

**LA CISTEINA DESULFURASA (IscS) DE
Geobacillus stearothermophilus V
CONFIERE A *Escherichia coli*
RESISTENCIA A TELURITO DE POTASIO**

Tesis Entregada a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar el grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología

Por Juan Carlos Tantaleán Vásquez

Abril, 2003

Director de Tesis: Dr. Claudio Vásquez Guzmán

INFORME DE APROBACIÓN .	1
..	3
AGRADECIMIENTOS .	5
LISTA DE ABREVIATURAS .	7
RESUMEN .	9
ABSTRACT .	11
1. INTRODUCCION .	13
2. MATERIALES Y METODOS .	19
2.1. CEPAS BACTERIANAS, PLASMIDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO. .	19
2.1.1. <i>Geobacillus stearothermophilus</i> V. .	19
2.1.2. <i>Escherichia coli</i> . .	19
2.1.3. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC) de K_2TeO_3 . .	20
2.1.4. Características de los plasmidios y cepas de <i>E. coli</i> . .	20
2.2. PROCEDIMIENTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR .	20
2.2.1. Extracción de DNA cromosomal. . .	20
2.2.2. Extracción de DNA plasmidial. . .	21
2.2.3. Cuantificación del DNA. .	21
2.2.4. Partidores y condiciones de PCR. . .	23
2.2.5. Digestión de DNA con enzimas de restricción. .	24
2.2.6. Ligación del DNA. .	24
2.2.7. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa. . .	24
2.2.8. Electroforesis de DNA en geles de agarosa. .	25
2.2.9. Clonamiento de productos de PCR. .	25
2.2.10. Secuenciación de DNA. . .	26
2.2.11. Transformación de <i>E. coli</i> . .	26
2.2.12. Ensayo de complementación de la mutante <i>iscS</i> . .	26

2.3. EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES. . .	27
2.3.1. Cinética de inducción de proteínas recombinantes. . .	27
2.3.2. Determinación de la estabilidad térmica de la proteína recombinante IscS. . .	27
2.3.3. Sobreexpresión y purificación de la IscS de <i>G. stearothermophilus</i> V. . .	27
2.3.4. Determinación de la masa molecular de la IscS nativa. . .	28
2.3.5. Determinación de la masa molecular de la IscS en condiciones desnaturalantes. . .	28
2.3.6. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida . . .	28
2.3.7. Microsecuenciación del extremo amino terminal de la IscS. . .	29
2.3.8. Determinación cuantitativa de proteínas. . .	29
2.3.9. Ensayo de actividad cisteína desulfurasa. . .	29
2.3.10. Análisis inmunológico de proteínas recombinantes. . .	30
2.4. BIOINFORMÁTICA: ANÁLISIS <i>IN SÍLICO</i> Y COMPARACIÓN DE SECUENCIAS CON BASES DE DATOS. . .	32
2.4.1. Análisis del inserto de 3.461 pb presente en el plasmidio p2VH. . .	32
2.4.2. Análisis de la secuencia de aminoácidos deducida de la IscS. . .	32
2.4.3. Modelamiento de proteínas. . .	32
2.4.4. Número de acceso a secuencias nucleotídica y aminoacídica. . .	33
3. RESULTADOS . .	35
3.1. Subclonamiento de los ORFs presentes en el inserto de 3.461 pb que confiere resistencia a telurito de potasio en <i>E. coli</i> . . .	35
3.2. Sobreexpresión de las proteínas codificadas en el inserto de p2VH. . .	38
3.3. Purificación de la IscS de <i>G. stearothermophilus</i> V. . .	39
3.4. Caracterización física de la IscS. . .	42
3.5. Clonamiento del gen <i>iscS</i> de <i>G. stearothermophilus</i> V con su región promotora y transformación de cepas de <i>E. coli</i> deficientes en los genes <i>iscS</i> y <i>sodA</i> <i>sodB</i> . . .	44
3.6. Mutagénesis del gen <i>iscS</i> de <i>G. stearothermophilus</i> V. . .	48
3.7. Estudios proteómicos preliminares en <i>G. stearothermophilus</i> V. . .	59
4. DISCUSION .	61
5. CONCLUSIONES . .	69

INFORME DE APROBACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

TESIS DE DOCTORADO

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

Juan Carlos Tantaleán Vásquez

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Doctor en Ciencias con mención en Microbiología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 30 de abril del año 2003.

Director de Tesis:

Dr. Claudio Vásquez Guzmán

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Carlos Jerez

Dr. David Holmes

Dr. Víctor Cifuentes

Dr. Davor Cotorás

a mi amada Rosy, a mis pequeños Christian y Kevin a mis queridos padres y hermanos

AGRADECIMIENTOS

Mi gratitud especial al Dr. Claudio Vásquez Guzmán, por su dirección acertada en la ejecución del presente estudio y por su amistad.

A las personas e instituciones que me apoyaron e hicieron posible el desarrollo y culminación de la presente tesis:

A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Molecular: Andrés Araya, Claudia Saavedra, Derie Fuentes, José Manuel Pérez e Iván Calderón, por sus contribuciones en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Sergio Pichuanes, por su ayuda permanente y desinteresada.

A mi esposa Rosy, por su sacrificio y apoyo constante.

A mis hijos Christian y Kevin, por su comprensión a pesar de su corta edad.

A mis padres Guillermo y María, por su ejemplo y estímulo permanente.

A mis hermanos Froilán, Oscar, Willy, Paco, Jesús y Milly, por su apoyo constante.

A mis amigos, por los momentos gratos e inolvidables.

Al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD), por el otorgamiento de la beca que me permitió realizar los estudios de Doctorado.

A la Universidad de Chile y a todos mis profesores, por la formación impartida.

A la Universidad de Santiago de Chile, por las facilidades brindadas.

A la Universidad San Luis Gonzaga de Ica-Perú.

A los Proyectos de investigación Fondecyt 1990917 y 1030234, Dicyt USACH y Beca PG/13/02 de la Universidad de Chile que aportaron gran parte de los recursos para llevar a cabo esta Tesis.

LISTA DE ABREVIATURAS

ADH: Alcohol deshidrogenasa.

ANC: Anhidrasa carbónica

Amp: Ampicilina

BCIP: 5-Bromo-4-Cloro-3-indolil fosfato

BSA: Albúmina sérica bovina

CitC: Citocromo C

Cm: Cloranfenicol

dNTPs: desoxinucleótidos trifosfato

DO: Densidad óptica

IPTG: Isopropil tio- β -D-galactósido

Km: Kanamicina

MIC: Concentración inhibitoria mínima

NBT: Nitro Blue Tetrazolium

ORF: Open reading frame (marco de lectura abierto).

OVA: Ovoalbúmina.

PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida .

PNK: Tampón fosfato salino.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa.

PLP: Piridoxal fosfato.

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo.

PSA: Persulfato de amonio.

TBS: Tampón Tris salino.

TEMED: N,N,N',N'-tetrametilendiamina.

PVDF: Difluoruro de polivinilideno.

SDS: Dodecil sulfato de sodio.

TAE: Tris-acetato EDTA.

Tet: Tetraciclina.

RESUMEN

Los mecanismos que subyacen la resistencia bacteriana a telurito de potasio (K_2TeO_3) no son bien conocidos. La evidencia actual apoya la idea que varias vías metabólicas, a través de sus enzimas y/o sus productos, podrían estar participando en el fenómeno.

Interesados en este fenómeno, nuestro grupo ha utilizado como modelo experimental la bacteria termofílica Gram positiva *Geobacillus stearothermophilus* V, la cual exhibe resistencia natural a K_2TeO_3 . Utilizando genotecas de este microorganismo construidas con la enzima *Hind*III se transformó células de *E. coli* sensibles a K_2TeO_3 seleccionándose por la adquisición de un fenotipo de resistencia (Tel^R).

Uno de los clones Tel^R obtenidos porta el plasmidio recombinante p2VH, que contiene un inserto de 3.461 pb de DNA cromosomal de *G. stearothermophilus* V clonado en el vector pSP72. En el inserto se identificaron tres marcos de lectura abiertos (ORFs) de más de 200 residuos de aminoácidos. El ORF1 (687pb) especifica una metalopeptidasa, el ORF2 (1200 pb) codifica para una cisteína desulfurasa y el ORF3 (963 pb) contiene información para una aminopeptidasa. Experimentos de subclonamiento demostraron que el ORF2 es el único responsable de conferir resistencia a K_2TeO_3 en *E. coli*. El producto de este gen (*iscS*) es una cisteína desulfurasa (IscS) que fue sobreexpresada, purificada a homogeneidad y parcialmente caracterizada. Se trata de una proteína con una *Mr* de 45 kDa por subunidad y que en estado nativo constituye un homodimero de aproximadamente 95 kDa que posee unido el cofactor piridoxal fosfato (PLP).

Experimentos de mutagénesis (por delección en su extremo 3' y por sustituciones definidas en el codón 213) del gen *iscS* permitieron determinar que la resistencia a K_2TeO_3 es dependiente de la actividad cisteína desulfurasa.

Otra evidencia que indicó una relación entre la expresión del gen *iscS* de *G. stearothermophilus* V y resistencia a K_2TeO_3 provino de ensayos de complementación de cepas *E. coli* deficientes en el gen *iscS* endógeno que presentaban un fenotipo de hipersensibilidad a K_2TeO_3 . La introducción del gen *iscS* del bacilo termofílico en *E. coli* PK6311 resultó en la adquisición de resistencia a la sal tóxica y en la recuperación parcial del fenotipo de crecimiento lento exhibido por esta cepa. Adicionalmente, la expresión de este gen suprimió el requerimiento de tiamina pero no el de ácido nicotínico de *E. coli* PK6311 para poder desarrollarse en medio mínimo.

Por otro lado, la cepa de *E. coli* QC774 (*sodA sodB*) también adquirió resistencia a K_2TeO_3 cuando fue transformada con *iscS* de *G. stearothermophilus* V, sugiriendo que la toxicidad del telurito podría estar relacionada a un daño oxidativo.

ABSTRACT

The mechanisms underlying bacterial resistance to potassium tellurite (K_2TeO_3) are not well understood. Recent evidence support the idea that enzymes and/or their substrates from certain metabolic routes could participate in this resistance.

Interested in studying this phenomenon, our group has employed the tellurite-resistant, thermophilic, Gram positive rod *Geobacillus stearothermophilus* V as substrate. Tellurite-sensitive *E. coli* cells were transformed with different gene libraries of *G. stearothermophilus* V and Tel^R transformants were isolated. One of them carries the recombinant plasmid p2VH, which contains a 3,461 bp *Hind*III fragment of *G. stearothermophilus* V chromosomal DNA cloned into vector pSP72. Three open reading frames (ORFs) larger than 200 amino acid residues were identified in the insert. ORF1 (687 bp) specifies a metallopeptidase, ORF2 (1200 bp) codes for a cysteine desulfurase and ORF3 (963 bp) carries information for an aminopeptidase. Subcloning experiments demonstrated that only ORF2 was responsible for conferring K_2TeO_3 resistance in *E. coli*. The product of the *iscS* gene is a cysteine desulfurase (IscS) which was overexpressed, purified to near homogeneity and partially characterized. The protein subunit exhibits a *Mr* of 45 kDa and in its native conformation the enzyme is a homodimer of about 95 kDa which has bound pyridoxal phosphate (PLP).

Mutagenesis of the *iscS* gene (by deletion of defined portions of its 3' end and by making defined substitutions in codon 213) allowed us to determine that resistance to K_2TeO_3 is dependent on the cysteine desulfurase activity.

Another line of evidence that allowed to establish a relationship between the expression of the *G. stearothermophilus* V *iscS* gene and K_2TeO_3 resistance came from complementation assays of *iscS*-deficient, tellurite-hypersensitive *E. coli* strains. The expression of the *iscS* gene from the thermophilic rod in *E. coli* PK6311 resulted in the acquisition of tellurite resistance and in the partial recovery of the slow growth phenotype exhibited by these cells. Also, *iscS* gene expression suppressed the requirement for thiamine (but not for nicotinic acid) of this strain to grow in minimal media.

On the other hand, *E. coli* QC774 (*sodA sodB*) strain also acquired resistance to tellurite when transformed with the *G. stearothermophilus* V *iscS* gene, suggesting that tellurite toxicity could be related to oxidative damage.

1. INTRODUCCION

Más del 95% del peso seco de un organismo está compuesto por C, O, H, N, P y S. Además de estos no metales las células requieren de otros elementos como Na, K, Ca, Mg, etc., los cuales juegan roles importantes tanto en el mantenimiento de la integridad celular como en el balance químico, osmótico y eléctrico de las células. Otros elementos como Cu, Co, Fe, Mo, Ni, Se, Zn, entre otros, son incorporados en proteínas y participan en catálisis, transferencia de electrones y/o en la estabilidad estructural de las mismas. Por otro lado, ciertos metales y metaloides (o algunos de sus derivados oxidados) son de interés biológico por su toxicidad, como por ejemplo Ag^+ , AsO_4^{2-} , AsO_3^{3-} , Cd^{2+} , Co^{2+} , CrO_4^{2-} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Sb^{3+} , SeO_3^{2-} , TeO_3^{2-} , TeO_4^{2-} y Zn^{2+} (Silver y Phung, 1996; Beveridge y col., 1997; Westenberg y Guerinot, 1997; Silver, 1998; Taylor, 1999; Cervantes y col., 2001).

El telurio (Te) deriva su nombre del griego *tellus* (tierra) y es un metaloide que comparte el grupo VI A de la tabla periódica con elementos biológicamente importantes como el oxígeno, azufre y selenio. Aún cuando se trata de un elemento escaso en el ambiente (en la litósfera ocurre en un 2×10^{-7} %), su uso creciente en la industria lo ha convertido en un contaminante de importancia y puede encontrarse en altas concentraciones cerca de los sitios de descarga de desechos (Taylor, 1999). Raramente se encuentra en la naturaleza en su forma elemental (Te^0) sino que más bien combinado con azufre u otros elementos formando compuestos del tipo weisita (Cu_2Te), calaverita (AuTe_2), melonita (NiTe_2), niggliita (PtTe_3) y tetradimita ($\text{Bi}_2\text{Te}_2\text{S}$) (Bagnall, 1975). También es frecuente encontrar el Te como sales de sus oxianiones, teluritos (TeO_3^{2-}) y teluratos (TeO_4^{2-}), las cuales son tóxicas para la mayoría de los seres vivos. En su

forma elemental (Te^0) el teluro no presenta toxicidad. El TeO_3^{2-} es particularmente tóxico para bacterias Gram negativas (Turner y col., 1999) y se ha sugerido que este efecto deriva de su fuerte poder oxidante, el cual podría interferir con numerosos procesos celulares (Summers y Jacoby, 1977). En *E. coli*, el TeO_3^{2-} ingresa a la célula por la vía de transporte de fosfato (Tomas y Kay, 1986) y es objeto de una reducción inicial por parte de una actividad secundaria de la enzima nitrato reductasa (Avazéri y col., 1997). Si este límite es superado, el glutatión y/u otros tioles reducidos del citosol podrían a su vez reducir el TeO_3^{2-} generando teluro metálico (Te^0) adicional y como consecuencia no deseada, los tóxicos radicales superóxido (O_2^-) (Taylor, 1999).

En los organismos aeróbicos, los radicales O_2^- se generan normalmente durante la respiración por autooxidación de componentes de la cadena respiratoria, siendo la NADH deshidrogenasa II la principal responsable (Messner e Imlay, 1999). Estos reactivos radicales son rápidamente convertidos a O_2 y H_2O_2 por superóxido dismutasas (SODs) (Gardner y Fridovich, 1991) y cuando sus niveles superan ciertos límites resultan extremadamente tóxicos para las células (Strohmeier e Imlay, 1998). Las especies O_2^- generan daño oxidativo y uno de sus blancos son los centros de [Fe-S] que forman parte de numerosas enzimas y proteínas esenciales para el metabolismo celular. Ejemplos de este tipo de enzimas son la fumarasa (Liochev y Fridovich, 1993), aconitasa (Gardner y Fridovich, 1991) y algunas dihidroxiácido deshidratasas (Kuo y col., 1987; Storz e Imlay, 1999), entre otras. La oxidación de estas proteínas conduce a la desintegración de sus centros [Fe-S] y a la pérdida concomitante de la actividad enzimática (Flint y col., 1993b). Adicionalmente, la oxidación de estos centros libera hierro el cual en presencia de H_2O_2 puede catalizar la reacción de Fenton generando radicales hidroxilo (OH^-) que dañan indiscriminadamente componentes celulares (Imlay y Linn, 1988; Zheng y col., 1999).

La toxicidad que el K_2TeO_3 ejerce sobre los seres vivos está lejos de ser aclarada. Como se mencionó anteriormente, una posibilidad es que ésta tenga su origen en el daño producido por radicales O_2^- generados durante la reducción a Te^0 sobre potenciales blancos de oxidación como son los centros de [Fe-S]. En *E. coli* también se ha documentado que la presencia de TeO_3^{2-} provoca la oxidación de tioles celulares y que algunos determinantes de resistencia a TeO_3^{2-} (Tel^R) protegen de esa oxidación (Turner y col., 1999). Uno de los tioles celulares blanco del telurito resultó ser el glutatión cuya oxidación compromete seriamente el balance redox de la célula (Turner y col., 2001). Por otro lado, la incorporación de Te en lugar de Se en la glutatión peroxidasa inhibe la reducción de H_2O_2 dependiente de glutatión, lo que podría generar estrés oxidativo a la célula (Garberg y col., 1999). Finalmente, dadas sus propiedades químicas, el Te podría reemplazar al azufre afectando diversas funciones celulares (Walter y Taylor, 1992).

No obstante la reconocida actividad antimicrobiana del K_2TeO_3 , existen bacterias naturalmente resistentes a él y en este sentido se ha empleado este compuesto en procedimientos microbiológicos como un agente de selección para el aislamiento de *Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* y *Shigella spp.*, entre otras (Zadik y col., 1993; Avazéri y col., 1997). Bacterias resistentes a K_2TeO_3 desarrollan generalmente colonias de color negro cuando crecen en medios de cultivo que contienen esta sal. Esto sería el resultado de la reducción de K_2TeO_3 a Te^0 y a su subsecuente deposición en la cara interna de la membrana

plasmática de las células (Tucker y col., 1962, 1966; Taylor y col., 1988; Lloyd-Jones y col., 1994). Bacterias sensibles también son capaces de formar colonias de color negro cuando crecen en medios sólidos que contienen concentraciones subletales de K_2TeO_3 (Summers y Jacoby, 1977), fenómeno que también ha sido documentado en levaduras (Liangyau y col., 1993).

Al menos en *E. coli* la responsable de la reducción de K_2TeO_3 y del nivel basal de resistencia exhibido por las células es la enzima nitrato reductasa (Avazéri y col., 1997). Trutko y col. (1998) han comunicado que la citocromo *d* oxidasa terminal de esta bacteria también posee actividad reductora de telurito. En *Thermus thermophilus* HB8 la reducción enzimática de K_2TeO_3 es dependiente de NAD(P)H (Chiong y col., 1988) y en *Micrococcus lactilyticus* ésta ocurre a expensas de hidrógeno molecular (Woolfolk y Whitely, 1962). Finalmente, en la bacteria fotosintética *Rhodobacter sphaeroides* el TeO_3^{2-} puede ser incluso utilizado como aceptor final de electrones (Moore y Kaplan, 1992).

Estudios genéticos y de secuenciación de DNA de diferentes bacterias han permitido identificar por lo menos cinco tipos de determinantes Tel^R diferentes, los que se encuentran codificados tanto en plasmidios como en el cromosoma bacteriano (Taylor, 1999). Entre los primeros se encuentra el operón *ter*, presente en los plasmidios pMER610 de *Alcaligenes* (Jobling y Ritchie, 1987, 1988; Hill y col., 1993) y R478 de *Serratia marcescens* (Whelan y Colleran, 1992; Whelan y col., 1995, 1997). También a esta clase pertenecen el operón *kilAtelAB* del plasmidio RK2, el cual se encuentra presente en un amplio rango de huéspedes (Bradley, 1985; Walter y col., 1991a) y otros determinantes presentes en los plasmidios pHH1508a de *Klebsiella aerogenes* (Bradley y col., 1982; Yan y Taylor, 1987; Walter y col., 1991b) y pTE53 de *E. coli* (Burian y col., 1998). Ejemplos de determinantes Tel^R codificados en el cromosoma bacteriano incluyen el operón *tehAtehB* de *E. coli* (Taylor y col., 1994), el gen *tmp* de *Pseudomonas syringae* (Cournoyer y col., 1998), los genes *trg* y *trgB* de *R. sphaeroides* (O'Gara y col., 1997), el gen *tehB* en *Streptococcus pneumoniae* (Liu y Taylor, 1999) y otros genes de *Bacillus subtilis* (Kumano y col., 1997).

En el análisis de los diferentes determinantes Tel^R no se ha encontrado secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos similares entre ellos lo que ha dificultado la postulación de un mecanismo único de resistencia. En este sentido, a la fecha se han propuesto mecanismos de resistencia que son más bien tentativos e incluyen una extrusión directa del ión, un flujo desde el interior de la célula, la volatilización de formas alquiladas de Te y la reducción del tóxico (Taylor, 1999). Recientemente sin embargo, ha prosperado más bien la hipótesis que la resistencia es de carácter multifuncional y que diferentes rutas metabólicas podrían contribuir directa o indirectamente con sus sustratos y/o sus productos al mecanismo de resistencia. En apoyo a esta hipótesis, estudios con mutantes metabólicas han sugerido que enzimas del metabolismo primario como las DsbA y DsbB (responsables de la formación de uniones disulfuro), nitrato reductasa, superóxido dismutasa, glutatión reductasa, tioredoxina reductasa, cisteína sintetasa o algunos de sus metabolitos (glutatión, glutaredoxina, tioredoxina, cisteína, entre otros) podrían estar involucrados en la resistencia a este tóxico (Avazéri y col., 1997; Cournoyer y col., 1998; Alonso y col., 2000; Guzzo y Dubow, 2000; Liu y col., 2000; Turner y col. 1999, 2001; Vásquez y col., 2001).

La importancia del metabolismo de la cisteína en la resistencia a K_2TeO_3 se sospecha hace años en la literatura. En *R. sphaeroides* por ejemplo, la disrupción del gen *cysK*-localizado río abajo de los genes *trgAB*- conduce a una disminución en la resistencia al tóxico (O’Gara y col., 1997) y en nuestro laboratorio se demostró que la expresión del gen *cysK* de *B. stearothermophilus* V en *E. coli* le confiere a esta última bacteria resistencia a K_2TeO_3 (Vásquez y col., 2001). De acuerdo a la nomenclatura propuesta por Nazina y col. (2001), este bacilo termofílico será denominado en lo sucesivo como *Geobacillus stearothermophilus* V.

Estudios realizados recientemente y en la misma línea en nuestro laboratorio condujeron al aislamiento de un nuevo clon de *E. coli* resistente a K_2TeO_3 . El plasmidio recombinante provino de una genoteca de *G. stearothermophilus* V construida con la enzima *HindIII* y contiene un inserto de 3.461 pb a partir de cuya secuencia se identificó tres marcos de lectura abiertos (ORFs). Hemos determinado que sólo aquel que codifica para una proteína similar a la enzima NifS de varios organismos es responsable de la resistencia a K_2TeO_3 . La primera NifS descrita corresponde a la cisteína desulfurasa de *Azotobacter vinelandii*, enzima que cataliza la formación de L-alanina y azufre elemental a partir de L-cisteína utilizando piridoxal 5'-fosfato (PLP) como coenzima (Zheng y col., 1993; Zheng y Dean, 1994). La reacción involucra la formación de un aducto entre el sustrato y el cofactor, el cual se encuentra unido covalentemente a un residuo de lisina conservado. En esta condición, un residuo de cisteína presente en el sitio activo realizaría un ataque nucleofílico formándose un enlace persulfuro. El azufre sería entonces retirado del sustrato para liberar alanina (Zheng y col., 1994).

