



UNIVERSIDAD DE CHILE

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

Predicción de líneas evolutivas a partir de rusticianina de *Acidithiobacillus ferrooxidans*

CAMILO REYES JAÑA

Memoria para optar al título profesional de
Bioquímico

Profesor Guía: **Dr. David S. Holmes**, Centro de Biología Genómica y Bioinformática,
Fundación Ciencia & Vida.

Profesor Patrocinante: **Dr. Davor Cotoras Tadic**, Laboratorio de microbiología,
facultad de Cs. Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile.

Santiago, Chile 2012

“Luchar, fracasar, volver a
luchar, fracasar de nuevo
volver otra vez a luchar, y así
hasta la victoria.”

Mao Tse Tung

Agradecimientos

Agradezco a todas aquellas personas que hicieron posible la realización de este trabajo:

A mi madre, Teresa, y a toda mi familia, por su incondicional cariño y apoyo en todos los procesos de mi vida.

A mi tía Piru, a quien recuerdo y extraño, quien hubiese estado feliz de alcanzar a verme finalmente convertido en un profesional.

A mi tutor, Dr. David Holmes, del Centro de Bioinformática y Biología Genómica de la Fundación Ciencia & Vida, por permitir la realización de mi tesis en su laboratorio y apoyarme en su desarrollo.

Al Dr. Davor Cotoras, de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, Universidad de Chile, por su siempre constante apoyo y ayuda durante este proceso.

A los miembros de la Comisión de Tesis: Dra. Daniela Seelenfreund y Dr. Sergio Álvarez, por sus útiles y constructivas correcciones.

Finalmente, a todas aquellas personas que me han acompañado en esta etapa de mi vida, y, con ello, han participado en mi formación personal y profesional.

Financiamiento

Esta tesis fue realizada en la Fundación Ciencia & Vida, Centro de Bioinformática y Biología Genómica, financiada por el proyecto FONDECYT N° 1090451.

Abreviaturas

Aa	: Aminoácidos.
Alf	: Alfabeto.
ARN	: Ácido ribonucleico.
FONDECYT	: Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico.
lfe	: Loop funcional elemental.
HMM	: Modelo oculto de Markov.
PDB	: Protein Data Bank
SD	: Desviación estándar.

Tabla de contenido

Agradecimientos	iii
Financiamiento	iv
Abreviaturas	v
Tabla de contenido	vi
Tabla de ilustraciones	vii
Resumen	ix
Abstract..	x
1.- Introducción	1
2.- Hipótesis.....	8
3.-Objetivo general	8
4.-Objetivos Específicos	8
5.- Materiales y métodos.....	9
5.1.- Búsqueda y selección de secuencias (bases de datos):	9
5.2.- Análisis de secuencias:	9
5.3.- Identificación de loop funcional elemental:	9
5.4.- Análisis de estructuras:	10
5.5.- Análisis de Loop funcional elemental:	10
5.6.- Determinación de modelos evolutivos:	11
5.7.- Creación de árboles filogenéticos:	11
5.8.- Creación de modelos tridimensionales proteicos:	11
5.9.- Determinación de contexto genómico:	12
6.- Resultados	13
7.- Discusión.....	33
8.- Conclusiones	39
9.- Referencias	40
ANEXOS	48

Tabla de ilustraciones

Figura 1.- Modelo de vida de la bacteria <i>A. ferrooxidans</i> en la superficie del mineral	4
Figura 2.-Estructura de rusticianina de <i>A. ferrooxidans</i>	4
Figura 3.-Cadena de electrones utilizada por <i>A. ferrooxidans</i>	6
Figura 4.- Modelo de vida de la bacteria <i>A. ferrooxidans</i> en la superficie del mineral	6
Figura 5.- Alineamiento de cianinas	13
Figura 6.- Alineamiento de secuencias candidatas	16
Figura 7.- Árbol filogenético de fragmentos de interés de las proteínas candidatas	17
Figura 8.- Comparación estructural de proteínas de la familia de las cianinas	18
Figura 9.- Comparación estructural y de sitios de interacción con el ión cobre de rusticianina y proteínas filogenéticamente cercanas	19
Figura 10.- Árbol filogenético de secuencias 16S de organismos generadores de cianinas.....	20
Figura 11.- Comparación de la subunidad II de la citocromo c oxidasa de <i>T. thermophilus</i> con rusticianina de <i>A. ferrooxidans</i>	21
Figura 12.- Alineamiento de Cyc1 de <i>A. ferrooxidans</i> con el citocromo c 552 de <i>T. thermophilus</i>	22
Figura 13.- Alineamiento de la subunidad a de AA3 de <i>A. ferrooxidans</i> con la BA3 oxidasa de <i>T. thermophilus</i>	24
Figura 14.- Sitio de interacción con el ion dicobre de la subunidad II de la citocromo c oxidasa de <i>T. thermophilus</i>	25
Figura 15.- Sección de la cadena transportadora de electrones de <i>T. thermophilus</i>	26
Figura 16.- Proteínas C552 de <i>T. thermophilus</i> y Cyc1 de <i>A. ferrooxidans</i>	26
Figura 17.- Proteínas citocromo BA3 oxidasa de <i>T. thermophilus</i> y subunidad a de AA3 de <i>A. ferrooxidans</i>	27
Figura 18.- Contexto genómico de las secuencias que codifican para la subunidad II de la citocromo c oxidasa de <i>T. thermophilus</i> y rusticianina de <i>A. ferrooxidans</i>	28

Figura 19.- Lfe de la rusticianina de <i>A. ferrooxidans</i>	29
Tabla 1.- Resultados de la búsqueda del lfe. de rusticianina	30
Figura 20.- Árbol filogenético de los loops de las proteínas resultantes del análisis del lfe. de rusticianina.....	31
Figura 21.- Árbol filogenético de 16S de organismos resultantes del análisis de lfe.de rusticianina	32
Figura 22.- Cambio propuesto del sitio de interacción con cobre	35

Resumen

El sostenido progreso de la tecnología computacional y el acelerado aumento del volumen de datos de interés científico en línea, han permitido el posicionamiento de la bioinformática como una disciplina de gran utilidad para las ciencias de la vida. En la presente memoria de título, se utilizaron herramientas bioinformáticas para dilucidar la relación existente entre diversas proteínas con un rasgo en común: su parecido a la rusticianina, una proteína indispensable para el proceso vital de oxidación de hierro de la bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Su secuencia de aminoácidos y pliegues estructurales fueron sometidos a análisis filogenético. Se dio especial atención a los aminoácidos críticos y estructura proteica rodeando su sitio de unión a cobre. Los resultados sugieren un enlace evolutivo entre la rusticianina y otras proteínas coordinadoras de cobre involucradas en variados procesos, pero desarrollando básicamente la misma función, transportar electrones. Finalmente, usando la subunidad II de citocromo c oxidasa de *Thermus thermophilus* como modelo, se muestra que esta familia de proteínas exhibe características ancestrales compartidas con rusticianina, que sugieren cómo las proteínas evolucionaron a partir de sus funciones en un metabolismo anaeróbico a las de metabolismo aeróbico cuando los niveles de oxígeno aumentaron hace alrededor de 2.400 millones de años.

Abstract

Prediction of evolutionary links starting from rusticyanin of *Acidithiobacillus ferrooxidans*

The continuing progress of computer technology and the rapid increase in the volume of online data of scientific interest have allowed the positioning of bioinformatics as a discipline of great use to the life sciences. In this thesis, various bioinformatics tools were used for the analysis of rusticyanin, an essential protein for the vital process of oxidation of iron, from the bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Rusticyanin belongs to the family of blue copper proteins. Its amino acid sequence and structural folds were subjected to phylogenetic analysis. Special attention was given to critical amino acids and protein structure surrounding its copper binding site. The results suggest an evolutionary link between rusticyanin and other copper-containing proteins involved in various processes but basically fulfilling the same function, namely electron transport. Finally, using the cytochrome c oxidase of *Thermus thermophilus* as a model, it is shown that this family of proteins exhibits ancestral characteristics shared with rusticyanin that suggest how proteins could evolve from functions in anaerobic metabolism to those of aerobic metabolism as atmospheric oxygen levels rose about 2.4 billion years ago.

1.- Introducción

La evolución es un proceso mediante el cual los organismos adquieren, modifican o eliminan ciertas características con el fin adaptarse al entorno y lograr tanto sobrevivir como proliferar. En evolución genómica, generalmente la presión selectiva causa que los procesos que conceden ventajas adaptativas a los organismos, sean mantenidos a lo largo de las generaciones, mientras que aquellos que no las generan, se pierden. Muchos de estos procesos sufren cambios, algunos de los cuales permiten a los organismos colonizar nuevos nichos; la sucesión de cambios nos permite trazar una historia evolutiva de los organismos y nos provee de información para especular sobre el origen de las especies. Por ejemplo, al tomar un gran conjunto de organismos para compararlos y analizarlos, probablemente aquel organismo que ha sufrido menos cambios sea más parecido al ancestro común y, por extensión, que las condiciones en las que vive, posiblemente sean parecidas a aquellas en las cuales vivió anteriormente (Schwartzman *et al.*, 2004). Hoy en día contamos con bastante información genética y proteica de una amplia gama de organismos, así como con las herramientas probabilísticas para manejarla, y con ello poder dilucidar las relaciones filogenéticas entre los organismos analizados. Esto nos permite especular sobre cómo era y cómo vivía el ancestro común.

Es muy posible que las primeras células en el planeta, ancestros comunes de todos los organismos que viven en la actualidad, tuviesen sólo una o pocas fuentes de energía. El proceso evolutivo permitió la obtención de energía de diversos orígenes, permitiéndoles colonizar nuevos nichos existentes, adaptándose a las condiciones ambientales del momento. Para la adaptación a nuevas fuentes de energía, fue requerido un desarrollo paulatino de mecanismos moleculares metabólicos más complejos. Es interesante que, aún considerando que las condiciones ambientales eran muy distintas a las actuales, los organismos extremófilos utilizan muchas de las fuentes de energía presentes en el pasado, como es el caso de las fumarolas hidrotermales, géiseres y efluentes minerales. Por ejemplo, la extracción de energía de efluentes minerales es utilizada, hasta la fecha, por microorganismos, y los mismos los aplicamos hoy en el proceso de biolixiviación.

El proceso de biolixiviación consiste en la utilización de microorganismos que, mediante su metabolismo, logran la extracción de minerales que nosotros rescatamos. Una de estas aplicaciones es la extracción del cobre, en la que la biolixiviación se diferencia de otros sistemas de extracción convencionales en los siguientes aspectos:

- Cantidad de energía requerida: Mucho menor que en otros procesos de extracción de cobre, como la pirometalurgia, debido a que los microorganismos sólo necesitan un ambiente óptimo para vivir y no requieren energía externa para funcionar.
- Impacto ambiental: Con una infraestructura adecuada, puede ser bajo o nulo, ya que no se liberan compuestos tóxicos al ambiente, pues es un sistema cerrado, es decir, que no libera materia al medio.
- Rentabilidad: Es un proceso rentable incluso al tratar mineral de baja ley (<0,5% de cobre); útil además para material sulfurado, el cual no es tratable vía lixiviación química.
- Velocidad: Es un proceso de extracción más lento que otros sistemas, pero esto puede ser revertido optimizando las condiciones para el crecimiento y funcionamiento bacteriano.

Las ventajas de la biolixiviación permiten que sea una opción viable para solucionar un problema creciente en la actualidad, el agotamiento de las reservas de cobre de alta ley. La biolixiviación permite, además, extraer cobre de manera rentable de mineral catalogado como desecho por ser de baja ley. Para optimizar la biolixiviación y así utilizarla para reemplazar o apoyar los sistemas actuales, se hace indispensable ahondar en el conocimiento de los mecanismos involucrados en el proceso.

El proceso de biolixiviación de cobre consiste en su extracción desde rocas mediante su oxidación de +1 a +2, pasando a un estado soluble, el que se logra mediante la reducción de ion hierro desde su estado de oxidación +3 a +2. Este paso es independiente de las bacterias. El rol que cumplen los microorganismos es regenerar los iones de hierro III (Fe^{+3}) mediante la oxidación de iones de hierro II (Fe^{+2}), ganando electrones en el proceso. Los microorganismos presentes en el medio generan sulfato (SO_4^{-2}) a partir de minerales sulfatados, como la pirita (FeS_2),

obteniendo un medio ácido mediante su formación. La sobresaturación del medio con sulfato permite la formación de sulfato cúprico (CuSO_4) al reaccionar con el ion cobre II (Cu^{+2}). El sulfato cúprico es tratado mediante electrólisis para la obtención de cobre de alta pureza.

La bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*A. ferrooxidans*), por su metabolismo quimiolitotrófico, es capaz de extraer metales eficientemente a partir de minerales de baja ley y drenaje ácido de minas. Por ello es considerada de gran importancia en el proceso de biolixiviación. Se estima que las condiciones en las que vive la *A. ferrooxidans* se asemejan a aquellas en las cuales se desarrollaron los primeros organismos durante la era arcaica (Dietrich *et al.*, 2006). Estas condiciones corresponden a ambientes con alto contenido de metales pesados y pH bajo (Orell *et al.*, 2010). *A. ferrooxidans* realiza la totalidad de sus procesos metabólicos adherida a la superficie mineral, mediante la formación de biopelículas (Figura 1). La acidez del medio permite que iones de hierro II (Fe^{+2}) no precipiten y es crítica para la oxidación por parte de la bacteria (Meruane *et al.*, 2003). Los Fe^{+2} , en solución, son metabolizados por la bacteria, obteniendo electrones y generando iones de hierro III (Fe^{+3}). En el medio, el Fe^{+3} oxida a Cu^{+1} , originando Cu^{+2} y Fe^{+2} . El Fe^{+2} producto de la oxidación de cobre es nuevamente oxidado a Fe^{+3} por *A. ferrooxidans* para la obtención de electrones. El Cu^{+2} en solución utilizado en la industria minera para obtener cobre de alta pureza.

El mecanismo molecular utilizado por *A. ferrooxidans* para la oxidación de hierro corresponde a una cadena de proteínas que extrae electrones desde el hierro para transportarlos al interior celular. Para ello el hierro es oxidado por el citocromo c (codificado por el gen *Cyc2*), extrayendo un electrón, que es transportado por la rusticianina (Figura 2) hacia el citocromo c4 o hacia el citocromo c552 (codificados por *CycA1* y *Cyc1* respectivamente). Cabe señalar que el proceso de oxidación de hierro es esencial para la supervivencia de la bacteria *A. ferrooxidans*, ya que permite la reducción de NAD^+ a NADH y también la extracción de protones desde el interior celular (Quatrini *et al.*, 2009) (Figura 3). La extracción de protones es un proceso crítico para esta bacteria, ya que permite mantener un pH interno neutro (~6,5) viviendo en un entorno de pH muy bajo (1,5-3,5).

