarro, Matías Castro y en especial a Mauricio Acosta y Lissette Valenzuela por su generosidad de conocimientos, su gran voluntad y su apoyo persistente durante la realización de este trabajo.

A Ricardo Cabrera y a Mauricio Báez del laboratorio de Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Chile por su colaboración y asesoramiento en la determinación de parámetros catalíticos de la enzima purificada en esta tesis.

A don Juan Araos por su inagotable labor y gran calidez humana.

A los fondos de financiamiento que permitieron la realización de esta tesis: Proyecto Fondecyt 1030767.

A la empresa Pucobre S.A. por su apoyo económico y facilidades concedidas en la etapa final de esta tesis.

INDICE DE MATERIAS

AGRADECIMIENTOS.....	ii
INDICE GENERAL.....	iii
INDICE DE FIGURAS.....	iv
INDICE DE TABLAS.....	v
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vi
RESUMEN.....	vii
SUMMARY.....	viii
1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. La química del átomo de azufre.....	1
1.2. Biolixiviación microbiana.....	3
1.2.1. Diversidad de bacterias presentes en los ambientes lixiviantes.....	4
1.2.1.1. El género <i>Acidithiobacillus</i>	5
1.3. La oxidación de compuestos inorgánicos de azufre reducido por bacteria....	7
1.3.1. Oxidación del tiosulfato.....	8
1.4.2.1. Las transferasas de azufre en los seres vivos.....	10
1.4.2.2. Las tiosulfato azufre transferasas en <i>A. ferrooxidans</i>	12
1.4. Expresión de proteínas durante el crecimiento de <i>A. ferrooxidans</i>	12
1.6. Búsqueda de genes putativos que codifican para proteínas rodanasas en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 mediante métodos bioinformáticos.....	13
1.7. Hipótesis.....	14
1.8. Objetivos.....	14
2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
2.1. Cepas, plasmidios y condiciones de cultivo.....	15
2.1.1. <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	15
2.1.2. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	16
2.1.3. Cepas y plasmidios de <i>E. coli</i>	16

2.2. Técnicas de biología molecular.....	17
2.2.1. Extracción del DNA cromosómico.....	18
2.2.2. Extracción del DNA plasmidial.....	18
2.2.3. Cuantificación del DNA.....	18
2.2.4. Electroforesis del DNA en geles de agarosa.....	18
2.2.5. Purificación de los productos de PCR.....	19
2.2.6. Clonamiento de los productos de PCR.....	19
2.2.7. Transformaciones.....	20
2.2.8. Reacción de PCR sobre colonias recombinantes.....	20
2.2.9. Secuenciamiento del DNA.....	21
2.3. Búsqueda de genes de TSTs en el genoma de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 mediante herramientas bioinformáticas.....	21
2.3.1. Búsqueda de los genes <i>p11, p14, p15, p16, p16.2, p21 y p28</i>	21
2.3.2. Diseño de partidores y condiciones de PCR para amplificar los genes <i>p11, p14, p15, p16 y p16.2</i>	22
2.3.3. Clonamiento y expresión de los genes tipo-rodanasa.....	23
2.4. Expresión y purificación de la proteína P15 recombinante (P15r).....	24
2.5. Análisis de proteínas.....	25
2.5.1. Preparación de muestras para electroforesis en geles de poliacrilamida.....	25
2.5.2. Electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.....	25
2.5.3. Determinación cuantitativa de proteínas.....	25
2.5.4. Inmunoelectrotransferencia.....	25
2.5.5. Detección inmunológica de proteínas.....	26
2.6. Determinación de la actividad tiosulfato:cianuro azufre transferasa.....	26
2.7. Caracterización de la proteína recombinante purificada.....	27
2.7.1. Determinación de la Km preliminar usando el método de Cornish-Bowden.....	28
2. RESULTADOS.....	29
3.1. Caracterización de las enzimas rodanasas en <i>A. ferrooxidans</i> mediante métodos bioinformáticos.....	29
3.1.1. Caracterización de las secuencias de los posibles genes rodanasa de <i>A. ferrooxidans</i>	29
3.1.2. Propiedades de las posibles proteínas tipo rodanasa	

encontradas en el genoma de <i>A. ferrooxidans</i>	32
3.1.3. Contextos genómicos de los genes tipo rodanasa presentes en <i>A. ferrooxidans</i>	34
3.2. Clonamiento, expresión y análisis de la actividad tiosulfato azufre transferasa de las proteínas recombinantes.....	38
3.2.1. Clonamiento de los genes p11, p14, p15, p16, p16.2 y p28 de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 en el sistema de expresión TOPO....	39
3.2.2. Determinación de la actividad tiosulfato azufre transferasa en los extractos libres de células de <i>A. ferrooxidans</i> y en las cepas recombinantes de <i>E. coli</i>	41
3.3. Purificación y caracterización bioquímica preliminar de la proteína recombinante TST P15.....	42
3.1.1. Búsqueda de las condiciones ideales de inducción y solubilidad de la proteína recombinante P15.....	43
3.2.2. Purificación de la proteína tipo rodanasa P15r bajo condiciones nativas..	45
3.3.3. Propiedades catalíticas de la proteína P15r producida en células de <i>E. coli</i>	47
4. DISCUSIÓN.....	52
5. CONCLUSIONES.....	59
6. REFERENCIAS.....	60

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura molecular del azufre octamérico (S ₈) y del tiosulfato.....	3
Figura 2. Posible modelo de la oxidación del tiosulfato en tiobacilos aerobios estrictos.....	9
Figura 3. Reacción catalizada por la enzima tiosulfato:cianuro azufre transferasa.....	10
Figura 4. Alineamiento parcial de las secuencias aminoacídicas de las proteínas tipo rodanasa de <i>A. ferrooxidans</i> con rodanasas de estructura ya conocida.....	30
Figura 5. Contextos genómicos de los genes tipo rodanasa presentes en <i>A. ferrooxidans</i>	34
Figura 6. Sobreexpresión <i>in vivo</i> de los genes p11, p14, p15, p16 y p16.2 en <i>E. coli</i>	40
Figura 7. Sobreexpresión <i>in vivo</i> de los genes p15 y p16.2 en <i>E. coli</i> analizada por electroforesis y western-blot.....	43
Figura 8. Análisis de la sobreexpresión del gen <i>p15</i> en <i>E. coli</i> bajo distintas condiciones de inducción.....	45
Figura 9. Expresión y purificación bajo condiciones nativas de la rodanasa recombinante P15 en <i>E. coli</i>	46
Figura 10. Efecto del pH sobre la actividad específica TST de la enzima P15r.....	47
Figura 11. Determinación de la Km preliminar para el tiosulfato de la enzima rodanasa P15r por medio del método de Cornish-Bowden.....	49
Figura 12. Propiedades cinéticas de la proteína rodanasa P15r.....	51

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Estados de oxidación del átomo de azufre.....	2
Tabla 2. Cepas de <i>E. coli</i> empleadas y generadas en esta tesis.....	16
Tabla 3. Plasmidios de <i>E. coli</i> empleados y construidos en esta tesis.....	17
Tabla 4. pBLASTP contra la rodanasa GlpE de <i>E. coli</i> , de las secuencias de algunas putativas proteínas tipo rodanasa encontradas en el genoma de <i>A. ferrooxidans</i>	30
Tabla 5. Propiedades de las putativas proteínas tipo rodanasa encontradas en el genoma de <i>A. ferrooxidans</i> mediante métodos bioinformáticos.....	33
Tabla 6. Actividad TST en extractos libre de células de <i>A. ferrooxidans</i> y en cepas recombinantes de <i>E. coli</i> que sobreexpresan algunas de las proteínas tipo rodanasa de <i>A. ferrooxidans</i>	42
Tabla 7. Actividad enzimática y parámetros cinéticos de las rodanasas de organismos procariontes, catalizando la reacción de transferencia de azufre-sulfano.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS

Amp	Ampicilina
BSA	Seroalbumina bovina
CIAR	Compuestos inorgánicos de azufre reducido
Cm	Cloramfenicol
DO₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
DTT	Ditiotreitol
Fe(II)	Ion ferroso
Fe (III)	Ion férrico
IPTG	Isopropil tio- β -galactósido
ORF	Open reading frame (marco abierto de lectura)
P15r	Proteína P15 recombinante
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
pI	Punto isoeléctrico
PMSF	Fluoruro de fenilmetilensulfonilo (inhibidor de proteasas)
PVDF	Difluoruro de Polivinilideno
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TAE	Tris-acetato EDTA
TBS	Amortiguador Tris salino
TST	Tiosulfato azufre transferasa

RESUMEN

Acidithiobacillus ferrooxidans es una bacteria quimiolitotrófica acidófila, que obtiene su energía a partir de la oxidación del ion ferroso, azufre elemental y otros compuestos de azufre reducidos. La habilidad de este microorganismo para solubilizar los sulfuros metálicos es aprovechada en operaciones de biominería.

Se ha propuesto al tiosulfato como el intermediario principal en la oxidación de los sulfuros metálicos. En el ciclo biológico de este compuesto están involucrados diversos tipos de enzima, tales como la tiosulfato deshidrogenasa, tiosulfato reductasas y las rodanasas (tiosulfato azufretransferasas). Estas últimas son una familia de enzimas ampliamente distribuidas que catalizan la transferencia de un átomo de azufre sulfano desde el tiosulfato al cianuro como aceptor. La actividad rodanasa ha sido descrita en *A. ferrooxidans*, lo que sugiere la existencia de una o varias proteínas pertenecientes a esta familia.

Mediante análisis bioinformáticos se encontraron ocho secuencias nucleotídicas que contenían un dominio rodanasa simple en el genoma de *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270: p11, p14, p14.3, p15, p16, p16.2, p21, y p28. De estos ocho genes, se aislaron seis desde el ADN total de *A. ferrooxidans*, se clonaron y sobreexpresaron en *Escherichia coli*.

Posteriormente se determinó que las proteínas P15 y P16.2 presentaban claramente actividad rodanasa, medida en extractos crudos de *E. coli* recombinantes. De estas dos rodanasas, se purificó la proteína P15 a través de cromatografía de afinidad en columnas de níquel-NTA. Una vez purificada esta proteína se procedió a caracterizarla

preliminarmente, midiendo el pH óptimo, la K_m y la V_{max} para dos de sus sustratos, tiosulfato y cianuro.

Los resultados obtenidos en esta tesis ayudarán a entender el posible papel de las rodanasas en el metabolismo u oxidación de los compuestos azufrados, lo que puede ser importante para el funcionamiento óptimo de las operaciones de biominería.

“Characterization of a thiosulfate sulfurtransferase (rhodanese) from the chemolithoautotrophic microorganism *Acidithiobacillus ferrooxidans*”

SUMMARY

Acidithiobacillus ferrooxidans is a chemolithoautotrophic bacterium that obtains its energy from the oxidation of ferrous iron, elemental sulfur, or partially oxidized sulfur compounds. The ability of this microorganism to solubilize metal sulfides is successfully applied in biomining operations.

It has been proposed that thiosulphate is the main intermediate in the oxidation of metal sulfides. In the biological cycle of this compound, varied types of enzyme are implied, such as the thiosulfate deshydrogenase, thiosulfate reductases and the rhodanases (thiosulfate sulfurtransferases). The above mentioned are a family of enzymes widely distributed that catalyze the transfer of a sulfane sulfur atom from the thiosulphate to cyanide as acceptor. The rhodanese activity has been described in *A. ferrooxidans*, which suggests the existence of one or several proteins belonging to this family.

Using *in silico* bioinformatic analysis we found that eight sequences presented a simple rhodanese domain in the *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 genome: p11, p14, p14.3, p15, p16, p16.2, p21, y p28. From these eight genes, six were isolated from the genomic DNA from *A. ferrooxidans*, cloned and expressed in *Escherichia coli*.

We have shown that the proteins P15 y P16.2 clearly presented rhodanese activity, measured in crude extract of recombinant *E. coli*. Of these two rhodanases, we purified the protein P15 through affinity chromatography in niquel-NTA columns. Once we

purified this protein, we initiated a preliminary characterization, measuring optimum pH and the K_m and the V_{max} for two different substrates, thiosulphate and cyanide.

The results obtained in this thesis will help to understand the possible function of rhodanases in the metabolism or oxidation of the sulfur compounds; this could be important for the improvement of the biomining operations.

INTRODUCCION

1.1. La química del átomo de azufre

La elevada complejidad y reactividad química que presentan los compuestos inorgánicos de azufre reducido (CIAR), se explica porque el átomo de azufre presenta varios estados de oxidación (Tabla 1) (Suzuki 1999, Steudel R., 2000). Entre los CIAR, en los sulfuros (H_2S) el átomo de azufre se encuentra en el estado más reducido (-2) en tanto que en el sulfato se halla en el estado más oxidado (+6). La pirita (FeS_2) es uno de los sulfuros metálicos más abundante en la naturaleza y su oxidación química genera azufre molecular. El azufre molecular puede adoptar muchas formas estructurales, entre los cuales se considera al anillo octamérico (S_8) como la forma más estable (Figura 1).

Se ha propuesto que el sulfito (SO_3^{-2}) es uno de los intermediarios más importantes de la oxidación biológica de los CIAR (Kelly, 1988). Otro de los intermediarios químicos importantes es el trióxido de azufre, el cual en su forma hidratada como ácido sulfúrico (H_2SO_4) se disocia de sus protones formando ion hidrosulfato (HSO_4^-) y finalmente el sulfato (SO_4^{-2}) (Tabla 1). Este último compuesto es el producto final de la oxidación completa de los CIAR por microorganismos.

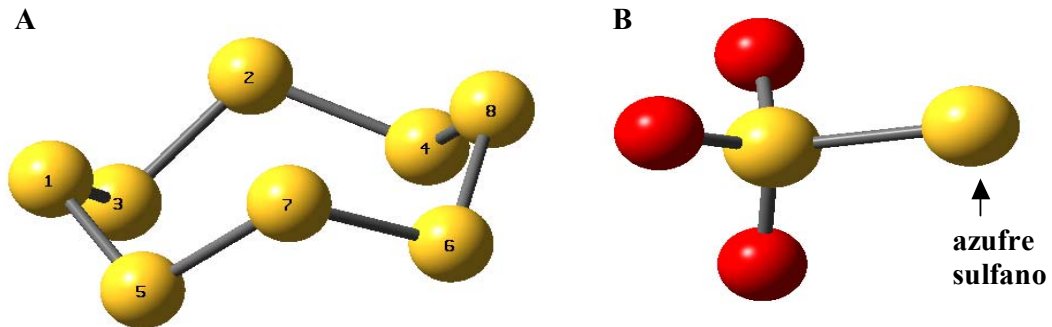
Tabla 1. Estados de oxidación del átomo de azufre

-2	-1	0	+1	+2	+3	+4	+5	+6
H ₂ S Sulfuro de hidrógeno	H ₂ S ₂ Disulfano	S _n Azufre elemental	Cl-S-S-Cl Dicloro disulfano	(SO) Monoóxido de azufre	S ₂ O ₄ ²⁻ Ditionita	SO ₂ Dióxido de azufre	S ₂ O ₆ ²⁻ Ditionato	SO ₃ Trióxido de azufre
HS ⁻ Ion sulfuro de hidrógeno	S ₂ ²⁻ Disulfuro como en la pirita	R-S _n -R Polisulfano orgánico		SO ₂ ²⁻ Sulfoxilato		H ₂ SO ₃ Acido sulfuroso	RSO ₃ ⁻ Sulfonato	SO ₄ ²⁻ Sulfato
S ²⁻ Ion sulfuro como en FeS						SO ₃ ²⁻ Sulfito		
						S-----SO ₃ ²⁻ Tiosulfato		
						S-----SO ₃ ²⁻ S-----SO ₃ Tetrionato		
H ₂ S-----S _n Polisulfano								
²⁻ S-----S _n Polisulfuro								

(modificado de Suzuki, 1999)

También existen en la naturaleza CIAR con átomos de azufre con distintos estados de oxidación conformando el mismo compuesto; entre estos hay varios que son utilizados oxidativamente como fuente energética por los microorganismos. Entre los más importantes tenemos el tiosulfato (S-SO₃²⁻, Figura 1B), tetrionato (O₃S-S-SO₃⁻) y los polisulfuros (²⁻S-S_n). El estado de oxidación efectivo por átomo de azufre en la molécula tiosulfato sería de +2. Por otro lado, el tetrionato tiene cuatro átomos de azufre de los cuales los dos átomos internos se hallan con valencia cero, mientras que de

los átomos de azufre externos unidos a los átomos de oxígenos, uno tendría valencia +4 (tipo sulfito) y el otro valencia +6 (tipo trióxido de azufre), respectivamente. Por otra parte, los átomos de azufre de los polisulfuros presentan un nivel de oxidación de azufre elemental o azufre sulfano (0), con la excepción del átomo de azufre del sulfuro terminal



(-2) (Tabla 1; Suzuki, 1999; Steudel, 2000).