Enzimas homólogas presentes en bacterias no fijadoras de nitrógeno se designan como IscS. En consecuencia, la referida proteína de *G. stearothermophilus* V que hemos responsabilizado de la resistencia a K_2TeO_3 en *E. coli* será considerada como IscS.

Recientemente se ha demostrado en *E. coli* que la IscS juega un rol importante al aportar azufre tanto para la síntesis *de novo* como para la reparación de centros [Fe-S] de enzimas dañadas por efecto oxidativo (Schwartz y col. 2000). La importancia metabólica de esta enzima queda también reflejada por su participación en la síntesis de biotina (Kiyasu y col., 2000), tionucleósidos (Lauhon y Kambampati, 2000; Mihara y col., 2002), tiamina, NAD (Lauhon y Kambampati, 2000) y selenofosfato (Lacourciere y col., 2000).

Dado que el K_2TeO_3 parece ser tóxico por ser un agente oxidante, la idea detrás de esta Tesis es que algunas proteínas claves en el metabolismo podrían perder sus centros de [Fe-S] comprometiendo la viabilidad celular. De este modo, uno de los posibles mecanismos de resistencia bacteriana a K_2TeO_3 podría estar dado por la recuperación de la actividad de proteínas esenciales que contienen centros [Fe-S]. En este sentido, la hipótesis de este trabajo es que la IscS de *G. stearothermophilus* V estaría (directa o indirectamente) involucrada en el fenómeno de resistencia a K_2TeO_3 en *E. coli*. En consecuencia, el objetivo general de esta Tesis fue caracterizar a nivel genético y molecular el gen estructural de esta enzima y determinar su participación en la resistencia a K_2TeO_3 en *E. coli*. Para concretar este objetivo general se plantearon los siguientes objetivos específicos: 1) clonar, secuenciar y caracterizar el gen que codifica para la cisteína desulfurasa (IscS) de *G. stearothermophilus* V; 2) purificar y caracterizar esta proteína, y 3) determinar si existe o no relación entre la expresión del gen *iscS* de *G.*

stearothermophilus V y la resistencia a K_2TeO_3 en *E. coli*.

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. CEPAS BACTERIANAS, PLASMIDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO.

2.1.1. *Geobacillus stearothermophilus* V.

Cepa silvestre de la colección del laboratorio, aislada según lo descrito por Vásquez (1985). El crecimiento de esta cepa se realizó en medio ATTC preparado de acuerdo a la siguiente composición en g/l: triptona, 5; extracto de levadura, 3; NaCl, 3; pH 7,0 ajustado con NaOH. Las incubaciones se realizaron a 63°C. Para crecimiento en medio sólido, se agregó agar (DIFCO) al medio (2% p/v concentración final) y las placas se incubaron toda la noche a 63°C.

2.1.2. *Escherichia coli*.

Se empleó las cepas JM109 (*endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *relA1*, *supE44*, $\Delta(lac-proAB)$, [F', *traD36*, *proA*⁺ *B*⁺, *lacI*^QZM15]) y JM109(DE3) (*endA1*, *recA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17* (r_k^- , m_k^+), *relA1*, *supE44*, $\Delta(lac-proAB)$, [F', *traD36*, *proA*⁺ *B*⁺, *lacI*

^qZM15, (DE3)) que fueron adquiridas a Promega®. Las cepas PK6311[□]Km^R (*piscS::Kan^R*) Tet^R (*zff-208::Tn10*)[□] y su isógena parental RZ4500 (MG1655/*lacZp145*) fueron donadas gentilmente por la Dra. Patricia Kiley (University of Wisconsin Medical School, USA). La cepa QC774 (*F⁻ placU169 rpsL sodA::lacZ-49 sodB::kanp2*) fue proporcionada por la Dra. Akiko Nishimura (National Institute of Genetics, Japan (<http://www.shigen.nig.ac.jp/ecoli/strain/>)). El crecimiento de estas cepas y sus derivadas se realizó en medio Luria-Bertani (LB), con la siguiente composición en g/l: triptona, 10; extracto de levadura, 5; NaCl, 5, pH 7,0 ajustado con NaOH. Las incubaciones se realizaron a 37°C con agitación. Para el crecimiento en medio sólido, se agregó agar (DIFCO) a una concentración final de 2% (p/v). Para crecimientos en presencia de K₂TeO₃, se utilizó un volumen apropiado de una solución stock estéril de K₂TeO₃ (1M) hasta alcanzar la concentración deseada. Cuando fue necesario, el medio LB se suplementó con isopropil tio-β-D-galactósido (IPTG) a una concentración final de 1mM, ampicilina (100 µg/ml), tetraciclina (10 µg/ml), kanamicina (40 µg/ml) o cloranfenicol (50 µg/ml). Las soluciones stock de antibióticos se prepararon a una concentración de 10 mg/ml y se mantuvieron a -20°C.

Los ensayos de auxotrofia se realizaron en placas con medio mínimo M9 (Na₂HPO₄·7H₂O, 50 mM; KH₂PO₄, 22 mM; NaCl, 8,5 mM; NH₄Cl, 18 mM) suplementado con glucosa (0,4%), MgSO₄ (2 mM), CaCl₂ (0,1 mM), leucina (0,01 %) y según sea el caso con tiamina (2 µg/ml) y/o ácido nicotínico (12,5 µg/ml).

2.1.3. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (MIC) de K₂TeO₃.

La menor concentración de K₂TeO₃ que inhibió el crecimiento de una cepa en particular se determinó inoculando 20 µl de cultivo bacteriano (crecido durante toda la noche) en tubos con 2 ml de medio LB que contenían concentraciones crecientes de K₂TeO₃ (en µg/ml: 0,0125; 0,025; 0,125; 0,25; 1,25; 12,5; 25 y 125). Las lecturas se realizaron después de 24 horas de incubación a 37°C con agitación.

2.1.4. Características de los plasmidios y cepas de *E. coli*.

Las características más relevantes de los plasmidios y cepas de *E. coli* empleados y generados durante la ejecución de esta Tesis se indican en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

2.2. PROCEDIMIENTOS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

2.2.1. Extracción de DNA cromosomal.

Las células de *G. stearothermophilus* V fueron crecidas en 250 ml de medio ATTC hasta una DO_{600} de 0,8. El cultivo se centrifugó a 4.500 x g durante 10 min y las células se lavaron y resuspendieron en 1 ml de Tris-HCl 20 mM, pH 8,0. Posteriormente el DNA cromosomal se extrajo de acuerdo a Ausubel y col. (1993).

2.2.2. Extracción de DNA plasmidial.

Las células de *E. coli* transformantes se crecieron en 5 ml de medio LB- ampicilina hasta alcanzar una DO_{600} de 0,8. El cultivo se centrifugó a 4.500 x g durante 10 min y las células se resuspendieron y lavaron en 1 ml de tampón Tris-HCl, 20 mM, pH 8,0. El DNA plasmidial se obtuvo empleando el kit Spin Miniprep de QIAGEN (Darmstadt, Alemania). La pureza del DNA plasmidial se estimó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE (composición en g/l: Trizma base 4,84; acetato de sodio anhidro 1,64; EDTA 0,74; pH 8,1 ajustado con ácido acético glacial).

2.2.3. Cuantificación del DNA.

La concentración de DNA fue cuantificada midiendo la DO_{260nm} . Una unidad de DO_{260nm} correspondió a 50 μ g/ml de DNA en solución. La pureza de la preparación de DNA se verificó midiendo la razón de DO_{260nm}/DO_{280nm} .

Tabla 1. Plasmidios de *E. coli* empleados y construidos en esta Tesis.

LA CISTEINA DESULFURASA (IscS) DE *Geobacillus stearothermophilus* V CONFIERE A *Escherichia coli* RESISTENCIA A TELURITO DE POTASIO

Plasmidio	Características relevantes	Referencia
pSP72	Vector de clonamiento general, 2.462 pb, sitio de clonamiento múltiple entre los promotores SP6 y T7, Amp ^R .	Promega
p2VH	Derivado de pSP72, contiene un inserto de 3.461 pb que confiere resistencia a K ₂ TeO ₃ Amp ^R .	Esta tesis
pET21b(+)	Derivado de pBR322, 25 copias/célula, 5.443 pb, vector de expresión con un promotor del fago T7, RBS de la proteína de la cápside mayor de T7, Amp ^R .	Novagen
pBluescript SK+	Vector de clonamiento general, 3.000 pb, sitio de clonamiento múltiple interrumpe gen <i>lacZ</i> , Amp ^R .	Stratagene
pJT687	Derivado de pET21b(+), lleva inserto el ORF687 en el sitio <i>NdeI/HindIII</i> , Amp ^R .	Esta tesis
pJT1200	Derivado de pET21b(+), lleva inserto el gen <i>iscS</i> en el sitio <i>NdeI/HindIII</i> , Amp ^R .	Esta tesis
pJT963	Derivado de pET21b(+), lleva inserto el ORF963 en el sitio <i>NdeI/HindIII</i> , Amp ^R .	Esta tesis
pJT1200-Pr	Derivado de pBluescript SK+, lleva inserto el gen <i>iscS</i> y su promotor en el sitio <i>HindIII</i> , Amp ^R .	Esta tesis
pJT1200(Δ90)	Derivado de pET21b(+), lleva inserto el gen <i>iscS</i> con una deleción de 90 pb en el extremo 3' en el sitio <i>NdeI/HindIII</i> , Amp ^R .	Esta tesis
pJT1200(Δ150)	Derivado de pET21b(+), lleva inserto el gen <i>iscS</i> con una deleción de 150 pb en el extremo 3' en el sitio <i>NdeI/HindIII</i> , Amp ^R .	Esta tesis
pJT1200(Δ210)	Derivado de pET21b(+), lleva inserto el gen <i>iscS</i> con una deleción de 210 pb en el extremo 3' en el sitio <i>NdeI/HindIII</i> , Amp ^R .	Esta tesis
pJT1200/K ²¹³ A	Derivado de pJT1200, lleva inserto el gen <i>iscS</i> (con una mutación que sustituye la Lys213 por Ala) en el sitio <i>NdeI/HindIII</i> , Amp ^R .	Esta tesis
pJT1200/K ²¹³ R	Derivado de pJT1200, lleva inserto el gen <i>iscS</i> (con una mutación que sustituye la Lys213 por Arg) en el sitio <i>NdeI/HindIII</i> .	Esta tesis

Tabla 2. Cepas de *E. coli* empleadas y generadas en esta Tesis.

Cepa	Características relevantes	Referencia
JM109	Huésped general, Nal^R .	Promega
JM109(DE3)	Huésped de expresión general, Nal^R .	Promega
2VH	JM109 que porta el plasmidio p2VH, Amp^R .	Esta tesis
JT687	JM109(DE3) que porta el plasmidio pJT687, Amp^R .	Esta tesis
JT1200	JM109(DE3) que porta el plasmidio pJT1200, Amp^R .	Esta tesis
JT963	JM109(DE3) que porta el plasmidio pJT963, Amp^R .	Esta tesis
JT1200Pr	JM109 que porta el plasmidio pJT1200-Pr, Amp^R .	Esta tesis
JT1200(Δ 90)	JM109(DE3) que porta el plasmidio pJT1200(Δ 90), Amp^R .	Esta tesis
JT1200(Δ 150)	JM109(DE3) que porta el plasmidio pJT1200(Δ 150), Amp^R .	Esta tesis
JT1200(Δ 210)	JM109(DE3) que porta el plasmidio pJT1200(Δ 210), Amp^R .	Esta tesis
JT1200K ²¹³ A	JM109(DE3) que porta el plasmidio pJT1200/K ²¹³ A, Amp^R .	Esta tesis
JT1200K ²¹³ R	JM109(DE3) que porta el plasmidio pJT1200/K ²¹³ R, Amp^R .	Esta tesis
RZ4500	Parental isogénica de PK6311	Patricia Kiley
PK6311	Mutante en el gen <i>iscS</i> , Km^R , Tet^R .	Patricia Kiley
QC774	Mutante doble de superóxido dismutasa.	Akiko Nishimura
PK6311/SK	PK6311, porta el plasmidio pBluescript SK+, Km^R , Tet^R , Amp^R .	Esta tesis
PK6311/1200Pr	PK6311, porta el plasmidio pJT1200-Pr, Km^R , Tet^R , Amp^R .	Esta tesis
QC774/1200Pr	QC774, porta el plasmidio pJT1200-Pr, Km^R , Cm^R , Amp^R .	Esta tesis

2.2.4. Partidores y condiciones de PCR.

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: DNA templado, 4 ng; dNTPs, 200 μM , partidores directos y reversos, 1 μM de cada uno; tampón de PCR, 10 μl y Taq Polimerasa, 2,5 unidades, ambos de Perkin-Elmer, USA. Luego de una desnaturalización a 94°C por 5 min, la amplificación se llevó a cabo por 30 ciclos a 94°C por 1 min; “annealing” del partidor a 37°C por 2 min y extensión a 72°C por 3 min. Una incubación final a 72°C por 10 min permitió una completa extensión de los fragmentos.

Los oligonucleótidos utilizados en la presente Tesis están referidos en la Tabla 3. Los sitios de restricción relevantes se muestran en **negrita**. Subrayado se indican los tripletes para introducir las sustituciones K^{213A} y K^{213R} en la enzima *IscS*.

2.2.5. Digestión de DNA con enzimas de restricción.

Las digestiones de DNA plasmidial con las enzimas *EcoRI*, *HindIII* y *NdeI* se realizaron empleando los tampones, la temperatura y el tiempo recomendados por el fabricante (New England Biolabs, USA). Para 1 µg de plasmidio se empleó 10 unidades enzimáticas en un volumen final de 20 µl. La verificación de la digestión y resolución de los fragmentos se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa como se describe en 2.2.8.

Tabla 3. Secuencia nucleotídica de los partidores utilizados en esta Tesis para la amplificación de DNA mediante PCR.

Partidor	Orientación	secuencia 5' → 3' PCR
P1	directo	GGAATTCCATATGTATAAGGATGATCAGGAAATAGA ORF687
P2	reverso	ACCCAAGCTTCTAGAGCGTGATCAGGTCTTTGT ORF687
P3	directo	GGAATTCCATATGAATCTTGAACAAATAAGAAAAGATACC ORF1200
P4	reverso	ACCCAAGCTTTCATTGCTGTCCCTCTTTCCTTAT ORF1200
P5	directo	GGAATTCCATATGAATAAATTTTTGCTTGAATCTGC ORF963
P6	reverso	ACCCAAGCTTTCATATCAGAATCTTCCCATCCT ORF963
P7	reverso	ACCCAAGCTTATCTGGCCATTTTATTGATCCTGTAT 1200-90
P8	reverso	ACCCAAGCTTATTCTATGATAATATGGTTTTCTTCCAAA 1200-150
P9	reverso	ACCCAAGCTTATACATTAAAAGGAATGATGGCCAGTC 1200-210
P10	directo	CTTGCAGCGTGCGGGAGAGCATGGCTTAGAGGTCCTGAG K213A
P11	reverso	CTCAGGACCTCTAAGCCATGCTCTCCCGCACGCTGCAAG K213A
P12	directo	CTTCCAGCGTGCGGGAGAAGATGGCTTAGAGGTCCTGAG K213R
P13	reverso	CTCAGGACCTCTAAGCCATCTTCTCCCGCACGCTGCAAG K213R
P14	directo	ACCCAAGCTTAAAACCGGGAATGGCATTAC 1200 + Promotor
P15	reverso	ACCCAAGCTTTCATTGCTGTCCCTCTTTCCTTAT 1200 + Promotor

2.2.6. Ligación del DNA.

Las ligaciones de segmentos de DNA con vectores de clonamiento o de expresión se realizó en un volumen de reacción de 20 µl finales que contenían 5 µl de fragmento amplificado (10-50 ng), 1 µl de solución de plasmidio (10 ng), 1 µl de DNA ligasa de fago T4 (3 U/µl) y 2 µl de tampón de ligación 10X, ambos de New England Biolabs, USA. La mezcla de reacción se incubó a 15°C por 2 horas. Los productos de ligación se verificaron mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% en tampón TAE. Se utilizó un volumen de 3 µl de reacción de ligación para transformar 50 µl de células competentes de las cepas de *E. coli* JM109 o JM109(DE3) como se describe en 2.2.11.

2.2.7. Purificación de fragmentos de DNA a partir de geles de agarosa.

Para recuperar fragmentos amplificados de DNA a partir de geles de agarosa se siguió el

protocolo de QIAquick Gel Extraction Kit Qiagen (Darmstadt, Alemania). Este método se basa en la escisión de la banda presente en el gel de agarosa y su solubilización en presencia de una resina que une el DNA, el que es posteriormente eluido con 50 μ l de H₂O precalentada a 65°C.

2.2.8. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

Las preparaciones de DNA cromosomal o plasmidial se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa (SeaKem, USA) al 1% o al 1,5% preparados en tampón TAE. Las muestras de DNA se mezclaron con solución de carga (azul de bromofenol 0,25 %, SDS 0,1%, glicerol 30%). Como estándar de peso molecular se utilizó una mezcla de DNA de fago λ digerido con *Hind*III y DNA de fago ϕ X174 digerido con *Hae*III. La tinción del gel se realizó por inmersión en una solución de bromuro de etidio (1 μ g/ml) durante 1 min. Las bandas se visualizaron bajo luz ultravioleta (320 nm) en un transiluminador Fotodyne, USA.

2.2.9. Clonamiento de productos de PCR.

Los productos de PCR se clonaron empleando el sistema TOPO TA Cloning (Invitrogen, USA). El método se basa en la actividad ligasa que dispone la topoisomerasa I la cual está unida covalentemente al 5' fosfato de cada hebra y liga los productos de PCR en 5 minutos a temperatura ambiente. Para orientar el clonamiento en el vector de expresión y mantener el marco de lectura, los genes clonados en pTOPO fueron digeridos con las enzimas de restricción *Nde*I y *Hind*III y ligados al vector pET21b(+) previamente digerido con las mismas enzimas como se describió anteriormente.

En el caso de clonamiento en pBluescript SK+, los insertos clonados en pTOPO se extrajeron por digestión con *Hind*III y purificados mediante el kit QIAquick PCR Purification de Qiagen (Darmstadt, Alemania). Posteriormente, éstos y el vector digerido con la misma enzima se ligaron como se describió anteriormente.

2.2.9.1. Clonamiento de los ORFs presentes en el inserto de 3.461 pb.

El DNA correspondiente a los ORFs contenidos en el inserto de 3.461 pb del plasmidio p2VH se amplificó por PCR empleando los partidores P1 a P6 (Tabla 3). Estos se diseñaron de modo que contuviesen un sitio de restricción *Nde*I en el extremo 5' y un sitio *Hind*III en el extremo 3' de los amplificados. Estos fragmentos se clonaron en el vector pET21b(+) según lo descrito anteriormente.

2.2.9.2. Generación de genes *iscS* mutados por delección en el extremo 3'.

Se obtuvo versiones mutantes del gen *iscS* de *G. stearothermophilus* V por delecciones en el extremo 3' mediante PCR. El partidor P3 (Tabla 3) es el partidor directo empleado en la amplificación del gen *iscS* y los partidores P7, P8 y P9 los partidores reversos para introducir delecciones de 90, 150 y 210 pb, respectivamente. Las condiciones de PCR fueron las mismas a las descritas en 2.2.4. Los productos de amplificación se purificaron

y clonaron como se describió en el punto anterior.

2.2.9.3. Generación de genes *iscS* mutantes por sustitución de la Lys213 por Ala o Arg.

Las mutaciones puntuales para sustituir la Lys213 por Ala (K213A) o Arg (K213R) en la *iscS* de *G. stearothermophilus* V se realizaron mediante PCR en dos etapas como se describió anteriormente (Loyola y col., 1998). Brevemente, los fragmentos 5' y 3' del gen se obtuvieron en la primera ronda de PCR utilizando los partidores P3-P11 y P10-P4 para la sustitución K213A y los partidores P3-P13 y P12-P4 para la sustitución K213R. Alícuotas de ambas reacciones se mezclaron y usaron para reconstituir el gen mutado en una segunda amplificación por PCR empleando esta vez los partidores P3 y P4. Las condiciones de PCR, purificación y clonamiento de los amplificados fueron las mismas descritas anteriormente.

2.2.10. Secuenciación de DNA.

Cuando se requirió, el DNA plasmidial fue extraído como se indicó anteriormente y fue remitido para secuenciación automática a empresas externas. Las secuencias de DNA obtenidas para las diferentes construcciones se sometieron a un análisis bioinformático con programas disponibles en Internet (ver sección 2.7 de Materiales y Métodos).

2.2.11. Transformación de *E. coli*.

Para transformar células de *E. coli* se utilizó un electroporador II (Invitrogen) con las siguientes condiciones: capacitancia, 1.800V; resistencia, 70 Ω y fuente poder a 1.500 V, 100 W y 25 mA. Se emplearon cuvetas (BIO-RAD) de 0,2 cm de separación de electrodos. Las células electrocompetentes se prepararon a partir de 1 ml de cultivo en crecimiento exponencial, el cual se lavó cuidadosamente con agua destilada fría (mantenida en hielo) por 3 veces. Se utilizó 1 μ l de DNA plasmidial (10 ng/ μ l) y 50 μ l de células competentes. Las células electroporadas fueron crecidas en 1 ml de medio LB en agitación suave durante 1 hora a 37°C. Posteriormente el cultivo se centrifugó a 4.500 x g por 3 min y las células se resuspendieron y sembraron en placas de agar LB que contenían los antibióticos apropiados.

2.2.12. Ensayo de complementación de la mutante *iscS*.

Para complementar la mutación *iscS* de la cepa PK6311 ésta se transformó con el plasmidio pJT1200-Pr (Tabla 1) como se indicó en el punto anterior. Las células transformantes se seleccionaron por la adquisición de resistencia a ampicilina, kanamicina y tetraciclina. Las características fenotípicas evaluadas en la cepa transformada fueron resistencia a K_2TeO_3 (MIC), tamaño de la colonia a las 24 horas de crecimiento en placas con agar LB, velocidad de crecimiento en medio LB y requerimientos de tiamina y de ácido nicotínico para crecer en medio mínimo M9.

2.3. EXPRESIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE PROTEÍNAS RECOMBINANTES.

2.3.1. Cinética de inducción de proteínas recombinantes.

Las células portadoras de vectores de expresión que contenían los genes de interés se crecieron en 100 ml de LB-ampicilina por 3 h o hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0,6. Luego de inducir con IPTG (1mM, concentración final) se tomaron muestras de 5 mL cada 60 min durante 7 horas. Los extractos crudos solubles y las correspondientes fracciones insolubles de las células inducidas se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturantes (SDS-PAGE) al 12 %.

2.3.2. Determinación de la estabilidad térmica de la proteína recombinante IscS.

Extractos crudos (ajustados a 5 mg/ml de proteína) de células de *E. coli* que sobreexpresaban la IscS de *G. stearothermophilus* V se incubaron por 20 minutos a diferentes temperaturas (37, 50, 60, 70 y 80°C). Las proteínas desnaturadas se separaron mediante centrifugación a 13.000 x g por 15 min y las fracciones tanto solubles como insolubles fueron resueltas mediante SDS-PAGE (12%).