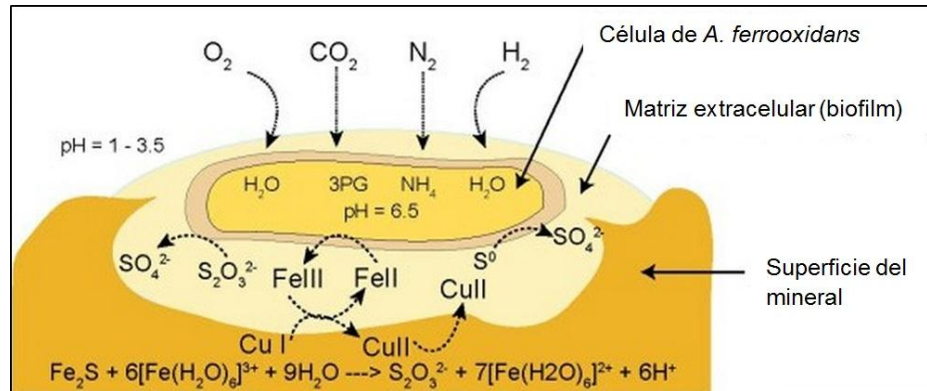


Figura 1.- Modelo de vida de la bacteria *A. ferrooxidans* en la superficie del mineral, se muestran las reacciones involucradas con su subsistencia. La bacteria metaboliza Fe^{+2} generando Fe^{+3} . En el medio, el Fe^{+3} es nuevamente convertido en Fe^{+2} , debido a que oxida Cu^{+1} contenido en las piedras, generando Cu^{+2} , soluble en el medio. Las especies sulfuradas son metabolizadas liberándose SO_4^{-2} al medio. (Valdés *et al.*, 2008)

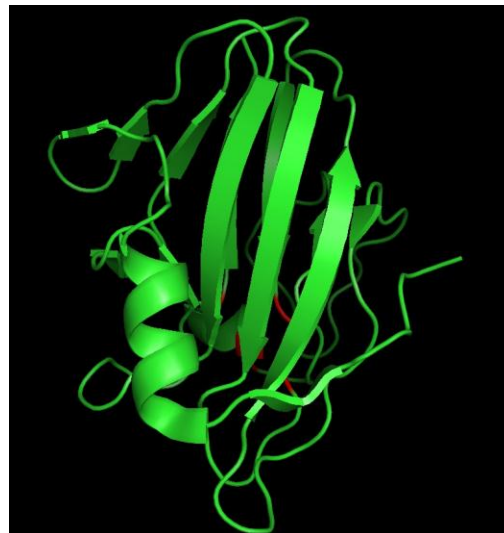


Figura 2.- Estructura de rusticianina de *A. ferrooxidans* obtenida mediante cristalografía de rayos X, mediante la técnica de dispersión anómala de longitudes de onda múltiples. La estructura central corresponde a un barril de láminas beta, con el sitio de interacción con el ion cobre en su interior. La estructura periférica es una hélice alfa, necesaria para interactuar con otras proteínas. (IRCY. Walter, R. L. *et al.*, 1996)

La rusticianina es una proteína rédox periplasmática que posee un centro de cobre el cual le da un potencial químico cercano a +680 mV (Botuyan *et al.*, 1996), el cual es el más alto de la familia de la cupredoxinas (familia de proteínas de bajo peso molecular, solubles, que contienen cobre) necesario para el correcto funcionamiento proteico a bajo pH. La estructura y composición de la rusticianina le da una gran estabilidad en medios ácidos (pH<2,0) la cual es necesaria debido a las condiciones extremas en las que vive la bacteria *A. ferrooxidans* (Cox *et al.*, 1978; Boyutan *et al.*, 1996).

Los sitios de coordinación para el ión cobre de la rusticianina y proteínas similares poseen 4 aminoácidos característicos que se unen directamente al ión, estos son cisteína, metionina y dos histidinas (Figura 4). En el caso de la rusticianina, son cisteína 138, metionina 148 e histidinas 85 y 143. Dichos aminoácidos se encuentran altamente conservados entre proteínas filogenéticamente cercanas, siempre cercanos al extremo carboxilo de la cadena proteica. Al igual que los sitios de coordinación, la configuración estructural de la proteína también se encuentra conservada y corresponde a un sándwich constituido de láminas beta (Vivekanandan *et al.*, 2004).

Las condiciones de vida de la *A. ferrooxidans* se asemejan a las condiciones existentes en tiempos ancestrales. Es posible que los mecanismos utilizados por las primeras células en aquel medio se asemejen a los de *A. ferrooxidans*. Lo anterior cobra especial importancia si la vida celular se originó o se presentó en etapas tempranas en un ambiente similar al que vive esta bacteria. De ser así, los mecanismos de obtención de energía podrían haber evolucionado acorde a la necesidad de aprovechamiento de otras fuentes de energía y la consiguiente presión adaptativa dada por el medio, generando nuevas especies. Si los mecanismos de obtención de energía evolucionaron en la forma propuesta, sería posible hacer un seguimiento de dichos cambios a través del análisis de sus componentes críticos. Para ayudar a trazar una historia evolutiva celular a partir de sus mecanismos de obtención de energía, analizando uno de sus componentes críticos, se busca dilucidar el camino evolutivo proteico de la rusticianina y proteínas potencialmente relacionadas filogenéticamente.

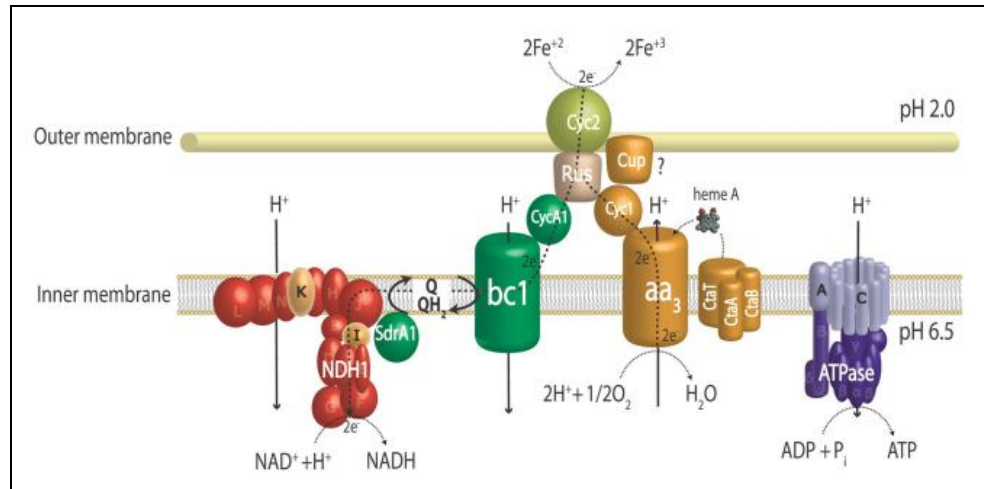


Figura 3.- Cadena de electrones utilizada por *A. ferrooxidans* para la generación de NADH y extracción de H^+ del interior de la célula. Se muestran los componentes del mecanismo proteico desde la extracción de electrones, mediante la oxidación de Fe^{+2} , y posterior transporte al interior celular. Rusticianina (Rus) es el intermediario entre Cyc2 y CycA1 o Cyc1, permitiendo la generación de NADH y la salida de protones, respectivamente. (Quatrini R. *et al.*, 2009)

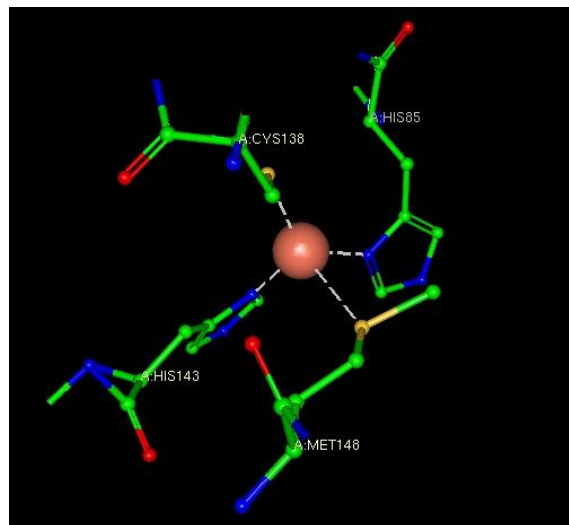


Figura 4.- Sitio de interacción de rusticianina (*A. ferrooxidans*) con el ión cobre. Dentro de la estructura de láminas beta, los aminoácidos histidina 85, cisteína 138, histidina 143 y metionina 148 se ubican en un bolsillo que permite alojar al ión cobre (esfera) e interactuar con él. (Vivekanandan *et al.*, 2004)

Los aspectos que se consideran para el análisis evolutivo de la rusticianina son la estructura y secuencia de la proteína, la estructura y secuencia del loop funcional elemental (lfe.), que contiene los sitios de coordinación para el ión cobre, y la presencia de aminoácidos críticos en posiciones específicas para la interacción con el ión cobre.

Los métodos utilizados para realizar esta investigación son alineamientos múltiples, búsqueda e identificación del motivo oculto de Markov (HMM), comparación de secuencias aminoacídicas con secuencias contenidas en las bases de datos UNIPROT (Apweiler *et al.*, 2004), PDB (Berman *et al.*, 2000) y NCBI, comparación de estructuras secundarias, determinación y comparación de lfe., generación de modelos proteicos tridimensionales y generación de árboles filogenéticos con la información encontrada.

Es importante recalcar que en la presente memoria de título convergen la ciencia aplicada y la ciencia básica. Aplicada porque *A. ferrooxidans* es una conocida bacteria biolixivante y su conocimiento es de gran utilidad para incrementar la eficiencia del proceso en el que está involucrada. Y básica porque la información buscada y la investigación realizada está al límite de la barrera del conocimiento actual, buscando su expansión.

2.- Hipótesis

La rusticianina de *A. ferrooxidans* está relacionada filogenéticamente con un ancestro de las proteínas coordinadoras de cobre.

3.-Objetivo general

- Reconstituir la relación filogenética entre rusticianina y proteínas que participan en procesos de obtención de energía en otros organismos.

4.-Objetivos Específicos

- Analizar y comparar la secuencia de rusticianina con secuencias obtenidas de proteínas con similitud estructural.
- Generar un árbol filogenético que incluya las proteínas de la familia de la rusticianina mediante MR BAYES.
- Identificar los sitios de coordinación para cobre de rusticianina y demostrar su conservación en otras proteínas mediante UGENE y LIGAND EXPLORER.
- Comparar gráficamente los residuos de coordinación del ión cobre de rusticianina con los de proteínas filogenéticamente cercanas.
- Generar un árbol filogenético que incluya las proteínas con similitud a rusticianina mediante MR BAYES.
- Comparar los árboles filogenéticos obtenidos entre sí y a su vez con árboles de 16S de referencia.
- Analizar otros elementos de la cadena de electrones a la que pertenece la rusticianina (*A. ferrooxidans*).

5.- Materiales y métodos

5.1.- Búsqueda y selección de secuencias (bases de datos):

Se utilizó la secuencia de rusticianina de *A. ferrooxidans* ATCC 23270, número NCBI GI: 218520076, para la búsqueda de cadenas aminoacídicas en las diferentes bases de datos. Primeramente se buscó en NCBI (nt y nr) mediante la herramienta PSI-BLAST (Altschul *et al.*, 1997), posteriormente se buscó en las bases de datos PDB (secuencias y estructuras publicadas) y UNIPROT.

Paralelamente se buscaron secuencias relacionadas a rusticianina mediante SAM-T08 (Katzman *et al.*, 2008), herramienta que utiliza la base de datos PDB para comparar tanto secuencia como estructura.

Para la búsqueda de ARN mitocondrial (16S), utilizado como referencia para la evaluación de los resultados obtenidos, se utilizó la base de datos ARB-Silva (Pruesse *et al.*, 2007).

5.2.- Análisis de secuencias:

Una vez obtenidas las secuencias candidatas a través de PSI-BLAST, fueron analizadas mediante alineamiento múltiple. Para las secuencias pertenecientes a la familia de las cupredoxinas (18 secuencias), ClustalX presentó un mejor desempeño al mostrar correctamente alineados los sitios de coordinación de ión cobre. Sin embargo, MAFFT (Kato *et al.*, 2002), con estrategia FFT-NS-i (método lento de refinamiento iterativo de máximo 1000 iteraciones), otorgó los mejores resultados ante un número mayor de candidatos (45 secuencias). Se utilizó el programa MEGA 5.03 (Tamura *et al.*, 2011) para obtener los alineamientos múltiples y árboles básicos.

5.3.- Identificación de loop funcional elemental:

El lfe. es un lazo proteico cerrado en forma de anillo de 25 a 30 aa. que proporcionan residuos funcionales importantes en patrones característicos para

alguna actividad proteica (Goncearenco *et al.*, 2010). Se determinó el lfe. de la rusticianina consultando su estructura PDB en la herramienta “Domain Hierarchy and closed Loops (DHcL)” (Koczyk *et al.*, 2008). Se identifica en la estructura, el loop donde se ubican los sitios de unión a ión cobre y su secuencia respectiva.

5.4.- Análisis de estructuras:

Las estructuras proteicas fueron obtenidas de la base de datos PDB y analizadas mediante los programas Ligand Explorer, Ugene (Fursov *et al.*, 2009), y PyMol (Delano, 2002).

Se utilizó Ligand Explorer para mostrar la presencia y posición del ión cobre, así como de los aminoácidos que lo enlazan, Ugene para la asignación de estructura secundaria a segmentos de las secuencias candidatas y PyMol para la superposición de las estructuras proteicas.