Figura 1. **A**, estructura molecular del azufre octamérico (S_8). Se indica con números los 8 átomos de azufre. **B**, estructura molecular del tiosulfato. Las esferas amarillas representan a los átomos de azufre, mientras que las rojas a los átomos de oxígeno. La flecha indica el átomo de azufre sulfano del tiosulfato.

1. 2. Biolixiviación microbiana.

La recuperación de metales pesados a través del uso de microorganismos se ha desarrollado rápidamente en la última década y está ya establecida como una técnica biotecnológica. La movilización de cationes metálicos desde minerales insolubles por medio de la oxidación biológica es conocida como biolixiviación. Desde el punto de vista económico, constituye un método eficiente y de bajo costo para la recuperación de metales a partir de minerales de baja ley. Actualmente es usado ampliamente en faenas mineras. Por ejemplo, en Chile y Estados Unidos aproximadamente el 18% del cobre

total se recupera mediante biolixiviación, mientras que en Sudáfrica y Australia se está aplicando para incrementar la extracción de oro (Lindström y cols., 1992). El desarrollo de campos como la biología molecular, química analítica y ciencia de superficies (nanobiotecnología), han contribuido a mejorar la comprensión de este bioproceso (Rohwerder y cols., 2003).

En el hábitat en el que ocurre la biolixiviación coexisten metales y/o azufre en distintos estados de oxidación en contacto con el aire, el agua y los microorganismos. En general, los ambientes lixiviantes contienen grandes cantidades de sulfuros metálicos y están sometidos simultáneamente a reacciones de oxidación química y bacteriana. El producto final de la oxidación de los compuestos azufrados es el ácido sulfúrico, el cual disminuye el pH del agua. Cuando se vierten las aguas ácidas de las minas a los ríos y lagos se generan graves problemas de contaminación ambiental. Por esta razón es importante entender el proceso de biolixiviación con el fin de controlar el daño ecológico originado en forma natural o por acción de la actividad humana.

1.2.1. Diversidad de bacterias presentes en los ambientes lixiviantes

Debido a las condiciones extremas de acidez (pH menor a cuatro) y limitados tipos de sustratos disponibles (compuestos inorgánicos de azufre y hierro) presentes en ambientes mineros, se esperaría encontrar una pobre diversidad microbiana en estos lugares. Sin embargo, ahora se conoce la gran diversidad de flora microbiana existente, con al menos 11 divisiones procarióticas (Hallberg y Johnson 2001).

En estos ambientes extremos es muy común encontrar a las clásicas especies mesofílicas como *A. ferrooxidans* y *A. thiooxidans*. También es común encontrar a la especie termofílica moderada *A. caldus*. Otras proteobacterias lixiviantes son especies

del género *Acidiphilium* como el *Ac. Acidophilum* (Hiraishi y cols., 1998), mientras miembros del género *Leptospirillum* son parte de una nueva división bacterial (Coram y Rawlings, 2002). Con respecto a este último genero, se reportó que en determinadas condiciones predomina la bacteria acidófila quimiolitotrófica estricta *L. ferrooxidans* (Rawlings y cols., 1999). Esta bacteria quimiolitotrófica estricta tiene la propiedad de oxidar solamente el ion ferroso (Fe^{2+}) a ion férrico (Fe^{3+}) y utilizarlo como única fuente de energía. Por esta razón en los cultivos puros de *L. ferrooxidans* crecidos en pirita se acumula azufre elemental. Cultivos mixtos de esta bacteria con *A. thiooxidans* oxidan completamente la pirita a sulfato (Schippers y cols., 1999). Estas evidencias demuestran que existe cooperatividad en la disolución de los sulfuros metálicos. Las bacterias lixiviantes gram-positivas corresponden a termófilos moderados, miembros de los géneros *Acidimicrobium*, *Ferromicrobium* y *Sulfobacillus* (Norris y cols., 1996). También existen arqueas extremadamente termofílicas, oxidadoras de azufre y/o hierro (II) incluyendo géneros como *Sulfolobus*, *Acidianus*, *Metallosphaera* y *Sulfurisphaera* (Kurosawa y cols., 1998; Norris y cols., 2000). Sorprendentemente, también se han descubierto recientemente arqueobacterias mesófilas y ácidofilas oxidadoras de hierro (II), tales como las dos especies ahora conocidas como *Ferroplasma acidiphilum* (Golyshina y cols., 2000) y *F. acidarmanus* (Edwards y cols., 2000).

1.2.1.1. El género *Acidithiobacillus*

La existencia del género *Thiobacillus* desde ya hace muchos años estuvo en constante revisión porque lo constituían una gran diversidad de especies con características muy disímiles, cuyos miembros se distribuían en las subclases α , β y γ de

las *Proteobacteria* (Kelly y Harrison., 1989). Sin embargo, la aplicación del análisis filogenético con la secuencia del rRNA 16S y de las técnicas de hibridación DNA-DNA ha permitido clarificar en alguna medida la taxonomía de las especies que conformaban el género *Thiobacillus*. Como resultado de estos análisis Kelly y Wood (2000) reasignaron a *Thiobacillus ferrooxidans* como una especie del nuevo género, *Acidithiobacillus* (*A*).

El género *Acidithiobacillus* comprende a especies bacterianas Gram-negativas de morfología cocobacilar, acidófilas y quimiolitotróficas estrictas (aciditiobacilos) y que según el análisis filogenético con el rRNA 16S pertenece a la subclase γ de las *Proteobacteria* (Kelly y Wood, 2000). La más estudiada por su importancia biotecnológica es *A. ferrooxidans*, y en menor medida *A. thiooxidans* y *A. caldus*. Estas bacterias oxidan azufre, sulfuros metálicos y otros compuestos inorgánicos de azufre reducido como dadores de electrones para su crecimiento quimilitoautotrófico aeróbico o anaeróbico. Solamente la especie *A. ferrooxidans* obtiene energía a partir de la oxidación aeróbica del ion ferroso (Kelly y Wood, 2000). Además es capaz de oxidar hidrógeno molecular, ácido fórmico y otros metales iónicos. El crecimiento anaeróbico de esta especie es posible por la oxidación de compuestos de azufre o hidrógeno acoplado con la reducción de hierro (III) (Pronk y cols., 1992; Ohmura y cols., 2002). Sólo recientemente se ha demostrado que *A. ferrooxidans* reduce azufre elemental en el transcurso de la oxidación anaeróbica del hidrógeno (Ohmura y cols., 2002).

El metabolismo del azufre en *A. ferrooxidans* constituye un área interesante de estudio, no solamente por la capacidad de este microorganismo de oxidar una variedad de compuestos azufrados, sino también porque puede incorporar átomos de azufre del

sulfato a los aminoácidos cisteína y metionina (Fry y Garcia, 1989; Sekowska y cols., 2000). En este sentido, *A. ferrooxidans* posee el potencial y la capacidad de regular simultáneamente la síntesis de enzimas que participan en reacciones químicas diametralmente opuestas. Por un lado, la producción oxidativa del sulfato y en el otro la asimilación reductiva de éste.

El genoma de esta bacteria ha sido secuenciado casi en su totalidad por The Institute for Genomic Research y se halla disponible vía internet en el sitio <http://tigr.org> y por Integrated Genomics (Selkov y cols., 2000). Además se ha intentado desarrollar herramientas genéticas que permitan el análisis mutagénico de este microorganismo, pero con resultados no siempre reproducibles (Cabrejos y cols., 1999; Liu y cols., 2000).

1.2. La oxidación de compuestos inorgánicos de azufre reducido por bacterias

Se ha calculado que los microorganismos pueden obtener hasta 14 moles de electrones de la oxidación del residuo azufrado por mol de sulfuro metálico en comparación al mol de electrones que se obtiene de la oxidación del ión ferroso. Por esta razón la oxidación biológica del azufre es muy importante desde el punto de vista energético para la lixiviación completa de los sulfuros metálicos por *A. ferrooxidans*. Existen en la literatura muchas propuestas sobre las vías involucradas en la oxidación de compuestos inorgánicos de azufre (Kelly, 1988; Pronk, 1990; Kelly y cols., 1997; Friedrich, 1998; Schippers y cols., 1999; Friedrich, 2001, Kappler y cols., 2001). Sin embargo, aún sigue vigente la pregunta de si existen varias vías paralelas o sólo un mecanismo general para la oxidación de compuestos inorgánicos de azufre reducido en

bacterias. Varios modelos propuestos consideran al tiosulfato como uno de los intermediarios claves en la oxidación de los CIAR (Schippers y cols., 1999; Kappler y cols., 2001).

1.3.1. Oxidación del tiosulfato

De acuerdo a la información bioquímica, fisiológica y los recientes datos genómicos disponibles se han postulado al menos tres vías para la oxidación del tiosulfato. En una de las vías el tiosulfato se oxidaría completamente hasta sulfato (Friedrich y cols., 2001), en la segunda el tiosulfato sería oxidado a través del tetrionato como intermediario principal (De Jong y cols., 1997) y en la tercera, el tiosulfato sería hidrolizado a azufre y sulfito. Friedrich y cols., (2001) sostienen que genes *sox* de *Paracoccus pantotrophus* serían esenciales para la oxidación del tiosulfato, siendo este un mecanismo común para la oxidación de los CIAR en las bacterias quimiolitotróficas y fototróficas. Es interesante observar que la mayoría de los genes *sox* se inducen cuando la bacteria crece en tiosulfato (Wodara y cols., 1997; Friedrich y cols., 2000). Este grupo de genes no existe en *A. ferrooxidans* (Ramirez y col., 2004), lo que representaría un interesante problema científico a resolver.

Varios organismos acidófilos pueden utilizar el tiosulfato como única fuente de energía, entre los que destacan *A. caldus*, *A. thiooxidans* y *A. ferrooxidans*. El mecanismo de la oxidación biológica del tiosulfato en estos microorganismos aún es motivo de controversia. Sin embargo, se postula que en la segunda vía el tiosulfato sería

convertido a tetrionato (Figura 2) mediante la enzima tiosulfato deshidrogenasa (TD) (Suzuki, 1999). Esta enzima ha sido parcialmente purificada a partir de tres microorganismos lixiviantes: *A. acidophilum* (Meulenberg y col., 1993), *A. thiooxidans* (Chan y Suzuki, 1994; Nakamura y col., 2001) y *A. ferrooxidans* (Silver y Lundgren, 1968). En *A. ferrooxidans* podría estar compuesta por tres polipéptidos y presentaría una actividad óptima a pH 5 (Visser y col., 1997).

En cuanto a la tercera vía de oxidación del tiosulfato, ésta se iniciaría con la ruptura del enlace S-S del tiosulfato por la enzima tiosulfato azufre transferasa (TST; Figura 2) de acuerdo a la reacción reversible de Suzuki, (Suzuki, 1999). En seguida, el S⁰ sería oxidado por la enzima azufre oxidasa y el SO₃²⁻ por la sulfito oxidoreductasa (Suzuki, 1999).

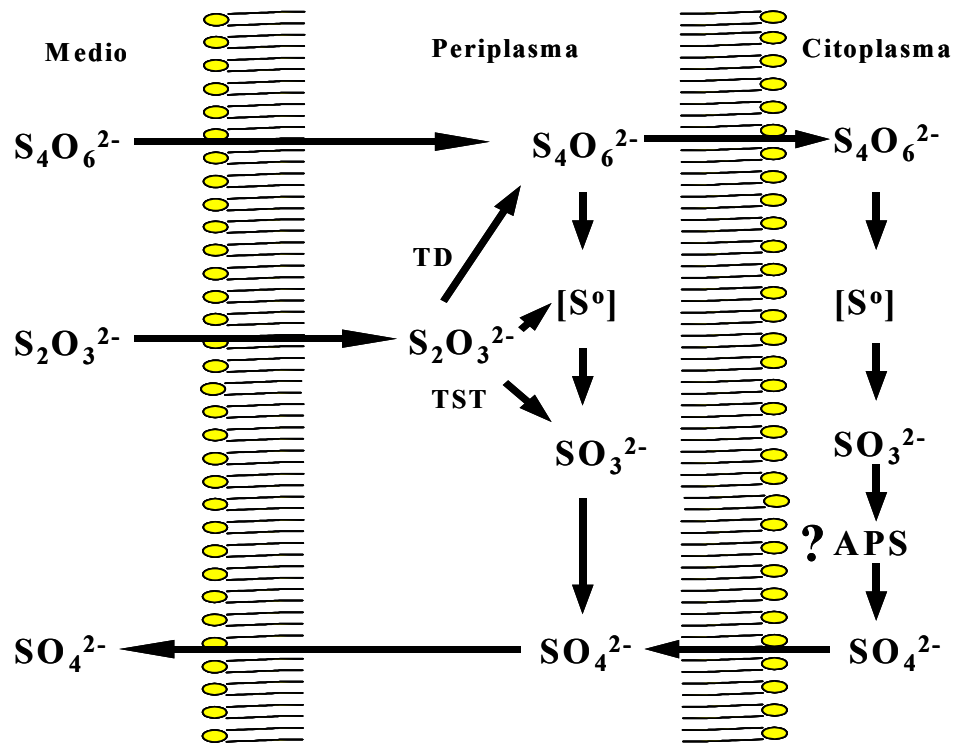


Figura 2. Posible modelo de la oxidación del tiosulfato en tiobacilos aerobios estrictos. El tiosulfato podría ser oxidado vía tetratonato por una tiosulfato deshidrogenasa (TD) o ser hidrolizado a azufre y sulfito por acción de una tiosulfato asufre transferasa (TST). El mecanismo de la oxidación del tetratonato aún es motivo de discusión (Brüser y cols., 2000 modificado)

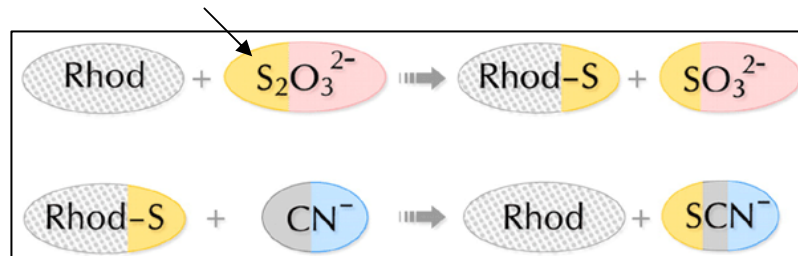


Figura 3. Reacción catalizada por la enzima tiosulfato:cianuro azufre transferasa (Rhod). Se muestra en amarillo el átomo de azufre sulfano transferido.