2.3.3. Sobreexpresión y purificación de la IscS de *G. stearothermophilus* V.

Células de *E. coli* JT1200 fueron cultivadas en 4 litros de medio LB-ampicilina hasta una DO_{600nm} de 0,6 (aproximadamente 3 h) e indujeron con IPTG (1 mM, concentración final) por 5 h adicionales. Las células inducidas se sedimentaron a 4.500 x g por 10 min a 4°C, lavaron con tampón A (Tris-HCl 20 mM pH 8,0) y resuspendidas en el mismo tampón (a razón de 4 ml/g células). Luego fueron rotas empleando un sonicador de alta intensidad (Ultrasonic Processor model Ge 50, USA) equipado con un vástago de 3 mm en presencia de 1µg/ml de PMSF (BRL). Los restos celulares fueron eliminados por centrifugación a 13.000 x g por 15 min y el sobrenadante fue considerado el extracto crudo. Esta fracción mostró un color amarillo característico de enzimas que unen el cofactor PLP. El extracto crudo se ajustó a una concentración de 5 mg/ml de proteínas con tampón A y calentó a 70°C por 20 minutos con agitación suave y continua. Las proteínas desnaturadas se eliminaron por centrifugación a 13.000 x g por 15 min. La fracción soluble se aplicó en un sistema de columnas cromatográficas conectadas en serie. La primera consistió en AffiGel Blue (BioRad, USA, 1 ml) seguida de una columna de CM-Sepharose (2 ml) y finalmente una de DEAE-Sepharose (2 ml, ambas de

Pharmacia, Suecia). La proteína IscS no se unió a las 2 primeras resinas y fue retenida en la última columna de donde se eluyó con un gradiente lineal de NaCl (0-0,15 M) preparado en tampón A. Las fracciones que contenían la proteína purificada se adsorbieron a una columna de Bio-HTP (Bio Rad, USA, 1 ml) y luego de lavar la enzima se eluyó con un volumen de tampón fosfato de potasio 0,25 M pH 7,2. La proteína concentrada fue dializada contra tampón B (Tris-HCl 20 mM pH 8,0, glicerol 5%) y conservada a -20°C .

Los espectros de absorción de la enzima IscS purificada y de sus derivadas mutadas se realizaron en un espectrofotómetro Hewlett-Packard modelo Agilent 8453. Las soluciones contuvieron 1,5 mg/ml de proteína en tampón B.

2.3.4. Determinación de la masa molecular de la IscS nativa.

La masa molecular de la IscS fue determinada por cromatografía de exclusión molecular utilizando una columna (1 x 50 cm) de Sephadex G 100 superfine (SIGMA) equilibrada en tampón B. El volumen vacío (V_0) de la columna se determinó utilizando azul dextrano. La curva de calibración se construyó filtrando individualmente 200 μl de proteínas (2 mg/ml) de masa molecular conocida (en kDa: alcohol deshidrogenasa (ADH), 150; seroalbúmina bovina (BSA), 66; ovoalbúmina (OVA), 45; anhidrasa carbónica (ANC), 29 y citocromo C (Cit C), 12,4, todas de Sigma, USA). Para la determinación del volumen de elución de la proteína IscS nativa se cargó 200 μl de una solución de proteína purificada (8 mg/ml) en la columna y se colectó fracciones de 0,5 ml. Estas se monitorearon midiendo la DO280nm y también visualmente por la presencia del color amarillo intenso característico del PLP unido a la enzima.

2.3.5. Determinación de la masa molecular de la IscS en condiciones desnaturalantes.

La masa molecular relativa de los monómeros de la proteína se determinó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE) como se describe en detalle en el punto siguiente. La movilidad electroforética relativa de la IscS fue comparada con la de los mismos estándares descritos en el punto anterior esta vez desnaturalados.

2.3.6. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida

2.3.6.1. Geles desnaturalantes.

Se utilizó la técnica descrita por Sambrook y col. (1989), modificada para minigeles. El gel separador se preparó vertiendo 5 ml de una solución de acrilamida 12% (p/v), bisacrilamida 0,32% (p/v), Tris-HCl 0,45 M pH 8,8, SDS 0,1% (p/v), PSA 0,2% (p/v) y TEMED 0,03% (v/v), entre dos placas de vidrio (9 x 11 cm) separadas por espaciadores de 0,8 mm. Para una perfecta polimerización se agregó etanol al 70% sobre la solución

del gel. Una vez polimerizado, el etanol se retiró y la superficie se lavó con agua destilada. Luego se vertió la solución del gel concentrador, la cual consistió en una solución de acrilamida 3% (p/v), bisacrilamida 0,08% (p/v), Tris-HCl 50 mM pH 6,8, SDS 0,1% (p/v), PSA 0,05% (p/v) y TEMED 0,06% (v/v). Antes de la polimerización se colocó rápidamente una peineta para la formación de los pocillos. Las muestras se mezclaron con una solución de carga [glicerol 20% (v/v), β -mercaptoetanol 10% (v/v), SDS 5% (p/v) y azul de bromofenol 0,01% (p/v)] y se calentaron a 100°C por 1-2 minutos. El tampón de corrida fue una solución de Tris 0,025 M pH 8,3, glicina 0,02 M y SDS 0,1% (p/v). La electroforesis se realizó a 70 mA hasta que el frente del colorante alcanzó el borde inferior del gel. Luego, el gel fue teñido por inmersión en una solución de tinción (ácido acético 10% (v/v), isopropanol 25% (v/v) y azul de Coomassie 0,1% (p/v). El desteñido se llevó a cabo en una solución de ácido acético al 10% (v/v) a 60°C.

2.3.6.2. Geles nativos.

Se utilizó el método descrito por Retamal y Babul (1988) en el cual el gel separador estuvo formado por 5 ml de una solución de acrilamida 10% (p/v), bisacrilamida 0,2% (p/v), Tris-HCl 0,375 M pH 8,9, PSA 0,07% (p/v) y TEMED 0,06% (v/v). Esta solución se vertió entre dos placas de vidrio para su polimerización como se describió en el punto anterior. Luego de terminada la polimerización se removió el etanol y se agregó 2 ml de la solución del gel concentrador que contuvo acrilamida, 2,4% (p/v), bisacrilamida 0,06% (p/v), Tris-HCl 0,47 M pH 6,9, PSA 0,07% (p/v) y TEMED 0,06% (v/v). Antes de la polimerización se colocó una peineta para la formación de los pocillos. Las muestras se mezclaron con una solución de carga que contuvo glicerol 50% (v/v) y azul de bromofenol 0,01% (p/v). El tampón de corrida fue una solución de Tris-HCl 0,06% (p/v) y glicina 0,3% (p/v). La electroforesis se realizó a 10 mA a 4°C hasta que el frente del colorante alcanzó el borde inferior del gel.

2.3.7. Microsecuenciación del extremo amino terminal de la IscS.

La proteína IscS parcialmente purificada por tratamiento térmico a 70°C por 20 min se sometió a SDS-PAGE y electrotransfirió a una membrana PVDF (BIO-RAD). La membrana se lavó con agua desionizada y tiñó con azul de Coomassie G-250 preparado en metanol 50% durante 1 minuto. La membrana se destiñó con metanol 50% y secada al aire a temperatura ambiente. La banda correspondiente a la proteína IscS fue cortada de la membrana y enviada para microsecuenciación aminoterminal al Centro de Análisis de Biomoléculas de la Universidad de Chile.

2.3.8. Determinación cuantitativa de proteínas.

La concentración de proteínas se determinó empleando el kit Bio-Rad Protein AssayTM. Se utilizó seroalbúmina bovina (BSA) como estándar.

2.3.9. Ensayo de actividad cisteína desulfurasa.

La actividad de la enzima IscS se determinó mediante un ensayo que contuvo cisteína 10 mM, KCN 10 mM, Tris-HCl 50 mM pH 8,0, MgCl₂ 1 mM y 10 µg de enzima en un volumen final de 100 µl. Luego de incubar a 50°C durante 2 h se agregó 250 µl de formaldehído al 15 % y 750 µl de reactivo nitrato férrico [Fe(NO₃)₃·9H₂O 6,67% (p/v) y HNO₃ 8,67% (v/v)]. La mezcla se centrifugó a 13.000 x g por 3 min y la generación de tiocianato se determinó a 460 nm. Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que cataliza la formación de 1 nmol de KSCN/min. La actividad específica se expresó como unidades/mg de proteína.

2.3.10. Análisis inmunológico de proteínas recombinantes.

2.3.10.1. Preparación de anticuerpos anti-IscS.

El antisuero anti IscS fue preparado en ratones Roquefeller hembra de acuerdo a Harlow y Lane (1988), inoculando intraperitonealmente 100 µg de IscS purificada por SDS-PAGE. Los fragmentos de gel que contenían la proteína IscS se lavaron por 3 veces con 1 ml cada vez de solución salina fisiológica (SSF, NaCl 0,9%), finamente cortados e incubados en 0,5 ml de SSF a 4°C por 24 horas. A 100 µl de la fracción sobrenadante que contenía la IscS (1µg/µl) se agregó 1 volumen de adyuvante incompleto de Freund (Gibco-BRL) y se mezcló repetidamente con una jeringa hasta producir una emulsión estable. Se aplicaron 3 dosis de inmunización con intervalos de 10 días. Una semana después de la última inyección, la sangre se colectó e incubó por 30 min a 37°C. El suero se obtuvo mediante centrifugación a 5.000 x g por 5 min.

2.3.10.2. Electrotransferencia de proteínas.

Las proteínas purificadas se fraccionaron por SDS-PAGE (12%) y electrotransferieron a membranas de nitrocelulosa o PVDF a corriente constante (200 mA) utilizando tampón de transferencia (Tris-HCl 125 mM pH 8,8, glicina 0,1 M, SDS 0,1% p/v y metanol 20% v/v) durante 30 minutos.

2.3.10.3. Detección inmunológica de IscS.

Las fracciones proteicas que contenían IscS silvestre o sus derivadas mutantes fueron resueltas por SDS-PAGE y electrotransferidas a una membrana de nitrocelulosa como se describió en el punto anterior. La membrana fue bloqueada con leche descremada 1% (p/v) recién preparada en tampón PNK (fosfato de sodio 15 mM, NaCl 1% (p/v), KCl 0,002% (p/v) pH 7,4) durante 45 minutos. Luego se agregó el suero anti-IscS (dilución 1:2.500) y se incubó durante 45 min a temperatura ambiente y con agitación suave. Luego, la membrana fue sometida a tres lavados por 5 min cada uno con una solución de Tween 20 0,02% (v/v) preparada en PNK. A continuación se adicionó anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma) (dilución 1:10.000 en leche descremada 1% (p/v) en PNK) como anticuerpo secundario y se incubó a temperatura ambiente durante 45 min. Luego de lavar como antes, se reveló con 20 ml de una solución que contuvo tampón sustrato de la fosfatasa alcalina (Tris-HCl 0,1 M pH 9,5, NaCl 0,1 M y MgCl₂ 5

mM), NBT 0,1 mg/ml y BCIP 0,05 mg/ml, durante 10-30 min a 37°C en oscuridad. Al cabo de este tiempo, la membrana se lavó con agua destilada y se secó en papel absorbente.

La especificidad del suero anti-IscS se ensayó contra IscS pura y contra proteínas totales de *E. coli* JM109(DE3). No se observó reacción cruzada con las proteínas de *E. coli* y solo se observó una banda de reacción con la IscS de *G. stearothermophilus* V purificada. No se observaron bandas de reacción al utilizar suero preinmune.

2.3.10.4. Detección de IscS mediante Dot Blot.

La expresión del gen *iscS* de *G. stearothermophilus* V en la cepa de *E. coli* PK6311 transformada con el plasmidio pJT1200-Pr fue detectada con un ensayo de Dot Blot. Para ello se utilizó una cámara de Bio-Dot (BioRad, USA). El ensayo consistió en fijar los extractos proteicos a una membrana de nitrocelulosa instalada en la cámara. Esto se consiguió haciendo pasar por gravedad 100 µl de extracto a través de los pocillos. A continuación la membrana se bloqueó con 300 µl de BSA 1% preparada en tampón TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7,0, NaCl 0,5 M). El exceso de proteína no fijada a la membrana se retiró mediante 3 lavados sucesivos con 500 µl de una solución de Tween 20 al 0,05% (v/v) preparada en tampón TBS (TTBS). Estos lavados se aceleraron mediante succión con una bomba de vacío acoplada a la cámara. Enseguida se agregó 100 µl de anti-IscS (dilución 1:2.500). Cuando la solución atravesó completamente la membrana ésta se lavó por tres veces consecutivas con la solución TTBS como se indicó antes. Luego se agregó 100 µl de anti-IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (dilución 1:10.000). La membrana fue retirada de la cámara y el revelado se realizó como se describió en 2.3.10.3.

2.3.10.5. Electroforesis de proteínas en dos dimensiones.

Proteínas totales de G. stearothermophilus V crecido en medio ATTC en ausencia y en presencia de K_2TeO_3 fueron resueltas mediante electroforesis en dos dimensiones siguiendo la técnica descrita por O'Farrel (1975) y O'Farrel y col. (1977). La primera dimensión consistió en una electroforesis en gradiente de pH (3 a 10) en un gel de poliacrilamida. La composición del gel fue acrilamida 3,8%, bisacrilamida 0,2%, urea 9,2 M, nonidet P-40 2%, anfolitos (pH 3 a 10) 2%, PSA 0,02% y TEMED 0,014%. La mezcla se vertió dentro de capilares de vidrio de 2 mm de diámetro cubiertos en su extremo inferior con parafilm y se dejó polimerizar a temperatura ambiente por 12 horas. Se aplicó la muestra y la electroforesis se realizó a 400 V (constante) por 5 h en una cámara vertical donde el extremo superior del gel se mantuvo dentro de una solución de H_3PO_4 (10 mM) y el inferior en una solución de NaOH (20 mM). A continuación, los geles se retiraron cuidadosamente del capilar, se equilibraron durante 2 h en una solución tampón que contuvo β -mercaptoetanol 5%, glicerol 10%, SDS 2,3% y Tris-HCl 0,0625 M pH 6,8 y se sometieron a electroforesis desnaturante en una segunda dimensión (SDS-PAGE). Brevemente, el gel de la primera dimensión se fijó con agarosa al 1% sobre el gel de poliacrilamida desnaturante de la segunda dimensión y se sometió a electroforesis, tñó y destñó en las mismas condiciones descritas en 2.3.6.1.

2.4. BIOINFORMÁTICA: ANÁLISIS *IN SÍLICO* Y COMPARACIÓN DE SECUENCIAS CON BASES DE DATOS.

2.4.1. Análisis del inserto de 3.461 pb presente en el plasmidio p2VH.

La secuencia de DNA de 3.461 pb de *G. stearothermophilus* V presente en el plasmidio p2VH se analizó buscando ORFs mediante el programa ORF finder (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>). La secuencia de aminoácidos deducida de cada ORF fue comparada con las secuencias de aminoácidos de proteínas disponibles en la base de datos mediante los programas BLASTp y PSI BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Se registraron las proteínas que mostraron los mayores porcentajes de identidad (aminoácidos iguales que ocupan un mismo lugar dentro de la secuencia) y de similitud (aminoácidos diferentes pero con propiedades químicas semejantes). El diseño de partidores para las distintas construcciones se realizó con el programa Web Primer (<http://genome-www2.stanford.edu/cgi-bin/SGD/web-primer>). Cuando fue necesario, se elaboraron secuencias complementarias e invertidas con el programa REVSEQ (<http://bioweb.pasteur.fr/seqanal/interfaces/revseq.html>).

2.4.2. Análisis de la secuencia de aminoácidos deducida de la IscS.

En este análisis se empleó programas disponibles en Internet cuyas direcciones se expresan entre paréntesis. La predicción de la existencia de dominios de interacción proteína-proteína se realizó con el programa COIL-COIL Prediction (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_lupas.html) y de estructura secundaria mediante el programa Consensus Secondary Structure Prediction (http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-in/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_seccons.html)

La secuencia fue comparada con sus similares por alineamiento utilizando el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) y la visualización de dominios y residuos conservados se realizó mediante el programa BoxShade 3.21 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html).

2.4.3. Modelamiento de proteínas.

El modelo molecular de la IscS de *G. stearothermophilus* V se realizó sometiendo la secuencia aminoacídica de la proteína a un análisis con el programa Geno3D: Automatic modeling of proteins 3D structure (<http://geno3d-pbil.ibcp.fr/>) del servidor NPS@. Este programa utiliza en sus cálculos la información de proteínas similares cristalizadas y disponibles en la base de datos de Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb>).

Los códigos de acceso a las proteínas que fueron seleccionadas como templado en el modelamiento son: pdb1jf9A, pdb1kmjA, pdb1kmkA y pdb1c0nA.

2.4.4. Número de acceso a secuencias nucleotídica y aminoacídica.

El número de acceso a GenBank asignado al fragmento de DNA cromosomal conteniendo el gen *iscS* de *G. stearothermophilus* V es AF533655. El número de acceso a la secuencia aminoacídica de IscS de esta bacteria en Swiss Prot es Q8KRH8.

3. RESULTADOS

Interesados en el estudio de los mecanismos responsables de la resistencia bacteriana a K_2TeO_3 hemos aislado clones de *E. coli* JM109 que han adquirido resistencia a este tóxico luego de ser transformados con genotecas de *G. stearothermophilus* V. Particularmente y en lo que se refiere a esta Tesis se caracterizó el plasmidio recombinante p2VH, obtenido a partir de una genoteca construida utilizando la enzima *HindIII* y el vector pSP72. Este plasmidio es responsable que el huésped exhiba por lo menos 10 veces más resistencia a K_2TeO_3 que aquella observada en células no transformadas.

3.1. Subclonamiento de los ORFs presentes en el inserto de 3.461 pb que confiere resistencia a telurito de potasio en *E. coli*.

El análisis de la secuencia nucleotídica del inserto de 3.461 pb mediante el programa ORFinder indicó la presencia de tres marcos de lectura abiertos (Figura 1). El ORF1, de 687 pb, codifica para una proteína de aproximadamente 25 kDa que muestra 53% de identidad y 69% de similitud con una metalopeptidasa de *B. anthracis* A2012 (Read y col., 2002). El ORF2, de 1200 pb, codifica para una proteína de 45 kDa que exhibe 35% de

identidad y 57% de similitud con la cisteína desulfurasa (NifS) de *Methanosarcina mazei* Goe1 (Deppenmeier y col., 2002) y el ORF3, de 963 pb, especifica una proteína de 34 kDa que muestra 29% de identidad y 42% de similitud con una aminodipeptidasa de *Methanopyrus kandleri* AV19 (Slesarev y col., 2002). El contexto genético del inserto indica que estos genes no se encuentran constituyendo un operón (Figura 1). Con la finalidad de aclarar cual de estos 3 ORFs es el responsable de la resistencia a K_2TeO_3 se amplificó cada uno de ellos por PCR y se clonaron en el vector de expresión pET21b(+). Los plasmidios recombinantes obtenidos se denominaron pJT687, pJT1200 y pJT963, respectivamente (Tabla 1). La identidad de ellos fue determinada por digestión con las enzimas de restricción *HindIII* y *NdeI* liberándose los insertos del tamaño esperado (Figura 2 A). Posteriormente, estos fueron introducidos en *E. coli* JM109(DE3) generándose los clones recombinantes JT687, JT1200 y JT963 (Tabla 2). Estos clones se ensayaron para determinar su resistencia a K_2TeO_3 y solamente el clon JT1200 mostró resistencia a la sal tóxica (Tabla 4).

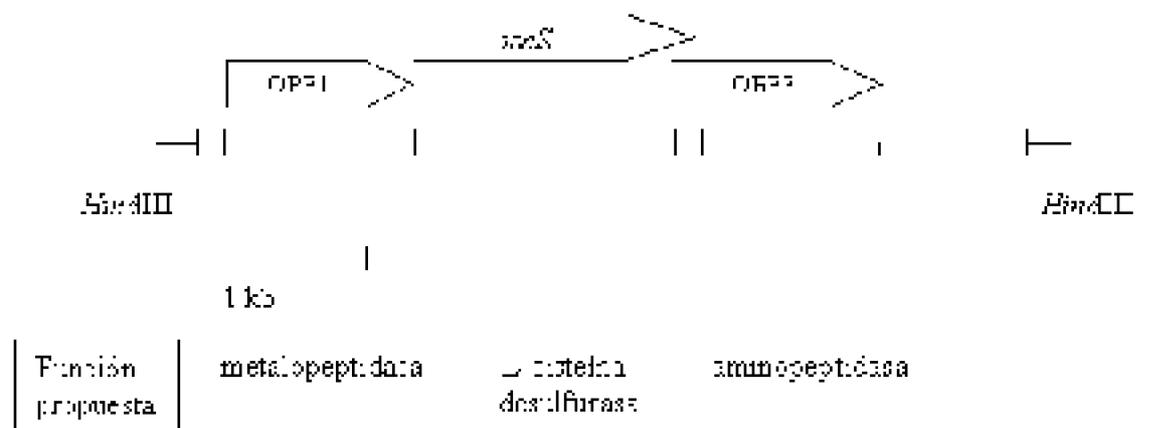
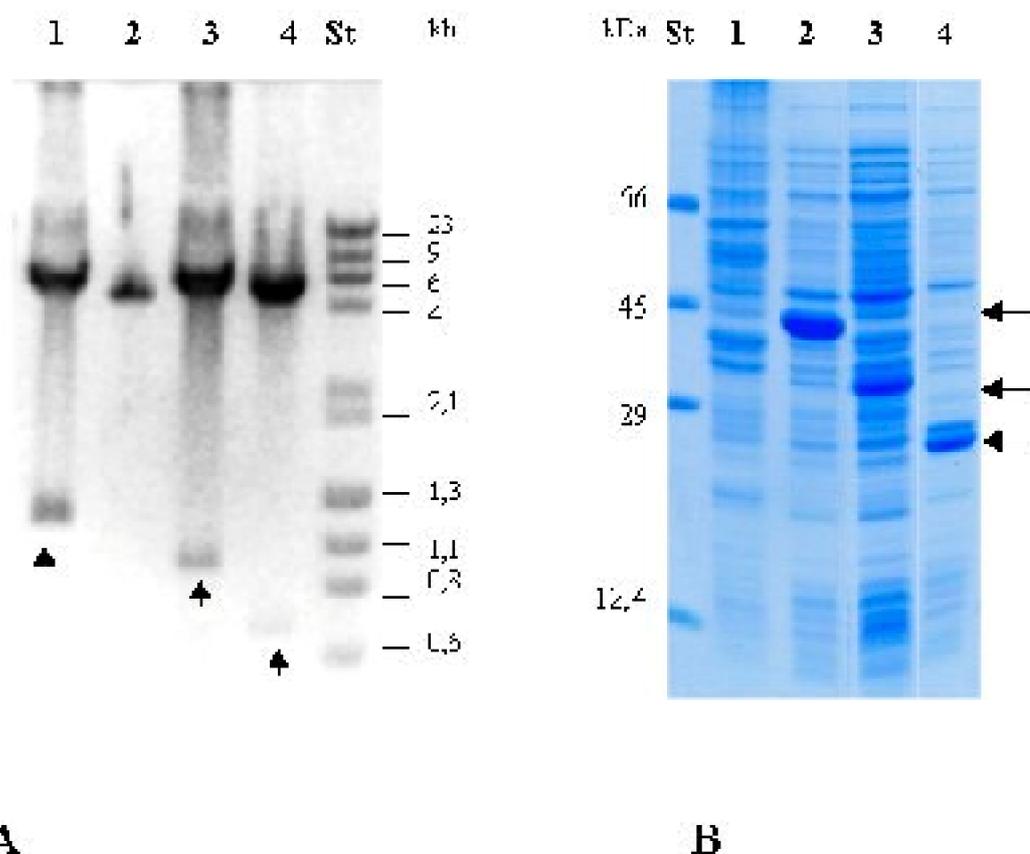


Figura 1. Representación esquemática de los ORFs identificados en el inserto *HindIII* de 3.461 pb presente en el plasmidio recombinante p2VH. Los límites de cada marco de lectura se indican con líneas verticales en la barra. Las funciones propuestas para los productos de cada gen se encuentran indicados.