5.5.- Análisis de Loop funcional elemental:

La secuencia del loop obtenido de rusticianina fue analizada mediante HHpred (Söding *et al.*, 2005), utilizando las bases de datos de HMM (modelos ocultos de Markov) PDB70_29oct11 y SCOP70_1.75. El método de alineamiento múltiple de estructuras fue HHblits con 8 iteraciones. El puntaje de estructura secundaria fue obtenido considerando estructuras predichas sólo contra estructuras predichas (excluye estructuras proteicas existentes en base de datos, generando nuevas estructuras basándose sólo en sus secuencias). El alineamiento fue global (compara la secuencia consultada con todas las secuencias de las bases de datos utilizadas) y fue realineado con MAC (Algoritmo de alineamiento de máxima precisión) (Remmert *et al.*, 2012). El umbral de valor de E, la cobertura mínima de las coincidencias y la identidad mínima de las coincidencias de las secuencias con la secuencia de interés utilizadas para HHblits fueron 0,1; 10 y 10, respectivamente. El umbral de realineamiento de MAC fue 0,0 (global) y se activó la corrección de parcialidades

composicionales. El número de secuencias por HMM utilizado fue 1, con un 20% mínimo de coincidencias.

Se buscaron proteínas relacionadas al lfe. de rusticianina mediante SAM-T08, comparando secuencias y estructuras.

5.6.- Determinación de modelos evolutivos:

Se utilizó Prottest (Abascal *et al.*, 2005) para la selección del modelo evolutivo que mejor se ajusta para el conjunto de secuencias proteicas alineadas a analizar con Mr. Bayes (Ronquist *et al.*, 2003). Se considera el mejor resultado dado por las estrategias estadísticas AIC (criterio de información de akatite), BIC (criterio de información bayesiano) y -lnL (máxima probabilidad).

5.7.- Creación de árboles filogenéticos:

La generación de árboles filogenéticos a partir de los alineamientos de las proteínas candidatas fue realizada mediante aproximación bayesiana con el programa Mr. Bayes y utilizando la tasa y el modelo evolutivo propuesto por Prottest. El número de iteraciones utilizada fue variable, se aumentó hasta lograr una desviación estándar (SD) menor o igual a 0.01. Posteriormente los árboles generados fueron visualizados mediante el programa Figtree v1.3.1.

Los árboles filogenéticos de las secuencias de ARN 16S se generaron mediante MEGA 5,03.

5.8.- Creación de modelos tridimensionales proteicos:

La generación de estructuras proteicas terciarias a partir de secuencias aminoacídicas fue realizada mediante la comparación de su perfil de HMM con los de otras proteínas de estructura identificada utilizando la herramienta HHpred, que compara la secuencia y su perfil HMM con los de la base de datos

seleccionada. Se utilizó la base de datos pdb70_21jul, con 8 iteraciones HHblits máximo, considerando puntaje de estructura secundaria y modo de alineamiento local.

Obtenidos los resultados de HHpred se creó un modelo, mediante Modeller (Eswar *et al.*, 2007) a partir de la(s) proteína(s) con menor valor de E (se utiliza más de una si sus valores de E son de similar magnitud), seleccionándola (s) manualmente.

5.9.- Determinación de contexto genómico:

Se utilizó la herramienta de NCBI, de la sección Gene, denominada “Gene regions, transcripts, and products”.

6.- Resultados

La secuencia aminoacídica de rusticianina, utilizada como base, es del organismo *A. ferrooxidans* ATCC 23270 (número NCBI GI: 218520076). Se identificó su péptido señal mediante la herramienta SignalP (Petersen *et al.*, 2011) correspondiente a sus primeros 32 aa, se buscó similitud de la secuencia sin el péptido señal con otras proteínas mediante PSI-Blast (3 iteraciones), utilizando la base de datos nr (no redundantes) y las opciones por defecto, encontrando coincidencias con otras cianinas (Información mostrada en el anexo 1), proteínas coordinadoras de ión cobre, cuya relación con rusticianina era conocida (Zhang, 2010, tabla suplementaria S1). Las secuencias de las cianinas fueron alineadas utilizando ClustalW enfatizando en la similitud de los aminoácidos cisteína, histidina y metionina, que se ligan directamente con cobre (Figura 5).

Plastocyanin_A_variabilis	AGEYTFYCE---PHRGA--GMVGKITVAG-----
Pseudoazurin_A_cycloclastes	-GVYGVKCT---PHYGM--GMVGVVQVGDAPANLEAVKGAKNPKRAQ
Halocyanin_H_volcanii	EGTYDYPCS---PHKQL--GMVGRVVCGDPGGPAEEGAI PNEPGSGL
Cyt_c_oxidase_T_aquaticus	AGEYRIICNQYCGVGH--LMFGKIVVEE-----
Nitrosocyanin_N_europaea	AGAFTIWCQLHPKNIHL-PGTLN--VVE-----
RusticyaninA_A_ferrooxidans	AGTYYYVCQ-IPGHAAT--GMFGKIVVK-----
Sulfocyanin_S_acidocaldarius	AGDYMLVCG-ILGHAAS--GMWAVLNASNNVTAPYAVID-----
Mavicyanin_C_pepo	PGTFYFLCG-IPGHCQL--GQKVEIKVDPGSSSA-----
Uclacyanin_putative_A_thaliana	VGAIHFLCL-TPGHCSL--GMKLAVQVLAAVSLEPPSPSAPSPPSPS
Phytocyanin_A_thaliana	VGINYFICS-TPGHCSLNGGMKLAVNIVVAG-SAGPPATFTPPSSTPG
Plantacyanin_S_oleracea	-GQNYFICS-FPGHCGG--GMKIAINAK-----
Basic_blue_protein_C_sativus	-GQSYFICN-FPGHCQS--GMKIAVNAL-----
Umecyanin_A_rusticana	TGPQYYICT-VGDHCRV--GQKLSINVVGAGGAGGGATPGA-----
Dicyanin_S_lycopersicum	SGEHYYMCT-FPRHCSL--GQKLAINVTGSDVTAPTPTAATPSSPT
Auracyanin_B_C_aurantiacus	PGTYLYICT-FPGHYLA--GMKGLTVTP-----
Azurin_Methylomonas_sp	DEAYTYPCS-YPGHFSM---MRGLKLEE-----
Amicyanin_P_denitrificans	-GTDYHCT---PHP---FMRGKVVE-----
Auracyanin_A_C_aurantiacus	AGTYLYICT-VPGHYPL--MQGKLVVN-----

Figura 5.- Alineamiento de cianinas. Cisteína, histidina y metionina son los aminoácidos que están enlazando directamente con el ión cobre y muestran coincidencia entre las diferentes secuencias. La glicina, aún cuando no interactúa directamente con cobre, se encuentra muy conservada entre estas secuencias. No se han encontrado reportes de la funcionalidad de la glicina en las cianinas.

La proteína rusticianina guarda relación con las secuencias de miembros de la familia de las cianinas, perteneciendo a ella. Se caracteriza por un elevado potencial redox y estabilidad en medio ácido (Barrett *et al.*, 2006). El parentesco entre los miembros de la familia de las cianinas explica la coincidencia de sus puntos de interacción con ión cobre, como se muestra en la Figura 5. La subunidad II de la citocromo c oxidasa fue incluida para generar antecedentes sobre su historia evolutiva, aún cuando no es una cianina. Los puntos de interacción con ión cobre mostrados en los alineamientos de las Figuras 5 y 6 (cisteína, histidina y metionina) además de una histidina ubicada lejos de los otros tres residuos, están en contacto directo con el ión cobre. De estos aa, la cisteína es el residuo que cuenta con el tiolato, el cual se enlaza directamente con cobre, por lo que es fundamental para su coordinación (Zeng *et al.*, 2007). La histidina sirve como llave de paso para el control de las reacciones redox (Giudici-Orticoni *et al.*, 1999) y la metionina ocupa la posición axial (Hough *et al.*, 2001). Sin embargo y como se observa, en muchas proteínas la metionina es reemplazada por glicina o glutamina. Esta sustitución ocasiona la formación de enlaces más fuertes, favoreciendo la formación de dicha estructura para Cu(II) y Cu(I), respectivamente (Vivekanandan *et al.*, 2004). Las recientes investigaciones de Ando (2010) sugieren que la metionina en la posición axial tiene función en la reorganización redox en el sitio activo de la proteína. No se han encontrado referencias de la función de la glicina, que en rusticianina ocupa la posición 132, y se haya altamente conservada tanto en cianinas como en las demás secuencias candidatas

Se obtuvo el HMM a partir del alineamiento mediante HMMBuild (Eddy, 1998), resultando el patrón G-(5-6)X-C-(2-4)X-H-(2-6)X-M. El HMM obtenido fue utilizado en búsquedas mediante PSI-Blast para la obtención de las secuencias relacionadas (en adelante, señaladas como “secuencias candidatas”). Se seleccionaron todas aquellas secuencias que guardan relación con rusticianina por sus sitios de unión a ión metálico, los segmentos que contienen los aminoácidos característicos de coordinación o la mayoría de ellos, en el patrón antes señalado. Se hizo un alineamiento local con las secuencias candidatas con MAFFT. Las secuencias analizadas corresponden a fragmentos de la secuencia completa, los cuales fueron extraídos considerando la ubicación de los residuos de interés y los residuos conservados. Se ve que el

alineamiento fue efectivo por la superposición que muestran en él los residuos de interés (Figura 6).

Se aisló el fragmento de interés, que contiene los sitios de interacción con el ión metálico, de las cadenas aminoacídicas de las secuencias candidatas. La determinación de las líneas evolutivas seguidas por las proteínas de estos organismos fue determinada mediante análisis por Mr. Bayes en un árbol filogenético. En el análisis se utilizaron el modelo y la tasa sugerido por Prottest, correspondientes a WAG y gamma respectivamente. Al utilizar 3×10^6 generaciones, se obtuvo una SD de 0,007565. El árbol filogenético de las secuencias candidatas, obtenido por Mr. Bayes (Figura 7), sugiere que la rusticianina, de *A. ferrooxidans*, es la proteína más cercana a la proteína ancestral, seguida por auracianina y la subunidad II de la citocromo c oxidasa. Las otras proteínas se agruparon según su función, observándose un grupo de cianinas de plantas como grupo externo.

Se compararon estructuralmente las proteínas de la familia de las cianinas (Figura 8). Esta comparación sugiere una estructura central común; con ello se relaciona, aparte de la secuencia, la estructura de estas proteínas.

Se superpusieron las proteínas rusticianina de *A. ferrooxidans*, la subunidad II de la citocromo c oxidasa de *T. thermophilus* y auracianina de *C. aurantiacus*, mediante PyMol (Figura 9). El análisis muestra que son proteínas filogenéticamente cercanas a rusticianina en el árbol filogenético (Figura 7). Las estructuras proteicas de las figuras 8 y 9 fueron obtenidas de la base de datos PDB.

Cyt_C_Oxidase_T_aquaticus	---GEVTVRYTF-Q--KAG-EYRIICN----QYCGVGHG-LMFGKIVVE----
Cyt_C_Oxidase_T_scotoductus	---GEVTVRYTF-K--KAG-EYRIICN----QYCGLGHQ-NMFGKIVVK----
Cyt_C_Oxidase_T_thermophilus	---GEVTVRYTF-K--RPG-EYRIICN----QYCGLGHQ-NMFGTIVVK----
Twin_arg_transloc_R_ferrireducens	---QETKSVTFKA-D--KPG-VYWCYCT----NFCHALHL-EMRSRLV----
NosZ_Fragment_Azospirillum_sp	---QETKSVTFIA-D--KPG-IYWCYCT----NFCHALHM-----
NO_reductase_P_denitrificans	---QMTSSVTFVA-A--NPG-VYWYVYQ----WFCHALHM-EMRGRMLV----
Nitrosocyanin_N_europaea	---GETKTSFTA-D--KAG-AFTIWCQ----LHPKNIH--LPGLINW----
Mlr4711_protein_R_loti	---CKSGTLTVEL---QAG-KYLLICN----VPCHYGA--GMVVEFTV----
Secr_metal-binding_protein_S_lividans	---GKSA--TFTAPS--TAG-DFPYACT----IHP-----FMKGILTVO----
Outer_memb_protein_H.8_N_gonorrhoeae	---GESSITLDP-AKLADG-DYKFACT----FPGHGAL--MNGKVTLV----
Apo-azurin_A_denitrificans	---GESDSVTFDV-SKLTPEAYAYFCS----FPGHWAM--MKGTILKLS----
Azurin1_A_xylooxidans	---GETDSVTFDV-SKLAGEYAYFCS----FPGHFAL--MKGVLLKV----
Azurin_P_fluorescens	---GEKDSVTFDV-SKLAAGTDYAFFCS----FPGHISM--MKGTIVTK----
Azurin_P_putida	---GEKDSVTFDV-SKLAAGEKYGFCS----FPGHISM--MKGTIVTK----
Azurin_Methylomonas_sp.	---GKTSVKFKV-SALSKEAYTYFCS----YPGHFSM--MRGILKLE----
AuracyaninB_C_aurantiacus	---GESGVTFRF-P--APG-TYLYICT----FPCHYLA--GMKGLTIV----
AuracyaninA_C_aurantiacus	---NETVEVTFIA-P--AAG-TYLYICT----VPCHYPL--MCGKLVVN----
Amicyanin_P_denitrificans	---EQAYSITFT---EAG-TVDYHCT----PHD-----FMRCKVUVE----
Plastocyanin_A_variabilis	---GQSTSTFPADA--PAG-EYTFYCE----PHRGA--GMVVKITVAG----
Plastocyanin_P_laminosum	---GESYEITFSSDF--PAG-TYTYICA----PHRGA--GMVVKITVAG----
Carbohyd_bind_family_6_M_palustris	---PATITVTFAPS--TPG-TVFFRCG----VHPTL--MFGQIIVQ----
Secr_glycosyl_hydrol_Algoriphagus_sp	---NSEDVIMTVPS--ETG-DYFFVCT----LDPNHWK--MNGIMKVI----
RusticyaninA_A_ferrooxidans	---KFCGYTNFVHP--TAG-TYTYVYQ----IPGHAAT--GMFGKIVVK----
Sulfocyanin_S_acidocaldarius	---GASAEVWGP-I--SAG-DYMLVCG----ILGHAAS--GMWAVLVS----
Halocyanin_H_volcanii	---GASFSTYFE---AEG-TYDYFCS----PEKQL--GMVGRVVCG----
Membr-bound_dehydrog_P_brasiliensis	---GQYRLTFTAPK--EPG-EYFYVCT----FPRHWMR--MYGVWVWV----
Pseudoazurin_H_denitrificans	---GFSKEVVFNA-E--KEG-LYVLKCA----PHYGM--GMVVLVQVC----
Copper_ion_bind/e_carrier_A_thaliana	---FTKQNDIIL-S--EVC-KLWFICG----VDDHCVN--GQKLSINVA----
Mavicyanin_C_pepo	---YTSKADSIPL-K--RPG-TFYFLCG----IPGHCQL--GQKVEIKVD----
Plantacyanin_S_oleracea	---YSSGQDIRKL---TRG-QNYFICS----FPGHCGG--GMKIAINAK----
Umecyanin_A_rusticana	---MITFPVKIML-N--TIG-PQYIICT----VGDHCRV--GQKLSINW----
Dicyanin_S_lycopersicum	---ISNGPARIL-T--NSG-EHYMCT----FPRHCSL--GQKLAIVT----
Uclacyanin_putative_A_thaliana	---FSDGDTKIDL-T--KVG-AIHFLCL----TPGHCSL--GMKLAIVQVL----
Phytocyanin_A_thaliana	---HSDGDTKIDL-K--TVG-INYFICS----TPGHCSLNG--GMKLAIVNV----
Allergen_Ra3_A_artemisiifolia	---EPGGDRFTL-L--TPG--SHFICTKDQKVFACVPGR-----
Laccase_C_cinereus	T--GDEVTVRFRT-D--NPG-PWFEECH----IEFHLMN--GLAIVFAE----
Laccase_T_thermophilus	PAAGDNVTVRFRT-D--NPG-PWFELCH----IDFHLEA--GFVAVFAE----
LacB_T_thermophilus	P--GMVTVRFRT-D--NAG-PWFELCH----IDFHLEA--GFVAVFAE----
Laccase_M_albomyces	---GCVLLAIFRT-D--NPG-AWLFEECH----IAWHVSG--GLSVDFLE----
Laccase_S_coelicolor	---ADSPGQIIAGEGVGAG--AMVYHCH----VQSHSDM--GMVGLFLVK----
Multicopper_oxidase_B_subtilis	---GEVLRIAATFGP--YSG-RYVWHCH----ILEHEDY--DMGRPDIT----
Nitrite_Reductase_A_faecalis	---CEKTLRFKA-T--KPG-VFVYHCAPPG-MVPWVVS--GMNGAIMV----
Nitrite_Reductase_A_cycloclastes	---GEETLRFKA-T--KPG-VFVYHCAPEG-MVPWVVS--GMNGAIMV----
Nitrite_Reductase_A_xylooxidans	---GEQAILRFKA-D--RSG-TFVYHCAPEG-MVPWVVS--GMSGILMV----
Nitrite_Reductase_R_sphaeroides	---GEKVLRFKA-T--RAG-AFVYHCAPPGMIPWVVS--GMAGCIMV----
PAN_1_N_gonorrhoeae	---CRTSTFDFKA-L--QPG-LYIYHCAVAP--VGMHIAN--GMVGLILV----
Nitrite_Reductase_P_haloplanktis	---GHTSTFDFKA-L--NPG-LYIYHCATAP--VGMHIAN--GMVGLILV----
Nitrite_Reductase_H_denitrificans	---GEETVTFKA-L--IPG-IYVYHCATPS--VPTHITN--GMVGLLLV----
Blue_Copper_Oxidase_N_europaea	---GDTFTYKFKA-E--PAG-TMWHCHVN--VNEHVTR--GMWGPLIV----
Trimeric_multiCu_oxid_Arthobacter_sp	---GQSFVTFEDA-T--PFG-THLYHCHQSP--LAPHIAK--GLYGGFIV----