1.4.2.1. Las azufre transferasas en los seres vivos

Las tiosulfato azufre transferasas (TST) constituyen una superfamilia de proteínas de amplia distribución en los tres dominios de los seres vivos y cataliza la transferencia del átomo de azufre sulfano de una molécula donadora a un aceptor tiofilico. Se consideran como miembros de la superfamilia TST a las tiosulfato:cianuro azufre transferasas (rodanasas, EC 2.8.1.1) (Figura 3) y a las 3-mercaptopiruvato:cianuro azufre transferasas (MPST, EC 2.8.1.2) (Papenbrock y Schmidt, 2000). Estas enzimas están estrechamente relacionadas por el tipo de reacción que catalizan y probablemente por su secuencia primaria de aminoácidos.

La rodanasa mayormente estudiada es la enzima mitocondrial de hígado de bovino, la cual ha sido caracterizada bioquímicamente y su estructura cristalina ya ha sido establecida. La enzima es un monómero de 239 aminoácidos (33 kDa de peso molecular) y consiste de dos dominios rodanasa estructuralmente similares (Ploegman y cols., 1978). Esta característica es interesante en relación a su función y evolución, ya que posiblemente esta proteína se habría originado a partir de una duplicación génica y que los módulos divergieron durante la evolución, pero manteniendo su estructura terciaria. En el dominio C-terminal de esta rodanasa se localiza la cisteína (Cys-247) responsable de la catálisis (Ploegman y cols., 1978). Esta cisteína altamente conservada conjuntamente con los aminoácidos con carga positiva Arg-186 y Lys-249 que participan en la unión del sustrato (Ploegman y cols., 1978) son los residuos más importantes del sitio activo. Esta enzima se halla localizada en las mitocondrias de las

células eucarióticas mientras que proteínas similares a rodanasas como las MPST se localizan en el citosol (Nagahara y cols., 1995). Proteínas homólogas a la rodanasa de bovino se han descrito en *Bacteria*, siendo las más caracterizadas las de *Synechococcus* (Laudenbach y cols., 1991), *Azotobacter vinelandii* (RhodA), (Pagani y cols., 2000; Bordo y col., 2000) y *E. coli* (SseA) (Colnaghi y col., 2001). Por otro lado el secuenciamiento completo de una variedad de genomas ha mostrado la existencia de genes que codifican para azufre transferasas que presentan un único dominio rodanasa en el mismo genoma (Ray y cols., 2000; Spallarossa y cols., 2001). Por ejemplo, en el genoma de *E. coli* en particular existen los genes *sseA* y *ynjE* que codifican para proteínas con dos dominios rodanasas, además de 8 genes, entre ellos *glpE*, *pspE* y *ygaP*, que codifican para proteínas con un sólo dominio rodanasa.

Su función fisiológica aún sigue siendo motivo de controversia, además de su posible participación en el metabolismo del tiosulfato. Otras funciones propuestas incluyen destoxicación de cianuro (Sorbo, 1957), formación de grupos prostéticos en proteínas de hierro-azufre (Pagani y cols., 1984), mantenimiento del pool de azufre (Westley, 1989), metabolismo del selenio (Ogasawara y cols., 2001) y biosíntesis de tiamina (Palenchar y cols., 2000).

1.4.2.2. Las TST en *A. ferrooxidans*

La actividad tiosulfato:cianuro azufre transferasa o rodanasa ha sido detectada en extractos crudos, células enteras (Gardner y Rawlings, 2000) y en una proteína parcialmente purificada a partir de *A. ferrooxidans* (Tabita y cols., 1969). Esta enzima

presenta actividad óptima en el rango de pH 7,5 a 9,0, al igual que otras rodanasas de otros organismos. En vista que existen evidencias que el tiosulfato sería oxidado en el periplasma de la bacteria que posee un pH de 2,5-3,0, esta enzima no estaría directamente involucrada en el metabolismo energético. Una TST periplásmica podría ser la responsable de dicha función. La anotación completa del genoma de *A. ferrooxidans* está ya disponible, lo que permitirá aclarar el número y diversidad de los miembros de esta superfamilia en esta bacteria quimiolitotrófica estricta.

1.5. Expresión de proteínas durante el crecimiento de *A. ferrooxidans*.

Experimentos previos a esta tesis en nuestro laboratorio utilizando la cepa 19859 de *A. ferrooxidans* han detectado varias diferencias el patrón de expresión de proteínas mediante electroforesis bidimensional, en relación a la naturaleza de los sustratos oxidables durante el crecimiento de esta bacteria (Ramírez y cols., 2002, 2004). Algunas de las proteínas que se inducen cuando las células crecen en azufre son similares a proteínas que participan en el metabolismo de compuestos azufrados. Una de las proteínas identificadas es una de 21 kDa (P21) que se induce cuando *A. ferrooxidans* ATCC 19859 crece en pirita, tiosulfato y otros compuestos inorgánicos de azufre reducido. Esta proteína tiene un dominio rodanasa típico de las TST y es exportada al lado periplásmico de la célula vía el sistema Sec (Ramírez y cols., 2002, 2004).

1.6 Búsqueda de genes putativos que codifican para proteínas rodanasas en *A. ferrooxidans* ATCC 23270 mediante métodos bioinformáticos.

En estudios anteriores se ha medido la actividad rodanasa en extractos crudos y en una proteína parcialmente purificada de *A. ferrooxidans* (Tabita y col., 1969; Gardner y Rawlings, 2000). Hace algunos años Ramírez y cols., comprobaron la existencia de actividad rodanasa en extractos crudos de la cepa ATCC 19859 de *A. ferrooxidans* crecidos en ion ferroso, azufre elemental y pirita, concluyendo que esta actividad es independiente del sustrato oxidable (Ramírez y cols., 2002, 2004). Con la finalidad de encontrar la(s) proteína(s) responsable(s) de dicha actividad, se utilizaron herramientas bioinformáticas, identificándose ocho secuencias nucleotídicas con un porcentaje de homología al dominio tipo-rodanasa en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270: *p11*, *p14*, *p14.3*, *p15*, *p16*, *p16.2* (Acosta y cols., 2005; Valenzuela y cols., 2006), y la previamente descrita *p21* (Ramírez y cols., 2002).

1.7 Hipótesis

Algunas(s) de la(s) proteína(s) con dominio rodanasa codificada(s) en el genoma de *A. ferrooxidans* es o son responsable(s) de la actividad azufre transferasa encontrada en los extractos crudos de esta bacteria.

1.8 Objetivos

- 1) Analizar los genes putativos de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 que codifican para proteínas de la familia rodanasa por medio de métodos bioinformáticos.
- 2) Clonar y expresar en *E. coli* los genes que codifican para putativas rodanasas de *A. ferrooxidans*.
- 3) Purificar bajo condiciones nativas una o más rodanasas recombinantes, para posteriormente determinar sus parámetros cinéticos (K_m , V_{max} y pH óptimo).

3. RESULTADOS

3.1 Caracterización de enzimas rodanasas en *A. ferrooxidans* mediante métodos bioinformáticos.

Todos los genes putativos encontrados en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC23270 que posiblemente codifican para proteínas de la familia rodanasa (Acosta y col., 2005), se caracterizaron en relación a sus estructuras primarias y secundarias, sus putativos sustratos, y finalmente se realizó una caracterización de sus entornos genéticos mediante métodos bioinformáticos.

3.1.1 Caracterización de las secuencias de los posibles genes rodanasa de *A. ferrooxidans*.

A seis de las ocho secuencias nucleotídicas encontradas en el genoma de *A. ferrooxidans* con un alto porcentaje de homología al dominio tipo-rodanasa: P11, P14.3, P15, P16, P16.2 y P28, se les realizó un PSI-BLAST dirigido contra una rodanasa previamente caracterizada, la GlpE de *E. coli* (Ray y cols., 2000), para evaluar parámetros como el e-value o el score, los que nos darían cuenta de cuales de estas secuencias tenían una mayor identidad con rodanasas previamente caracterizadas (Tabla 4). La figura 4 muestra un alineamiento parcial de las secuencias aminoacídicas de todas estas posibles proteínas tipo rodanasa con otros dominios rodanasa presentes en proteínas cuya actividad TST o MST ha sido demostrada *in vitro*. Todas estas proteínas muestran similitud, conteniendo los dominios CH2A y CH2B altamente conservados (Fauman y cols., 1998). Además todas poseen un sitio catalítico con una cisteína,

también altamente conservada, típico de las tiosulfato azufre transferasas (Figura 4). Otros dos residuos aminoacídicos, Asp19 y Arg21 (según la numeración usada para GlpE), son conservados en todas estas enzimas y están también presentes en la mayoría de otros dominios rodanasa (Bordo y col., 2000). En todas las estructuras rodanasas estos residuos forman puentes de hidrógenos, una interacción que puede contribuir sustancialmente a la energía libre del dominio tipo rodanasa (Spallarossa y col., 2001) y por tanto a la interacción con el sustrato.

TABLA 4. pBLASTP contra la rodanasa GlpE de *E. coli*, de las secuencias de algunas putativas proteínas tipo rodanasa encontradas en el genoma de *A. ferrooxidans*.

Proteínas tipo-rodanasa	Score blast (bits)	E value blast	% identidad blast	Secuencia aa del sitio activo
P11	72	3,00E-12	38%	CLSGGR
P14.3	51	7,00E-06	32%	CGSGNR
P16	100	2,00E-20	42%	CASGMR
P15	180	1,00E-44	61%	CRSGHR
P16.2	135	4,00E-31	44%	CRTGGR
P28	184	2,00E-45	43%	CYHGNA

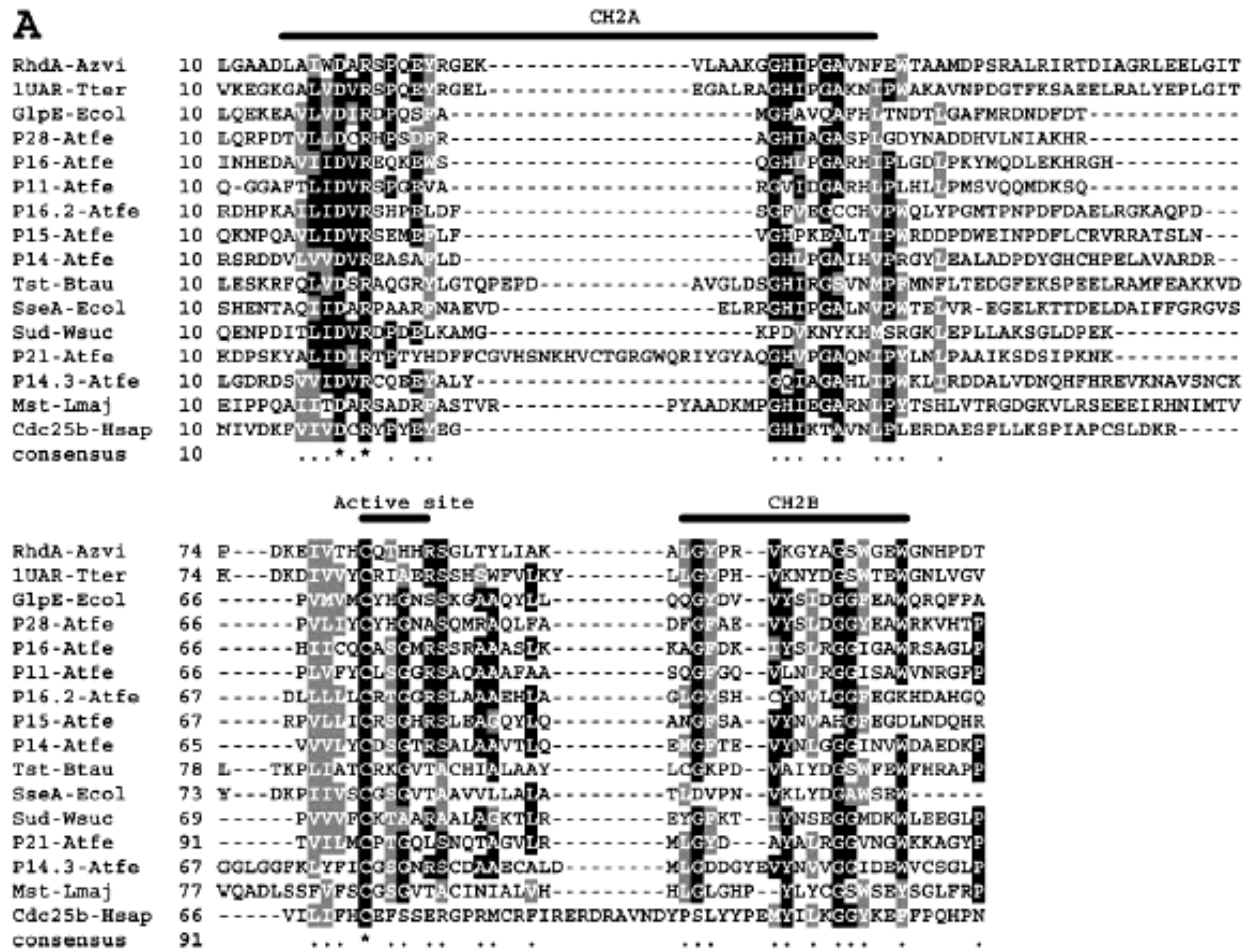


Figura 4. Alineamiento parcial de secuencias aminoacídicas de proteínas tipo rodanasa de *A. ferrooxidans* con rodanasas de estructura ya conocida. El sitio activo y los dos motivos estructurales, designados como CH2A y CH2B, están marcados con líneas negras sobre los alineamientos. RhdA-Azvi, *Azotobacter vinelandii*; 1UAR-Tter, rodanasa de *Thermos thermophilus*; GlpE-Ecol, TST de *E. coli*; Tst-Btau, TST de *Bos taurus*; SseA-Ecol, MST de *E. coli*; Sud-Wsuc, polisulfuro transferasa (PST) de *Wolinella succinogenes*; Mst-Lmaj, MST de *Leishmania major*; Cdc25-Hsap, CdcC25 fosfatasa de *Homo sapiens*; proteínas tipo rodanasa de *A. ferrooxidans* son P11-Atfe, P14-Atfe, P14.3-Atfe, P15-Atfe, P16-Atfe, P16.2-Atfe, P21-Atfe, y P28-Atfe.