A **B**

Figura 2. Clonamiento y expresión de los productos codificados por los ORFs presentes en el inserto de 3.461 pb de *G. stearothermophilus* V. **A**, electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de digestión de los plasmidios recombinantes con las enzimas *NdeI* y *HindIII*. Líneas: 1, pJT1200; 2, pET21b(+); 3, pJT963; 4, pJT687. St, estándares de peso molecular (mezcla de DNA de fago λ digerido con *HindIII* y DNA de fago \emptyset X174 digerido con *HaeIII*). Las flechas indican los insertos correspondientes. **B**, PAGE-SDS (12%) de las proteínas presentes en extractos crudos de *E. coli* JM109(DE3) transformadas con los plasmidios indicados e inducidas con IPTG (1mM). Líneas: 1, pET21b(+); 2, pJT1200; 3, pJT963 y 4, pJT687. Las flechas indican la migración de las proteínas sobreexpresadas. St, estándares de proteínas de Mr conocida en kDa (albúmina sérica bovina, 66; ovoalbúmina, 45; anhidrasa carbónica, 29 y citocromo C, 12,4).

Cepa	Plasmidio	MIC (µg/ml)
<i>E. coli</i> JM109	Ninguno	1.25
	pSP72	1.25
	p3U-rescrip.	1.25
	p2VH	1.25
	pJT1200-Isr	12.50
<i>E. coli</i> JM109 (p2VH)	Ninguno	1.25
	p3U-rescrip.	1.25
	pJT687	1.25
	pJT963	1.25
	pJT1200	12.5-25.0
	pJT1200(200)	1.25
	pJT1200(A150)	1.25
	pJT1200(22.0)	1.25
	pJT1200R ^{203A}	1.25
	pJT1200R ^{203B}	12.5
<i>E. coli</i> ER537 (p2VH)	Ninguno	0.25
	p3U-rescrip.	0.25
	pJT1200-Isr	1.25
<i>E. coli</i> BL2100	Ninguno	1.25
<i>E. coli</i> Q1574 (codA-rescrip.)	Ninguno	0.125-0.25
	pJT1200-Isr	12.5

Tabla 4. Concentraciones inhibitorias mínimas (MICs) de telurito de potasio para las cepas de *E. coli* utilizadas en esta Tesis.

3.2. Sobreexpresión de las proteínas codificadas en el inserto de p2VH.

Los clones JT687, JT1200 y JT963 fueron crecidos en LB-ampicilina y se analizó la expresión de las respectivas proteínas recombinantes luego de ser inducidas con IPTG. En los 3 casos las proteínas permanecieron en la fracción soluble y mostraron los tamaños esperados al ser analizadas por PAGE-SDS (Figura 2B).

3.3. Purificación de la IscS de *G. stearothermophilus* V.

En un intento por relacionar la actividad de esta enzima con la resistencia a K_2TeO_3 exhibida por el clon JT1200, la proteína IscS fue sobreexpresada y purificada a homogeneidad. La cinética de inducción mostró una banda principal del tamaño esperado y que el tiempo apropiado para cosechar las células es 3-5 h postinducción (Figuras 3A, 3B). Las células sedimentadas mostraron un intenso color amarillo, típico de enzimas que tienen el cofactor PLP unido.

Figura 3. Cinética de inducción de la IscS de *G. stearothermophilus* V. PAGE-SDS (12%) de las proteínas presentes en extractos crudos de cultivos de *E. coli* JT1200 cosechadas postinducción con IPTG (1 mM) a los tiempos indicados (horas). **A**, proteínas solubles. **B**, proteínas presentes en las fracciones insolubles (sedimentos) de las correspondientes muestras analizadas en **A**. La flecha indica la migración de la proteína IscS. **St**, estándares de proteínas de *Mr* conocida en kDa (albúmina sérica bovina, 66; ovoalbúmina, 45; anhidrasa carbónica, 29 y citocromo C, 12,4).

fig003.jpg

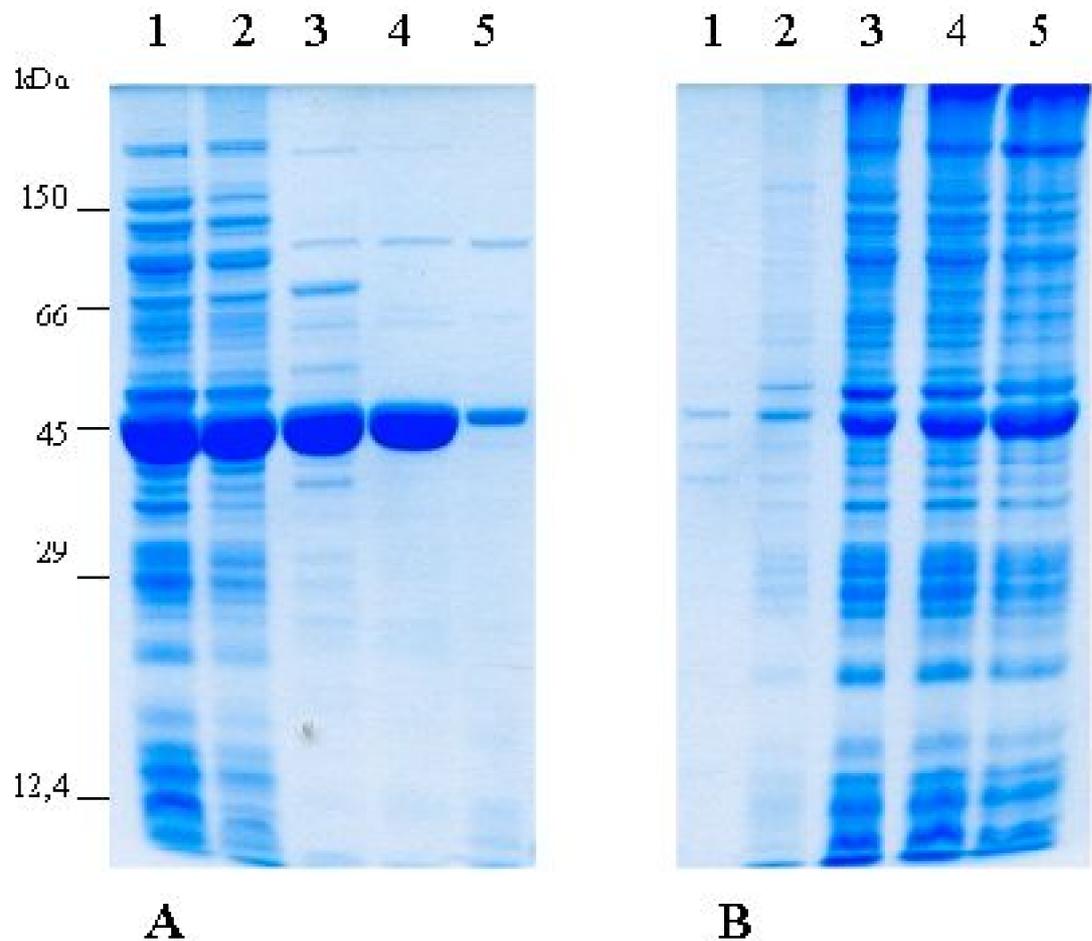


Figura 4. Efecto de la temperatura sobre las proteínas presentes en extractos crudos de *E. coli* JT1200. PAGE-SDS (12%) de las proteínas que permanecen en la fracción soluble (A) e insoluble (B) luego de calentar el extracto durante 20 min a las temperaturas indicadas (°C). Líneas: 1, 37; 2, 50; 3, 60; 4, 70 y 5, 80. A la izquierda de la figura se indica la migración de estándares de proteínas de Mr conocida (alcohol deshidrogenasa, 150; albúmina sérica bovina, 66; ovoalbúmina, 45; anhidrasa carbónica, 29 y citocromo C, 12,4).

Dada la naturaleza termofílica de *G. stearothermophilus* V (crece normalmente a 60-65°C), se aplicó un tratamiento térmico en la etapa inicial del proceso de purificación con la finalidad de eliminar el máximo posible de proteínas del huésped. De este modo, extractos crudos de células inducidas fueron calentados a diferentes temperaturas durante un tiempo definido. La proteína IscS se mantuvo en condición soluble luego de ser incubada a 70°C hasta por 20 min, desnaturalándose casi por completo a 80°C en las mismas condiciones (Figuras 4A y 4B). Las proteínas de *E. coli* desnaturaladas fueron eliminadas por centrifugación y el paso siguiente de purificación consistió en cromatografiar el sobrenadante resultante en columnas dispuestas en serie como se indicó en Materiales y Métodos, sección 2.3.3. Este procedimiento permitió finalmente obtener una preparación de IscS con un grado de pureza > 95%, a juzgar por PAGE-SDS (Figura 5A). Los pasos de la purificación de la IscS de *G. stearothermophilus* V se

resumen en la Tabla 5 en que se destaca el alto rendimiento obtenido. La proteína purificada fue sometida a PAGE-SDS, transferida a membranas de PVDF y enviada para determinar su secuencia amino terminal. Los primeros 20 aminoácidos determinados (MNLEQIRKDTPLHKKYSYIN) se correspondieron exactamente con aquellos deducidos de la secuencia nucleotídica del gen *iscS*, confirmando así la identidad de la proteína purificada.

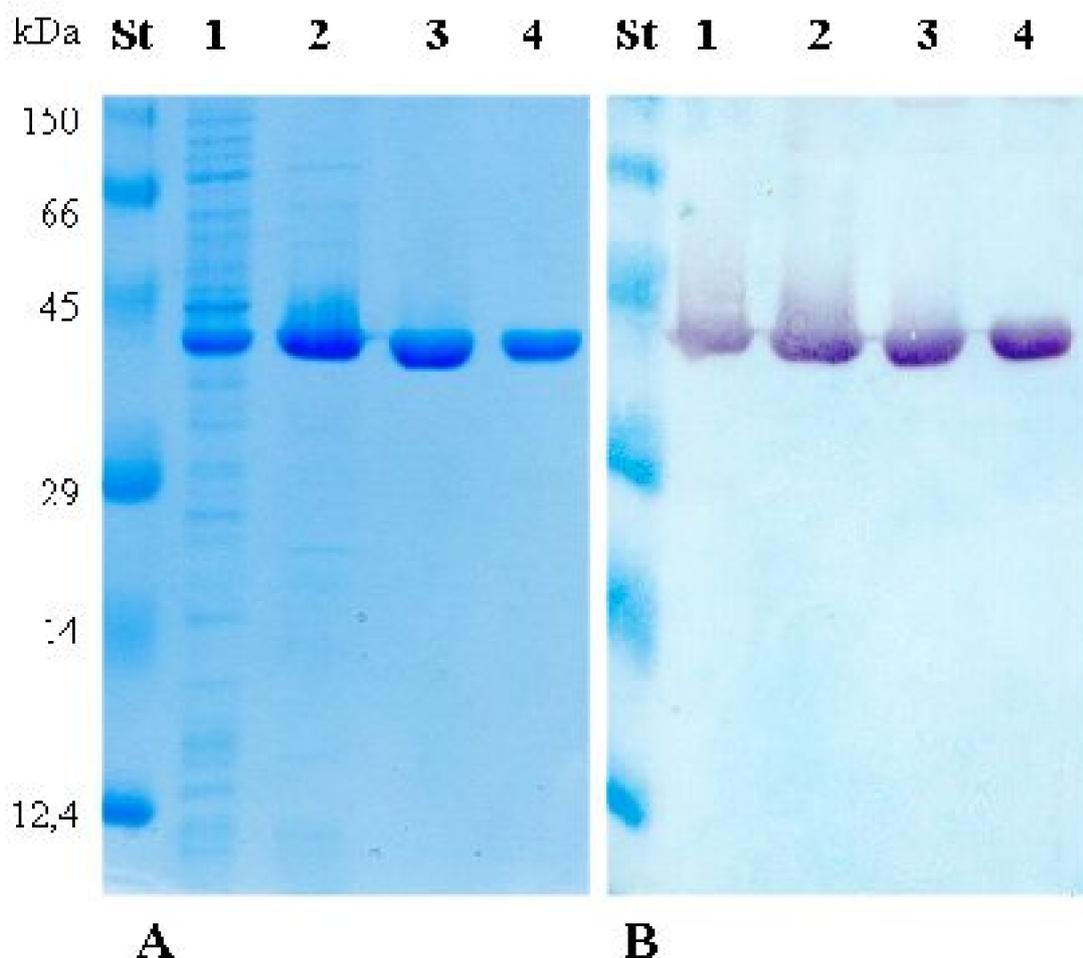


Figura 5. Purificación de la *IscS* de *G. stearotherophilus* V. Alícuotas idénticas de las diferentes fracciones obtenidas durante el proceso de purificación fueron sometidas por duplicado a PAGE-SDS (12%). **A**, gel teñido con azul de Coomassie. **B**, Western blot utilizando anticuerpos anti-*IscS* de *G. stearotherophilus* V. Líneas: **1**, extracto crudo; **2**, fracción tratada a 70°C por 20 min.; **3**, fracción purificada por cromatografía en columna (ver Materiales y Métodos, sección 2.3.3) y **4**, fracción concentrada en BioHTP. **St**, estándares de proteínas de M_r conocida en kDa (alcohol deshidrogenasa, 150; albúmina sérica bovina, 66; ovoalbúmina, 45; anhidrasa carbónica, 29 y citocromo C, 12,4).

Fración	Vol. (ml)	Prot. (mg)	Activ. (U)	Activ. Espec. (U/mg Prot.)	Rec. dim. (%)	Purif. (veces)
Extracto crudo	14,0	275	38,2	0,16	100	1,0
Tratado 70°C	30,5	76	45,3	0,60	120	4,3
Columnas* cromatográficas	3,5	20	35,0	1,25	92	8,5

* AffiGel Blue, CM-Sepharose, DEAE Sepharose, Bio IFF
U: unidades ESCN/min.

Tabla 5. Purificación de la IscS de *G. stearothermophilus* V.

Con la finalidad de contar con una herramienta adicional en el estudio estructural de la IscS se preparó anticuerpos policlonales anti-IscS de *G. stearothermophilus* V según se describió en Materiales y Métodos, sección 2.3.10.1. Estos fueron producidos en ratones a los que se inoculó IscS purificada por vía intraperitoneal. En 30 días se obtuvo un buen título de anticuerpos anti-IscS que en ensayos de Western blot mostraron sólo una banda de reacción (Figura 5B).

3.4. Caracterización física de la IscS.

Aparte de la banda de absorción característica a 280 nm, el espectro UV-visible de la IscS purificada muestra una banda a 421 nm correspondiente al PLP unido a la enzima (Figura 6). Similarmente a las desulfurasas de otros microorganismos la IscS de *G. stearothermophilus* V en su forma nativa es un homodímero. Una masa molecular relativa de aproximadamente 95 kDa fue estimada para el dímero por cromatografía de exclusión molecular (Figura 7), la que concuerda con la del monómero (45 kDa, Figura 5A).

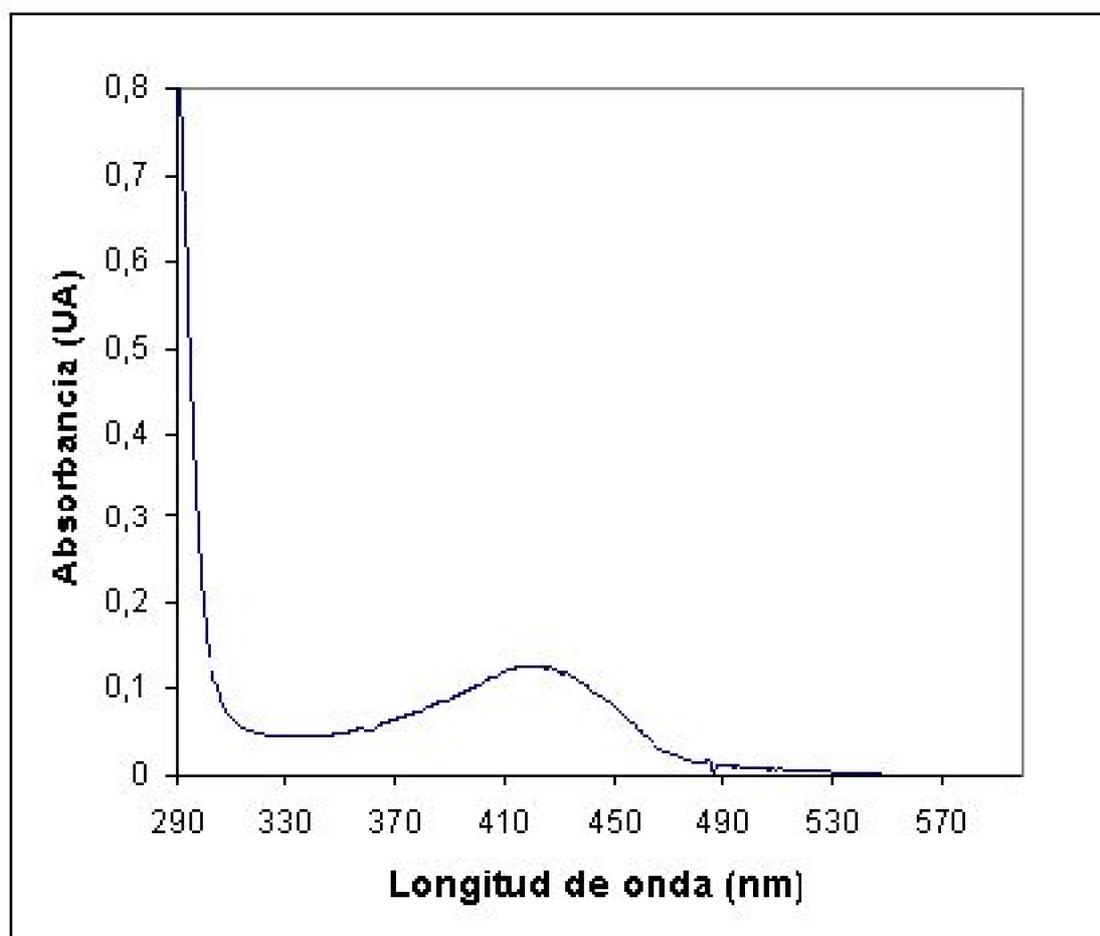
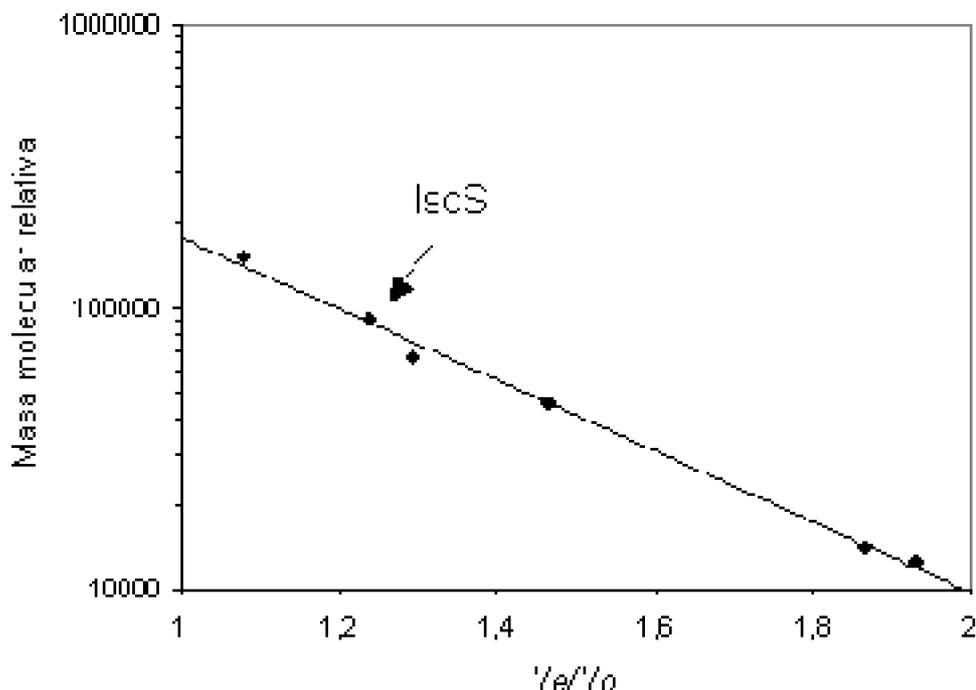


Figura 6 .Espectro de absorción UV-visible de la IscS de *G. stearothermophilus* V. La solución de enzima (1,5 mg/ml) en Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, glicerol 5% fue analizada como se describió en Materiales y Métodos, sección 2.3.3.



3.5. Clonamiento del gen *iscS* de *G. stearothermophilus* V con su región promotora y transformación de cepas de *E. coli* deficientes en los genes *iscS* y *sodA**sodB*.

En la región río arriba del gen *iscS* de *G. stearothermophilus* V se identificó secuencias -10 y -35 conservadas, un potencial sitio de unión al ribosoma y dos secuencias repetidas directas separadas por 14 pb que podrían constituir sitios regulatorios (Figura 8). Teniendo en cuenta esta información, se diseñó partidores apropiados para amplificar por PCR el ORF1200 incluyendo la región referida más arriba (partidores P14 y P15, Tabla 3, Figura 9). El fragmento amplificado fue clonado en el vector pBluescript SK+ como se indicó en Materiales y Métodos, sección 2.2.9, e introducido en *E. coli* JM109 para generar el clon JT1200-Pr (Tabla 2). Determinaciones de MIC indicaron que este plasmidio confiere resistencia a K_2TeO_3 en el nuevo huésped (Tabla 4).

```

.....550  gttttatcgggggacatcgaagcactcctacatcctcggcagcctcaacacgctgggtgct
601  caaaccacgggwtgggctttcctcctcgtttgacacgggwtcttcaacttctcagggtcaggcgggtg
661  cccgggctcgaagcctcctcttggctgattcctggcaaatgggctctatcctcctttcggatgctctctc
      -35      TAC      -10
721  caaaagacctgatcaccgctctcagggagggatcaggcaatcgaatcttgcacaaatcagcaaaa
      M N L E O I R K      8
781  gataccctcggcttcacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacacac
      D T T L H K K Y S Y I N T A A A S P P P      28
841  cagcaagcttgcctgacaccaatgaccgattaccctgcaaaaccacagcctcagtttggggccacac
      C O V V D A H T D Y L O K T A S L C P Y      18
901  ttgcctcggctttcggcaagagacatctatgcaacaggtcgtatgcaatctcgggaaaactggca
      L P A P R K E I Y A K V D E I A C K V A      58
961  gaattctataggtgcaagttcc 961 ...
      E T I G A S S 75 ...

```

Figura 8. Secuencia nucleotídica de la región río arriba del gen *iscS* de *G. stearothermophilus* V. Las regiones en que se encuentran secuencias repetidas directas se muestran carácter cursivo y subrayas con flechas. Las regiones de unión de la RNA polimerasa -10 y -35 están indicadas en negrita. En un recuadro y en carácter cursivo se muestra el sitio de unión al ribosoma. La figura muestra solamente la secuencia nucleotídica inicial del marco de lectura (en azul) junto a la correspondiente secuencia de aminoácidos deducida (en mayúsculas).