G - (5-6)X-C - (2-8)X - H-(2-7)X-M

Figura 6.- Alineamiento de secuencias candidatas. Los aminoácidos marcados están conservados entre las diferentes cadenas aminoácídicas, siendo cisteína, histidina y metionina aquellos que coordinan al ión cobre. Algunas proteínas prescinden del residuo metionina. Al igual que en el caso de las cianinas, el aminoácido glicina (marcado en rojo) se encuentra en la mayoría de las proteínas. Basándose en el alineamiento, se dedujo el patrón característico, el que se muestra en la parte inferior de la figura. Rusticianina está marcada como referencia.

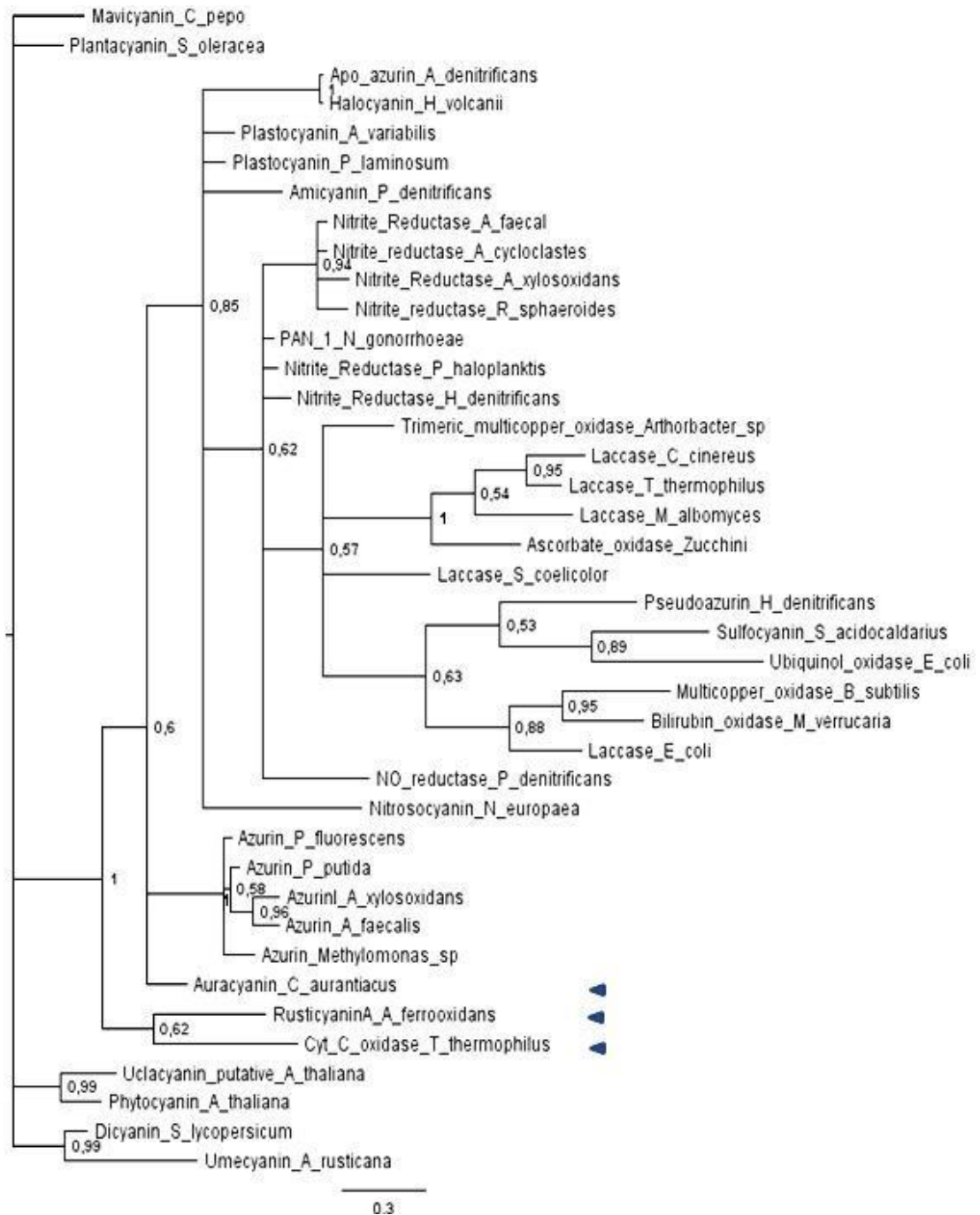


Figura 7.- Árbol filogenético obtenido mediante Mr. Bayes a partir de los fragmentos de interés de las proteínas candidatas. Se marcan las proteínas más emparentadas a la proteína ancestral. Se observa que las proteínas procedentes de plantas se diferencian como grupo externo en el árbol construido. El número mostrado en cada nodo corresponde al valor de probabilidad calculado por el programa.

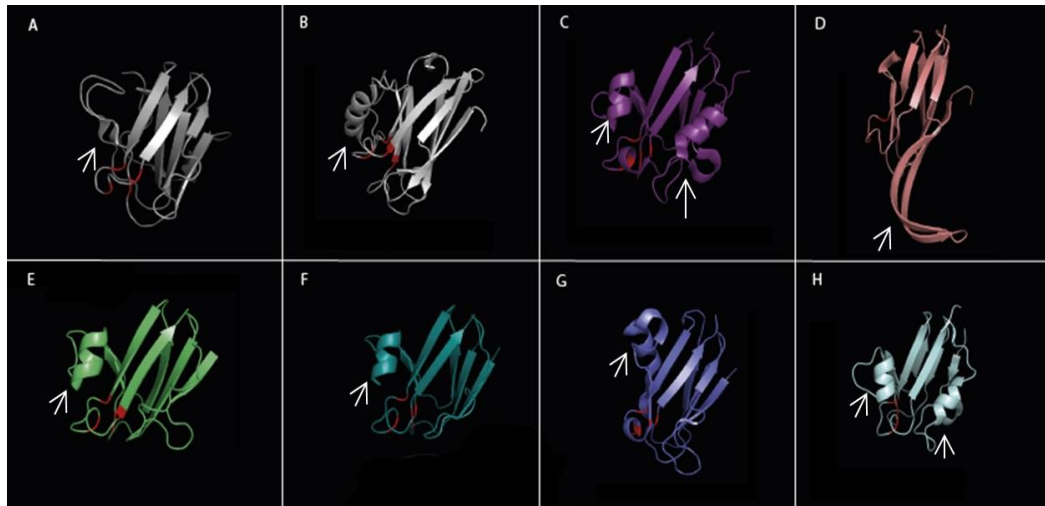


Figura 8.- Comparación estructural de proteínas de la familia de las cianinas, (A)Amicianina (3L45, Sukuman *et al.*, 2010), (B) Azurina (2H47, Dodd *et al.*, 2000), (C) Mavicianina (1WS7, Xie *et al.*, 2004), (D) Nitrosocianina (1IBY, Lieberman *et al.*, 2001), (E) Proteína básica azul (1CBP, Guss *et al.*, 1996), (F) Plantacianina (1F56, Einsle *et al.*, 2000), (G) Plastocianina (1NIN, Badsberg *et al.*, 1996), (H) Umecianina (1X9U, Koch *et al.*, 2005). Se observa que todas las proteínas tienen en común el barril de láminas beta central. Las flechas blancas muestran las estructuras anexas al barril de láminas beta central.

Al igual que la secuencia, la comparación de las estructuras publicadas de las cianinas (Figuras 8 y 9a, b, c), indica una alta conservación de la forma proteica, de barril de sábanas beta. Dicha conservación también se observa en los puntos de coordinación con ión cobre, que en todos los casos se encuentra en la base de la estructura. Se muestra que al superponer las estructuras, los aminoácidos de coordinación quedan ubicados en un mismo sector (Figura 9-E). En las proteínas varían las estructuras anexas al barril beta, encontrándose, generalmente, una hélice alfa asociada (señaladas por flechas blancas en las Figuras 8 y 9). Su utilidad es otorgar una correcta configuración espacial subcelular y ensamblaje al sistema proteico, lo que posibilita el correcto funcionamiento del sistema al cual pertenece la proteína.

Según los antecedentes aportados por el árbol filogenético, las proteínas más cercanas a rusticianina y a la proteína ancestral común son auracianina y la subunidad II de la citocromo c oxidasa. Dichas proteínas fueron comparadas estructuralmente en la Figura 9 a, b, c y d. Se observa similitud tanto en su conformación como en el sitio de unión a ión cobre. En la figura 9 e es posible indentificar los residuos críticos de unión a cobre en proteínas de cobre tipo I. La diferencia observada entre estas proteínas cercanas radica en la helice alfa ubicada fuera del barril de sábanas beta, indicando una interaccion diferente con las proteínas con las cuales se asocian.

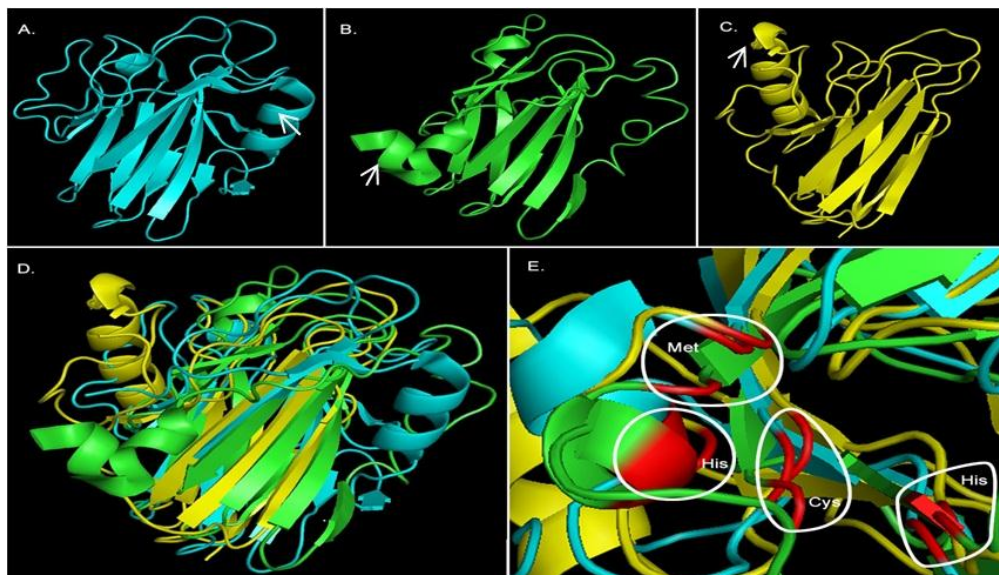


Figura 9.- Comparación estructural y de sitios de interacción con el ión cobre de rusticianina y proteínas filogenéticamente cercanas. (A).- Rusticianina, de *A. ferrooxidans*. (B).- Subunidad II de la citocromo c oxidasa, de *T. thermophilus* (2FWL, Muresanu *et al.*, 2006), (C).- Auracianina, de *C. aurantiacus* (1QHQ, Bond *et al.*, 2001) (D).- Superposición estructural de rusticianina, subunidad II de la citocromo c oxidasa y auracianina. (E).- Comparación de los sitios de coordinación con el ión cobre. Las flechas blancas muestran las estructuras anexas al barril de láminas beta central.