3.1.2 Propiedades de las posibles proteínas tipo rodanasa encontradas en el genoma de *A. ferrooxidans*.

En la tabla número 5 se muestran las propiedades encontradas a través de métodos bioinformáticas de las 8 posibles proteínas rodanasas. Las masas moleculares fluctúan entre 11,7 y 29,6 KDa, y los puntos isoeléctricos de las proteínas P11, P16 y P21 son muy básicos, mientras que los puntos isoeléctricos de las otras proteínas tipo rodanasa están entre 4,75 y 6,49. Solamente P16 y P21 muestran dominios transmembrana, lo que sugiere un anclaje a la membrana citoplasmática o una posible ubicación periplásmica. Para el resto de las proteínas se predice una localización citoplasmática. Además se puede destacar que la proteína P28, tiene un dominio adicional del tipo ANK, el cual se sabe estaría encargado de mediar interacciones proteína-proteína (Sedgwick y Smerdon, 1999).

Se conocen al menos dos residuos polares en el lazo del sitio activo de las enzimas TST (Spallarossa y col., 2001). Por otra parte, Bordo y Bork (2002) sugieren utilizar las secuencias conservadas del sitio activo CRxG[R/T] y CG[S/T]GVT para identificar TSTs y MSTs respectivamente. Al analizar las secuencias de las rodanasas de *A. ferrooxidans* con ambos criterios, se obtuvo que las proteínas P15 y P16.2 presentan la secuencia consenso completa para las TSTs, mientras que P16 presenta una secuencia del sitio activo que es intermedio entre los patrones para TST y MST. Las proteínas P11, P14, P14.3 y P21 presentan secuencias medianamente parecidas a secuencia de consenso de las MSTs (Tabla 5).

TABLA 5. Propiedades de las putativas proteínas tipo rodanasa encontradas en el genoma de *A. ferrooxidans* mediante métodos bioinformáticos.

<i>Proteína</i>	<i>Masa molecular (KDa)</i>	<i>Punto isoeléctrico</i>	<i>Dominio transmembrana predicho</i>	<i>Dominios presentes</i>	<i>Loop del sitio activo</i>	<i>Actividad predicha</i>	<i>Localización subcelular predicha</i>
P11	11,7	9,1	No	Rod	CLSGGR	?	Citoplásmica
P14	14,5	4,84	No	Rod	CDSGTR	?	Citoplásmica
P14.3	14,3	4,75	No	Rod	CGSGNR	?	Citoplásmica
P15	15,2	6,18	No	Rod	CRSGHR	TST	Citoplásmica
P16	15,6	9,26	Si	Rod	CASGMR	MST?	Membrana interna
P16.2	16,3	6,49	No	Rod	CRTGGR	TST	Citoplásmica
P21	23,8	9,36	Si	Rod	CPTGQL	MST?	Periplásmica
P28	28,6	5,8	No	Rod + Ank	CYHGNA	TST?	Citoplásmica

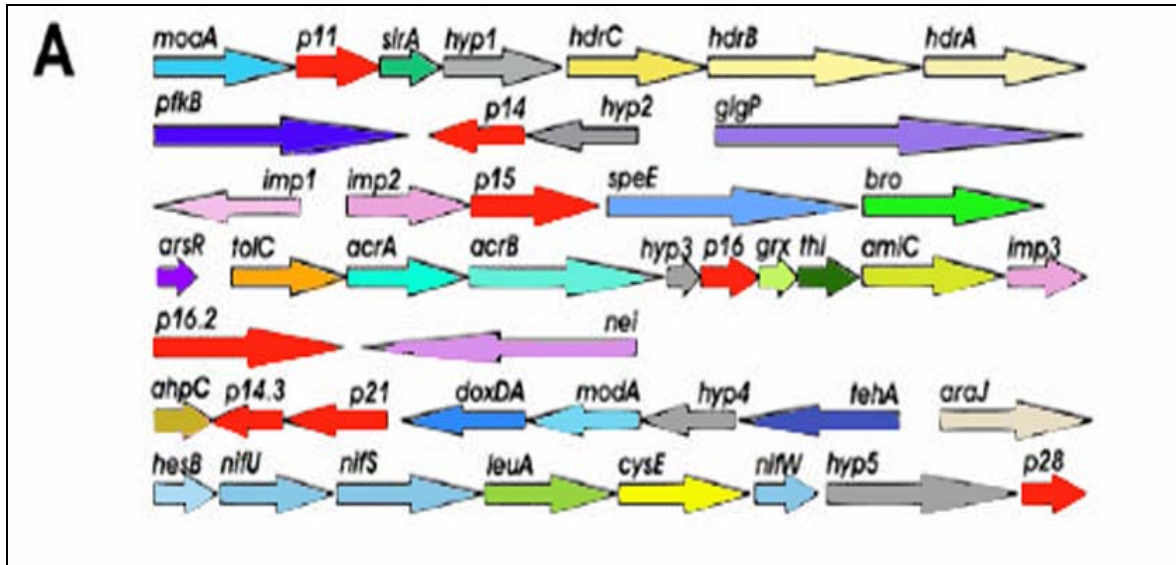


Figura 5. Contextos genómicos de los 8 genes tipo rodanasa presentes en *A. ferrooxidans*. Los nombres y las posibles funciones de cada uno de los putativos genes están descritos en el texto. Los diferentes genes tipo rodanasa se muestran en color rojo.

3.1.3 Contextos genómicos de los genes tipo rodanasa presentes en *A. ferrooxidans*.

El uso de herramientas bioinformáticas para determinar regiones génicas vecinas es una buena aproximación para sugerir las posibles funciones biológicas y los posibles sustratos de la superfamilia de proteínas rodanasa (Spallarossa y cols., 2001).

La figura 5 muestra el análisis realizado al entorno de los genes putativos tipo rodanasa de *A. ferrooxidans*, determinando que sólo p16.2 y posiblemente p15 no formarían parte de un operón, los restantes genes formarían parte de unidades transcripcionales consistentes de por lo menos dos genes.

Río arriba de p11 se encontraría un gen que codificaría una enzima de biosíntesis de un cofactor de molibdeno (*moaA*). Río abajo de p11, cinco ORFs podrían formar un operón formado por una proteína redox reguladora de la formación de puentes disulfuro

(*sirA*), una proteína hipotética conservada (*hyp1*), y tres subunidades de una heterodisulfuro reductasa (*hdrC*, *hdrB*, y *hdrA*). Se sabe que el precursor Z de la molibdenoproteína (MPT) es sintetizada por las proteínas MoaA, MoaB, y MoaC (Hanzelmann y Schindelin, 2004). Con esto se podría especular que posiblemente P11 está involucrado en la biosíntesis del cofactor de molibdeno en *A. ferrooxidans*. Además se ha presentado evidencia fisiológica de una proteína tipo rodanasa que está involucrada en la biosíntesis del cofactor de molibdeno en humanos (Matthies y col., 2004). En algunos microorganismos fototróficos oxidadores de azufre se ha descrito un sistema transportador de sulfuros o polisulfanos desde el periplasma hacia el citoplasma (Pott y Dahl, 1998). Este sistema transportador incluye varios componentes, entre los cuáles se encontraría una heterodisulfuro reductasa en el lado citoplasmático de la membrana. La presencia de al menos tres genes codificantes para subunidades de una putativa heterodisulfuro reductasa en *A. ferrooxidans*, sugiere que podría existir también un sistema similar en este microorganismo.

Río abajo del gen *p14*, se localizó un gen que codifica para una carbohidrato kinasa de la familia PfkB en dirección divergente. Río arriba de *p14*, nosotros encontramos en la misma orientación un ORF hipotético (*hyp2*) correspondiente a una proteína hipotética requerida para el anclaje a células hospederas en otros microorganismos (Acosta y cols., 2005). Este gen putativo es vecino de una putativa carbohidrato fosforilasa (*glgP*) en la dirección opuesta.

El contexto genómico de *p15*, muestra río abajo una putativa espermidina/espermina sintasa (*spE*), una proteína relacionada con el transporte y metabolismo de aminoácidos (Hashimoto y col., 1998). En la misma orientación, se encuentra un ORF codificante para una putativa proteína de unión a ADN de la familia BRO (Bideshi y col., 2003).

Río arriba de *p15*, nosotros encontramos en la misma orientación un putativo gen (*imp2*) y al lado de éste, pero en la dirección opuesta, un putativo gen *imp1*. Ambos genes putativos codificarían para potenciales proteínas integrales de membrana de función desconocida (Acosta y col., 2005).

Río abajo de *p16* y en la misma orientación, encontramos ORFs codificantes para putativas glutaredoxina (*grx*), una tioredoxina (*thi*) (Holmgren, 1989), una *N*-acetilmuramoil-L-alanina amidasa (*amiC*) (Berhardt y De Boer, 2003), y *imp3*, una proteína integral de membrana que puede ser similar a una hemolisina III (Baida y Kuzmin, 1995). Río arriba de *p16*, encontramos tres ORFs (*acrB*, *acrA*, *tolC*), los dos primeros codificantes para bombas de eflujo de cationes y multidrogas implicados en mecanismos de defensa, mientras que TolC es una proteína de eflujo de la membrana externa en bacterias Gram-negativas (Andersen, 2003). Finalmente, un ORF (*arsR*) también perteneciente al contexto de *p16*, codifica para un represor de resistencia arsenical. Esta proteína parece disociarse de ADN en presencia de metales iónicos (San Francisco y cols., 1990). Los putativos genes alrededor de *p16* sugieren fuertemente que éstos podrían formar parte de un sistema de defensa para situaciones de estrés, tales como una alta concentración de metales tóxicos, situación muy común en el hábitat de bacterias biolixiviantes. Por lo tanto, es de esperar que *A. ferrooxidans* posea este mecanismo de detoxificación para sobrevivir en estos ambientes.

El contexto de la putativa proteína tipo rodanasa P16.2, muestra solamente un ORF cercano (*nei*) río abajo y en la dirección opuesta. Esta putativa proteína Nei es una formamidopirimidina-ADN glicosilasa, posiblemente involucrada con la replicación, recombinación y reparación del ADN (Zhang y col., 2000).

En el contexto de *p21*, se dedujeron varios putativos ORFs relacionados con el

metabolismo del azufre (Ramirez y cols., 2002, 2004): río abajo de *p21* se encontró una proteína que contiene un putativo dominio tipo rodanasa y un putativo gen *ahpC*, que codifica para una proteína de la familia AhpC-TSA. Esta familia contiene proteínas relacionadas a una alquil hidroperóxido reductasa (AhpC) y antioxidante tiol-específica (TSA) (Chae y cols., 1994). Río arriba de *p21* se encontraron varios ORFs en la misma dirección aparentemente formando un cluster: *doxDA*, codificante para una quinol oxidasa terminal presente en la membrana plasmática de *Acidianus ambivalens* (Muller y cols., 2004); *modA*, codificante para un putativo sistema de transporte periplásmico de molibdato; *hyp4*, una proteína desconocida y *tehA*, un putativo transportador de C4-dicarboxilato (Janaush y col., 2002). Finalmente, *araJ*, una permeasa de eflujo de arabinosa (Reeder y Schleif, 1991), orientada en dirección contraria al cluster de *p21*.

Por último, el gen *p28* estaría ubicado al final de un posible cluster, compuesto por los siguientes ORFs: *hesB* (también conocido como *iscN*), el cual podría estar involucrado en la fijación de nitrógeno, ya que este gen sólo se expresa en condiciones donde se fija nitrógeno (Dombrecht y col., 2002), *nifU* (también conocido como *iscU*), y *nifS* (*iscS*). Las proteínas NifS y NifU de *Azotobacter vinelandii* son requeridas para la activación completa de una nitrogenasa (Yuvaniyama y cols., 2000; Frazzon y cols., 2002). NifS es una cisteína desulfurasa que provee el azufre inorgánico necesario para la formación de los centros Fe-S contenidos dentro de las proteínas que componen la nitrogenasa. Se ha sugerido que NifU complementaría la función de NifS, en la formación de los centros de Fe-S (Yuvaniyama y cols., 2000). Ya que estos dos genes se encuentran en organismos no fijadores de nitrógeno, sería posible que NifU provea de un mecanismo general de maduración de centros Fe-S contenidos en las proteínas (Acosta y cols., 2005). En este cluster también se encuentra *leuA* que codifica para una

isopropilmalato/homocitrato/citramalato sintasa, una proteína relacionada con el transporte y metabolismo de aminoácidos; *cysE* (*nifV*), un putativo gen codificante para una serina acetiltransferasa (Evans y col., 1991); *nifW*, un gen codificante para una putativa proteína fijadora de nitrógeno, la cual podría ser una proteína accesoria para la actividad nitrogenasa. Por lo tanto, el contexto genómico de la proteína tipo rodanasa P28 apoyaría uno de los roles fisiológicos que han sido propuestos para las rodanasas: participación en la biosíntesis y/o reconstitución de centros de hierro azufre (Pagani y cols., 1984). Es conocido también que algunas cepas de *A. ferrooxidans* son capaces de fijar nitrógeno (Mackintosh, 1978). Recientemente, un trabajo teórico basado en un análisis del genoma de *A. ferrooxidans*, propone un esquema especulativo para la asimilación de azufre y su conexión con la fijación de nitrógeno y formación de centros de hierro azufre (Valdes y cols., 2003). En este esquema, los autores encontraron en el genoma tres copias de “clusters” involucrados en la fijación de nitrógeno. Uno de estos corresponde al contexto genómico del cual forma parte P28, aunque Valdes y cols. (2003) no reportan la presencia de este gen tipo rodanasa.

3.2 Clonamiento, expresión y análisis de la actividad tiosulfato azufre transferasa de las proteínas recombinantes.

La tecnología de ADN recombinante es una metodología muy usada en tiempos actuales, la cual permite la producción de proteínas heterólogas en hospederos microbianos. El sistema de expresión más usado actualmente es el de *Escherichia coli*, el cual tiene la ventaja de una producción rápida y a gran escala de proteínas

recombinantes, permitiendo identificar sus funciones biológicas y/o un posible uso industrial (Rudolph y cols., 1998).

Con la finalidad de encontrar cual o cuales proteínas son responsables de la actividad rodanasa encontrada en *A. ferrooxidans* (Tabita y cols., 1969; Ramírez y cols., 2002), nosotros aprovechamos las ventajas de la tecnología recombinante, clonando y expresando en *E. coli* los genes que codificarían las putativas tiosulfato azufre transferasas, previamente identificadas mediante métodos bioinformáticos en el genoma de *A. ferrooxidans* (Esta tesis y Acosta y cols., 2005).

3.2.1 Clonamiento de los genes *p11*, *p14*, *p15*, *p16*, *p16.2* y *p28* de *A. ferrooxidans* ATCC 23270 en el sistema de expresión TOPO.

Los fragmentos amplificados de PCR de 6 genes tipo rodanasa (*p11*, *p14*, *p15*, *p16*, *p16.2* y *p28*) se clonaron directamente en el plasmidio pCRT7/NT-TOPO (Invitrogen®). Los productos obtenidos se usaron para transformar *E. coli* DH5- α . Los clones recombinantes se analizaron usando PCR de colonias y los correspondientes plasmidios con sus insertos en la orientación correcta se purificaron y usaron para transformar *E. coli* BL21 (DE3) para la expresión de las proteínas tipo-rodanasa de *A. ferrooxidans*. Los clones fueron seleccionados sobre medio LB sólido suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g/ml}$).