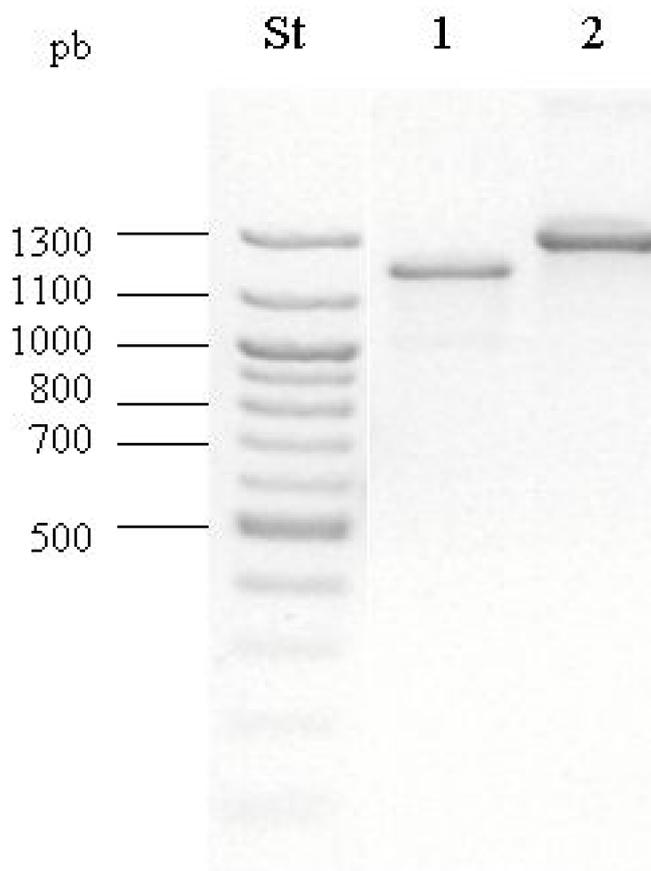


Figura 9. Amplificación del gen *iscS* de *G. stearothermophilus* V sin y con su región promotora. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa (1,5%). Líneas: 1, gen *iscS* (1.217 pb); 2, gen *iscS* con su región río arriba (1.375 pb). A la izquierda de la figura se indica la migración de estándares de masa molecular conocida (escala de 100 pb, New England BioLabs, USA).

El mismo plasmidio pJT1200-Pr fue utilizado para demostrar la actividad de la IscS de *G. stearothermophilus* V *in vivo* al complementar una cepa deficiente en el gen *iscS*. La introducción de pJT1200-Pr en *E. coli* (*iscS*⁻) resultó en la restitución parcial del fenotipo de crecimiento lento que exhibe esta cepa (Figuras 10 y 11B), en la adquisición de resistencia a K₂TeO₃ (la cepa PK6311 es hipersensible a este tóxico, Tabla 4) y en la complementación del requerimiento de tiamina pero no de ácido nicotínico de esta mutante *iscS*⁻.

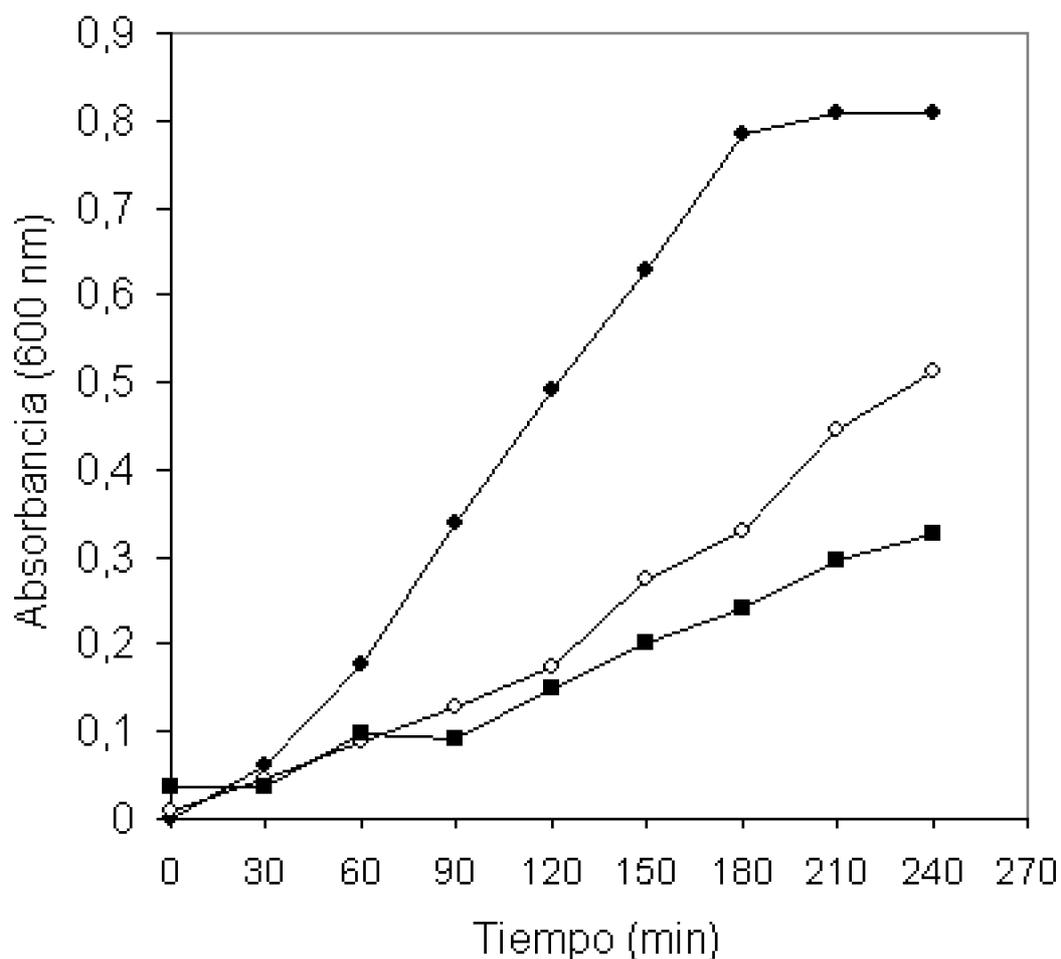


Figura 10. Complementación de la mutación *iscS*⁻ de *E. coli* PK6311 con el gen *iscS* de *G. stearothermophilus* V. Las células fueron cultivadas en medio LB a 37°C como se describió en Materiales y Métodos, sección 2.1.2. Símbolos: ●, *E. coli* RZ4500 (*iscS*⁺); ○, *E. coli* PK6311 (*iscS*⁻) que porta el plasmidio pJT1200-Pr; ■, *E. coli* PK6311 (*iscS*⁻).

Dado que el vector pBluescript no es un vector de expresión, la presencia física de la enzima IscS en extractos crudos de las cepas transformadas con pJT1200-Pr fue demostrada por Dot blot utilizando anticuerpos anti-IscS de *G. stearothermophilus* V (Figura 12).

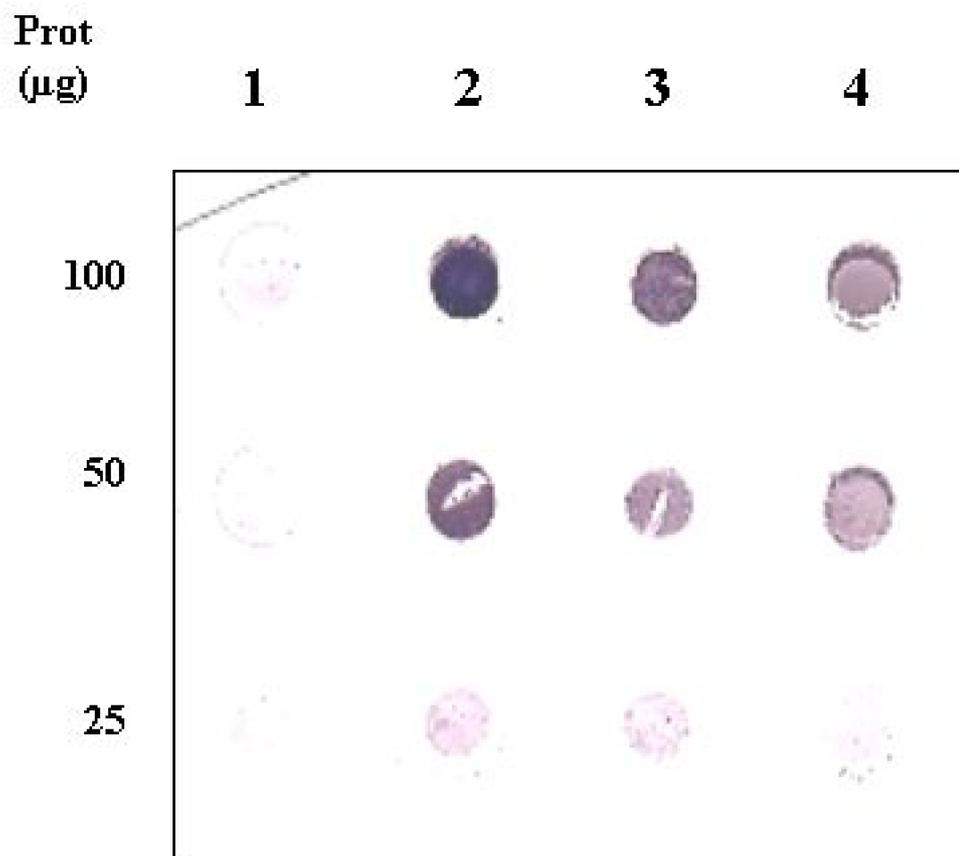


Figura 12. Inmunodeterminación de la expresión del gen *iscS* de *G. stearotherophilus* V. Extractos crudos obtenidos de las células de *E. coli* indicadas fueron fijados a una membrana de nitrocelulosa y revelados por Dot Blot como se indicó en Materiales y Métodos, sección 2.3.10.4. Líneas: 1, PK6311 (control); 2, JT1200; 3, PK6311/1200-Pr; 4, PK6311/1200-Pr crecida en presencia de K_2TeO_3 . A la izquierda de la figura se indica la cantidad de proteína de cada extracto (en μg) que fue depositada en cada pocillo.

Por otro lado, cuando el plasmidio pJT1200-Pr se introdujo en *E. coli* QC774, mutante en los genes de superóxido dismutasa e hipersensible a K_2TeO_3 , los transformantes también adquirieron resistencia al tóxico (Tabla 4).

3.6. Mutagénesis del gen *iscS* de *G. stearotherophilus* V.

Con la finalidad de relacionar la actividad de la enzima IscS con la resistencia a K_2TeO_3 observada se transformó células de *E. coli* con plasmidios que llevaban versiones mutantes de la enzima IscS. El diseño de estas mutaciones tuvo su asiento en el análisis bioinformático de la secuencia de aminoácidos deducida del ORF1200.

La utilización del programa COIL-COIL predijo que la secuencia de aminoácidos NTKEEIERAVDLIKTL ubicada en el extremo carboxilo terminal de la proteína podría estar involucrada en interacciones proteína-proteína y probablemente entonces en la formación del homodímero. De acuerdo a la potencial estructura secundaria de la IscS de *G. stearothermophilus* V determinada mediante el programa Consensus Secondary Structure Prediction, este dominio correspondería a la última alfa-hélice de la proteína (Figura 13).

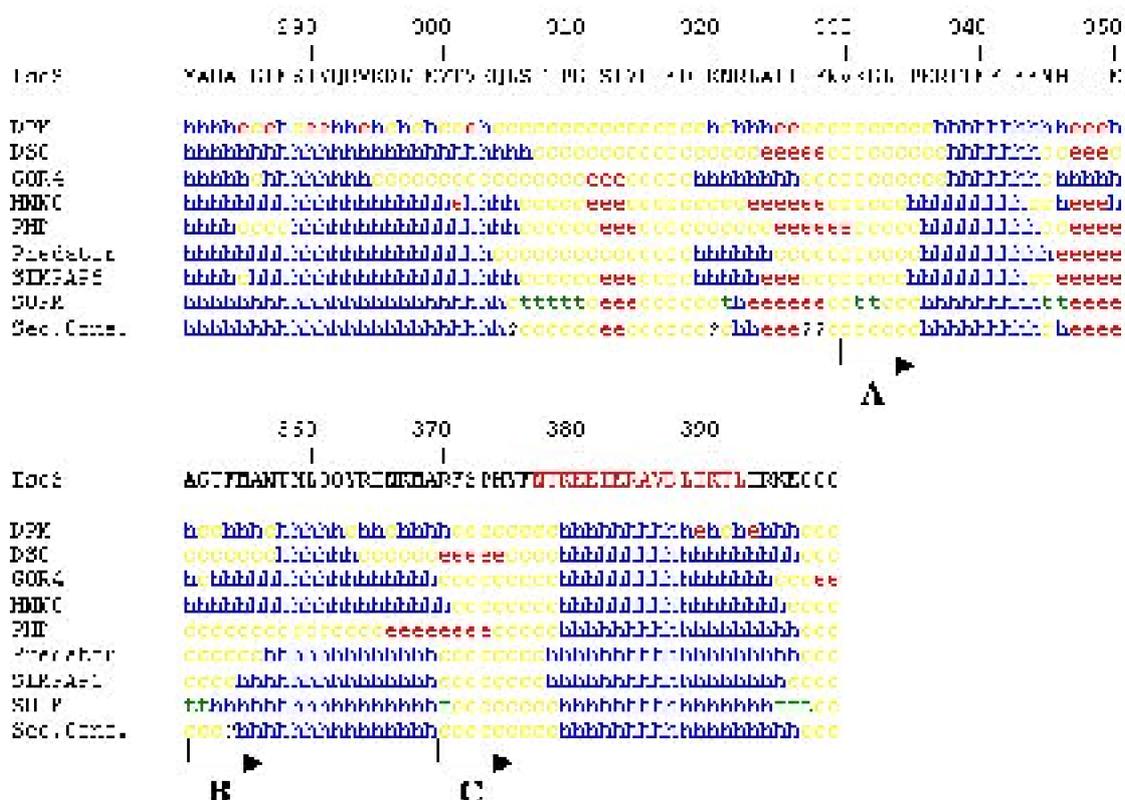


Figura 13. Estructura secundaria predicha del extremo carboxilo terminal de la proteína IscS de *G. stearothermophilus* V (longitud total de la secuencia 399 aa). Los residuos posiblemente involucrados en interacciones proteína-proteína se indican en rojo en la secuencia de aminoácidos (residuos N³⁷⁷ → L³⁹²). Las regiones indicadas son: h, alfa hélice; e, cadena extendida; t, vuelta beta; c, enrollamiento al azar;?, no definido. Los programas utilizados para generar esta secuencia consenso se muestran a la izquierda de la figura. Las flechas A, B y C representan los residuos eliminados en las mutaciones por delección de 210, 150 y 90 pb del gen *iscS*, respectivamente.

Con esta información se construyeron versiones mutantes del gen *iscS* de *G. stearothermophilus* V a las que se deletó 90, 150 y 210 pb de su extremo 3'. Los fragmentos de DNA amplificados fueron clonados en el vector pET21b(+) generando los plasmidios recombinantes pJT1200(Δ 90), pJT1200(Δ 150) y pJT1200(Δ 210), respectivamente (Tabla 1). Luego de identificarlos por digestión con las enzimas de restricción *Nde*I y *Hind*III (Figura 14A) estos plasmidios fueron introducidos en *E. coli* JM109(DE3) donde dirigieron la síntesis de las esperadas versiones truncas de la IscS (Figura 14B), identificadas a su vez utilizando anticuerpos anti-IscS (Figura 14C). Un aspecto común observado en los tres clones fue la ausencia del color amarillo típico de las células que expresan la IscS silvestre, sugiriendo que estas versiones truncas de la enzima son incapaces de ligar el cofactor. Intentos de purificación de estas proteínas se vieron además dificultados debido a que se encuentran principalmente en la fracción insoluble (Figura 15). Como se esperaba, estos clones resultaron sensibles a K_2TeO_3 (Tabla 4).

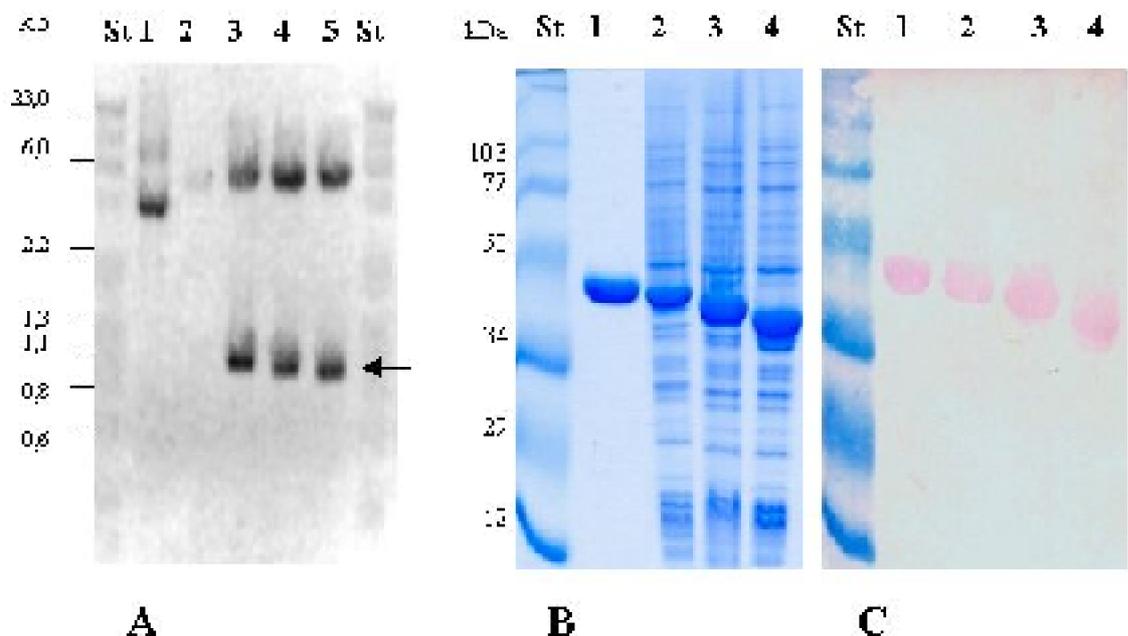


Figura 14. Mutagénesis del gen *iscS* de *G. stearothermophilus* V por delección del extremo 3'. **A**, electroforesis en gel de agarosa (1%) de los productos de digestión de los plasmidios indicados con las enzimas *Nde*I/*Hind*III. Líneas: **2**, pJT1200; **3**, pJT1200(Δ 90); **4**, pJT1200(Δ 150); **5**, pJT1200(Δ 210); **St**, estándares de peso molecular (mezcla de DNA de fago λ digerido con *Hind*III y DNA de fago ϕ X174 digerido con *Hae*III). El carril **1** contiene pJT1200 sin digerir. La flecha indica la migración de los insertos. **B**, PAGE-SDS de las proteínas totales de células de *E. coli* JM109(DE3) inducidas que portan los plasmidios recombinantes indicados que contienen versiones truncas del gen *iscS*. Líneas: **2**, pJT1200(Δ 90); **3**, pJT1200(Δ 150) y **4**, pJT1200(Δ 210). La línea **1** contiene IscS silvestre purificada. El gel se encuentra teñido con azul de Coomassie. **C**, muestras idénticas fueron fraccionadas como en **B**, electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa y analizadas por Western blot utilizando anticuerpos anti-IscS. **St**, proteínas preteñidas de Mr conocida (indicada en kDa) utilizadas empleadas como estándar (low range, BioRad, USA).

Figura 17. Modelo molecular de la IscS silvestre de *G. stearothermophilus* V. **A**, vista del monómero. **B**, ubicación de los residuos de Lys213 y Lys 320. El modelo fue construido utilizando el programa Geno3D.

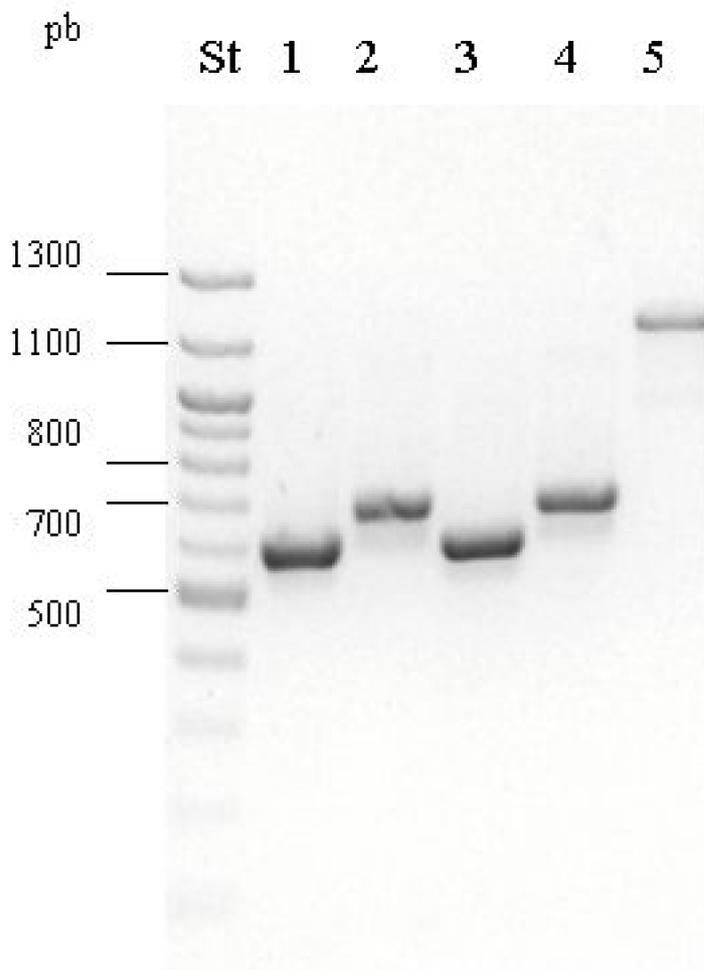


Figura 18. Mutagénesis sitio dirigida del residuo Lys213 de la IscS de *G. stearothermophilus* V. Electroforesis en gel de agarosa (1.5%) de los productos de amplificación de la primera etapa de PCR para sustituir la Lys213 por Ala o Arg. Líneas: **1** y **2**, amplificados de 592 pb y 667 pb para sustituir Lys213 por A, respectivamente; **3** y **4**, amplificados de 592 pb y 667 pb para sustituir K213 por R, respectivamente; **5**, control de amplificación del gen *iscS* silvestre. **St**, estándares de masa molecular conocida (New England BioLabs, USA).

Los plasmidios recombinantes obtenidos (pJT1200/K²¹³A y pJT1200/K²¹³R, Tabla 1) fueron introducidos en *E. coli* JM109(DE3) generándose los clones JT1200K²¹³A y JT1200K²¹³R (Tabla 2). Como se esperaba, la solución de enzima IscS/K²¹³A (purificada a homogeneidad, Figura 19) no mostró el color amarillo clásico de la silvestre, sugiriendo incapacidad de unir el cofactor. Esto quedó confirmado al analizar su espectro UV-visible, en que la banda de absorción a 421 nm está claramente ausente (Figura 20).

Aun cuando la enzima purificada conservó su estructura dimérica (Figura 21), ésta resultó inactiva *in vitro* (Figura 22). La enzima tampoco sería activa *in vivo*, a juzgar por la sensibilidad a K_2TeO_3 que mostró el clon que expresa la IscS/K²¹³A (Tabla 4). Una observación adicional es que –comparada con la enzima silvestre– la IscS/K²¹³A presentó una mayor sensibilidad a la temperatura, debiendo omitirse la etapa inicial a 70°C durante su purificación (ver Materiales y Métodos, sección 2.3.3 y Figura 23).