Como referencia, se generó un árbol con las secuencias de ARN 16S de los diferentes organismos que generan cianinas. Las secuencias fueron obtenidas de la base de datos ARB-Silva, se utilizó MAFFT para alinearlas y el árbol filogenético fue generado con Mr. Bayes (Figura 10). Se observa la formación de tres ramas, la

superior, correspondiente a bacterias; la intermedia, correspondiente a arqueas y la inferior, correspondiente a plantas.

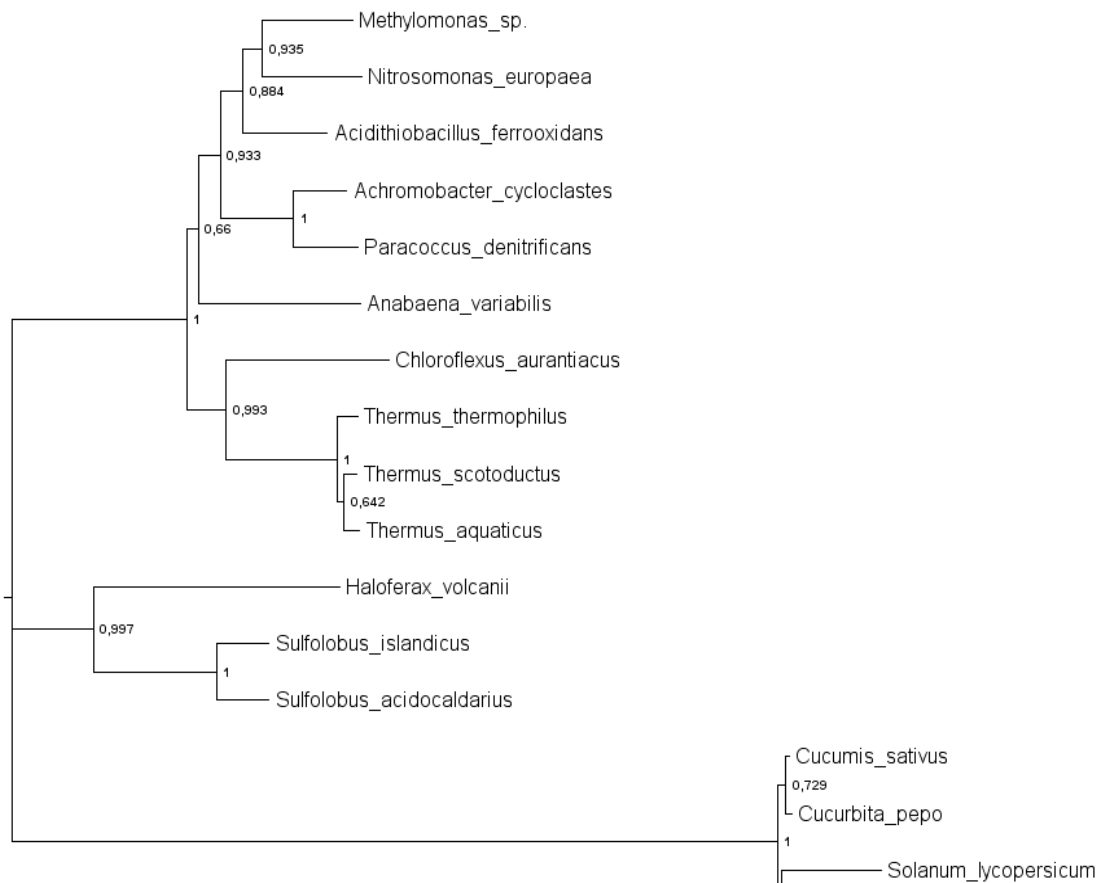


Figura 10.- Árbol filogenético de secuencias 16S pertenecientes a organismos que generan proteínas de la familia de las cianinas. Se observan tres ramas: Bacterias (superior), arqueas (intermedia) y células vegetales (inferior). El número mostrado en cada nodo corresponde al valor de probabilidad calculado por el programa.

Se compararon las secuencias de la subunidad II de la citocromo c oxidasa, de *T. thermophilus*, con la rusticianina de *A. ferrooxidans*, mediante un alineamiento con MAFFT (Figura 11). Se señalan las estructuras secundarias y los sitios de unión con cobre. Se observa conservación tanto de los aminoácidos de interacción con ion cobre como de las estructuras secundarias de la proteína. Sin embargo, la subunidad II de la citocromo c oxidasa posee dos cisteínas en el sitio de unión a cobre, a diferencia de la rusticianina, que sólo posee uno. Esta diferencia le confiere la capacidad de unir iones dicobre (Maneg *et al.*, 2003). Además, la secuencia aminoacídica de la rustianina presenta dos fragmentos, uno de 11 aa y otro de 7 aa, que no comparte con la subunidad II de la citocromo c oxidasa. No se encontró información acerca de la funcionalidad de estas secciones.

```

CLUSTAL format alignment by MAFFT L-INS-1 (v6.850b)

Cyt OX T thermophil M-----AYTLATHTAGVI PAKLERV-DPTIVRQEGPWADPAQAVVQT
Rusticyanin_A_f MYTQNTMKKNWYVIVGAAAALAATVGMGTAMAGTLDTTWKEATLPQVKAMLEKDTGKVS
*          *  **  *  ***:*  .  .  :*:  .  :  .  *  .

Cyt OX T thermophil GPNQY---TVYVLA-----FAFGYQPNP-IEVPQGA--EIVFKITSPDVIHGFI
Rusticyanin_A_f DIVTIYSGKIVHVVAADVLPGFPPSFEVHDKKNPTLEIPAGATVDVIFINTNKGFGHSFD
.. *  **:*:*          *  .  :  **  :*:  **  **  :*:  *  .  .  .  *  .

Cyt OX T thermophil VEGININVEVLP-----GEVSTVRYTFK-RPGEYRIICNQYCGLGHQN
Rusticyanin_A_f ITKKGPPYAVMPVIDPIVAGTGFSPVPKDGKFGYTDFTWHPTAGIYYYVC-QIPGHAATG
:  ..  *:*          *:*..  .  :*:  .  *  *  :*  *  *  .  .

Cyt OX T thermophil MFGTIVVKE
Rusticyanin_A_f MFGKIVVK-
***.****

```

Figura 11.- Comparación de la subunidad II de la citocromo c oxidasa (*T. thermophilus*) con rusticianina (*A. ferrooxidans*). Los residuos marcados por un cuadro corresponden a los sitios de unión con ión cobre. Los espacios marcados con una línea roja corresponden a hélices alfa y los con línea azul, a láminas beta. Asterisco (*) simboliza identidad, dos puntos (:) sustitución conservativa y punto (.) sustitución semi-conservativa.

En aras de sugerir una conservación del mecanismo de transporte de electrones entre ambas especies, se compararon otros elementos de las cadenas. Se buscaron semejanzas entre Cyc1 (proteína que está en contacto directo con rusticianina de *A. ferrooxidans*) con las secuencias nucleotídicas (tBLASTn) y aminoacídicas (protein BLAST) publicadas de *T. thermophilus*. Como resultado, se encontró similitud con citocromo c552. Se comparó la secuencia aminoacídica de ambas proteínas mediante un alineamiento con MAFFT (Figura 12). Se realizó igual procedimiento con la subunidad a de AA3 de *A. ferrooxidans* encontrándose similitud con la subunidad I de BA3 oxidasa de *T. thermophilus* (Figura 13).

```

CLUSTAL format alignment by MAFFT L-INS-1 (v6.850b)

Cyc1_A_ferrooxi GRDTLYPIVPRLAGQHKSYLEAQLKAYKDHSRADQNGEIMWNPVAQALDSAKITALADYF
c552_T_thermoph -----MAQA-----
                               :***

Cyc1_A_ferrooxi NAQKPPMQSSGIKHAGVKEGKAI FNQGV TNEQIPACMECHGSAGQG-AGPFPRLAGQ---
c552_T_thermoph -----DGAKIYAQ-----CAGCHQONGQGIPGAF PPLAGHVAE
                               :*  * : *          *  ** .  *** .*. **  ***:

Cyc1_A_ferrooxi -----RYGYIIQQLT YFHNGTRVNILMNQIAKNITVAQMKD--VAA YLSSL-----
c552_T_thermoph ILAKEGGREYL ILLVLLYGLQGQIEVKGMKYNGVMSSFAQLKDEEIAAVLNHIATAWGD A K
                               *:*  * *  :*      .  * : .  :.***:**  :** * . :

Cyc1_A_ferrooxi -----
c552_T_thermoph KVKGF KPFTAEEVKKLR AKKLT PQQVLAERKKLGLK

```

Figura 12.- Alineamiento de Cyc1 (*A. ferrooxidans*) con citocromo c552 (*T. thermophilus*) mediante MAFFT. Se observan zonas acotadas similares entre ambas proteínas. Asterisco (*) simboliza identidad, dos puntos (:) sustitución conservativa y punto (.) sustitución semi-conservativa.

Se observa que si bien las secuencias no conservan un alto grado de identidad (30% de identidad en el alineamiento de AA3 de *A. ferrooxidans* con la subunidad I de la BA3 oxidasa de *T. thermophilus* y 31% en el caso de los citocromos c552), éstas sí comparten similitud de ciertos aminoácidos en áreas acotadas distribuidas a lo largo de las proteínas. Se evaluó si dicha similitud se originó de forma azarosa, observando el valor E al comparar las proteínas supuestamente relacionadas. En el caso de AA3 de

A. ferrooxidans con la subunidad I de la BA3 oxidasa de *T. thermophilus* se obtuvo el valor $E\ 1e^{-16}$ y en el caso de los citocromos c552 se obtuvo $2e^{-3}$. Dichos resultados sugieren que las proteínas analizadas son similares.

Al comparar la estructura del sitio de unión a cobre de rusticianina y de la subunidad II de la citocromo c oxidasa (Figura 14), se observa que la subunidad II de la citocromo c oxidasa expone dos cisteínas hacia el ión, mientras que la rusticianina expone una cisteína. La diferencia de cisteínas permite la unión de dos átomos de cobre en un ion dicobre, en el caso de dos cisteínas, o un ion cobre, en el caso de una cisteína.

Se analizaron estructuralmente los componentes de la cadena transportadora de electrones de *A. ferrooxidans*, con sus respectivas interacciones (Figura 3), y se compararon con los correspondientes a *T. thermophilus*. Los componentes de la cadena de electrones de *T. thermophilus* fueron obtenidos de dos estructuras de complejos que contienen la subunidad II de la citocromo c oxidasa, uno con C552 (pdb: 2FWL) y otro con la subunidad I de BA3 oxidasa (pdb: 3EH3). Las estructuras de complejos se ensamblaron mediante alineamiento estructural con PyMol y se compararon con el modelo de la cadena transportadora de electrones de *A. ferrooxidans* (Figura 15).

CLUSTAL format alignment by MAFFT L-INS-1 (v6.850b)

```

AA3a_A_ferrooxi MATNEIQESALNMMGVDKTPFAASMLFPLVRATLWGLTGYFAAAWITALLLHTVIVNPLP
Cyt_BA3_ox_T_th SEISRVYEA-----YPEKKAT-----LYFLVLGFLA
      ..: *:          :* :**          *: :.: *.

AA3a_A_ferrooxi ATVGYVVGVLVCLMGSGVWEGWIRRAFPGGKEAPTYTGIERYFRFGPDSKSTAVRYVVLNI
Cyt_BA3_ox_T_th LIVGSLFGPFQALNYGNVDAYPLLHMHMHHHHAVRASEISRVYEAYPEKKAT-LYFLVLGFLG
      ** :.* . * ..* : . :.* : *.* :. *!.*:* : :!.*:

AA3a_A_ferrooxi VTFFLAGMAAMAIRIELLTPDSTSW---WLSEIQ-YNQTFGIHGLMMLLGVVASAIVGGV
Cyt_BA3_ox_T_th LALIVGSLFGPFQALNYGNVDAYPLLKRLLPFVQSYQGLTLHGVLMAI-VFTQLFAQAI
      :!.*: :. :. :. * :. * . * * * :!.*: : *!.* :. :.

AA3a_A_ferrooxi GYYLILPLMLGTRNVVFPKLLGLSWMLLPPATVAVFMSPTIGGFQTGWGWYPPLAQNSGSG
Cyt_BA3_ox_T_th MVYLPARELNMRPNM--GLMMLSWMMAFIGLVVAALPELLANEATVLYTFYPLPKGH----
      ** . * . * : * : ****: . *.. :. . . : **** :

AA3a_A_ferrooxi IVWYVLGAATILFASLLGAINIAGTMVYMRKGMSELGRVP-----IFVWGLFAAATI
Cyt_BA3_ox_T_th --WAFYLGASVFVLSLTVVSIYIVLDL-WRRWKAANPGKVTPLVTYMAVVFWMMLFLASLG
      * . !.*:.* * :* * . : : * * . *!* . : * * * :

AA3a_A_ferrooxi LVVESPATYTGALMDLSDMIAGSHFYTGPTGHPLAYLDQFWFLFHPPEVYVFLPAPAFIWL
Cyt_BA3_ox_T_th LVLEAVLFLLPWSFGLVEGV-----DPLVARTLFWWTGHPIVYFWMLLPAYAIIY
      **!*: :.* : : .** .** : * * *!.*:****!*

AA3a_A_ferrooxi EILPAAAKRPLFARGWAIAGLVGVSMGLGMLGVHHTYFT--AVSDARMPIFMTITETVSIIP
Cyt_BA3_ox_T_th TILPKQAGGRLVSDPMARLAFLLFLLSTPVGFHHQFADPGIDPTWKMHSVLTLPVAVP
      *** * *!.* : * :. : :!*: :*.* * : . : : * .!* *!*

AA3a_A_ferrooxi TGFIYLSAIGTL-WGGRLR-----INAAVLLVLMAMMNFLLIGLGTGIFNAD
Cyt_BA3_ox_T_th SLMTAFTVAASLEFAGRLRGGRLFGWIRALPWNPAFVAPVLGLLGFIPGGAGGIVNAS
      : : :. :.* :!.***          *!.*: :!.*: * * **!*

AA3a_A_ferrooxi VPADLQLHNTYWVIAHFHYTMLGGVIFSWIAALYMWFPKVTGRKINEFWGKFH--AWWF
Cyt_BA3_ox_T_th FTLDYVHNTAWVPGFHFLQVASLVTLTAMGSLYMLLPNLTKGKIPISDAQRRLLGLAVVWLW
      .. * :*** ** !.* : . * :. :!.* :!*:* *!.* :. :. * :

AA3a_A_ferrooxi FVFFNCTFFPMFIAGLDGMNRRIAIYLPYLHDINLFMSSIFF-LGAGFLIPLANLLYSW
Cyt_BA3_ox_T_th FLGMMIMAVGLHWAGLLNVPRR--AYIAQVPDAYPHAAVPMVFNVLGIVLLVALLFIY
      * : . :. * * .!.* : * * *!.* : * . :. : * :!.*: : * * * :

AA3a_A_ferrooxi RYGPKAEBANPWGNSGLEWQIKSPTPYVPYPAGTEP-EVVGPNNDYAAEAKEPFIWV----
Cyt_BA3_ox_T_th GLFSVLLSREKPELAE----APLPFAEVISGPEDRRLVLAMDRIQFWFAVAAILVVLAY
      . :. :. : * :* *!.* :!* *!.* :* . * . . * *

AA3a_A_ferrooxi -----PTPS---K
Cyt_BA3_ox_T_th GPTLVQLFGHLNPVPGWRLW
      *!.*

```

Figura 13.- Alineamiento de la subunidad a de AA3 (*A. ferrooxidans*) con BA3 oxidasa (*T. thermophilus*) mediante MAFFT. Se muestran residuos similares distribuidos en la toda la extensión de las cadenas. Asterisco (*) simboliza identidad, dos puntos (:) sustitución conservativa y punto (.) sustitución semi-conservativa.