El análisis de la inducción/expresión de los genes tipo rodanasa, se realizó en presencia y ausencia de 1 mM de IPTG, el cual fue añadido cuando la $\text{DO}_{600 \text{ nm}}$ de los cultivos alcanzaron un rango de 0,4-0,5 de absorbancia. La expresión de algunos de los genes tipo rodanasa se analizó mediante electroforesis en poliacrilamida-SDS de

extractos totales de células (Figura 6). Se encontró que la inducción es independiente de IPTG, probablemente por un problema en el promotor del vector de expresión TOPO. Como control negativo de la expresión se utilizó una cepa de *E. coli* transformada con un vector TOPO sin inserto.

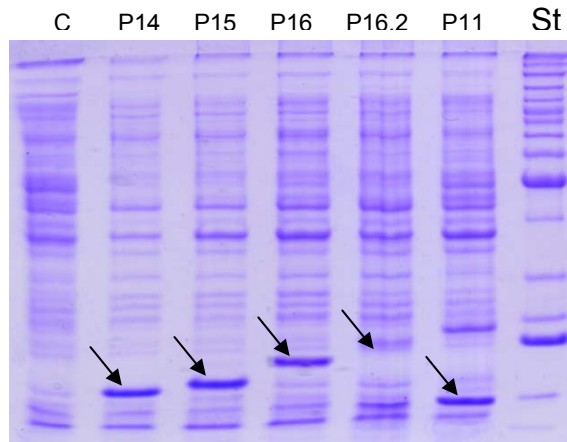


Figura 6. Sobreexpresión *in vivo* de los genes *p11*, *p14*, *p15*, *p16* y *p16.2* en *E. coli*. Las cepas de *E. coli* BL21(DE3) que llevan el vector TOPO-NT con los genes tipo rodanasa *p11*, *p14*, *p15*, *p16* y *p16.2* y el vector TOPO-NT sin inserto como control (C), se crecieron hasta una DO = 0,5. Estas se indujeron con 1 mM IPTG por 2 h. Las muestras de proteínas totales se separaron mediante electroforesis de poliacrilamida-SDS al 12,5% y se tiñeron con azul de Comassie. Las flechas indican la posición de migración de las putativas proteínas tipo rodanasa. St: estandar de PM.

3.2.2 Determinación de la actividad tiosulfato azufre transferasa en extractos libres de células de *A. ferrooxidans* y cepas recombinantes de *E. coli*.

En la tabla 6, mostramos la actividad TST medida *in vitro* por la transferencia del azufre sulfano desde el tiosulfato al cianuro usando extractos libres de células de *A. ferrooxidans* y de los transformantes de *E. coli*. Los valores de actividad TST obtenidos de extractos celulares de *A. ferrooxidans* en nuestras condiciones están en el rango reportado por Tabita y col. (1969) para este microorganismo (0,250 moles SCN⁻/min/mg de proteína).

Los extractos sonicados de cepas de *E. coli* que sobreexpresan los genes p15 y p16.2, muestran valores altos de actividad TST (1,45 y 3 U/mg de proteína, respectivamente). Estos valores son 5 y 10 veces más altos comparados con la cepa control. Aunque la actividad TST observada fue menos que la observada para la cepa de *E. coli* que sobreexpresa la proteína GlpE (Ray y col., 2000), estos resultados indican claramente que los genes p15 y p16.2 codifican para proteínas funcionales con actividad TST. Aún más, estas proteínas podrían ser las responsables de la actividad rodanasa encontrada en extractos crudos de *A. ferrooxidans* crecido en tiosulfato (Tabla 6). Los extractos celulares que contienen las proteínas P14 y P16, mostraron bajos valores de actividad TST. No encontramos actividad TST *in vitro* para la proteína tipo rodanasa P21, anteriormente descrita por Ramírez y cols., (2002).

Por lo tanto, *A. ferrooxidans* tiene al menos dos proteínas tipo rodanasa con actividad TST. Estos resultados concuerdan con la predicción hecha en la tabla 2, basada en el “loop” de aminoácidos del sitio activo de estas dos proteínas TSTs.

Tabla 6. Actividad TST en extractos libres de células de *A. ferrooxidans* y cepas recombinantes de *E. coli* que sobreexpresan algunas de las proteínas tipo rodanasa de *A. ferrooxidans* *

Extracto crudo de	Actividad TST (U/mg proteína)
<i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 crecido en tiosulfato	0,32 ± 0,12
<i>E. coli</i> expresando <i>p15</i>	1,45 ± 0,072
<i>E. coli</i> expresando <i>p16</i>	0,57 ± 0,184
<i>E. coli</i> expresando <i>p16.2</i>	3,03 ± 0,185
<i>E. coli</i> expresando <i>p14</i>	0,43 ± 0,134
<i>E. coli</i> expresando el plasmidio sin inserto (control)	0,28 ± 0,024
<i>E. coli</i> expresando <i>glpE</i>	11,89 ± 0,231

* Una unidad de actividad es la cantidad de enzima generadora de 1 μmol de SCN/min.

3.3 Purificación y caracterización bioquímica preliminar de la proteína recombinante TST P15.

Se determinó que P15 y P16.2 tenían un alto valor de actividad TST, por lo que probablemente son las responsables de la actividad rodanasa encontrada en extractos crudos de este microorganismo.

Previo a purificar una de las dos proteínas TST encontradas, decidimos realizar un análisis de la inducción de éstas, para determinar si se expresa en forma soluble o insoluble, ya que de ser de soluble una de estas proteínas, nos permitiría purificarla en condiciones nativas.

La proteína recombinante P15r, a diferencia de la proteína P16.2r, presenta una clara inducción/expresión, según análisis mediante electroforesis en poli(acrilamida)-SDS. Después de realizar un western-blot a las proteínas P15r y P16.2r, se podía apreciar que ambas tenían una expresión adecuada (Figura 7).

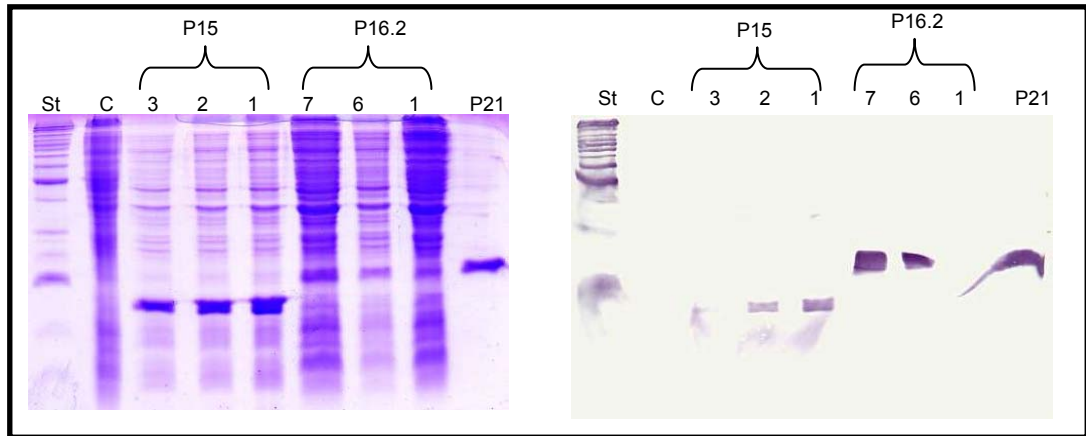


Figura 7. Sobreexpresión *in vivo* de los genes *p15* y *p16.2* en *E. coli* analizada por electroforesis y western-blott. Distintos clones de las cepas que llevan el vector con el gen *p15* (3, 2, 1), con el gen *p16.2* (7, 6, 1), más la cepa que lleva el vector sin inserto (C), se crecieron hasta una DO = 0,5. Se indujeron 2 horas con 1 mM de IPTG. Muestras de proteínas totales se separaron por electroforesis y posteriormente se sometieron a un western-blot con un anticuerpo monoclonal anti-His. Como control positivo de la hibridización se usó la proteína P21 pura.

Sin embargo, posteriormente determinamos que la proteína P16.2r sólo se expresa en forma insoluble (datos no mostrados). En cambio una cantidad apreciable de la proteína P15r (Figura 8), a pesar de estar mayormente en la fracción insoluble, se expresa en forma soluble, por lo que decidimos purificar a esta última proteína.

3.3.1 Búsqueda de las condiciones ideales de inducción y solubilidad de la proteína recombinante P15.

Las enzimas producidas a través de la tecnología recombinante deben estar en su conformación nativa y activa para poder medir sus actividades biológicas. Por lo tanto, las proteínas contenidas en cuerpos de inclusión tienen que ser solubilizadas y renaturadas (Arakawa y col., 2003). La solubilización y replegamiento de estos agregados es un proceso muy complejo y delicado. La primera etapa de este proceso es la solubilización de los cuerpos de inclusión por medio de agentes caotrópicos como la

urea. Luego se realiza la remoción por diálisis o dilución del agente solubilizante. A continuación ocurre la renaturación propiamente tal, la cual incluye varias metodologías tales como el uso de aditivos pequeños o el uso de chaperonas, con resultados que pocas veces son óptimos.

Dada la complejidad y el costo que significa trabajar con cuerpos de inclusión, analizamos las condiciones ideales de expresión e inducción de la proteína recombinante tipo rodanasa P15r, para ver si obteníamos una cantidad adecuada de proteína soluble, con pretensiones de purificarla en condiciones nativas.

La figura 8 muestra el análisis de inducción/solubilidad junto con la medición de actividad TST de los extractos celulares solubles de la proteína recombinante P15. Se puede apreciar que en todas las condiciones de inducción la mayor cantidad de sobreexpresión corresponde a la fracción insoluble de la proteína P15r y que la inducción es independiente de IPTG. Sin embargo en las condiciones: 1) IPTG (1mM) a 37°C durante 2 horas de inducción; y 2) IPTG (1mM) a 30°C durante 4 horas de inducción, muestran una cantidad suficiente de proteína P15r soluble para poder purificarla bajo condiciones nativas en columnas de afinidad Ni-NTA. Además en estas dos condiciones, se obtuvo la mayor actividad específica TST (U) medida en los extractos celulares solubles de la cepa recombinante de *E. coli* que sobreexpresa la proteína tipo rodanasa P15 (Figura 8, parte inferior).

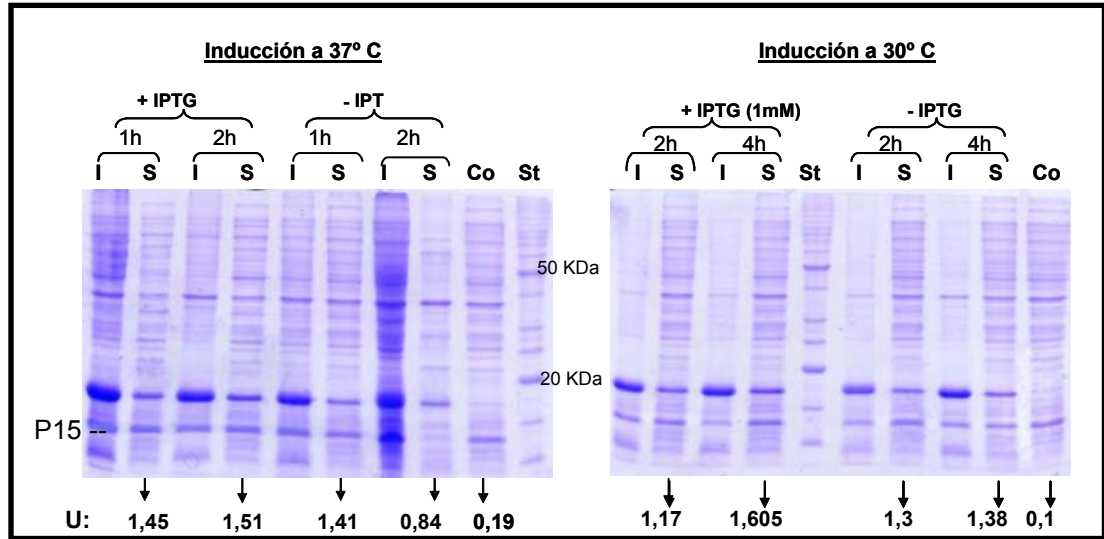


Figura 8. Análisis de la sobreexpresión del gen *p15* en *E. coli*, en distintas condiciones de inducción. La cepa de *E. coli* que lleva el vector con el gen *p15* y la cepa control que lleva el vector sin inserto (Co), se crecieron hasta alcanzar una DO = 0,5. A continuación se crecieron a 37 °C y 30 °C, 1, 2 ó 4 horas (1h, 2h ó 4h) en presencia (+) o ausencia (-) de 1 mM IPTG. Muestras de las fracciones insolubles y solubles (I y S) se separaron mediante electroforesis de poliacrilamida-SDS al 15% y se tiñeron con azul de Comassie. St: estándar de peso molecular. En la parte inferior de la figura se muestra la actividad específica TST (U) medida en los extractos solubles de las distintas condiciones de inducción.

Por lo tanto, para purificar la proteína P15r en condiciones nativas se hizo un cultivo de 2 L de la cepa recombinante de *E. coli* crecido hasta una DO = 0,5 y se indujo por 2 h con 1mM de IPTG.

3.3.2 Purificación de la proteína tipo rodanasa P15r en condiciones nativas.

El próximo objetivo de esta tesis, consistió en purificar la proteína recombinante tipo rodanasa P15 del microorganismo *A. ferrooxidans*.

La inducción con IPTG de *E. coli* BL21(DE3) (TOPOp15) resulta en la sobreexpresión de una proteína de aproximadamente 15-KDa, consistente con la masa

molecular predicha para la proteína tipo rodanasa P15 (Figura 9, carril 2). La proteína sobreexpresada se encontró mayormente en la fracción insoluble (dato no mostrado), aunque también se detectó en menor grado en la fracción soluble (Figura 9, carril 3). A partir de la fracción soluble, la proteína sobreexpresada se purificó a homogeneidad por cromatografía de afinidad de un paso simple en una columna de Níquel-NTA bajo condiciones nativas (Figura 9, carril 4). La proteína P15r eluyó con entre 300 y 400 mM de imidazol, con un rendimiento de 8 mg de proteína pura por litro de cultivo.

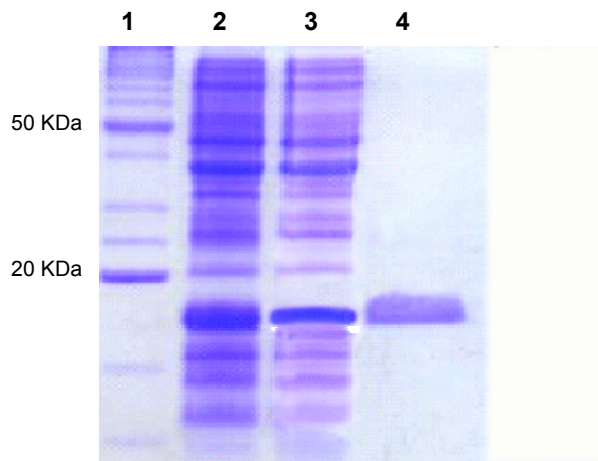


Figura 9. Expresión y purificación bajo condiciones nativas de la rodanasa recombinante P15r en *E coli*. La cepa de *E. coli* que contiene el gen p15 se indujo con 1 mM IPTG. Las proteínas totales (carril 2) y la fracción soluble (carril 3), la proteína P15r purificada (carril 4) y los estándares de peso molecular (carril 1), se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida y se tiñeron con azul de Coomassie.