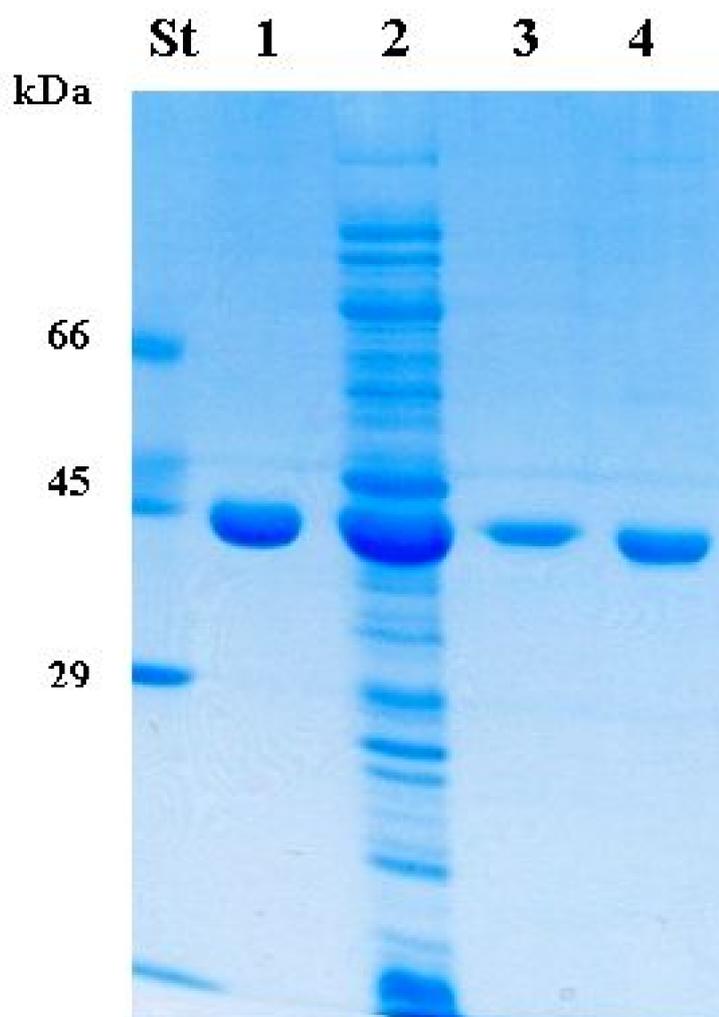


Figura 19. Purificación de la enzima mutante IscS/K213A. PAGE-SDS (12%) de las proteínas contenidas en las diferentes fracciones obtenidas durante la purificación. Líneas: **2**, extracto crudo de *E. coli* JT1200K213A inducido con IPTG (1 mM) (75 µg); **3**, fracción DEAE-Sepharose (2 µg); **4**, IscS/K213A concentrada en BioHTP (5 µg). El carril **1** contiene IscS silvestre (12,5 µg). **St**, estándares de proteínas de Mr conocida en kDa (albúmina sérica bovina, 66; ovoalbúmina, 45; anhidrasa carbónica, 29).

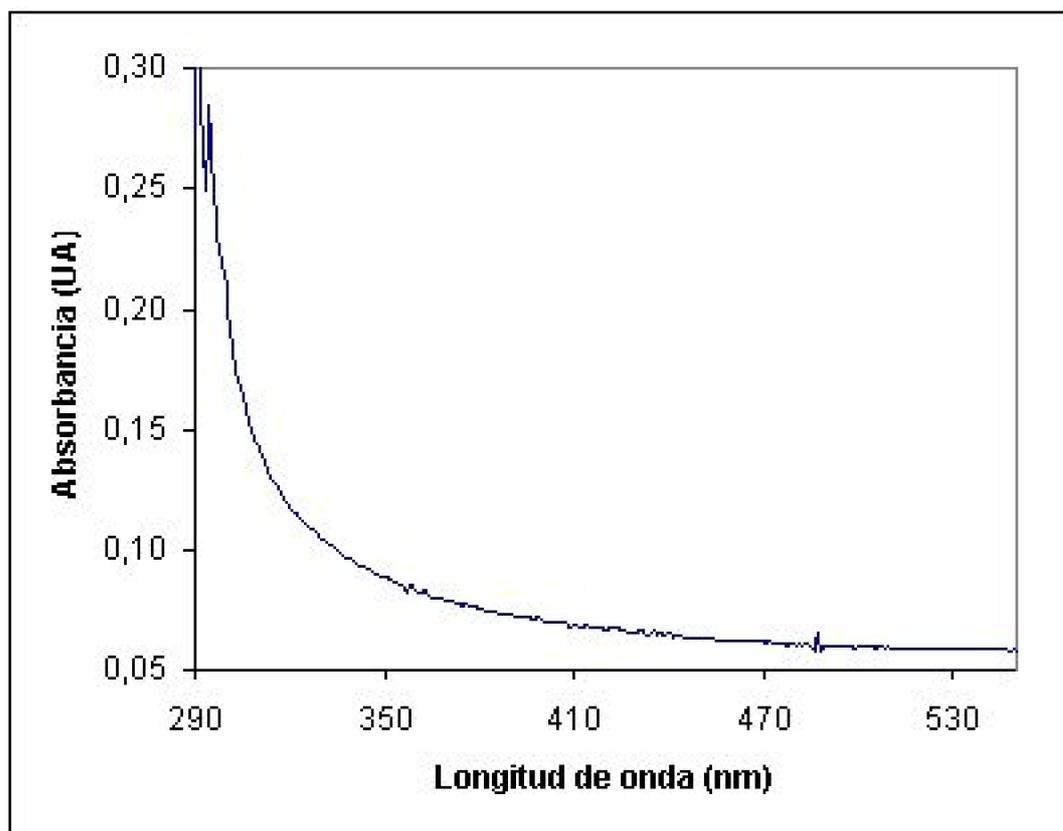


Figura 20. Espectro de absorción UV-Visible de la enzima mutante *IscS/K213A* purificada. La solución de proteína (1 mg/ml) en Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, glicerol 5% fue analizada como se describió en *Materiales y Métodos*, sección 2.3.3.

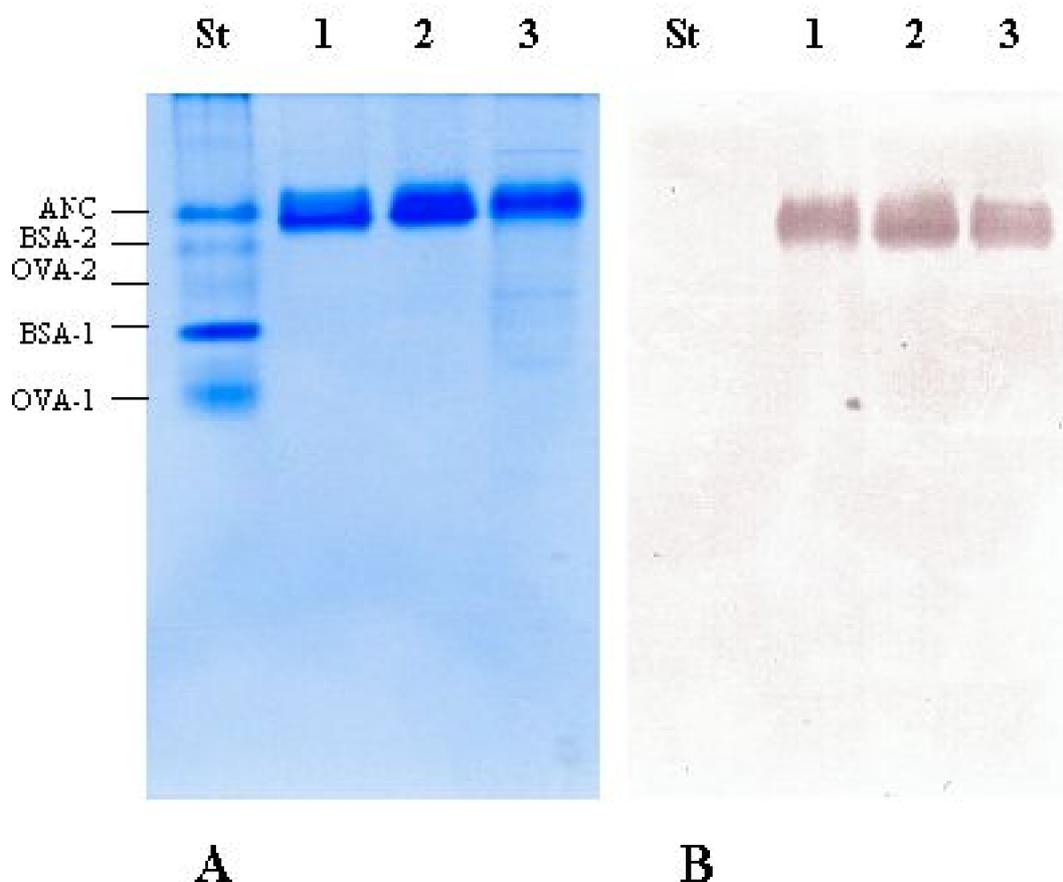


Figura 21. Estructura cuaternaria de las enzimas IscS silvestre (1), IscS/K213R (2) y IscS/K213A (3). **A**, PAGE en condiciones no desnaturalantes. **B**, Western blot de un gel idéntico a A utilizando anticuerpos anti-IscS de *G. stearothermophilus* V. **St**, migración de proteínas estándar de Mr conocida indicadas a la izquierda de la figura (ANC, anhidrasa carbónica; BSA-1, monómero de albúmina sérica bovina; BSA-2 dímero de albúmina sérica bovina; OVA-1, monómero de ovoalbúmina; OVA-2, dímero de ovoalbúmina).

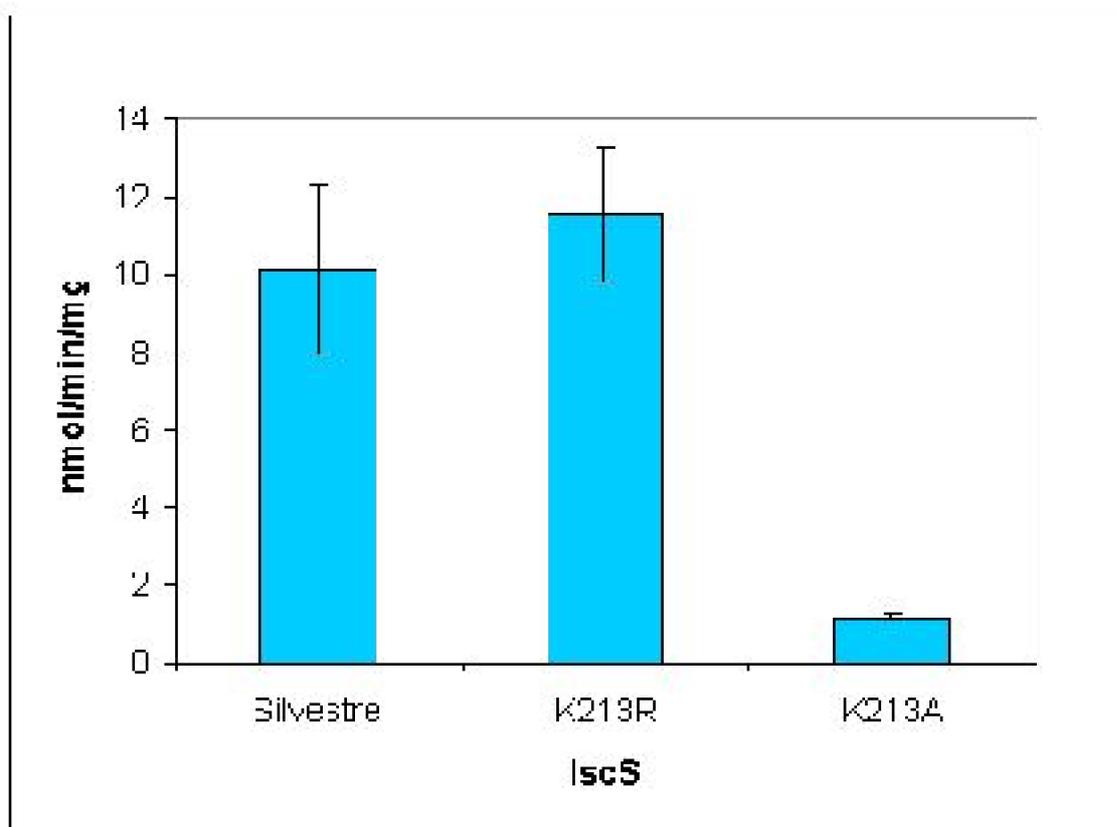


Figura 22. Determinación de la actividad cisteína desulfurasa de enzimas IscS purificadas. La actividad se expresa en unidades específicas (nmoles de KSCN generados por minuto a 50°C por mg de proteína). Las barras corresponden a la desviación estándar.

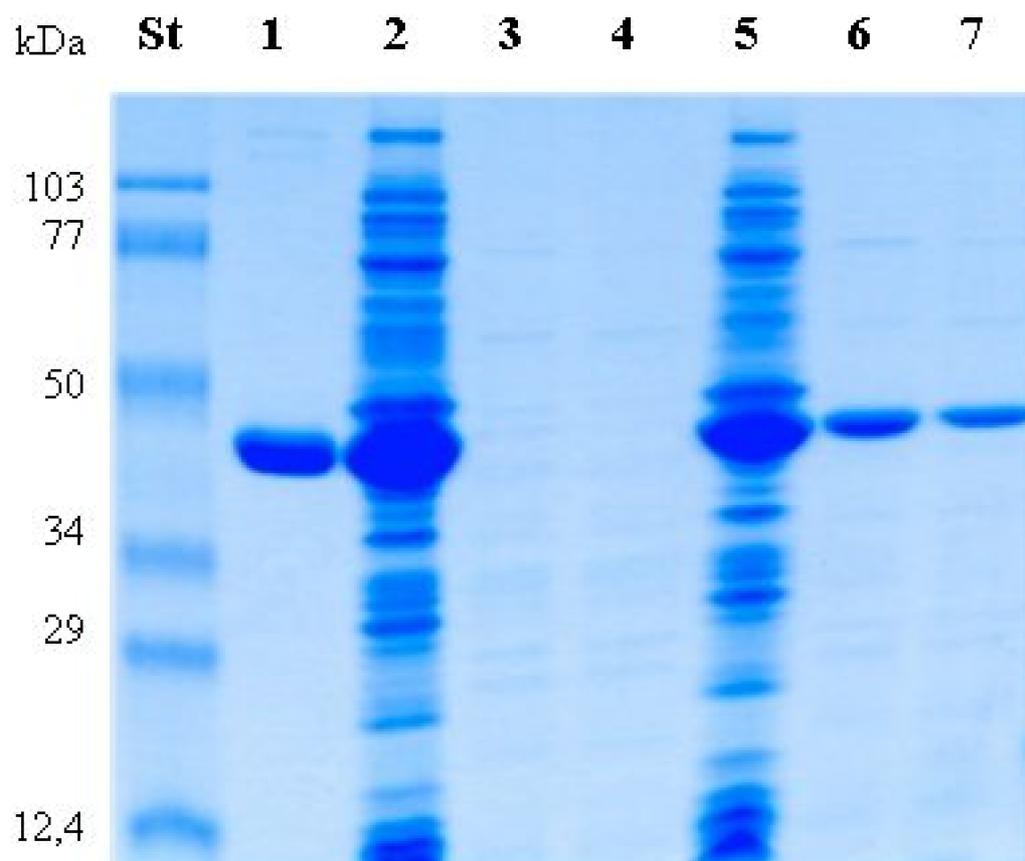


Figura 23. Efecto de la temperatura sobre las *IscS* mutantes *IscS/K213A* e *IscS/K213R*. PAGE-SDS (12%) de las proteínas que permanecen en la fracción soluble en extractos crudos de *E. coli* JT1200K213A (carriles 2-4) y *E. coli* JT1200K213R (carriles 5-7) luego de ser tratados a 37°C (carriles 2 y 5) y a 70°C por 10 min (carriles 3 y 6) o 20 min (carriles 4 y 7). La línea 1 es un control de *IscS* silvestre. **St**, proteínas de *Mr* conocida (low range, BioRad, USA).

Sorprendentemente y a diferencia de lo que ocurre con la sustitución K213→A, la solución de enzima *IscS/K²¹³R* purificada (Figura 24) retuvo un intenso color amarillo. Esto sugiere que esta mutación no altera la capacidad de la enzima para unir el cofactor, lo que está de acuerdo con el espectro UV-visible que es muy similar al de la enzima silvestre. La banda a 421 nm correspondiente a la absorción de la coenzima es claramente visible (Figura 25). La estructura cuaternaria de esta enzima mutante es también homodimérica (Figura 21) y a diferencia de la *IscS/K²¹³A* muestra una estabilidad a 70°C similar a la silvestre (Figura 23) y es activa *in vitro* (Figura 22). Adicionalmente el clon que expresa esta *IscS/K²¹³R* resultó ser resistente a K_2TeO_3 (Tabla 4), sugiriendo de nuevo que existe una relación directa entre actividad de cisteína desulfurasa y resistencia a K_2TeO_3 .

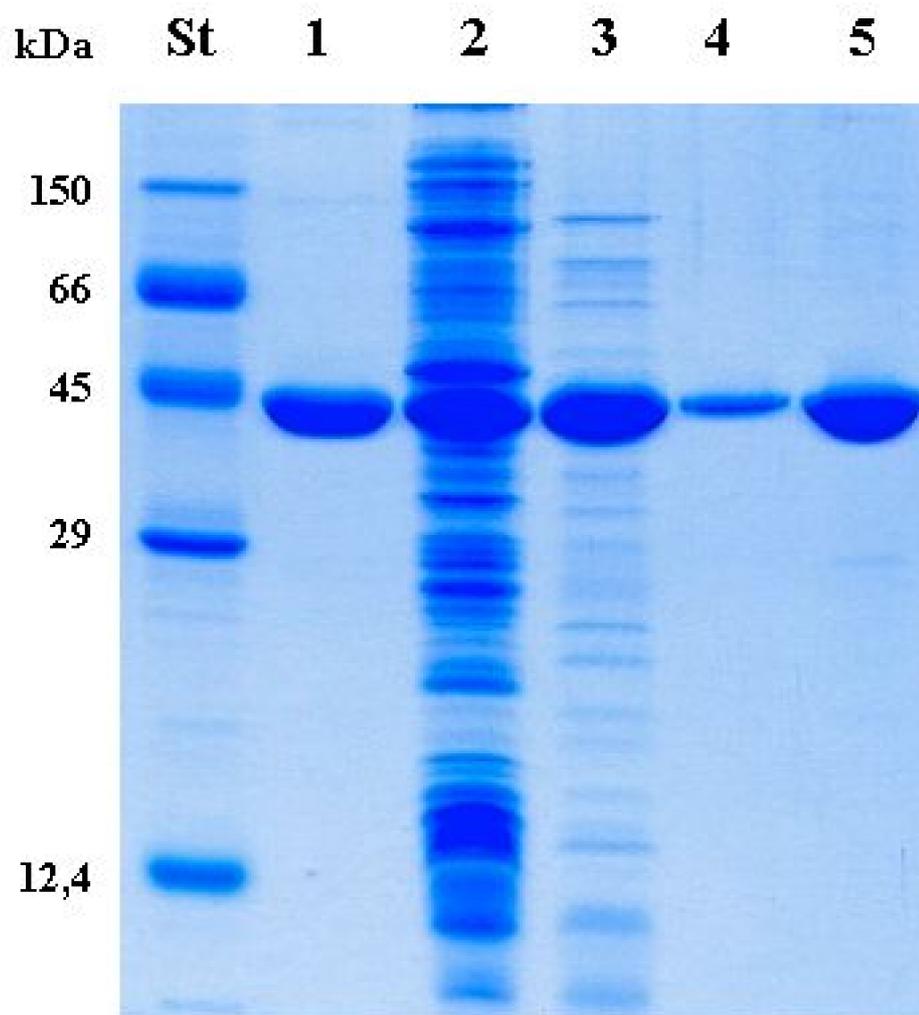


Figura 24. Purificación de la enzima mutante *IscS/K213R*. PAGE-SDS (12%) de las proteínas contenidas en las diferentes fracciones obtenidas durante la purificación. Líneas: **2**, extracto crudo de *E. coli* JT1200K213R inducido con IPTG (1 mM) (100 μ g); **3**, extracto crudo de JT1200K213R tratado a 70° por 10 min (25 μ g); **4**, fracción DEAE-Sepharose (2 μ g); **5**, *IscS/K213R* concentrada en BioHTP (14 μ g). El carril **1** contiene *IscS* silvestre (12,5 μ g). **St**, estándares de proteínas de Mr conocida en kDa (albúmina sérica bovina, 66; ovoalbúmina, 45; anhidrasa carbónica, 29; citC, 12,4).

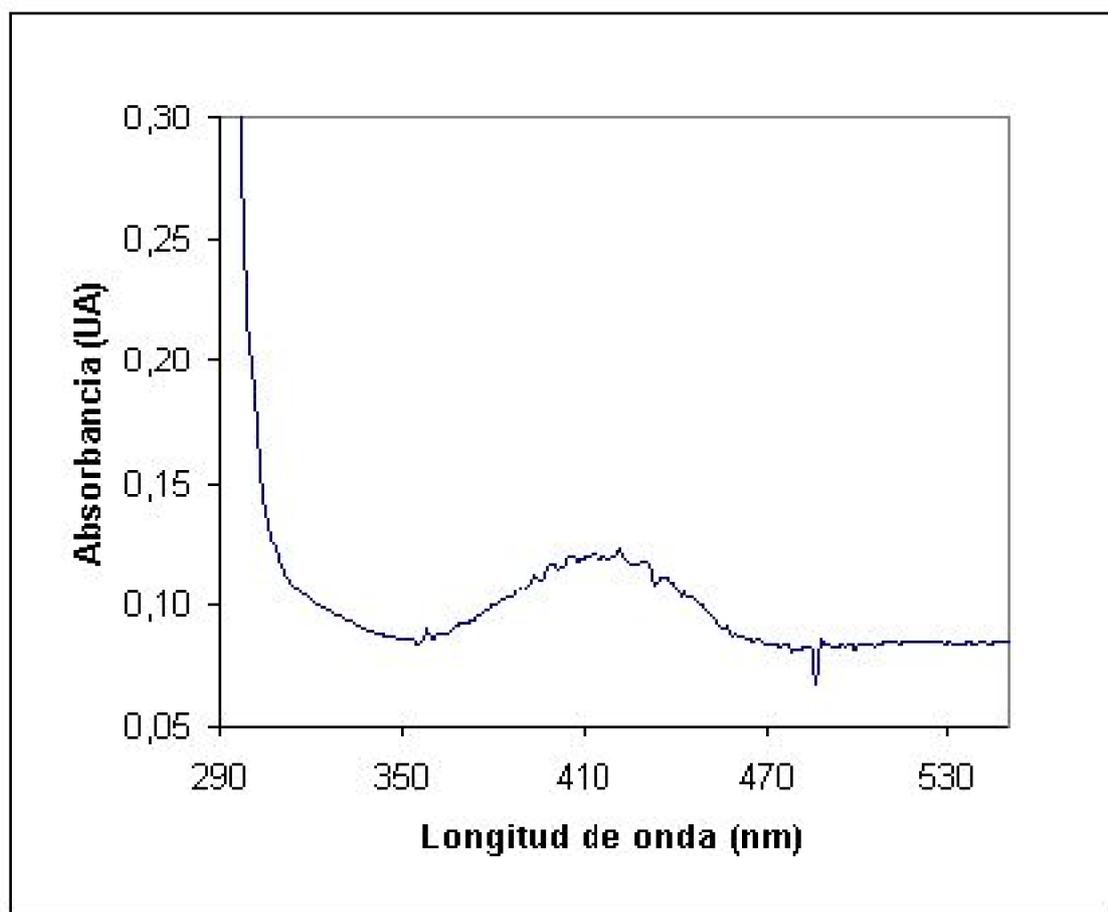


Figura 25. Espectro de absorción UV-visible de la proteína IscS/K213R. La solución de enzima (1 mg/ml) en Tris-HCl 10 mM, pH 8,0, glicerol 5% fue analizada como se describió en Materiales y Métodos, sección 2.3.3.

3.7. Estudios proteómicos preliminares en *G. stearothermophilus* V.

Un enfoque alternativo para estudiar el fenómeno de resistencia a K_2TeO_3 en *G. stearothermophilus* V consiste en analizar el patrón de expresión global de proteínas cuando la bacteria crece tanto en ausencia como en presencia de la sal tóxica.