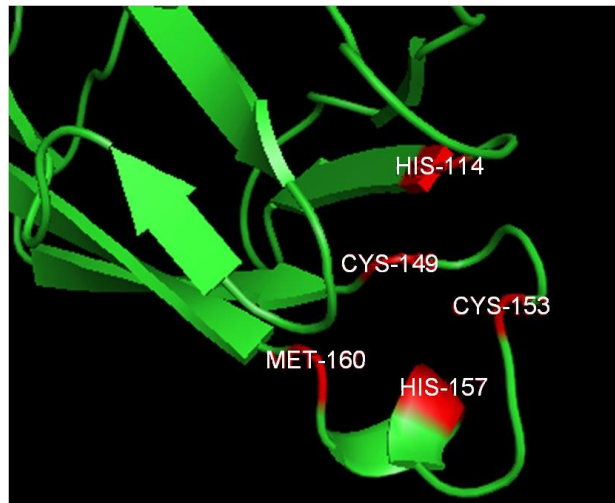


Figura 14.- Sitio de interacción con ión dicobre de la subunidad II de la citocromo c oxidasa de *T. thermophilus* (2FWL, Muresanu *et al.*, 2006). Los aminoácidos que interactúan con el ión dicobre, marcados en la estructura con color rojo, son histidina 114, cisteína 149, cisteína 153, histidina 157 y metionina 160.

Se compararon las estructuras de C552 (*T. thermophilus*) con c552, codificado por Cyc1 (*A. ferrooxidans*). La secuencia aminoacídica de Cyc1 fue obtenida a partir de la secuencia génica publicada en NCBI (ID: 7135079). Se obtuvo la estructura de la proteína de *A. ferrooxidans* a partir de la secuencia aminoacídica, según lo descrito en métodos. La estructura de c552 de *T. thermophilus* se obtuvo de pdb (pdb: 2FWL) (Figura 16).

Se compararon también las estructuras proteicas de la subunidad I de BA3 oxidasa (*T. thermophilus*) y la subunidad a de AA3 (*A. ferrooxidans*) (Figura 17). La estructura de la proteína de *T. thermophilus* se obtuvo de pdb (pdb: 3EH3). La estructura de la proteína de *A. ferrooxidans* fue lograda a partir de su secuencia aminoacídica depositada en NCBI (código GenBank: CAA07035.1) según lo descrito en métodos.

Las Figuras 16 y 17 muestran que las estructuras de las proteínas previamente citadas son similares, aún cuando poseen diferencias en sus aminoácidos. Se destaca que las estructuras de la subunidad I de BA3 oxidasa de *A. ferrooxidans* y la subunidad

a de AA3, de *T. thermophilus* presentan un alto grado de similitud , obteniendo un valor P del alineamiento estructural de 0, pese a la diferencia de sus secuencias.

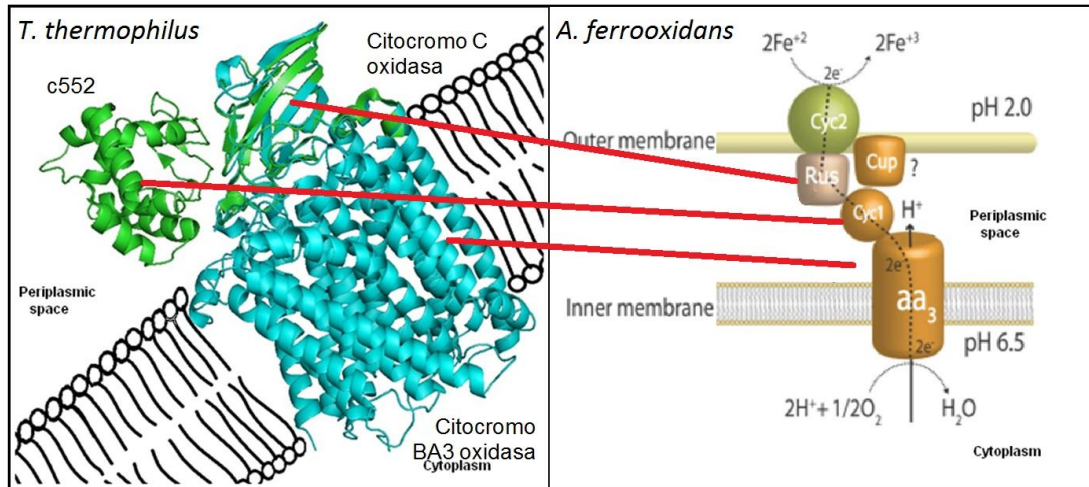


Figura 15.- Comparación de una sección de la cadena transportadora de electrones de *T. thermophilus* (Compuesta por las estructuras 2FWL y 3EH3) con sección de modelo propuesto de cadena transportadora de electrones de *A. ferrooxidans* (Quatrini R. *et al.*, 2009). Las líneas representan la relación entre las proteínas.

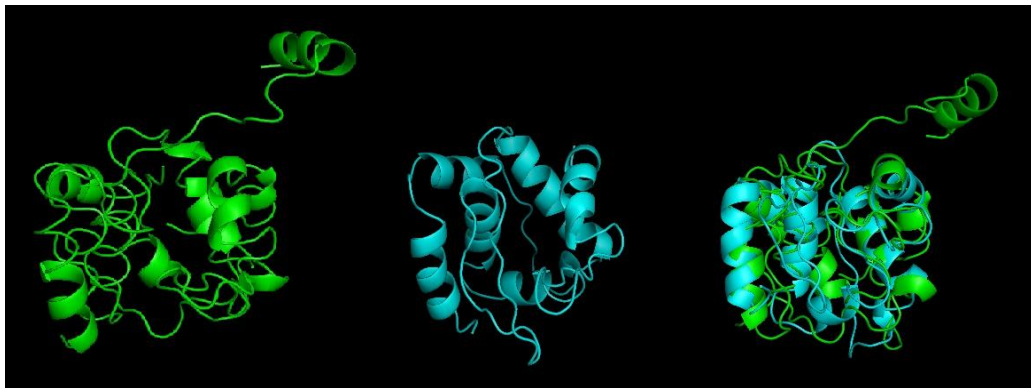


Figura 16.- Comparación de las proteínas periplásmicas que interactúan con las proteínas de interés. Proteínas C552 de *T. thermophilus* (Muresanu *et al.*, 2006) (izquierda), Cyc1 de *A. ferrooxidans* (centro), alineamiento estructural (derecha). El valor P del alineamiento estructural es $3,19 \times 10^{-2}$ (menor a 0,05 es significativo).

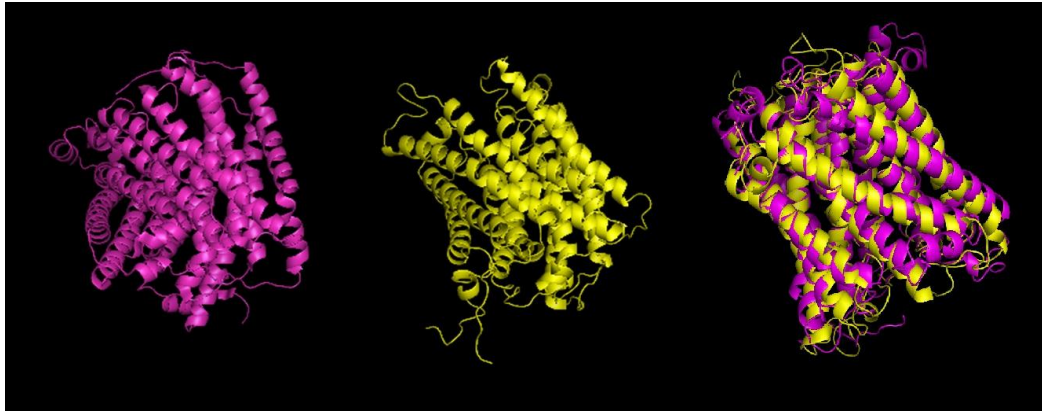


Figura 17.- Comparación de las proteínas transmembrana que interactúan con las proteínas de interés. Proteínas citocromo BA3 oxidasa de *T. thermophilus* (3EH3, Liu *et al.*, 2009) (izquierda), la subunidad a de AA3, de *A. ferrooxidans* (centro), alineamiento estructural (derecha). El valor P del alineamiento estructural es 0 (menor a 0,05 es significativo).

Se buscaron los genes de las proteínas rusticianina y la subunidad II de la citocromo c oxidasa en la base de datos NCBI. Se observó su contexto genómico en la sección “Genomic regions, transcripts and products”. Se identificaron los genes que codifican para las proteínas que interactúan con rusticianina y la subunidad II de la citocromo c oxidasa (Figura 18).

El análisis del contexto genómico del gen de rusticianina, de *A. ferrooxidans* y el gen de subunidad II de la citocromo c oxidasa, de *T. thermophilus*, mostrado en la Figura 18, relevó que ambos se encuentran cercanos a los genes que codifican para las proteínas AA3 y la subunidad I de BA3 oxidasa, respectivamente. Sin embargo, sólo el gen que codifica para c552 de *A. ferrooxidans* está cercano al de la proteína de interés. El resultado muestra que la conservación observada a nivel proteico no se ve reflejada a nivel génico.

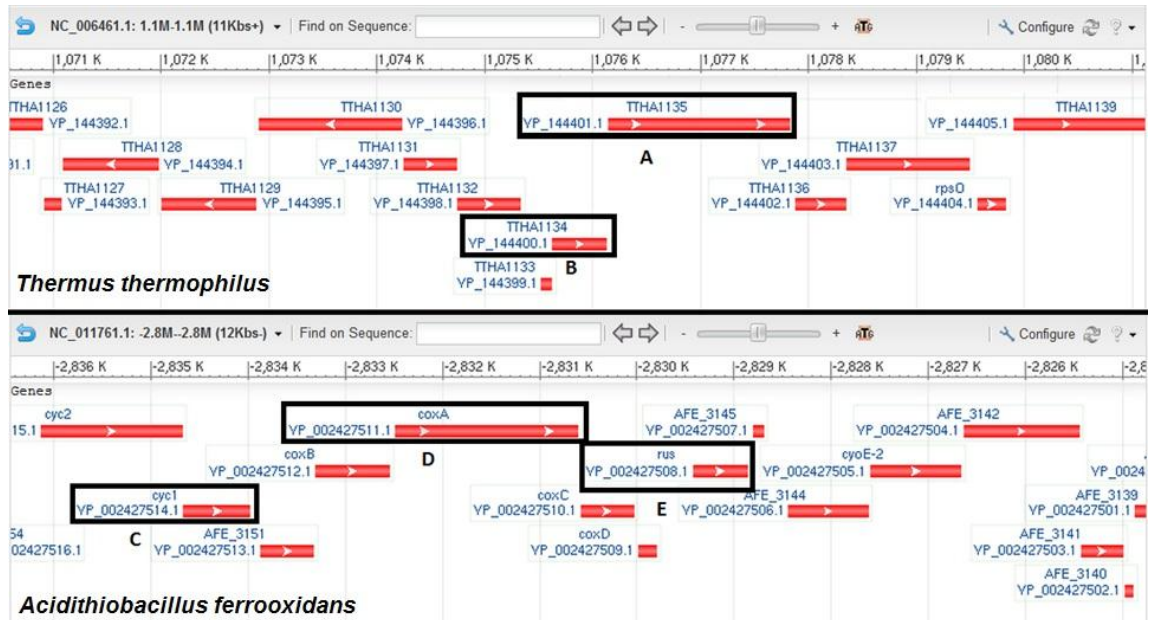


Figura 18.- Contexto genómico de las secuencias que codifican para la subunidad II de la citocromo c oxidasa (**B**) de *T. thermophilus* y rusticianina (**E**) de *A. ferrooxidans*. En el caso de *T. thermophilus* se haya la secuencia que codifica para la subunidad I de la citocromo c oxidasa (**A**) se encuentra cercana a la que codifica para la subunidad II (**B**). En el caso de *A. ferrooxidans*, están las secuencias que codifican para C552 y la subunidad I de AA3 (**C** y **D** respectivamente).

Para establecer un criterio adicional de búsqueda de secuencias relacionadas con rusticianina, se buscaron vínculos de su lfe, el cual presenta los aminoácidos que coordinan el ión cobre, con los de otras proteínas. Se analizó la secuencia de rusticianina mediante la herramienta DHcL (Materiales y Métodos, 8.3) obteniendo que su lfe corresponde a sus últimos 23 aa. (Figura 19). Para reconocer secuencias relacionadas que además poseen una estructura semejante, la cadena aminoacídica de dicho loop fue analizada mediante SAM-T08. Los resultados obtenidos corresponden a la búsqueda iterativa T06, precedida por la predicción de estructura local con el alfabeto str4, se presentan las proteínas en función de su valor E (Tabla 1). Fueron seleccionados aquellas proteínas que presentasen un valor de E inferior a 0,1.

Para el análisis filogenético de las secuencias de lfe. se excluyeron aquellas correspondientes a proteínas de cobre complejas y simples diferentes de tipo I. Las secuencias (Mostradas en el anexo 2) fueron alineadas con MAFFT. A partir del alineamiento, se obtuvo un árbol filogenético mediante Mr. Bayes (utilizando el método WAG + GAMMA), con 10^6 iteraciones, resultando con una SD de 0,009091 (Figura 20).