3.3.3 Propiedades catalíticas de la proteína P15r producida en células de *E. coli*.

Para profundizar nuestro estudio, decidimos determinar algunos parámetros cinéticos de la enzima P15r purificada, tales como K_m y V_{max} . Estos resultados nos permitirían comparar esta rodanasa de *A. ferrooxidans*, con otras rodanasas ya caracterizadas y también darnos pistas acerca del posible rol que cumple esta enzima en el metabolismo quimiolitotrófico de esta bacteria acidófila.

En primera instancia determinamos el efecto del pH en la actividad TST de la enzima P15r, de esta forma todos los experimentos posteriores se realizarían alrededor del pH óptimo de esta enzima. La figura 9 muestra que el pH óptimo de la enzima P15r está entre los pH 8,5 y 9, concordando con lo que ha sido reportado para otras rodanasas citoplasmáticas (Bordo y cols., 2000).

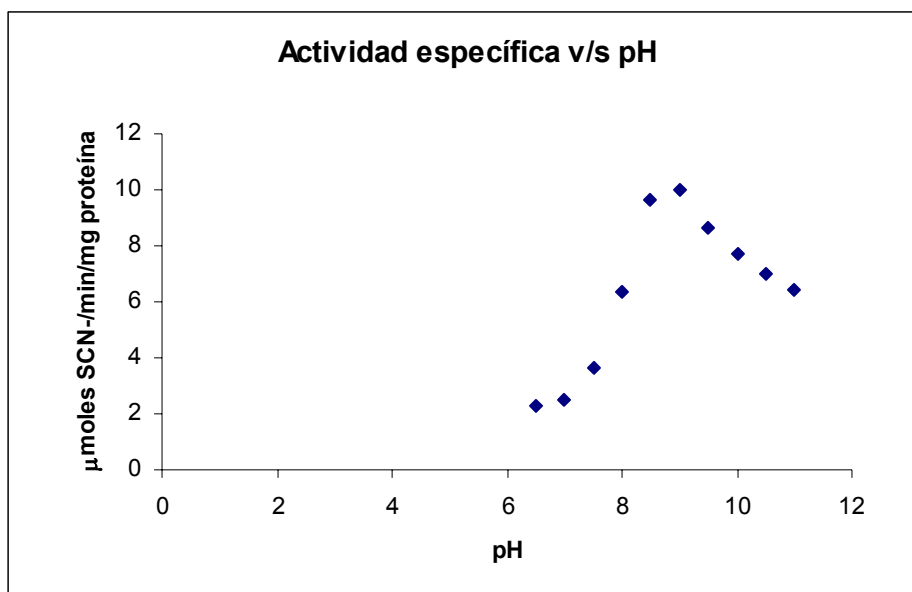
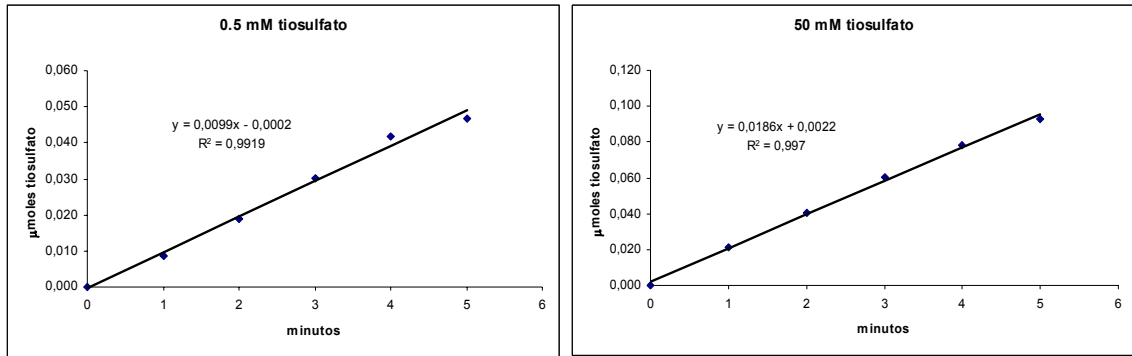


Figura 9. Efecto del pH sobre la actividad específica TST de la enzima P15r. Las actividades enzimáticas se efectuaron en tampón Tris-HCl 50 mM (pH 6,5-9,5). Mientras que entre los pH 10-11 se utilizó el buffer Caps 50 mM.

Debido a que la proteína P15 no había sido caracterizada previamente, para determinar un rango de concentración de sustratos adecuado para la determinación de los parámetros cinéticos K_m y V_{max} , se recurrió al método de Cornish-Bowden, el cual permite determinar una K_m preliminar a partir de dos concentraciones equidistantes de los sustratos tiosulfato o cianuro (Cornish-Bowden, 1975). A partir de la K_m preliminar encontrada, se escoge un rango de concentración de sustratos adecuado para determinar los parámetros cinéticos definitivos para los dos sustratos de la enzima P15r.

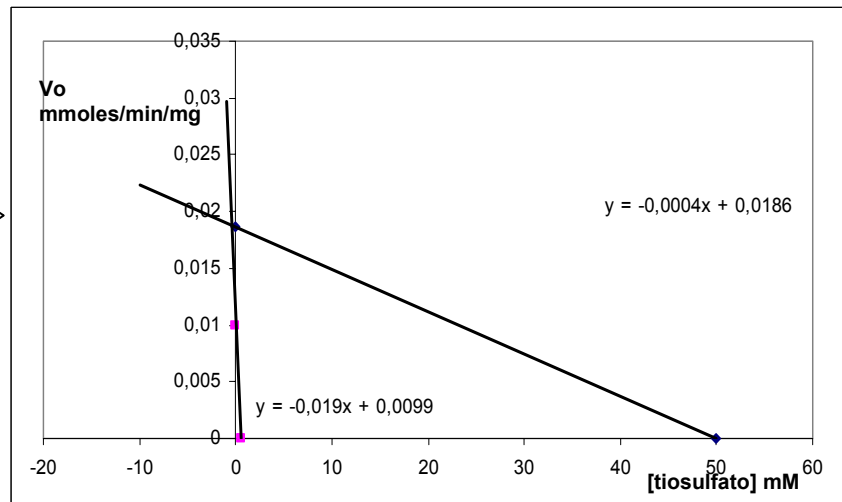
La figura 11 muestra la determinación de la K_m preliminar para el tiosulfato de la proteína rodanasa P15r a través del método del gráfico directo y lineal de Cornish-Bowden (Cornish-Bowden, 1975). Primero se tomaron dos concentraciones del sustrato tiosulfato, 0,5 mM y 50 mM. Se realiza un ensayo cinético con cada concentración dando como resultado una determinada pendiente, que corresponde a la velocidad inicial (V_o) de cada concentración (Figura 11 A). Posteriormente se grafican las velocidades iniciales obtenidas, con sus respectivas concentraciones, donde la intersección de estas dos rectas determinará la K_m preliminar para este sustrato (Figura 11 B).

A



B

[tiosulfato] mM	V _o
0	0
0,5	0,0099
50	0,0186



1) $V_1 = -0,0004x + 0,0186$

2) $V_2 = -0,019x + 0,0099$ $x = -0,467 \rightarrow K_m \text{ preliminar tiosulfato} = 0,5 \text{ mM.}$

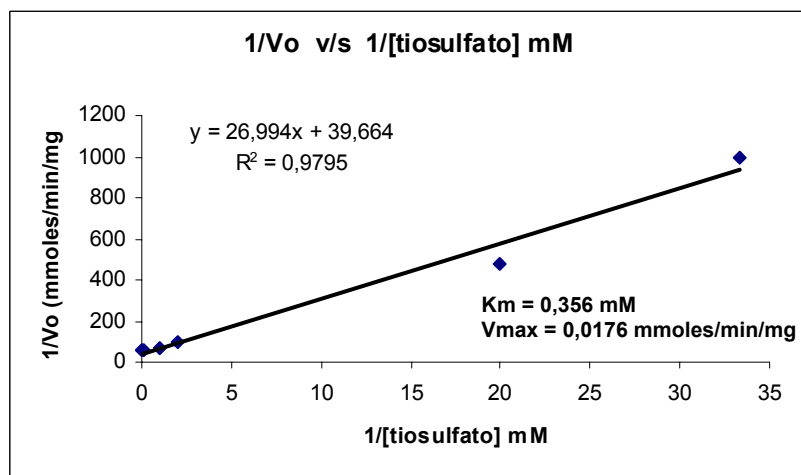
Figura 11. Determinación de la Km preliminar para el tiosulfato de la enzima rodanasa P15r por medio del método de Cornish-Bowden. A) Curvas de progreso a las dos concentraciones de tiosulfato indicadas; B) Gráfico de las pendientes (velocidades iniciales) obtenidas en A para determinar el valor de la Km preliminar para el sustrato tiosulfato.

Para el otro sustrato, cianuro, se repitió el procedimiento anterior, determinando una Km preliminar para este sustrato igual a 9 mM.

Una vez determinada la K_m preliminar para los sustratos tiosulfato y cianuro de la enzima rodanasa P15r, se procedió a determinar las curvas cinéticas con un rango de sustratos alrededor de las K_m preliminares, para así determinar las constantes cinéticas definitivas para estos dos sustratos.

La reacción de transferencia del azufre-sulfano catalizada por la enzima rodanasa P15r, muestra una cinética simple de Michaelis-Menten. Los valores de K_m para la unión de cianuro y tiosulfato a la rodanasa P15r, son de 6,4 mM y 0,356 mM respectivamente. Los valores de V_{max} son de 0,025 mmoles/min/mg para el cianuro y 0,0176 mmoles/min/mg para el tiosulfato (Figura 12).

A



B

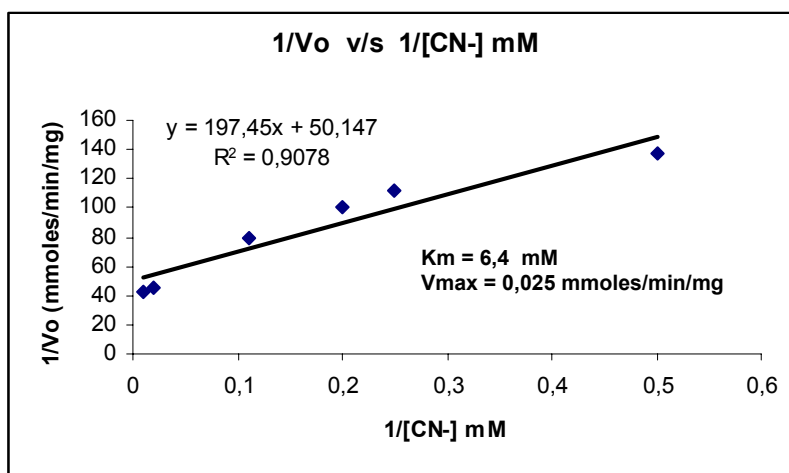


Figura 12. Propiedades cinéticas de la proteína rodanasa P15r. Efecto de la concentración de tiosulfato (A) y cianuro (B) sobre la velocidad inicial (V_i), para la reacción de transferencia del azufre-sulfano catalizada por la proteína rodanasa P15r a pH 8,5 y 30 °C.

DISCUSIÓN

Considerando al tiosulfato como uno de los intermediarios más importantes de la oxidación de los CIARs, la comprensión de sus vías de oxidación y de sus componentes genéticos y moleculares resultan de sumo interés para entender la naturaleza quimiolitotrófica y acidófila de *A. ferrooxidans*. En este sentido el aporte de diversos estudios sobre la oxidación del tiosulfato a través del sistema Sox presente en algunos tiobacilos neutrófilos y en bacterias fototróficas ha significado una importante contribución (Friedrich y cols., 2001; Kappler y cols., 2001). Sin embargo hasta la actualidad el sistema Sox no ha sido hallado en *A. ferrooxidans*, por lo que hace presumir que la oxidación del tiosulfato sería distinta en este microorganismo.

En este contexto es posible que las proteínas pertenecientes a la superfamilia de las tiosulfato azufre transferasas puedan cumplir un rol vital en el metabolismo del tiosulfato en *A. ferrooxidans*. Recientemente se ha determinado que esta familia de enzimas está ampliamente distribuida en el dominio bacteria y que múltiples genes ortólogos de rodanasa pueden estar codificados en el mismo genoma (Cipollone y cols., 2004; Koonin, 2000; Bordo y Bork, 2002). En esta tesis encontramos ocho genes tipo rodanasa en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. El mismo número de ORFs codificantes para proteínas que consisten o contienen un dominio rodanasa han sido identificados en el genoma de *E. coli* K-12 (Spallarossa y cols., 2001). Tal como mencionan estos autores, la variabilidad de aminoácidos observada en el “loop” del sitio activo de todos los homólogos identificados sugiere una diversificación de la especificidad del sustrato, influyendo en actividades enzimáticas relacionadas con la formación, interconversión y transporte de compuestos que contienen átomos de azufre

sulfano. En *E. coli*, por ejemplo, además de las TSTs GlpE y PspE, y la MST SseA, se ha descrito una proteína ThiI, la cual contiene un dominio tipo rodanasa C-terminal fusionado a un dominio N-terminal que está involucrado en la biosíntesis del anillo tiazol de la tiamina y la 4-tiouridina de tRNAs (Wolfe y cols., 2004). Además una de las ocho azufretransferasas de *E. coli* es una proteína YbbB, la que es una tRNA 2-selenouridina sintasa dependiente de selenofosfato (Wolfe y cols., 2004). No se ha encontrado proteínas con similitud a estas azufretransferasas de *E. coli* en el genoma de *A. ferrooxidans*, siendo posible que proteínas con estas funciones no estén presentes en este microorganismo acidófilo (Acosta y cols., 2005). Los ocho genes que codifican para proteínas tipo rodanasa descritos en esta tesis, serían parte de la ubicua superfamilia de proteínas rodanasa, pudiendo tener roles importantes en la adquisición y metabolismo del azufre por *A. ferrooxidans*. La existencia en *A. ferrooxidans* de una proteína exportable P21 similar a una TST, la cual es regulada dependiendo de el sustrato oxidable, es muy interesante, considerando que la oxidación de pirita genera tiosulfato como uno de los principales intermediarios (Schippers y Sand, 1999). Sin embargo, no se detectó actividad rodanasa *in vitro* para la versión recombinante de la proteína P21 (Ramírez y cols., 2002), lo que nos indicaría que no es una enzima rodanasa periplásmica, sino que probablemente formaría parte de un complejo encargado de la oxidación de tiosulfato, distinto al complejo Sox previamente descrito (Friedrich, 1998).

Estudios hechos sobre una pequeña proteína tipo rodanasa de *Wolinella succinogenes*, muestran que esta actúa como una sulfuro deshidrogenasa periplásmica (Sud) que utiliza la misma cisteína catalítica para tanto la transferencia aniónica como para la actividad hidrolasa (Kreis-Kleinschmidt y cols., 1995). Esto sugiere una posible función redox para esta proteína tipo rodanasa, similar a funciones efectuadas por

proteínas tioredoxinas. Esto es apoyado por la presencia en el extremo C-terminal de P21, de un motivo cisteína Cys-XX-Trp-XX-Cys, el cual tiene la propiedad de unirse a centros de hierro-azufre en complejos transportadores de electrones (Berks y cols., 1995). Es posible que P21 de *A. ferrooxidans* tenga una actividad redox ditiol-disulfuro análoga a la proteína Sud de *W. succinogenes*. La proteína tipo rodanasa P14 de *A. ferrooxidans* muestra alta similitud a la proteína Sud, teniendo un motivo polisulfuro azufre transferasa más que uno tiosulfato azufre transferasa. Sin embargo P14 no posee péptido señal sec, lo que indicaría que no es una proteína periplásmica como Sud, por lo que no se sabe que rol puede cumplir en *A. ferrooxidans*.