En este sentido se realizó estudios preliminares en que proteínas totales de *G. stearothermophilus* V crecido en ambas condiciones fueron analizadas mediante electroforesis en dos dimensiones. Los resultados iniciales mostraron diferencias en el patrón de expresión global en que se observó la inducción de algunas proteínas cuando las células crecen en presencia del tóxico (Figura 26).

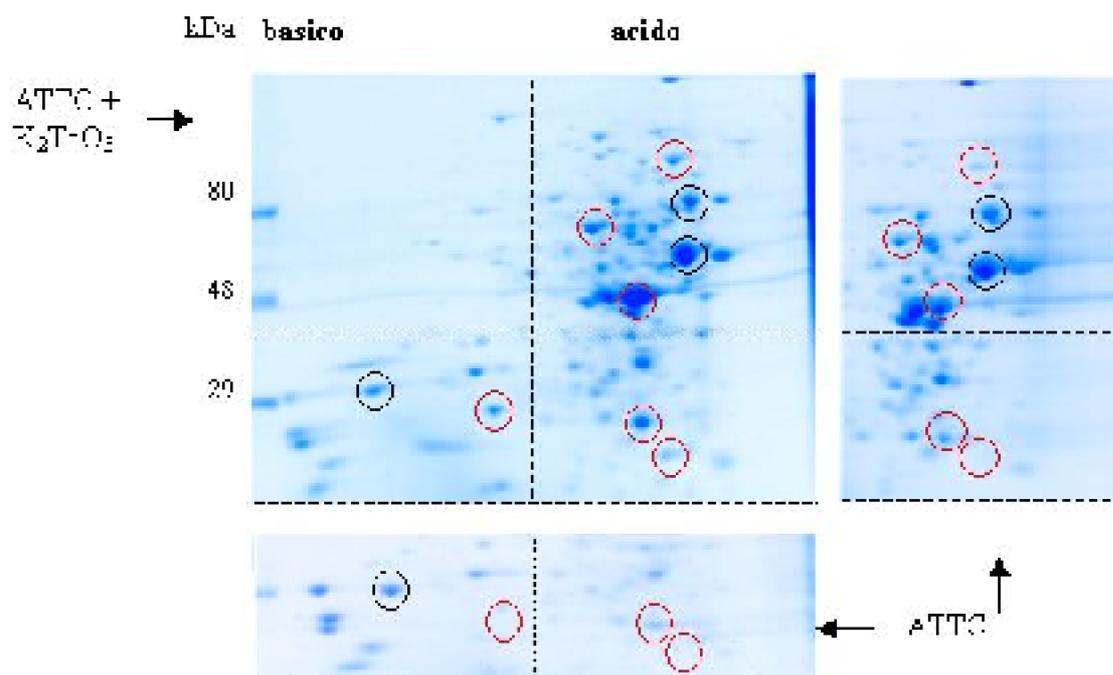


Figura 26. Resolución de proteínas totales de *G. stearothermophilus* V mediante electroforesis en dos dimensiones. Las proteínas sobreexpresadas en presencia de K_2TeO_3 se indican en círculos rojos. Las proteínas que no muestran un cambio evidente en sus niveles de expresión en círculos negros. Las condiciones de electroforesis se encuentran descritas en Materiales y Métodos, sección 2.3.10.5. A la izquierda de la figura se indica la migración de proteínas de Mr conocida (en kDa).

4. DISCUSION

Aún cuando las razones de la toxicidad exhibida por el compuesto telurito de potasio no están del todo claras, éstas parecieran involucrar por lo menos tres mecanismos diferentes. Primero, el telurito es un agente oxidante fuerte que puede causar un daño oxidativo general a las células (Summers y Jacoby, 1977). Segundo, más recientemente se ha sugerido que el K_2TeO_3 causaría un daño más bien específico en algunos tioles críticos (Turner y col., 1999) y alternativamente, se ha indicado que el telurio podría reemplazar al azufre y/o al selenio en ciertas enzimas u otros metabolitos afectando sus funciones esenciales (Garberg y col., 1999).

Nuestro grupo de trabajo ha estado interesado desde hace algunos años en el estudio de la resistencia bacteriana a este compuesto y para ello hemos utilizado como modelo a *G. stearothermophilus* V, bacteria termofílica Gram positiva que presenta una resistencia natural a K_2TeO_3 (Vásquez, 1985; Moscoso y col., 1998). En este sentido y con el propósito de identificar determinantes que pudiesen estar implicados en la resistencia de este bacilo a la sal tóxica, hemos construído varias genotecas de DNA de este microorganismo las que han sido utilizadas para transformar células de *E. coli* sensibles a K_2TeO_3 . Varios clones han sido seleccionados por adquisición directa de resistencia al tóxico y algunos de los plasmidios recombinantes obtenidos han sido analizados y caracterizados (Vásquez y col., 1999, 2001).

En esta Tesis se describe el clonamiento, secuenciación y caracterización de un nuevo fragmento de DNA cromosomal de *G. stearothermophilus* V de 3.461 pb que confiere resistencia a K_2TeO_3 en *E. coli*. Este clon fue denominado 2VH en virtud a que

provino de una genoteca construída utilizando la enzima de restricción *Hind*III. Consecuentemente, el plasmidio recombinante que porta este clon fue denominado p2VH.

Utilizando el programa ORF Finder se identificó tres ORFs que especifican polipéptidos de más de 225 residuos de aminoácidos en el fragmento clonado (Figura 1). Todos ellos fueron amplificados individualmente por PCR, clonados en un vector de expresión e introducidos en *E. coli*. Estos experimentos de subclonamiento mostraron que solamente las células de *E. coli* que expresan el ORF1200 (codifica para la enzima cisteína desulfurasa, IscS) exhiben resistencia a K_2TeO_3 (Tabla 4, ver más adelante). El gen *iscS* se encuentra flanqueado por el ORF687 y el ORF963 lo que hace una diferencia con respecto a los cromosomas de *A. vinelandii*, *E. coli* y *Salmonella enterica*. En estas bacterias el gen *iscS* está formando parte del operón *isc* que incluye los genes *iscR*, *iscU* e *iscA* que participan en la síntesis de centros de [Fe-S] (Skovran y Downs, 2000; Schwartz y col., 2001; Mihara y Esaki, 2002).

En la región río arriba del gen *iscS* de *G. stearothermophilus* V se identificaron dos secuencias repetidas invertidas y elementos distintivos de un promotor como cajas -10, -35 y una secuencia de unión al ribosoma (Figura 8) (Rosenberg y Court, 1979). No se identificó elementos similares en las regiones río arriba de los ORFs 687 y 963. La superposición de los marcos de lectura de los ORFs 1200 y 963 sugiere que ambos podrían ser transcritos a partir del promotor del gen *iscS*. No se realizaron sin embargo estudios a nivel transcripcional para dilucidar este punto. Experimentos de subclonamiento demostraron que el promotor del gen *iscS* de *G. stearothermophilus* V es funcional en *E. coli* (ver más adelante). La comparación de la secuencia de aminoácidos del ORF 687 con la base de datos sugirió que se trata de una proteína trunca por lo que no fue posible realizar un análisis de la región río arriba de este gen. En todo caso, un estudio más acabado del entorno genético del gen *iscS* de *G. stearothermophilus* V sólo será posible cuando esté disponible la secuencia completa del genoma de esta bacteria.

Con el propósito de relacionar el producto del gen *iscS* de *G. stearothermophilus* V con la resistencia a K_2TeO_3 observada en clones de *E. coli* que lo expresan, se decidió purificar la proteína IscS. La idea fue demostrar que se trata efectivamente de una cisteína desulfurasa y tratar de correlacionar de algún modo esta actividad con fenómeno de resistencia observado.

Las células de *E. coli* que sobreexpresan el gen *iscS* al ser inducidas con IPTG exhiben un intenso color amarillo, producto de la presencia del cofactor piridoxal fosfato unido a la proteína (Zheng y col., 1993). Esta característica resultó de mucha utilidad para seguir la presencia de la enzima tanto en los extractos crudos como en las fracciones obtenidas durante las diferentes etapas de purificación.

La enzima fue purificada a homogeneidad y caracterizada parcialmente. Esta mostró una naturaleza intrínsecamente termoestable lo que permitió someter al extracto crudo a un tratamiento térmico inicial para eliminar la mayoría de proteínas de *E. coli*. Incluso los pasos de purificación subsiguientes fueron llevados a cabo a temperatura ambiente sin pérdida aparente de actividad. A nuestro entender esta es la primera comunicación de la purificación de una enzima IscS termoestable a homogeneidad. Similarmente a otras desulfurasas (Zheng y col. 1993, 1998), la enzima de *G. stearothermophilus* V presenta

una estructura cuaternaria de homodímero de aproximadamente 95 kDa. El monómero exhibió una masa molecular relativa de 45 kDa (Figura 5A) y el espectro UV-visible de la enzima nativa -con una banda de absorción típica a 421 nm (Figura 6) - fue también muy similar a aquellos documentados para otras cisteína desulfurasas (Zheng y col., 1993; Flint, 1996).

La caracterización de la proteína silvestre y las derivadas mutadas obtenidas en este trabajo (ver más adelante) fue facilitada utilizando anticuerpos policlonales anti-IscS. La limpieza observada en los ensayos de Western blot aboga en favor de la mono-especificidad de los anticuerpos obtenidos. Aun cuando la sobreexpresión de la IscS de *G. stearothermophilus* V se realizó en células de *E. coli* que pueden expresar su propia IscS, la especificidad de los anticuerpos por la proteína del bacilo Gram positivo quedó demostrada en los ensayos de Western blot utilizando las versiones truncas de la IscS de *G. stearothermophilus* V (ver más adelante).

La relación que existe entre resistencia a K_2TeO_3 y la actividad cisteína desulfurasa fue demostrada con experimentos en que se utilizó versiones mutadas del gen *iscS* (knockout). En primera instancia y utilizando el programa COIL-COIL (Lupas y col., 1991) se determinó que la secuencia comprendida entre los aminoácidos N³⁷⁷ y L³⁹² presentes en el extremo carboxilo terminal de cada monómero de IscS (Figura 13) estaría involucrada en interacciones proteína-proteína que conducirían a la formación de los homodímeros. Con esta información se planeó realizar mutaciones que eliminasen 30, 50 y 70 residuos aminoacídicos del extremo carboxilo de IscS. Estas deleciones fueron elegidas por cuanto eliminan la región de α -hélice putativamente involucrada en las mencionadas interacciones. Los genes mutados fueron introducidos en *E. coli* donde se demostró la síntesis de las correspondientes proteínas truncas por SDS-PAGE y por análisis de Western (Figura 14B y 14C). Los 3 clones recombinantes no mostraron resistencia a telurito de potasio (Tabla 4) y en extractos preparados a partir de ellos no fue posible detectar actividad de cisteína desulfurasa termoestable. Esto último era de algún modo esperable ya que preparaciones parcialmente purificadas de estas IscS truncas no mostraron el típico color amarillo de la enzima silvestre sugiriendo que ellas son incapaces de unir PLP (aun cuando el motivo de unión de este cofactor sigue presente en estas proteínas).

Si bien es cierto que estos resultados fueron los esperados, quisimos demostrar la relación resistencia a telurito-actividad desulfurasa utilizando una segunda estrategia de mutagénesis que fuese menos “agresiva” para la estructura de la enzima que las deleciones en el extremo C terminal. En este sentido, la comparación de la secuencia de aminoácidos de la IscS de *G. stearothermophilus* V con la de otras cisteína desulfurasas reveló que un residuo de Lys, aparentemente clave en la unión de PLP, se encuentra conservado en un dominio central de todas las desulfurasas (Zheng y col., 1993; Alexander y col., 1994; Mihara y col., 1997). En el caso de *G. stearothermophilus* V esta lisina se encuentra en la posición 213 de la estructura primaria de la IscS que de acuerdo al modelo molecular se encontraría alojada en el interior de la matriz proteica (Figura 17A).

Con la intención de confirmar que este residuo participa en la unión del cofactor y eventualmente anular esta capacidad se realizó 2 sustituciones del residuo K²¹³: una por

Ala (IscS/K²¹³A), que elimina el grupo funcional a la vez que acorta el largo de la cadena lateral (ver Figura 27A) y otra por Arg (IscS/K²¹³R), que representa un cambio relativamente conservativo sin alterar la carga. Los genes mutados obtenidos por PCR recombinante fueron clonados separadamente y sobreexpresados en *E. coli*. Las células que expresan IscS/K²¹³A no mostraron resistencia a K₂TeO₃ (Tabla 4) y la solución incolora de enzima purificada resultó inactiva. La causa más probable de esta inactividad está relacionada con su incapacidad de unir el cofactor, a juzgar por su espectro UV en que se aprecia la ausencia del pico de absorción a 421 nm (Figura 20). Estos resultados sugieren fuertemente que el residuo K²¹³ está involucrado en la unión del cofactor.

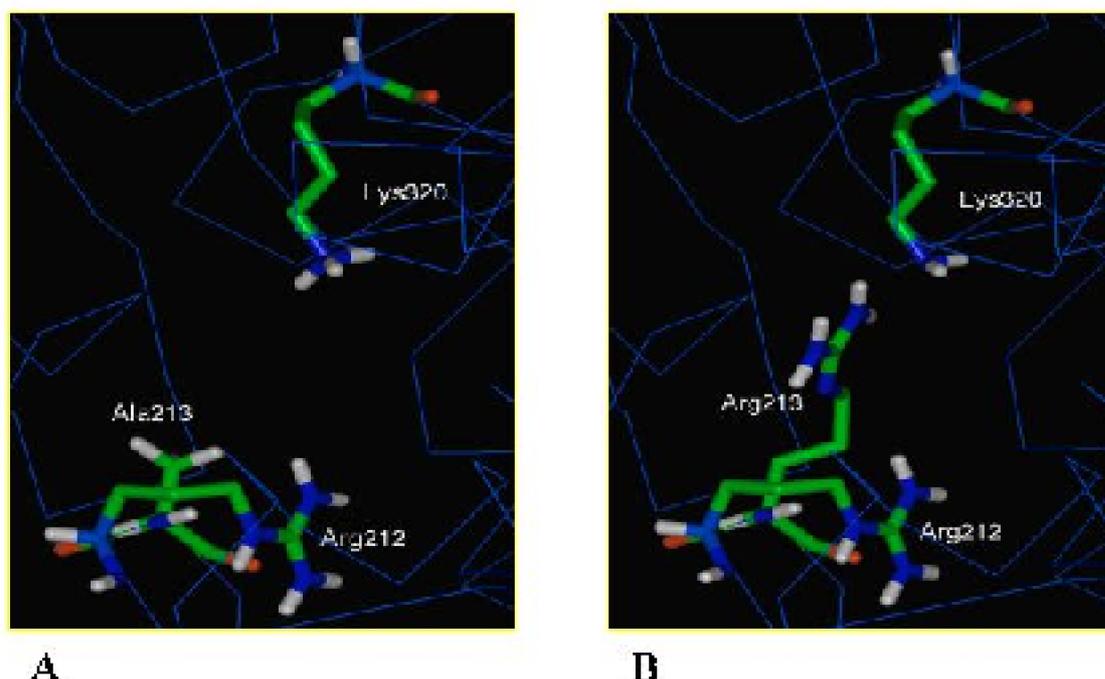


Figura 27. Modelo molecular de enzimas IscS de *G. stearothermophilus* V que contienen las sustituciones K213→A (A) y K213→R (B). El modelo fue construido utilizando el programa Geno3D.

Dado que -a diferencia de la enzima silvestre y de la IscS/K²¹³R- la IscS/K²¹³A se desnatura completamente cuando se calienta a 70°C, la posibilidad que el cofactor también participe de algún modo en la mantención de la integridad estructural de la enzima no puede ser descartada. Evidencias en este sentido han sido comunicadas en el caso de la O-acetilserina sulfhidrilasa de *Salmonella typhimurium* (Bettati y col., 2000).

Por su parte, la sustitución de Lys²¹³ por Arg (IscS/K²¹³R) resultó sorprendentemente en una enzima activa y con propiedades fisicoquímicas y características espectrales indistinguibles de la enzima silvestre (Figura 25). Adicionalmente, las células de *E. coli* que expresan esta proteína adquirieron concomitantemente resistencia a telurito de potasio (Tabla 4), sugiriendo una vez más que la actividad desulfurasa está relacionada con el fenómeno de resistencia.

El resultado anterior es también interesante por cuanto no existen en la literatura evidencias de la unión de PLP por parte de residuos de arginina. Este resultado podría

ser interpretado a la luz de las predicciones del modelo molecular de la IscS que fue construido paralelamente a los experimentos de mutagénesis. El modelo muestra que la K^{320} se encuentra muy cercana ($5,07 \text{ \AA}$) a la K^{213} en la estructura tridimensional de la enzima (Figura 17B). En el modelo que considera la sustitución $K^{213}R$, la R^{213} se encontraría lo suficientemente cerca de la K^{320} como para contribuir a la disminución de su pKa y facilitar así la unión del cofactor a este residuo (Figura 27B). De acuerdo a esto la posición en que quedaría alojado el PLP sería equivalente a la de la enzima silvestre, lo cual haría que los espectros UV de ambas enzimas fuesen casi indistinguibles. Los resultados de las Figuras 6 y 25 apoyan esta predicción. Sin embargo, se requiere de experimentos adicionales para confirmar cual es el residuo de Lys que lleva unido el cofactor en cada caso.

Una aproximación experimental que también fue abordada para establecer una correlación entre actividad cisteína desulfurasa y resistencia a K_2TeO_3 consistió en experimentos de complementación de *E. coli* PK6311 en la que el gen *iscS* se encuentra interrumpido por un cassette de resistencia a kanamicina. Dado que esta bacteria no es un huésped para la expresión de genes clonados bajo el control del promotor T7, los ensayos de complementación requirieron de la construcción de un plasmidio que portase el gen *iscS* de *G. stearothermophilus* V con su propia zona promotora. La introducción de pJT1200-Pr en *E. coli* PK6311 resultó en una disminución del tiempo generacional (Figuras 10 y 11) y también en la reversión del fenotipo de hipersensibilidad a K_2TeO_3 mostrado por esta cepa (Tabla 4). El hecho que el fenotipo de crecimiento lento exhibido por *E. coli* PK6311 sea complementado sólo parcialmente no es de extrañar, pues Schwartz y cols. (2001) obtuvieron el mismo resultado en experimentos similares utilizando el propio gen *iscS* de *E. coli*. La explicación en ese caso se basó en un posible efecto pleiotrópico de la mutación sobre los otros genes componentes del operón *isc* (Schwartz y col., 2001).

La presencia física de la enzima IscS en extractos crudos de *E. coli* PK6311/pJT1200-Pr fue demostrada mediante Dot blot utilizando anticuerpos anti-IscS (Figura 12). Estos resultados son indicativos de la funcionalidad del promotor del gen *iscS* de *G. stearothermophilus* V en *E. coli*. Anteriormente nuestro grupo ya había demostrado que otros promotores de *G. stearothermophilus* V (como el del gen *cysK*) son perfectamente funcionales en *E. coli* (Vásquez y col., 2001).

Por otro lado, Lauhon y Kambampati (2000) comunicaron que sólo el gen *iscS* (y no los genes *csdA* y *csdB*, que también especifican cisteína desulfurasas) de *E. coli* es capaz de complementar los requerimientos de tiamina y de ácido nicotínico de una mutante *iscS*⁻ para crecer en medio mínimo. En nuestro caso y en un experimento similar, el gen *iscS* de *G. stearothermophilus* V complementó el requerimiento de vitamina B1 y no el de ácido nicotínico de la cepa de *E. coli* PK6311 (resultados no mostrados).

Aún cuando no está del todo claro, el daño celular atribuido a la capacidad oxidante del telurito derivaría de la generación de radicales O_2^- durante su reducción a Te^0 (Taylor, 1999). La toxicidad de estos radicales para proteínas que llevan centros de [Fe-S] expuestos ha quedado demostrada al tratar células de *E. coli* con oxígeno hiperbárico (Flint y col., 1993a) y notablemente algunas de ellas como la dihidroxiácido deshidratasa, pueden ser reactivadas *in vitro* si se provee una actividad IscS (Flint y col.,

1996). En este sentido y si efectivamente la toxicidad del K_2TeO_3 está dada por la génesis de radicales O_2^- , la recuperación de algunas (o muchas) proteínas [Fe-S] que pudiesen haber sido dañados directa o indirectamente podría ser consecuencia de la actividad del producto del gen *iscS*. Una evidencia adicional en este sentido proviene de los trabajos de Strain y col. (1998), quienes demostraron que la mutación *sod 1* (deficiencia de superóxido dismutasa) en *Saccharomyces cerevisiae* puede ser complementada por el gen *nfs1p*, que codifica para la proteína Nfs1p. Esta proteína es similar a las cisteína desulfurasas bacterianas NifS e IscS (Li y col., 1999). La complementación en este caso estaría dada por la recuperación de proteínas [Fe-S] dañadas por los radicales O_2^- que no pueden ser dismutados dado que la Sod1 se encuentra mutada. Interesantemente, la introducción del plasmidio pJT1200-Pr en la cepa de *E. coli* QC774 (*sodA^- sodB^-*), hipersensible a K_2TeO_3 , resultó en un incremento de la resistencia al tóxico por (Tabla 4). Aun cuando se trata de un experimento muy preliminar, este resultado sugiere que el gen *iscS* de *G. stearothermophilus* V es capaz de revertir el efecto deletéreo que le impone la doble mutación de superóxido dismutasa a la célula. Si esta reversión está mediada por la recuperación de proteínas [Fe-S] u otro mecanismo requiere de estudios adicionales para ser determinado.

Por otro lado, es notable que enzimas y/o compuestos que normalmente participan en el metabolismo basal o primario estén de algún modo involucrados en resistencia a K_2TeO_3 . Entre ellos se han incluido la nitrato reductasa (Avazéri y col., 1997), tiopurina metiltransferasa (Cournoyer y col., 1998), cisteína sintetasa (Moore y Kaplan, 1992; Alonso y col., 2000; Vásquez y col., 2001), glutatión y probablemente otros tioles celulares (Turner y col., 1999, 2001).

En particular, la presencia del gen *cysK* ha sido descrita como parte de otros determinantes Te^r en otras bacterias y a diferencia nuestra no se le ha responsabilizado directamente de tal resistencia. En la bacteria fotoheterotrófica *Rhodobacter sphaeroides* encontró 2 loci genéticos involucrados en la resistencia a telurito de potasio e interesantemente uno de éstos incluye al gen *cysK* ubicado río arriba del locus *trgAB* (Moore y Kaplan, 1992; O'Gara y cols., 1997). Más recientemente el grupo de Rodríguez-Lemoine clonó un segmento de DNA de *E. coli* que confiere resistencia simultánea a colicinas y a telurito de potasio. Al analizar la secuencia de este segmento, estos investigadores encontraron que el gen *cysK* formaba parte de este determinante (Alonso y cols., 2000).

Dado que la sobreexpresión del gen *cysK* de *G. stearothermophilus* V en *E. coli* tiene como corolario la síntesis de una gran masa de enzima CysK (Vásquez y cols., 2001), se esperaría que la concentración de su producto-cisteína-fuese también consecuentemente alta (Esquema 1, # 5). Sin embargo, experimentos realizados en el laboratorio no han permitido detectar estos esperados niveles de CysK libre. Una probable explicación es que tal como ocurre *in vitro*, la enzima sea inhibida por Cys *in vivo* (C. Vásquez, resultados no publicados). Alternativamente, parte importante de esta cisteína sintetizada *de novo* podría ser rápidamente utilizada por la enzima IscS en la síntesis, reparación o reensamble de centros de Fe-S dañados por la presencia de K_2TeO_3 (Esquema 1, # 7). La "cercanía" metabólica de ambas enzimas, IscS y CysK, está fuertemente sugerida por los trabajos de Flint y cols. (1996), quienes encontraron que extractos crudos de *E. coli* que

catalizaban la formación de centros [Fe-S] *in vitro* contenían al menos cuatro actividades enzimáticas capaces de proveer el azufre para la síntesis del centro [Fe-S]: O-acetilserina sulfhidrilasa A (CysK), O-acetilserina sulfhidrilasa B (CysM), β -cistationasa y cisteína desulfurasa.