El análisis de lfe de rusticianina reveló que el loop presente en auracianina de *C. aurantiacus*, presenta una alta similitud tanto a nivel de secuencia como estructural (Tabla 1, Figura 20). Se observa la organización de los loops en familias de proteínas, sin embargo, el loop de rusticianina mostró mayor similitud con los de proteínas de plantas que con los bacterianos, lo que se expresa en su cercanía en el árbol. Mediante esta búsqueda no se encontró similitud con la subunidad II de la citocromo c oxidasa.



Figura 19.- Loop funcional elemental de la rusticianina de *A. ferrooxidans* (color amarillo), correspondiente a los aminoácidos 131 - 154. El sitio de coordinación al ion cobre se ubica en el loop en el centro del segmento marcado.

Tabla 1.- Tabla de resultados de la búsqueda del lfe de rusticianina mediante SAM-T08, de valor de E menor a 0.1. El resultado seleccionado corresponde a T06 - str4. Se observa que la proteína de mayor similitud con el loop es la auracianina. El resultado completo se muestra en el anexo 2.

EFL RUSTICYANIN ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS 2CAK T06-W0.5-1-str4-0.1 SCORES					
Código PDB	Length	Evalue	SCOP_domains	Protein	Organism
1qhqA	140	4.05e-06	b.6.1.1	Auracyanin	<i>C. aurantiacus</i>
2calA	154	8.63e-06		Rusticyanin	<i>A. ferrooxidans</i>
1e30A	155	8.95e-06	b.6.1.1	Rusticyanin	<i>A. ferrooxidans</i>
3ft0A	129	0.000143		Azurin	<i>P. aeruginosa</i>
1a4aA	129	0.000968	b.6.1.1	Azurin	<i>A. denitrificans</i>
2aanA	139	0.000975		Auracyanin A	<i>C. aurantiacus</i>
1jzgA	128	0.001037	b.6.1.1	Azurin	<i>P. aeruginosa</i>
1nwpA	128	0.001512	b.6.1.1	Azurin	<i>P. putida</i>
1cuoA	129	0.001688	b.6.1.1	Azurin	<i>Methylomonas sp.</i>
2ccwA	129	0.001883	b.6.1.1	Azurin II	<i>A. xylosoxydans</i>
3fswA	128	0.003580		Azurin	<i>P. aeruginosa</i>
1xb3A	128	0.004594	b.6.1.1	Azurin	<i>P. aeruginosa</i>
1hfuA	503	0.008888	b.6.1.3 b.6.1.3 b.6.1.3	Laccase	<i>C. cinereus</i>
3fpxA	499	0.01068		Laccase	<i>T. hirsuta</i>
3ef4A	124	0.01435		Pseudoazurin	<i>H. denitrificans</i>
1pmyA	123	0.01597	b.6.1.1	Pseudoazurin	<i>M. extorquens</i>
1bqkA	124	0.01734	b.6.1.1	Pseudoazurin	<i>A. cycloclastes</i>
1kdjA	102	0.01737	b.6.1.1	Plastocyanin	<i>D. crassirhizoma</i>
3erxA	123	0.01766		Pseudoazurin	<i>P. pantotrophus</i>
1kdj	102	0.01905		Plastocyanin	<i>D. crassirhizoma</i>
1py0A	125	0.01969	b.6.1.1	Pseudoazurin	<i>A. faecalis</i>
1pazA	123	0.01982	b.6.1.1	Pseudoazurin	<i>A. faecalis</i>
3px1A	499	0.01986		Laccase	<i>T. hirsuta</i>
2q5bA	105	0.02063	b.6.1.1	Plastocyanin	<i>P. laminosum</i>
2ih8A	559	0.02089	b.6.1.3 b.6.1.3 b.6.1.3	Laccase 1	<i>M. albomyces</i>
2pltA	98	0.02220	b.6.1.1	Plastocyanin	<i>C. reinhardtii</i>
1plc	99	0.02221		Plastocyanin	<i>P. nigra</i>
2gimA	106	0.02583	b.6.1.1	Plastocyanin	<i>A. variabilis</i>
3dkhA	559	0.02673		Laccase	<i>M. albomyces</i>
1gycA	499	0.02728	b.6.1.3 b.6.1.3 b.6.1.3	Laccase	<i>T. versicolor</i>
1bqk	124	0.03132		Pseudoazurin	<i>A. cycloclastes</i>
1jxgA	100	0.03863	b.6.1.1	Plastocyanin	<i>P. nigra</i>
1iuzA	98	0.03913	b.6.1.1	Plastocyanin	<i>U. pertusa</i>
3kw7A	502	0.04210		Laccase B	<i>Trametes sp.</i>
1ag6A	99	0.04782	b.6.1.1	Plastocyanin	<i>S. oleracea</i>
4pazA	123	0.04933	b.6.1.1	Pseudoazurin	<i>A. faecalis</i>
1plcA	99	0.04975	b.6.1.1	Plastocyanin	<i>P. nigra</i>
2cbpA	96	0.07131	b.6.1.1	Cucumber basic protein	<i>C. sativus</i>
1ws8A	109	0.07395	b.6.1.1	Mavicyanin	<i>C. pepo</i>
3cvbA	105	0.07458		Plastocyanin	<i>P. laminosum</i>
1jerA	138	0.07699	b.6.1.1	Cucumber stellacyanin	<i>C. sativus</i>
1bypA	99	0.09297	b.6.1.1	Plastocyanin	<i>S. latifolia</i>

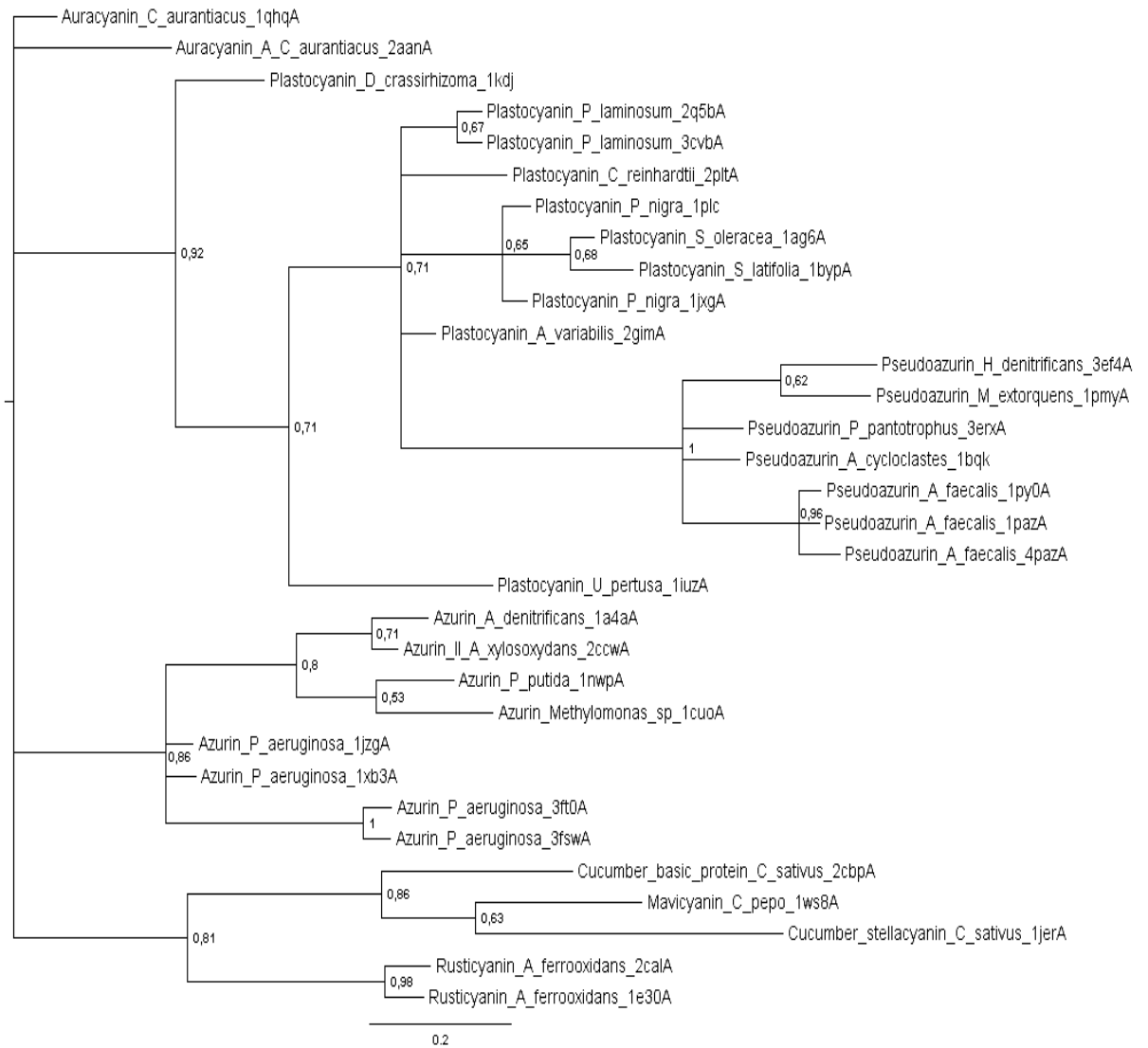


Figura 20.- Árbol filogenético de los loops de proteínas resultantes del análisis del lfe de rusticianina con SAM T08, obtenido mediante MR BAYES con 10^6 iteraciones. El número mostrado en cada nodo corresponde al valor de probabilidad calculado por el programa.

Como referencia, se agrega el árbol filogenético resultante del análisis de las secuencias 16S mediante MEGA de los organismos que presentan las proteínas obtenidas por SAM t08 (Figura 21). La organización del árbol difiere de la obtenida al analizar secuencias del lfe de estos organismos. En el árbol se separan las ramas de bacterias (rama superior) y células vegetales (rama inferior). Dentro de la rama de las bacterias se separa en bacterias no fotosintéticas (rama superior) y fotosintéticas (rama inferior).

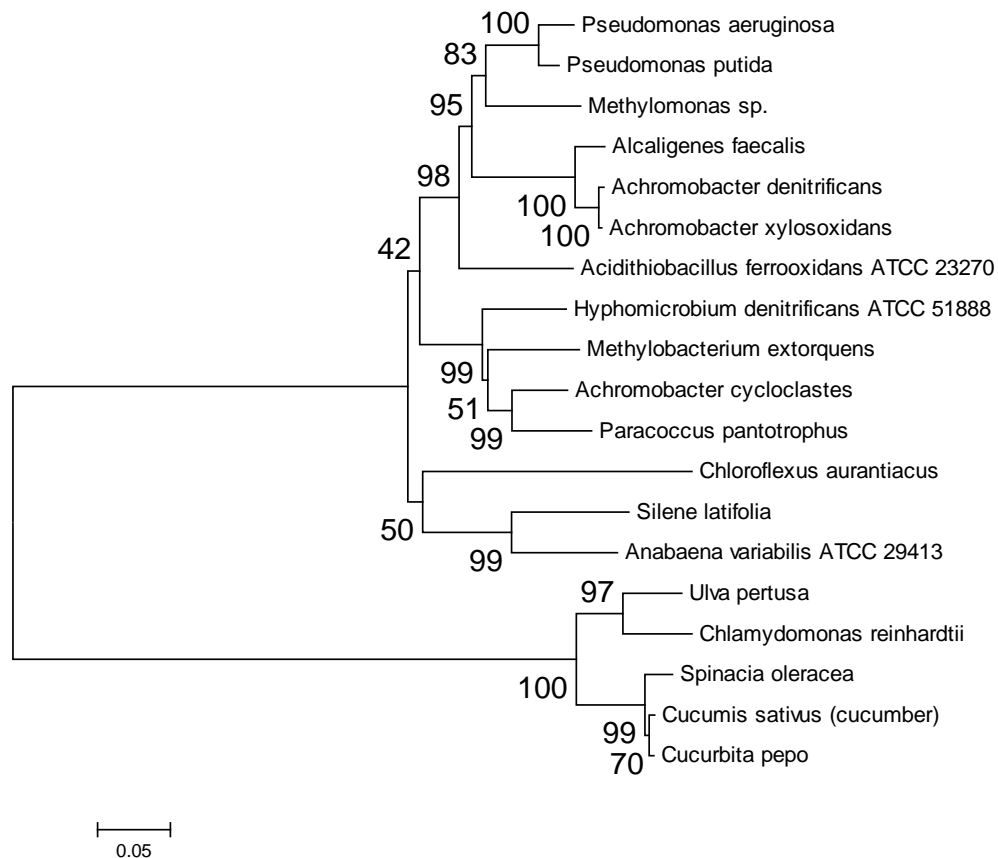


Figura 21.- Árbol filogenético de 16S de organismos resultantes del análisis de lfe. de rusticianina con SAM T08. Se observan dos ramas, correspondientes a bacterias (rama superior) y plantas (rama inferior).. El número mostrado en cada nodo corresponde al valor de probabilidad, en porcentaje, calculado por el programa MEGA.

7.- Discusión

En la presente memoria de título, se investigó sobre las relaciones filogenéticas de la rusticianina, proteína involucrada en el transporte de electrones procedentes de la oxidación de ión hierro II, en *A. ferrooxidans*. Se estima que el hierro fue una posible fuente de energía de organismos en periodos ancestrales, carentes de oxígeno (>2.400 millones de años). La evolución que llevó a rusticianina podría ser representativa de la evolución sufrida por mecanismos de obtención de energía desde un metabolismo anaeróbico a uno aeróbico.

En la investigación, se compararon diferentes características de la rusticianina con proteínas contenidas en las bases de datos PDB y NCBI. La finalidad de la comparación fue establecer similitudes con otras secuencias, para luego analizarlas filogenéticamente. Fruto de la búsqueda comparativa en las bases de datos, se hallaron proteínas capaces de coordinar al ion cobre. Se evidenció la relación entre la secuencia, segmentos de la secuencia, estructura o fragmentos específicos de las estructuras de estas proteínas con rusticianina. Se entregaron pruebas de la similitud de los sitios de coordinación en ellas, como alineamientos y comparaciones estructurales, obteniéndose de los resultados el patrón característico G-(5-6)X-C-(2-4)X-H-(2-6)X-M. Sin embargo, los residuos presentes en otras áreas de la cadena no son constantes, pero sí la estructura de la proteína. Se puede observar que a pesar de las diferentes configuraciones aminoacídicas, el barril de láminas beta se conserva al igual que los sitios de interacción con ión cobre (Figura 8 y 9). Posiblemente esto sucede debido a las diferentes condiciones en las que crecen estos organismos, en las cuales el pH y la temperatura resultan determinantes para la formación y correcto funcionamiento proteico. Aunque no se profundizó en la conformación de otros dominios de la proteína diferentes a los sitios de coordinación, es interesante notar la conservación de los aminoácidos glicina en las cercanías de los sitios de interacción con cobre porque, pese a que no se ha reportado su función, son muy conservados. El papel que cumpliría esta glicina constituye un desafío para futuras investigaciones.