Aunque en esta tesis no medimos la expresión de todas las proteínas tipo rodanasa de *A. ferrooxidans*, algunas de ellas como P15 y P16.2 claramente presentan actividad TST, la que podría ser constitutiva, tal como ha sido reportado para otras rodanasas citoplasmáticas (Chandra y Friedrich, 1986; Friedrich, 1998). Estas actividades se expresan a niveles similares en células crecidas en hierro ferroso o compuestos de azufre, pues extractos libres de células obtenidas a partir de estas dos condiciones muestran valores similares de actividad TST *in vitro* (datos no mostrados).

Tabita y cols., (1969) reportaron la purificación parcial de una rodanasa de *A. ferrooxidans*. Recientemente, Gardner y Rawlings detectaron actividad tiosulfato:cianuro azufre transferasa en células enteras y extractos crudos libres de células de *A. ferrooxidans*, *A. thiooxidans*, y *A. caldus* en tanto que esta actividad se halla ausente en *L. ferrooxidans*, un microorganismo que es capaz solamente de oxidar ion ferroso o el hierro presente en la piritita, pero no el ion sulfuro de este mineral. (Schippers y Sand, 1999; Sand y cols., 2001). Estos resultados apoyan la idea que las rodanasas estarían involucradas en la oxidación del azufre *in vivo* en estos

microorganismos acidófilos. Más aún, la actividad TST detectada en extractos libres de células de *A. ferroxidans* (Gardner y Rawlings, 2000; Tabita y cols., 1969), puede deberse a las proteínas P15 y P16.2 descritas en esta tesis.

Una vez determinada cual de las proteínas recombinantes presenta actividad TST, decidimos purificar a la proteína tipo rodanasa P15. Sin embargo, la sobreexpresión de esta proteína heteróloga usando como sistema de expresión a *E. coli*, producía cuerpos de inclusión, problema muy común de la tecnología recombinante. La gran dificultad y complejidad que presenta la renaturación de proteínas a partir de cuerpos de inclusión es un proceso que está bien documentado (Arakawa y cols., 2003; Rudolph y cols., 1998). Se sabe que el incremento en la concentración de polipéptidos no nativos debido al alto nivel expresión es responsable de la agregación de la proteína recombinante. Entonces, mientras las proteínas recombinantes se agregan cuando *E. coli* se cultiva a 37 °C, la reducción de la temperatura de cultivo puede incrementar la cantidad de proteína recombinante en su estructura nativa, debido al decrecimiento en la tasa de síntesis proteica (Rudolph y cols., 1998). Nosotros aplicamos este principio al analizar las condiciones de inducción de la proteína P15r a 30 y 37 °C (Figura 7), determinando que con 2 h de inducción a 37 °C se obtenía cierta cantidad de proteína soluble, la que extrapolada a 2 litros de cultivo de la cepa de *E. coli* recombinante, nos producía una cantidad suficiente de proteína sobreexpresada soluble para purificarla por cromatografía de afinidad bajo condiciones nativas, evitando el uso de complejas técnicas de renaturación.

Purificamos la proteína P15r por cromatografía de afinidad de un simple paso sobre una columna de Niquel-NTA (Figura 9). La actividad específica obtenida para la proteína pura fue de 15 $\mu\text{mol}/\text{min}/\text{mg}$ proteína, lo que corresponde a un incremento de

10 veces con respecto a la actividad específica obtenida para el extracto crudo de la cepa de *E. coli* que sobreexpresa la proteína P15r. La actividad específica de la proteína pura P15r es relativamente baja, al compararla con los valores de actividad específica de rodanasas recombinantes purificadas de otros microorganismos (Tabla 7). Esta baja actividad específica obtenida puede deberse a varios motivos, entre los que se encuentran los siguientes: 1) el plegamiento incompleto o incorrecto de la proteína recombinante después de ser sintetizada, debido a un sistema chaperona de *E. coli* que no funciona adecuadamente con la proteína de *A. ferrooxidans*; 2) La falta de alguna proteína accesoria para la actividad rodanasa; 3) Ausencia los sustratos fisiológicos reales de la proteína P15r; 4) Una rápida inactivación de la enzima recombinante purificada debido a la oxidación de la cisteína del sitio activo. Esta última alternativa es poco probable, pues al realizar las curvas cinéticas de la reacción catalizada por la proteína P15r se observaba un comportamiento normal del tipo Michaelis-Menten (Figura 12), por lo que decidimos interpretar el valor de actividad específica de P15r como su valor real de actividad rodanasa, determinando posteriormente los parámetros cinéticos para esta proteína.

Dado que la rodanasa P15r no había sido caracterizada previamente, aplicamos el método de aproximación de Cornish-Bowden (Cornish-Bowden, 1975) para determinar las K_m preliminares. Posteriormente se determinaron las K_m definitivas para los dos sustratos de esta rodanasa. Este método resultó ser una buena aproximación, puesto que las K_m preliminares no variaron mucho con respecto a las K_m definitivas (Figuras 11 y 12).

Una evaluación comparativa de los parámetros cinéticos de otras rodanasas de procariontes con la rodanasa P15r de *A. ferrooxidans* se muestra en la tabla 7. El valor

de K_m para la unión de tiosulfato de la proteína rodanasa P15 es la menor de la tabla (0,356 mM), indicando una afinidad relativamente alta por tiosulfato, sugiriendo que este compuesto podría ser un sustrato fisiológico de esta rodanasa, tal como se menciona para la rodanasa de *E. coli*, PspE (Adams y cols., 2002). Este resultado se vería apoyado al analizar el contexto genómico de *p15*, donde se encuentra una putativa SpeE, proteína relacionada con el transporte y metabolismo de aminoácidos, indicando probablemente que la proteína P15 participaría en el metabolismo de aminoácidos azufrados.

La K_m para cianuro se encuentra dentro del rango observado para otras rodanasas, indicando una baja afinidad por este compuesto. Este dato junto al análisis del contexto genómico de *p15* descartaría su participación en la detoxificación de cianuro.

El pH óptimo de esta enzima fue muy cercano al pH estándar usado para medir la actividad rodanasa (pH = 8,6) y más alto que el pH presente en el citosol bacteriano (pH = 7).

Finalmente, nuestros resultados apoyan la idea que las proteínas que contienen dominio rodanasa, en especial la proteína P15 de *A. ferrooxidans*, podrían participar en la oxidación de metales sulfurados y adaptación medioambiental en esta bacteria biominera.

Tabla 7. Actividad enzimática y parámetros cinéticos de rodanasas de organismos procariontes que catalizan la reacción de transferencia de azufre-sulfano.

Organismo	Recombinante	Actividad específica extracto crudo*	Actividad específica proteína pura*	Km tiosulfato (mM)	Km CN⁻ (mM)	Referencia
<i>E.coli</i>	No	0,5	700	8,7	24	Alexander y Volini, 1987
<i>A. calcoaceticus</i>	No	2,4	1670	3,2	0,3	Vandenbergh y Berk, 1980
GlpE <i>E.coli</i>	Sí	11	270	78	17	Ray y cols., 2000
PspE <i>E.coli</i>	Sí	0,6	800	4,6	27	Adams y cols., 2002
Pa RhdA <i>P. aeruginosa</i>	Sí	135	750	7,4	14	Cipollone y cols., 2004
P15 <i>A. ferrooxidans</i>	Sí	1,5	15	0,356	6.4	Este trabajo
<i>A. vinelandii</i>	No	0,34	350	1,0	8,7	Pagani y cols., 1993
<i>A. vinelandii</i>	Sí	225	450	No reportado	No reportado	Bordo y cols., 2000

*Actividad específica: $\mu\text{moles de SCN}^-/\text{min}/\text{mg}$ de proteína.

CONCLUSIONES

- 1) Encontramos ocho genes putativos codificantes para proteínas tipo rodanasa en *A. ferrooxidans*. El contexto genómico de algunos de estos genes sugiere fuertemente la participación de estas proteínas en el metabolismo y/o oxidación de azufre en esta bacteria.
- 2) Las proteínas P15r y P16.2r poseen actividad tiosulfato:cianuro azufre transferasa , basado en su medición de actividad *in vitro* y las características de sus putativas estructuras de sitio activo.
- 3) Se clonó, expresó y purificó la proteína recombinante P15.
- 4) Se determinaron los parámetros catalíticos de la proteína P15r pura, con un pH óptimo de igual a 8,5, una $V_{max} = 0,025 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ y una $K_m = 6,4 \text{ mM}$ para el cianuro, mientras que una $V_{max} = 0,0176 \mu\text{moles}/\text{min}/\text{mg}$ y una $K_m = 0,356 \text{ mM}$ para el tiosulfato, concluyendo que este último podría ser el sustrato fisiológico de esta enzima.
- 5) Debido a la carencia de un sistema genético apropiado para realizar genómica funcional en *A. ferrooxidans*, no es posible aún asignar roles definitivos para estas proteínas azufretransferasas en el metabolismo de azufre o en otras funciones no definidas en esta bacteria.

6. REFERENCIAS

- Acosta M., Beard S., Ponce J., Vera M., Mobarec J.C. y Jerez C.A.** 2005. Identification of putative sulfurtransferase genes in the extremophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 genome: structural and functional characterization of the proteins. *OMICS*. **9**:13-29.
- Adams H., Teertstra W., Koster M. y Tommassen J.** 2002. PspE (phage-shock protein E) of *Escherichia coli* is a rhodanase. *FEBS Letters* **518**: 173-176.
- Alexander K. y Volini M.** 1987. Properties of an *Escherichia coli* rhodanese. *J. Biol. Chem.* **262**: 6595-6604.
- Altschul S.F., Madden T.L., Schäffer A.A., Zhang J., Zhang Z., Miller W., y Lipman D.L.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucl. Acids. Res.* **25**:3389-3402.
- Andersen C.** 2003. Channel-tunnels: outer membrane components of type I secretion systems and multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **147**: 122–165.
- Amaro A.M., Chamoro D., Seeger M., Arredondo R., Peirano I., y Jerez C.A.** 1991. Effect of external pH perturbations on *in vivo* protein synthesis by the acidophilic bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **173**:910-915.
- Arakawa T., Kumagai, I., Ejima, D. y Tsumoto, K.** 2003. Practical considerations in refolding proteins from inclusion bodies. *Protein expression and purification* **28**: 1-8.
- Baida G.E., y Kuzmin, N.P.** 1995. Cloning and primary structure of a new hemolysin gene from *Bacillus cereus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1264**: 151–154.
- Berks B.C., Ferguson y S.J., Moir, J.W.B.** 1995. Enzymes and associated electron transport systems that catalyze the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. *Biochim. Biophys. Acta.* **1232**: 97–173.
- Bernhardt T.G., y De Boer, P.A.** 2003. The *Escherichia coli* amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway. *Mol Microbiol* **48**: 1171–1182.
- Bidshi D.K., Renault, S., Stasiak, K., Federici BA, y Bigot Y.** 2003. Phylogenetic analysis and possible function of bro-like genes, a multigene family widespread among large double-stranded DNA viruses of invertebrates and bacteria. *J. Gen.Virol.* **84**: 2531–2544.
- Bordo D., y Bork, P.** (2002). The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily. Sequence–structure–function relations. *EMBO Rep.* **3**: 741–746.
- Bordo D., Deriu D., Colnaghi R., Carpen A., Pagani S., y Bolognesi M.** 2000. The cristal structure of a sulfurtransferase from *Azotobacter vinelandii* highlights the evolutionary relationship between the rhodanese and phosphatase enzyme families. *J. Mol. Biol.* **298**:691-704.

Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.

Brüser T., Lens P.N.L., y Trüper H.G. 2000. The biological sulfur cycle. *En P.L.N. Lens y L.H. Pol (eds) Environmental Technologies to treat sulfur pollution.* IWA Publishing. London England. pp:47-85.

Cabrejos M.E., Zhao H.L., Guacucano M., Bueno S., Levican G., Garcia E., Jedlicki E., y Holmes D.S. 1999. IST1 insertional inactivation of the *resB* gene: implications for phenotypic switching in *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Lett.* **175**:223-229.

Chae H.Z., Robison K. y Poole L.B. 1994. Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 7017-7021.

Chan C.W., y Suzuki I. 1994. Thiosulfate oxidation by sulfur grown *Thiobacillus thiooxidans* cells, cell free extracts, and thiosulfate-oxidizing enzyme. *Can. J. Microbiol.* **40**:816-822.

Cipollone R., Bigotti M.G., Frangipani E., Ascenzi P. y Visca P. 2004. Characterization of a rhodanese from the cyanogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **325**: 85-90.

Colnaghi R., Pagani S., Kennedy C., y Drummond M. 1996. Cloning, sequence analysis and overexpression of the rhodanese gene of *Azotobacter vinelandii*. *Eur. J. Biochem.* **236**:240-248.

Colnaghi R., Cassinelli G., Drummond M., Forlani F. y Pagani S. 2001. Properties of the *Escherichia coli* rhodanese-like protein SseA: contribution of the active-site residue Ser240 to sulfur donor recognition. *FEBS Lett.* **500**:153-6.

Coram N.J. y Rawlings D.E. 2002. Molecular relationship between two groups of the genus *Leptospirillum* and the finding that *Leptospirillum ferriphilum* sp. nov. dominates South African commercial biooxidation tanks that operate at 40 degrees C. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 838-845.

De Jong, G.A.H., W. Hazeu, P. Bos, y G. Kuenen. 1997. Polythionate degradation by tetrathionate hydrolase of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiology* **143**:499-504.

Dombrecht B., Tesfay M.Z., Verreth C., y col. 2002. The *Rhizobium etli* gene *iscN* is highly expressed in bacteroids and required for nitrogen fixation. *Mol. Genet. Genomics.* **267**: 820-828.

Edwards K.J., Hu B., Hamers R.J. y Banfield J.F. 2001. A new look at microbial leaching patterns on sulfide minerals. *FEMS Microbiol. Ecol.* **34**:197-206.

Evans D.J., Jones R. y Woodley P.R., y col. 1991. Nucleotide sequence and genetic analysis of the *Azotobacter chroococcum nifUSVWZM* gene cluster, including a new gene (*nifP*) which encodes a serine acetyltransferase. *J. Bacteriol.* **173**: 5457-5469.