Es posible que otra fracción de la cisteína generada como consecuencia de la sobreexpresión del gen *cysK* podría ser consumida en la reducción de tioles celulares oxidados en el proceso (Esquema 1, # 4). La importancia de este tipo de compuestos en la resistencia a K_2TeO_3 se ha hecho cada vez más evidente. Resultados recientes de nuestro laboratorio indican que el contenido de RSH totales (y en particular el de GSH) es mayor en células que portan plasmidios conteniendo el gen *cysK* que en aquellas que llevan sólo el vector de clonamiento cuando son cultivadas en presencia de K_2TeO_3 . Nuestra interpretación es que la enzima CysK podría tener una participación en la generación de poder reductor (cisteína, glutatión) dentro de la célula que sería requerido para compensar o recuperar el GSH (u otro tiol) consumido, de manera que el contenido de RSH celulares se mantenga en un nivel apropiado para evitar así un desbalance redox (Esquema 1, #5).

Finalmente y aún cuando los resultados obtenidos en esta Tesis indican que la IscS de *G. stearothermophilus* V media resistencia a K_2TeO_3 en *E. coli*, no escapa a nuestra atención (con excepción de la cepa de *E. coli* PK6311) que todas las células de *E. coli* que adquirieron resistencia a K_2TeO_3 al ser transformadas con el gen *iscS* de *G. stearothermophilus* V poseen su propio gen *iscS*. Una posibilidad es que los niveles aumentados de IscS sean responsables de la adquisición de resistencia. Dado que en *E. coli* el gen *iscS* constituye parte del operón *isc* cuya expresión es regulada negativamente por IscR (Frazzon y Dean 2001; Schwartz y col., 2001), un incremento en los niveles de IscS funcional sería equivalente a un estado desreprimido. Una evidencia reciente que apoya lo anterior provino del trabajo de Bébien y col.(2002), quienes han comunicado como consecuencia de la exposición de *E. coli* a selenito (SeO_3^{2-}) se induce una serie de proteínas, entre las que se encuentra la IscS.

Conscientes que la gran mayoría de los resultados descritos en este trabajo han sido obtenidos en un sistema heterólogo (expresión de genes de *G. stearothermophilus* V en *E. coli*), hemos incursionado en ensayos proteómicos para determinar si la exposición de *G. stearothermophilus* V a K_2TeO_3 resulta en la inducción de proteínas específicas. En resultados muy preliminares, hemos encontrado que en geles de dos dimensiones se observan algunas proteínas particulares cuya expresión se encuentra aumentada en presencia del tóxico. Si estas corresponden a proteínas del tipo CysK y/o IscS está por ser determinado en estudios futuros.

5. CONCLUSIONES

1. Células de *E. coli* sensibles a K_2TeO_3 adquieren resistencia al tóxico cuando son transformadas con el gen *iscS* de *G. stearothermophilus* V.

2. La proteína IscS de *G. stearothermophilus* V es citoplasmática, termoresistente, homodimérica y utiliza piridoxal fosfato (PLP) como cofactor.

3. Versiones truncaas del gen *iscS* de *G. stearothermophilus* V no confieren resistencia a K_2TeO_3 en *E. coli*. Las correspondientes IscS mutadas no unen PLP y son inactivas.

4. La mutación Lys213→Ala genera una enzima IscS que no une PLP, es inactiva, termosensible y no confiere resistencia a K_2TeO_3 en *E. coli*.

5. La mutación Lys213→Arg genera una enzima con características indistinguibles de la IscS silvestre. La expresión del gen mutante confiere resistencia a K_2TeO_3 en *E. coli*.

6. La introducción del gen *iscS* de *G. stearothermophilus* V en la cepa *E. coli* PK6311 (*iscS*⁻) restaura parcialmente las características de crecimiento, suprime el requerimiento de tiamina en medio mínimo y le confiere resistencia a K_2TeO_3 .

6. REFERENCIAS

- Alexander, F. W., E. Sandmeier, P. K. Mehta y P. Christen. 1994. Evolutionary relationships among pyridoxal-5'-phosphate-dependent enzymes. Regio-specific #, # and # families. *Eur. J. Biochem.* 219: 953-960.
- Alonso, G., C. Gomes, C. González, and V. Rodríguez Lemoine. 2000. On the mechanism of resistance to channel-forming colicins (PacB) and tellurite, encoded by plasmid Mip233 (IncHI3). *FEMS Microbiol. Lett.* 192: 257-261.
- Ausubel, F., R. Brent, R. Kingston, D. Moore, J. Seidman, J. Smith y K. Struhl (ed.). 1993. *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Avazéri, C., R. Turner, J. Pommier, J. Weiner, G. Giordano y A. Verméglio. 1997. Tellurite reductase activity of nitrate reductase is responsible for the basal resistance of *Escherichia coli* to tellurite. *Microbiology* 143: 1181-1189.
- Bagnall, K. W. 1975. Selenium, tellurium, and polonium, p. 935–1008. *In* M. Schmidt, W. Siebert, and K. W. Bagnall (ed.), *The chemistry of sulfur, selenium, tellurium and polonium*. Pergamon Press, New York, N.Y.
- Bébién, M., G. Lagniel, J. Garin, D. Touati, A. Verméglio y J. Labarre. 2002. Involvement of superoxide dismutases in the response of *Escherichia coli* to selenium oxides. *J. Bacteriol.* 184: 1556-1564.
- Bettati, S., S. Benci, B. Campanini, S. Raboni, G. Chirico, S. Beretta, K. D. Schnackerz, T. L. Hazlett, E. Gratton y A. Mozzarelli. 2000. Role of pyridoxal 5'-phosphate in the structural stabilization of O-acetylserine sulfhydrylase. *J. Biol. Chem.*

275:40244-40251.

- Beveridge, T., M. Hughes, H. Lee, K. Leung, R. Poole, I. Savvaidis, S. Silver y J. Trevors. 1997. Metal-microbe interactions: contemporary approaches. *Adv. Microb. Physiol.* 38: 177-243.
- Bradley, D. 1985. Detection of tellurite-resistance determinants in IncP plasmids. *J. Gen. Microbiol.* 131: 3135-3137.
- Bradley, D., V. Hughes, H. Richards y D. Datta. 1982. R plasmids of a new incompatibility group determine constitutive production of H pili. *Plasmid* 7: 230-238.
- Burian, J., N. Tu, L. Klucar, L. Guller, G. Lloyd-Jones, S. Stuchlik, P. Fejdi, P. Siekel y J. Turna. 1998. *In vivo* and *in vitro* cloning and phenotype characterization of tellurite resistance determinant conferred by plasmid pTE53 of a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Folia Microbiol.* 43: 589-599.
- Cervantes, C., J. Campos-Garcia, S. Devars, F. Gutierrez-Corona, H. Loza-Tavera, J. C. Torres-Guzman y R. Moreno-Sanchez. 2001. Interactions of chromium with microorganisms and plants. *FEMS Microbiol. Rev.* 25:335-347.
- Chiong, M., E. González, R. Barra y C. Vásquez. 1988. Purification and biochemical characterization of tellurite-reducing activities from *Thermus thermophilus* HB8. *J. Bacteriol.* 170: 3269-3273.
- Cournoyer, B., S. Watanabe y A. Vivian. 1998. A tellurite-resistance genetic determinant from phytopathogenic pseudomonads encodes a thiopurine methyl transferase: evidence of a widely-conserved family of methyltransferases. *Biochim. Biophys. Acta* 1397: 161-168.
- Deppenmeier, U., A. Johann, T. Hartsch, R. Merkl, R. A. Schmitz, R. Martinez-Arias, A. Henne, A. Wiezer, S. Baumer, C. Jacobi, H. Bruggemann, T. Lienard, A. Christmann, M. Bomeke, S. Steckel, A. Bhattacharyya, A. Lykidis, R. Overbeek, H. P. Klenk, R. P. Gunsalus, H. J. Fritz y G. Gottschalk. 2002. The genome of *Methanosarcina mazei*: evidence for lateral gene transfer between bacteria and archaea. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* 4:453-461
- Flint, D. H. 1996. *Escherichia coli* contains a protein that is homologous in function and N-terminal sequence to the protein encoded by the *nifS* gene of *Azotobacter vinelandii* and that can participate in the synthesis of the Fe-S cluster of dihydroxy-acid dehydratase. *J. Biol. Chem.* 271: 16068-16074.
- Flint, D. H., E. S. Randall, J. F. Tuminello, B. D. Lusiak y O. R. Brown. 1993a. The inactivation of dihydroxy-acid dehydratase in *Escherichia coli* treated with hyperbaric oxygen occurs because of the destruction of its Fe-S cluster, but the enzyme remains in the cell in a form that can be reactivated. *J. Biol. Chem.* 34: 25547-25552.
- Flint, D. H., J. F. Tuminello y M. H. Emptage. 1993b. The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J. Biol. Chem.* 268: 22369-22376.
- Flint, D. H., J. F. Tuminello y T. J. Miller. 1996. Studies on the synthesis of the Fe-S cluster of dihydroxy-acid dehydratase in *Escherichia coli* crude extract. Isolation of O-acetylserine sulfhydrylases A and B and beta-cystathionase based on their ability to mobilize sulfur from cysteine and to participate in Fe-S cluster synthesis. *J. Biol. Chem.* 271: 16053-16067.
- Frazzon, J. y D. R. Dean. 2001. Feedback regulation of iron-sulfur cluster

- biosynthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 14751-14753.
- Garberg, P., L. Engman, V. Tolmachev, H. Lundqvist, R. Gerdes e I. Cotgreave. 1999. Binding of tellurium to hepatocellular selenoproteins during incubation with inorganic tellurite: consequences for the activity of selenium-dependent glutathione peroxidase. Int. J. Biochem. Cell Biol. 31: 291-301.
- Gardner, P. R. e I. Fridovich. 1991. Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* aconitase. J. Bacteriol. 266: 19328-19333.
- Guzzo, J. y M. Dubow. 2000. A novel selenite- and tellurite-inducible gene in *Escherichia coli*. Appl. Environ. Microbiol. 66: 4972-4978.
- Harlow, E. y D. Lane. 1988. Antibodies. A laboratory manual. Harlow, E. and Lane, D., Eds. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Hill, S., M. Jobling, B. Lloyd, P. Strike y D. Ritchie. 1993. Functional expression of the tellurite resistance determinant from the IncHI-2 plasmid pMER610. Molec. Gen. Genet. 241: 203-212.
- Imlay, J. y S. Linn. 1988. Toxic DNA damage through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. Science 240: 640-642.
- Jobling, M. y D. Ritchie. 1987. Genetic and physical analysis of plasmid genes expressing inducible resistance to tellurite in *Escherichia coli*. Molec. Gen. Genet. 208: 288-293.
- Jobling, M. y D. Ritchie. 1988. The nucleotide sequence of a plasmid determinant for resistance to tellurium anions. Gene 66: 245-258.
- Kiyasu, T., A. Asakura, Y. Nagahashi y T. Hocino. 2000. Contribution of cysteine desulfurase (NifS protein) to the biotin synthase reaction of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 182: 2879-2885.
- Kumano, M., A. Tamakoshi y K. Yamane. 1997. A 32 kb nucleotide sequence from the region of the lyncomycin-resistance gene (22⁰-25⁰) of the *Bacillus subtilis* chromosome and identification of the site of the *lin-2* mutation. Microbiology 143: 2775-2782.
- Kuo, C. F., T. Mashino e I. Fridovich. 1987. #, #- Dihydroxyisovalerate dehydratase a superoxide-sensitive enzyme. J. Biol. Chem. 262: 4724-4727.
- Lacourciere, G. M., H. Mihara, T. Kurihara, N. Esaki y T. C. Stadman. 2000. *Escherichia coli* NifS-like protein provide selenium in the pathway for the biosynthesis of selenophosphate. J. Biol. Chem. 275: 23769-23773.
- Lauhon, C. T. y R. Kambampati. 2000. The *iscS* gene in *Escherichia coli* is required for the biosynthesis of a-thiouridine, thiamine, and NAD. J. Biol. Chem. 275: 20096-20103.
- Li, J., M. Kogan, S. A. B. Knight, D. Pain y A. Dancis. 1999. Yeast mitochondrial protein, Nfs1p, coordinately regulates iron-sulfur cluster proteins, cellular iron uptake, and iron distribution. J. Biol. Chem. 274: 33025-33034.
- Liangyau, Y., H. Kangming, C. Duanren, Y. Canming y O. Zheng. 1993. Evidence for telluro amino acid in biological materials and some rules of assimilation of inorganic tellurium by yeast. Anal. Biochem. 209: 318-322.
- Liochev, S. I. e I. Fridovich. 1993. Modulation of the fumarases of *Escherichia coli* in

- response to oxidative stress. Arch. Biochem. Biophys. 301: 379-384.
- Liu, M. y D. Taylor. 1999. Characterization of gram-positive tellurite resistance encoded by the *Streptococcus pneumoniae tehB* gene. FEMS Microbiol. Lett. 174: 385-392.
- Liu, M., R. Turner, T. Winstone, A. Saetre, M. Dyllick-Brenzinger, G. Jickling, L. Tari, J. Weiner y D. Taylor. 2000. *Escherichia coli* TehB requires S-Adenosylmethionine as a cofactor to mediate tellurite resistance. J. Bacteriol. 182: 6509-6513.
- Lloyd#Jones, G., A. Osborn, D. Ritchie, P. Strike, J. Hobman, N. Brown y D. Rouch. 1994. Accumulation and intracellular fate of tellurite in tellurite-resistant *Escherichia coli*: a model for the mechanism of resistance. FEMS Microbiol. Lett. 118: 113-120.
- Lupas, A., M. Van Dyke y J. Stock. 1991. Predicting coiled coils from protein sequences. Science 252:1162-1164
- Messner, K. R. e J. A. Imlay. 1999. The identification of primary sites of superoxide and hydrogen peroxide formation in the aerobic respiratory chain and sulfite reductase complex of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 274: 10119-10128.
- Miraha, H., T. Kurihara, T. Yoshimura, K. Soda y N. Esaki. 1997. Cysteine sulfinate desulfinate, a NIFS-like protein of *Escherichia coli* with selenocysteine lyase and cysteine desulfurase activities. J. Biol. Chem. 272: 22417-22424.
- Mihara, H. y N. Esaki. 2002. Bacterial cysteine desulfurases: their function and mechanisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. 60:12-23.
- Moore, M. y S. Kaplan. 1992. Identification of intrinsic high-level resistance to rare-earth oxides and oxyanions in members of the class *Proteobacteria*: characterization of tellurite, selenite, and rhodium sesquioxide reduction in *Rhodobacter sphaeroides*. J. Bacteriol. 174: 1505-1514.
- Moscoso, H., C. Saavedra, C. Loyola, S. Pichuantes y C. Vásquez. 1998. Biochemical characterization of tellurite-reducing activities from *Bacillus stearothermophilus* V. Res. Microbiol. 49: 389-397.
- Nazina, T. N., T. P. Tourova, A. B. Poltarau, E. V. Novikova, A. A. Grigoryan, A. E. Ivanova, A. M. Lysenko, V. V. Petrunyaka, G. A. Osipov, S. S. Belyaev y M. V. Ivanov. 2001. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzenensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermo-catenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermoglucosidasius* and *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. thermocatenulatus*, *G. thermoleovorans*, *G. kaustophilus*, *G. thermoglucosidasius* and *G. thermodenitrificans*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 433-446
- O'Farrell, P.H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250:4007-4021.
- O'Farrel, P.Z., H. M. Goodman y P. H. O'Farrel. 1977. High resolution two-dimensional electroforesis of basic as well as acidic proteins. Cell 12: 1133-1142.
- O'Gara, J., M. Gomelsky y S. Kaplan. 1997. Identification and molecular genetic analysis of multiple *loci* contributing to high-level tellurite resistance in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. Appl. Environ. Microbiol. 63: 4713-4720.
- Read, T. D., S. L. Salzberg, M. Pop, M. Shumway, L. Umayam, L. Jiang, E. Holtzapple,

- J. D. Busch, K. L. Smith, J. M. Schupp, D. Solomon, P. Keim y C. M. Fraser. 2002. Comparative genome sequencing for discovery of novel polymorphisms in *Bacillus anthracis*. *Science* 296:2028-2033.
- Retamal, C. y J. Babul. 1988. Determination of the molecular weight of proteins by electrophoresis in slab gels with a transverse pore gradient of crosslinked polyacrylamide in the absence of denaturing agents. *Anal Biochem.* 175:544-547.
- Rosenberg, M. y D. Court. 1979. Regulatory sequences involved in the promotion and termination of RNA transcription. *Annu. Rev. Genet.* 13:319#53.
- Sambrook, J., E. Fritsch y T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schwartz, C. J., O. Djaman, J. A. Imlay y P. Kiley. 2000. The cysteine desulfurase, IscS, has a major role in *in vivo* Fe-S cluster formation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 9009-9014.
- Schwartz, C. J., J. L. Giel, T. Patschkowski, C. Luther, F. J. Ruzicka, H. Beinert y P. Kiley. 2001. IscR, an Fe-S cluster-containing transcription factor represses expression of *Escherichia coli* genes encoding Fe-S cluster assembly proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 14895-14900.
- Silver, S. 1998. Genes for all metals- a bacterial view of the periodic table. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 1: 1-12.
- Silver, S. y L. Phung. 1996. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 753-789.
- Skovran, E. y D. M. Downs. 2000. Metabolic defects caused by mutations in the *iscS* gene cluster in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: implications for thiamine synthesis. *J. Bacteriol.* 182: 3896-3903.
- Storz, G. y J. Imlay. 1999. Oxidative stress. *Curr. Opin Microbiol.* 2: 188-194.
- Strain, J., C. R. Lorenz, J. Bode, S. Garland, G. A. Smolen, D. T. Ta, L. E. Vickery y V. C. Culotta. 1998. Suppressors of superoxide dismutase (*SOD1*) deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of proteins predicted to mediate iron-sulfur cluster assembly. *J. Biol. Chem.* 273: 31138-31144.
- Strohmeier Gort, A. y J. A. Imlay. 1998. Balance between endogenous superoxide stress and antioxidant defenses. *J. Bacteriol.* 180:1402-1410.
- Summers, A. y G. Jacoby. 1977. Plasmid determined resistance to tellurium compounds. *J. Bacteriol.* 129: 276-281.
- Taylor, D. 1999. Bacterial tellurite resistance. *Trends Microbiol.* 7: 111-115.
- Taylor, D., E. Walter, R. Sherburne Y D. Bazett-Jones. 1988. Structure and location of tellurium deposited in *Escherichia coli* cells harboring tellurite resistance plasmids. *J. Ultrastruct. Molec. Struct. Res.* 99: 18-26.
- Taylor, D., Y. Hou, R. Turner y J. Weiner. 1994. Location of a potassium tellurite resistance operon (*tehAtehB*) within the terminus of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 176: 2740-2742.
- Tomas, J. y W. Kay. 1986. Tellurite susceptibility and non-plasmid mediated resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 30: 127-131.

- Trutko, S. M., N. E. Suzina, V. I. Duda, V. K. Akimenko y A. M. Oronin. 1998. Involvement of the respiratory chain in potassium tellurite reduction in bacteria. *Dokl. Biochem.* 358: 8-15.
- Tucker, F., J. Thomas, M. Appleman, S. Goodman y J. Donohue. 1966. X-ray diffraction studies on metal deposition in group D streptococci. *J. Bacteriol.* 92: 1311-1314.
- Tucker, F., J. Walper, M. Appleman y J. Donohue. 1962. Complete reduction of tellurite to pure tellurium metal by microorganisms. *J. Bacteriol.* 83: 1313-1314.
- Turner, R., Y. Aharonowitz, J. Weiner y D. Taylor. 2001. Glutathione is a target in tellurite toxicity and is protected by tellurite resistance determinants in *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* 47: 33-40.
- Turner, R., J. Weiner y D. Taylor. 1999. Tellurite-mediated thiol oxidation in *Escherichia coli*. *Microbiology* 145: 2549-2557.
- Vásquez, C. 1985. Isolation and partial characterization of *BstVI*, a thermostable isoschizomer of *Xho* I. *Biochem. Intern.* 10: 655-662.
- Vásquez, C., C. Saavedra, C. Loyola, H. Moscoso y S. Pichuantes. 1999. Cloning of a tellurite resistance determinant from *Bacillus stearothermophilus* V in *Escherichia coli*. *Biochem. Molec. Biol. Int.* 47: 171-175.
- Vásquez, C., C. Saavedra, C. Loyola, M. Araya y S. Pichuantes. 2001. The product of the *cysK* gene of *Bacillus stearothermophilus* V mediates potassium tellurite resistance in *Escherichia coli*. *Curr. Microbiol.* 43: 418-423.
- Walter, E. y D. Taylor. 1992. Plasmid-mediated resistance to tellurite: expressed and cryptic. *Plasmid* 27: 52-64.
- Walter, E., C. Thomas, J. Ibbotson y D. Taylor. 1991a. Transcriptional analysis, translational analysis, and sequence of the *kiIA*-tellurite resistance region of plasmid RK2 Te^R. *J. Bacteriol.* 173: 1111-1119.
- Walter, E., J. Weiner y D. Taylor. 1991b. Nucleotide sequence and overexpression of the tellurite-resistance determinant from the IncHI2 plasmid pHH1508a. *Gene* 101:1-7.
- Westenberg, D. y M. Guerinot. 1997. Regulation of bacterial gene expression by metals. *Adv. Genet.* 36: 187-238.
- Whelan, K. y E. Colleran. 1992. Restriction endonuclease mapping of the HI2 incompatibility group plasmid R478. *J. Bacteriol.* 174: 1197-1204.
- Whelan, K., E. Colleran y D. Taylor. 1995. Phage inhibition and colicin resistance, and tellurite resistance, are encoded by a single cluster of genes on the IncHI2 plasmid R478. *J. Bacteriol.* 197: 5016-5027.
- Whelan, K., R. Sherburne y D. Taylor. 1997. Characterization of a region of the IncHI2 plasmid R478 which protects *Escherichia coli* from toxic effects specified by components of the tellurite, phage, and colicin resistance cluster. *J. Bacteriol.* 178: 63-71.
- Woolfolk, C. A. y H. R. Whitely. 1962. Reduction of inorganic compounds with molecular hydrogen by *Micrococcus lactilyticus* I. Stoichiometry with compounds of arsenic, selenium, tellurium, transition and other elements. *J. Bacteriol.* 84: 647-658.
- Yan, W. y D. Taylor, D. 1987. Characterization of transfer regions within the HI2 incompatibility group plasmid pHH1508a. *J. Bacteriol.* 169: 2866-2868.

-
- Zadik, P., P. Chapman y C. Siddons. 1993. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *J. Med. Microbiol.* 39: 155-158.
- Zheng, L., R. H. White, V. L. Cash, R. F. Jack y D. R. Dean. 1993. Cysteine desulfurase activity indicates a role for NifS in metallocluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2754-2758.
- Zheng, L., R. H. White, V. L. Cash y D. R. Dean. 1994. Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the *nifS* gene product. *Biochemistry* 33: 4714-4720.
- Zheng, L., V. L. Cash, D. H. Flint y D. R. Dean. 1998. Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter venelandii*. *J. Biol. Chem.* 273: 132664-13272.
- Zheng, M., B. Doan, T. D. Schneider y G. Storz. 1999. OxyR and SoxRS regulation of *fur*. *J. Bacteriol.* 181: 4639-4643.