- Fauman E.B., Cogswell J.P., Lovejoy B., Rocque W.J., Holmes W., Montana V.G., Piwnica-Worms H., Rink M.J., y Saper M.A.** 1998. Crystal structure of the catalytic domain of the human cell cycle control phosphatase, Cdc25A. *Cell*. **93**:617-625.
- Frazzon J., Fick J.R., y Dean D.R.** 2002. Biosynthesis of iron-sulphur clusters is a complex and highly conserved process. *Biochem. Soc. Trans.* **30**: 680–685.
- Friedrich, C.G.** 1998. Physiology and genetics of sulfur-oxidizing bacteria. *Adv. Microbial Physiology* **39**:235-289
- Friedrich C.G., Quentmeier A., Bardischewsky F., Rother D., Kraft R., Kostka S., y Prinz H.** 2000. Novel genes coding for lithotrophic sulfur oxidation of *Paracoccus pantotrophus* GB17. *J. Bacteriol.* **182**:4677-4687.
- Friedrich C.G., Rother D., Bardischewsky F., Quentmeier A., y Fischer J.** 2001. Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by bacteria: emergence of a common mechanism? *Appl. Environ. Microbiol.* **67**:2873-2882.
- Fry I.J., y García E.** 1989. Cloning and characterization of *Thiobacillus ferrooxidans* genes involved in sulfur assimilation. *En J. Salley, R.G.L. McCready y P.L. Wichlacz* (eds), *Biohydrometallurgy, proceeding of the international symposium held at Jackson Hole*, pp: 171-185. Wyoming, Canada.
- Gardner M.N., y Rawlings D.E.** 2000. Production of rhodanese by bacteria present in bio-oxidation plants used to recover gold from arsenopyrite concentrates. *J. Appl. Microbiol.* **89**:185-190.
- Golyshina O.V., Pivovarova T.A., Karavaiko G.I., Kondrateva T.F.** 2000. *Ferroplasma acidiphilum* gen. nov., sp. nov., an acidophilic, autotrophic, ferrous-iron-oxidizing, cell-wall-lacking, mesophilic member of the *Ferroplasmaceae* fam. nov., comprising a distinct lineage of the Archaea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**:997-1006.
- Hallberg, K.B. y Johnson, D.B.** 2001. Biodiversity of acidophilic prokaryotes. *Adv. Appl. Microbiol.* **49**: 37-84.
- Hänzelmann P., y Schindelin H.** 2004. Crystal structure of the *S*-adenosylmethionine dependent enzyme MoaA and its implications for molybdenum cofactor deficiency in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**:12870–12875.
- Hashimoto T., Tamaki K. y Suzuki K.** 1998. Molecular cloning of plant spermidine synthases. *Plant. Cell. Physiol.* **39**: 73–79.
- Hiraishi A., Nagashima, K.V. y Matsuura K.** 1998. Phylogeny and photosynthetic features of *Thiobacillus acidophilus* and related acidophilic bacteria: its transfer to the genus *Acidiphilium* as *Acidiphilium acidophilum* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**: 1389-98.
- Holmgren, A.** 1989. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* **264**: 13963–13966.
- Janausch I.G., Zientz E. y Tran Q.H.** 2002. C4-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. *Biochim Biophys Acta* **1553**: 39–56.

- Kappler U., Friedrich C.G., Trüper H.G., y Dahl C.** 2001. Evidence for two pathways of thiosulfate oxidation in *Starkeya novella* (formerly *Thiobacillus novellus*). Arch. Microbiol. **175**:102-111.
- Kelly D. P., Shergill J.K., Lu W.-P., y Wood A.P.** 1997. Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. Antonie van Leeuwenhoek **71**: 95-107.
- Kelly D.P.** 1988. Oxidation of sulphur compounds. En J.A.Cole y S.J. Ferguson (eds) The nitrogen and sulphur cycles, pp: 65-98. Cambridge University Press, Great Britain.
- Kelly D.P., y Harrison A.H.** 1989. Genus *Thiobacillus*. En Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. J.T.Staley, M.P.Bryant, N. Pfennig y J.G. Holt (Eds). 1 ed, vol 3, pp: 1842-1858. Baltimore: Willians and Wilkins.
- Kelly D.P., y Wood A.P.** 1998. Microbes of the sulfur cycle. En R.S. Burlage, R. Atlas, D. Stahl, G. Geesey y G. Sayler (eds), Techniques in microbial ecology p:31-57. Oxford University Press. USA.
- Kelly D.P., y Wood A.P.** 2000. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen.nov., *Halothiobacillus* gen.nov. and *Thermithiobacillus* gen.nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **50**: 511-516.
- Koonin E.V., Aravind L., y Galperin M. Y.** 2000. A comparative-genomic view of the microbial stress-response. En Bacterial stress responses. G. Storz and R. Hengge-Aronis (eds.). pp.417-444. ASM Press, Washington, D.C.
- Kreis-Kleinschmidt V., Fahrenholz F., Kojro E., y Kröger A.** 1995. Periplasmic sulphide dehydrogenase (Sud) from *Wolinella succinogenes*: isolation, nucleotide sequence of the *sud* gene and its expression in *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. **227**:137-142.
- Kurosawa N., Itoh Y.H., Iwai T. y Sugai A.** 1998. *Sulfurisphaera ohwakuensis* gen. nov., sp. nov., a novel extremely thermophilic acidophile of the order Sulfolobales.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature **227**:680-685.
- Laudenbach D.E., Ehrhardt D., Green L., y Grossman A.** 1991. Isolation and characterization of a sulfur-regulated gene encoding a periplasmically localized protein with sequence similarity to rhodanese. J Bacteriol. **173**: 2751-2760
- Lindström E.B., Gunneriusson E., y Tuovinen O.H.** 1992. Bacterial oxidation of refractory sulfide ores for gold recovery. Crit. Rev. Biotechnol. **12**:133-155.
- Liu Z., Guilian N., Appia-Ayme C., Borne F., Ratouchniak J., y Bonnefoy V.** 2000. Construction and characterization of a *recA* mutant of *Thiobacillus ferrooxidans* by marker exchange mutagenesis. J. Bacteriol. **182**:2269-2276.
- Mackintosh, M.E.** 1978. Nitrogen fixation by *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Gen. Microbiol. **105**: 215–218.
- Matthies A., Rajagopalan K.V. y Mendel R.R.** 2004. Evidence for the physiological role of a rhodanese-like protein for the biosynthesis of the molybdenum cofactor in humans. Proc Natl Acad Sci USA **101**: 5946–5951.

- Meulenberg R., Pronk J.T., Hazeu W., van Dijken J.P., Frank J., Bos P., y Kuenen J.G.** 1993. Purification and partial characterization of thiosulfate dehydrogenase from *Thiobacillus acidophilus*. *J. Gen. Microbiol.* **139**:2033-2039.
- Müller F.H., Bandejas T.M. y Urich, T.** 2004. Coupling of the pathway of sulphur oxidation to dioxygen reduction: characterization of a novel membrane-bound thiosulphate:quinone oxidoreductase. *Mol. Microbiol.* **53**: 1147–1160.
- Nagahara, N., Okazaki T., y Nishino T.** 1995. Cytosolic mercaptopyruvate sulfurtransferase is evolutionarily related to mitochondrial rhodanese. *J. Biol. Chem.* **270**:16230-16235
- Nakamura K., Nakamura M., Yoshikawa H., y Amano Y.** 2001. Purification and properties of thiosulfate dehydrogenase from *Acidithiobacillus thiooxidans* JCM7814. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **65**:102-108.
- Norris P.R., Clark D.A., Owen J.P. y Waterhouse S.** 1996. Characteristics of *Sulfobacillus acidophilus* sp. nov. and other moderately thermophilic mineral-sulphide-oxidizing bacteria. *Microbiology.* **142**:775-783.
- Norris P.R., Burton N.P. y Foulis N.A.** 2000. Acidophiles in bioreactor mineral processing. *Extremophiles.* **4**:71-76.
- Ogasawara Y., Lacourciere G., Stadtman T.C.** 2001. Formation of a selenium-substituted rhodanese by reaction with selenite and glutathione: possible role of a protein perselenide in a selenium delivery system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **98**:9494-9498.
- Ohmura N, Sasaki K., Matsumoto N., Saiki H.** 2002. Anaerobic respiration using Fe(3+), S(0), and H(2) in the chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.* **184**:2081-7.
- Pagani S., Bonomi F., y Cerletti P.** 1984. Enzymic synthesis of the iron-sulfur cluster of spinach ferredoxin. *Eur. J. Biochem.* **142**:361-366.
- Pagani S., Sessa G., Sessa F., y Colnaghi R.** 1993. Properties of *Azotobacter vinelandii* rhodanese. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **29**: 595-604.
- Pagani S., Forlani F., Carpen A., Bordo D., y Colnaghi R.** 2000. Mutagenic analysis of Thr-232 in rhodanese from *Azotobacter vinelandii* highlighted the differences of this prokaryotic enzyme from the known sulfurtransferases. *FEBS Letters* **472**:307-311.
- Palenchar P.M., Buck C.J., Cheng H., Larson T.J. y Mueller E.G.** 2000. Evidence that ThiI, an enzyme shared between thiamin and 4-thiouridine biosynthesis, may be a sulfurtransferase that proceeds through a persulfide intermediate. *J. Biol. Chem.* **275**:8283-8286.
- Papenbrock J., y Schmidt A.** 2000. Characterization of two sulfurtransferase isozymes from *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.* **267**:5571-5579.
- Ploegman J.H., Drent G., Kalk K.H., Hol W.G.J., Heinrikson R.L., Keim P., Weng L., y Russell J.** 1978. The covalent and tertiary structure of bovine liver rhodanese. *Nature* **273**:124-129.

- Pott A.S., and Dahl, C.** 1998. Sirohaem sulfite reductase and other proteins encoded by genes at the *dsr* locus of *Chromatium vinosum* are involved in the oxidation of intracellular sulfur. *Microbiology* **144**: 1881–1894.
- Pronk J. T., Meulenber R., Hazeu W., Bos P., y Kuenen J.G..** 1990. Oxidation of reduced inorganic sulphur compounds by acidophilic thiobacilli. *FEMS Microbiol. Rev.* **75**:293-306.
- Pronk, J.T.** 1991. Oxidation of reduced inorganic sulphur compounds by acidophilic thiobacilli. *En Physiology of the acidophilic thiobacilli* pp: 11-23. Technische Universiteit Delft, Tesis de PhD. The Netherlands.
- Pronk J.T., de Bruyn J.C., Bos P., Kuenen J.G.** 1992. Anaerobic Growth of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl Environ Microbiol.* **58**:2227-2230.
- Ramírez P., Toledo H., Guiliani N., y Jerez C.A.** 2002. An exported rhodanese-like protein is induced during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in metal sulfides and different sulfur compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:1837-1845.
- Rawlings D.E., Tributsch H., y Hansford G.S.** 1999. Reasons why “*Leptospirillum*”-like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores. *Microbiology* **145**:5-13
- Ray W.K., Zeng G., Potters M.B, Mansuri A.M. y Larson T.J.** 2000. Characterization of a 12-kilodalton rhodanese encoded by *glpE* of *Escherichia coli* and its interaction with thioredoxin. *J. Bacteriol.* **182**:2277-2284.
- Reeder T., y Schleif R.** 1991. Mapping, sequence, and apparent lack of function of *araJ*, a gene of the *Escherichia coli* arabinose regulon. *J Bacteriol* **73**: 7765–7771.
- Rohwerder T., Gehrke T. y Kinzler K.** 2003. Bioleaching review part A: progress in bioleaching: fundamentals and mechanisms of bacterial metal sulfide oxidation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**: 239–248.
- Rudolph, R., Schwarz, E., Lilie, H.,** 1998. Advances in refolding of proteins produced in *E. coli*. *Curr. Op. Biotechnol.* **9**: 497-501.
- Sambrook, J., y Russell, D.W.** 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY).
- San francisco M.J.D., Hope C.L. y Owolabi J.B.** 1990. Identification of the metalloregulatory element of the plasmid-encoded arsenical resistance operon. *Nucleic Acid. Res.* **18**: 619–624.
- Schippers A., Rohwerder T., y Sand W.** 1999. Intermediary sulfur compounds in pyrite oxidation: implications for bioleaching and biodepyritization of coal. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**:104-110.
- Sedgwick S.G. y Smerdon S.J.** 1999. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. *Trends. Biochem. Sci.* **24**: 311–316.
- Sekowska A., Kung H-F., y Danchin A.** 2000. Sulfur metabolism in *Escherichia coli* and related bacteria: facts and fiction. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **2**:145-177.

- Selkov E., Overbeek R., Kogan Y., Chu L., Vonstein V., Holmes D., Silver S., Haselkorn R., y Fonstein M.** 2000. Functional analysis of gapped microbial genomes: amino acid metabolism of *Thiobacillus ferrooxidans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**:3509-3514.
- Shrihari S.R., Bhavaraju J.M., Modak R., Kumar P.R., y Gandhi K.S.** 1993. Dissolution of sulphur particles by *Thiobacillus ferrooxidans*: substrate for unattached cells. Biotechnol. Bioeng. **41**:612-616.
- Silver M., y Lungren D.G.** 1968. The thiosulfate-oxidizing enzyme of *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). Can. J. Biochem. **46**: 1215-1220.
- Sorbo, B.** 1957. A colorimetric method for the determination of thiosulfate. Biochim Biophys. Acta. **23**:624-627.
- Spallarossa A., Donahue J.L., Larson T.J., Bolognesi M., y Bordo D.** 2001. *Escherichia coli* GlpE is a prototype sulfurtransferase for the single-domain rhodanese homology superfamily. Structure **9**:1117-1125.
- Stuedel, R.** 2000. The chemical sulfur cycle. En P.L.N. Lens y L. Hulshoff Pol pp 1-31. Environmental Technologies to treat sulfur pollution. IWA Publishing. Londres Inglaterra.
- Studier F.W., Rosenberg A.H., Dunn J.J., y Dubendorff J.W.** 1990. Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. Methods Enzymol. **185**:60-89
- Suzuki, I.** 1999. Oxidation of inorganic sulfur compounds: chemical and enzymatic reactions. Can. J. Microbiol. **45**:97-105
- Tabita R., Silver M., y Lundgren D.G.** 1969. The rhodanese enzyme of *Ferrobacillus ferrooxidans* (*Thiobacillus ferrooxidans*). Can. J. Biochem. **47**:1141-1145.
- Valdes J., Veloso F., y Jedlicki E.** 2003. Metabolic reconstruction of sulfur assimilation in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* based on genome analysis. BMC. Genomics. **4**: 51-57.
- Vandenbergh P.A. y Berk R.S.** 1980. Purification and characterization of rhodanese from *Acinetobacter calcoaceticus*. Can. J. Microbiol. **26**: 281-286.
- Visser J.M., De Jong G.A.H., Robertson L.A., y Kuenen J.G.** 1997. Purification and characterization of a periplasmic thiosulfate dehydrogenase from the obligately autotrophic *Thiobacillus* sp. W5. Arch. Microbiol. **166**:372-378.
- Westley, J.** 1981. Thiosulfate:cyanide sulfurtransferase (rhodanese). Methods. Enzymol. **77**: 285-291.
- Wodara C., Bardischewsky F., y Friedrich C.G.** 1997. Cloning and characterization of sulfite dehydrogenase, two *c*-type cytochromes, and a flavoprotein of *Paracoccus denitrificans* GB17: essential role of sulfite dehydrogenase in lithotrophic sulfur oxidation. J. Bacteriol. **179**:5014-5023.
- Wolfe M.D., Ahmed F., y Lacourciere G.M.** 2004. Functional diversity of the rhodanese homology domain. J. Bio. Chem. **279**: 1801-1809.

Yuvaniyama P., Agar J.N., y Cash V.L. 2000. NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 599–604.

Zhang Q.M., Miyabe I., y Matsumoto Y. 2000. Identification of repair enzymes for 5-formyluracil in DNA. Nth, Nei, and MutM proteins of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **275**: 35471–35477.