Todas las proteínas candidatas encontradas participan en cadenas transportadoras de electrones. Esto es debido al potencial electroquímico generado por el ión cobre, el

cual facilita la ganancia de electrones. Algunas proteínas, como las citocromo c oxidasas, presentan dos cisteínas en lugar de una en el sitio de interacción con cobre, lo que permite anclar 2 iones cobre. Aquello es una diferencia importante respecto a las cianinas, que sólo poseen una cisteína en el sitio de interacción con cobre, uniendo sólo un ión. Si se considera a la rusticianina y a la auracianina como las proteínas que han presentado menos cambios a partir del ancestro común con la subunidad 2 de la citocromo c oxidasa, la diferencia entre sitios de unión a cobre es un asunto de interés. Es probable que el ancestro común haya presentado un sitio de interacción con cobre, en lugar de dos, el que se conservó en rusticianina y auracianina. Otra alternativa, menos probable que la anterior debido a que señala que una proteína simple se formó a partir de una compleja, es que la proteína ancestral haya tenido dos sitios de unión a cobre, como en la subunidad 2 de la citocromo c oxidasa. Lo anterior involucra la pérdida de un sitio de unión a cobre para generar proteínas como rusticianina y auracianina. Se sugiere que la primera opción es más probable, siendo los sistemas más simples los que generalmente evolucionan a sistemas más complejos. Se propone entonces que inicialmente existía un sistema con aa específicos para unir un ión cobre, al que luego, en el proceso evolutivo, se sumaron otros que confirieron capacidad para coordinar un ion más (Figura 22). Al presentar dos cisteínas, el sitio de unión de la subunidad II de citocromo oxidasa c puede coordinar dos átomos de cobre (ión dicobre) en lugar de uno, como rusticianina o auracianina. Se sugiere que este cambio se presentó en una proteína ancestral y otorgó la capacidad de unir al ion dicobre ante un desafío evolutivo, como podría ser el aumento de los niveles de oxígeno. Sin embargo, este cambio posiblemente no se presentó en proteínas que unen sólo un ion cobre, dando lugar a proteínas como la rusticianina o la auracianina.

La relación evolutiva planteada resulta notable, ya que el sistema al que pertenece la subunidad II de la citocromo c oxidasa corresponde al de la respiración aeróbica celular. Por lo tanto, es posible que la adición de aminoácidos críticos a una proteína capaz de unir sólo un ion cobre permitiese la respiración aeróbica o su mejora. La modificación propuesta podría haber sido gatillada por el aumento progresivo de los niveles de oxígeno hace 2.400 millones de años, pasando de un mundo anóxico a uno óxico.

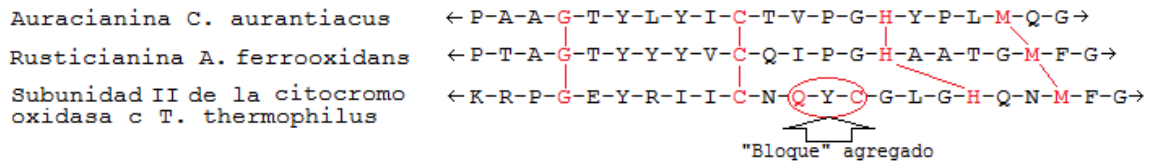


Figura 22.- Cambio propuesto del sitio de interacción con cobre. Los aminoácidos en rojo son la glicina conservada y los aminoácidos que interactúan con cobre (cisteína, histidina y metionina). Se indica con una flecha el bloque agregado propuesto.

Al revisar las diferentes estructuras, se puede observar conservación tanto en el dominio de la proteína que interactúa con cobre, como de la estructura en barril de láminas beta. Sin embargo, existen diferencias notables en el largo de las láminas beta que componen el barril central de la proteína. Uno de los factores que puede haber propiciado esta diferencia son las condiciones fisicoquímicas en las cuales se encuentran inmersas las proteínas. En el caso puntual de la rusticianina, ella requiere de una estructura más estable debido a que se encuentra en condiciones generalmente desnaturantes, como alta acidez (Botuyan *et al.*, 1996). Dicha estabilidad podría estar dada por el número de láminas beta, superior al de otras cianinas (Información mostrada en anexo 3).

Es destacable que, pese al inconstante número de láminas beta entre cianinas, así como el número de aminoácidos que conforma cada una, el número de aminoácidos de la última lámina beta sea siempre 6 ó 7. Esta conservación sugiere que el número de aminoácidos constituyentes de la última lámina beta, precedida por los sitios de unión al ión cobre, juega un rol importante en la funcionalidad de la proteína.

Es importante enfatizar que la estructura de cada proteína fue obtenida en ambientes distintos a las demás proteínas. Debido a que las condiciones adecuadas para mantener la conformación natural de la proteína son específicas, las estructuras son resultado de diferentes configuraciones aminoacídicas para tolerar el medio y mantener la estructura nativa y funcional en él.

Se analizaron las secuencias de otros componentes de la cadena transportadora de electrones de *A. ferrooxidans* diferentes de rusticianina. Posteriormente se obtuvo

su estructura proteica para compararlos con sus supuestos homólogos de *T. thermophilus*. Se observó que la Cyc1 (*A. ferrooxidans*) se diferencia de c552 en su tamaño, pero sus estructuras de hélices alfa son una característica común. En cambio, la estructura obtenida de AA3 es similar a la estructura publicada de la subunidad I de la BA3 oxidasa de *T. thermophilus*. Sin embargo, la comparación de sus secuencias (Figura 13) y nivel de similitud de sus secuencias no explica esto. Por lo anterior, surgen dudas sobre la eficiencia de Modeller en la generación de estructuras proteicas. Queda cuestionarse si la proteína utilizada de molde fue la adecuada o simplemente si la secuencia, pese a ser diferente, genera una estructura similar. Esto constituiría una hipótesis aceptable si se considera que la funcionalidad de la proteína está dada por su estructura y aminoácidos específicos críticos. Aún si la hipótesis es acertada, es erróneo considerar una estructura obtenida mediante Modeller como completamente correcta. Se sugiere, para comparaciones posteriores, determinar las estructuras mediante métodos cristalográficos.

El resultado de la búsqueda tanto estructural como de secuencia del lfe de rusticianina mediante SAM-t08 (Tabla 1) no mostró cercanía con el loop de subunidad II de la citocromo c oxidasa de *T. thermophilus*. Una de las razones que explicaría este hecho es que el valor E máximo utilizado podría haber sido demasiado bajo (0,1). Esto indica que el loop no es realmente tan similar como podría esperarse, considerando estructura y secuencia, entre estas proteínas. Resulta interesante observar que proteínas fúngicas, las lacasas, presentan un alto grado de similitud (el valor de E de la lacasa de *C. cinereus* fue 0,008888 siendo el valor mínimo presentado por estas proteínas) con el lfe de rusticianina, mayor incluso que el de algunas cianinas como la plastocianina de *S. latifolia*, con un valor de E de 0,09297. En análisis posteriores se descartaron las lacasas por no tratarse de proteínas de cobre tipo I, siendo proteínas complejas. Cabe cuestionarse si la estrategia de búsqueda, el alfabeto utilizado en la predicción de estructura secundaria y el método de búsqueda iterativa, de proteínas elegida en SAM-T08 fue la adecuada. SAM-T08 predice la estructura secundaria de la secuencia consultada mediante quince alfabetos diferentes paralelamente para después comparar dicha estructura con todas las presentes en la base de datos PDB.

De los quince alf utilizados para el análisis con SAM-T08 (str2, alpha, bys, pb, o_sep, n_sep, o_notor, n_notor, o_notor2, n_notor2, str4, dssp_ehl2, CB_burial_14_7, near-backbone-11 y CB8-sep9), los tres últimos se basan en la interacción de la proteína con el medio. Ellos identifican segmentos hidrófilos e hidrófobos que por su naturaleza interactúan o se esconden del medio acuoso. Dicha predicción no fue considerada útil debido a que se analiza un segmento pequeño de la proteína. De los doce alf. restantes, estructurales, se seleccionó str4 por tratarse del más completo, siendo una combinación de los alf. str2, notor2 y alpha. Lo que hace str4 es clasificar los tipos de láminas según su orientación como str2, considera los ángulos de torsión respecto al plano en los enlaces peptídicos con oxígeno y con nitrógeno tal como evalúa notor2. Los ángulos de torsión alfa los evalúa como alpha. La búsqueda iterativa seleccionada, t06, fue elegida por ser la más sensible de las tres utilizadas paralelamente por SAM-T08. Considerando que los criterios de selección de estrategia son adecuados para el análisis del loop, es posible suponer que la diferencia entre los resultados otorgados por el análisis de lfe. y de secuencia completa está dado por elementos diferentes del loop. Aún cuando el resultado puede parecer contraproducente en el sentido de no relacionar la rusticianina con la subunidad II de citocromo c oxidasa, es efectivo en relacionarla con la auracianina, lo cual es relevante dado que participan en procesos distintos, aunque la función es la misma (transporte de electrones).

Una consideración importante es señalar que DHcL es la única herramienta disponible para la determinación de lfe., por lo que no se puede comparar con otro software actual.

El conjunto de resultados obtenidos sugiere que las cadenas transportadoras de electrones de *T. thermophilus* y *A. ferrooxidans*, provienen de sistema similar en un ancestro común más cercano a ellas que al resto de las bacterias generadoras de cianinas o proteínas candidatas. Es posible que el sistema presente en el ancestro común cumpliera la función reversa, es decir, la extracción de electrones desde el interior celular, si se encontrara en un ambiente anóxico. Actualmente, se discute que tanto la rusticianina como la cadena proteica a la que pertenece podrían extraer electrones desde el interior celular en condiciones anóxicas, utilizando Fe^{+3} como

aceptor final de electrones (Ohmura *et al.*, 2002). El nuevo desafío es predecir sistemas ancestrales, a partir de los presentes en la actualidad, capaces de extraer electrones desde el interior celular en un ambiente anóxico, que den cuenta del sistema de vida anterior al aumento de oxígeno ambiental y otorguen información sobre el origen de la vida en la tierra y el último ancestro común universal.

Idealmente, los hallazgos futuros podrían conducir incluso al conocimiento de los sistemas de transporte de electrones prebióticos que posiblemente fueron adquiridos por las vesículas que posteriormente derivaron en las células primitivas (Schump *et al.*, 2010). Hay antecedentes de moléculas capaces de servir como transportadoras de electrones, como las fenazinas y los grupos de hierro azufre (Zhao *et al.*, 2009), que por sus características electroquímicas, podría haber otorgado alguna funcionalidad a las protocélulas y constituido una ventaja adaptativa frente a otras. Dichas moléculas, presentes tanto en el pasado lejano como en organismos vivientes en la actualidad, podrían ser el origen de los sistemas de transportes de electrones celulares y su presencia es compatible con ambientes extraterrestres, como por ejemplo, la luna Europa, de Júpiter, por lo que podrían ser pilares para la formación de vida fuera del planeta Tierra.

8.- Conclusiones

- El sitio de coordinación con el ión cobre, caracterizado por los aminoácidos cisteína, histidina y metionina, se encuentra altamente conservado entre las proteínas candidatas encontradas.
- La estructura del sitio de coordinación con ion cobre se encuentra altamente conservada entre las proteínas candidatas.
- Los resultados encontrados sugieren que la subunidad II de la citocromo c oxidasa de *T. thermophilus* y la rusticianina de *A. ferrooxidans* evolucionaron a partir de una proteína ancestral común.
- La adición de aminoácidos capaces de unir ion cobre permitieron a la subunidad II de la citocromo c oxidasa unir al ion dicobre, marcando una divergencia en el proceso evolutivo proteico de proteínas que unen cobre.
- Las proteínas cyc1 y subunidad a de la AA3 oxidasa, que interactúan con rusticianina, guardan similitud con c552 y la subunidad I de BA3, que interactúan con la subunidad II de la citocromo c oxidasa.
- La similitud estructural de rusticianina y la subunidad II de la citocromo c oxidasa, así como también la similitud de las proteínas que interactúan con ellas sugieren la conservación, en el proceso evolutivo, del segmento de la cadena transportadora de electrones al cual pertenecen.
- El desafío evolutivo impuesto por el aumento de oxígeno, pasando de un mundo anóxico a uno óxico, pudo haber ocasionado la divergencia evolutiva que supuestamente generó la subunidad II de la citocromo c oxidasa de *T. thermophilus* y la rusticianina de *A. ferrooxidans*, a partir de un ancestro común.

9.- Referencias

- ABASCAL F, ZARDOYA R, POSADA, D. (2005). "ProtTest: Selection of best-fit models of protein evolution." Bioinformatics; 21 (9): 2104-2105.
- ALMEIDA F. C., LESZCZYNIECKA M., FISHER P. B., DESALLE R. (2008) "Examining ancient inter-domain horizontal gene transfer." Evolutionary Bioinformatics Online; 4: 109-119.
- ALTSCHUL S. F., MADDEN T. L., SCHÄFFER A. A., ZHANG J., ZHANG Z., MILLER W., LIPMAN D. J. (1997) "Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs." Nucleic Acids Research; 25 (17): 3389-3402.
- ANDO K. (2010) "The axial methionine ligand may control the redox reorganizations in the active site of blue copper proteins" Journal of Chemical Physics; 133: 175101-175110.
- APWEILER R., BAIROCH A., WU C.H., BARKER W.C., BOECKMANN B., FERRO S., GASTEIGER E., HUANG H., LOPEZ R., MAGRANE M., MARTIN M.J., NATALE D.A., O'DONOVAN C., REDASCHI N., YEH L.S. (2004) "UniProt: the Universal Protein knowledgebase." Nucleic Acids Research; 32 (Database): 115-119.
- BADSBERG, U., JORGENSEN, A. M., GESMAR, H., LED, J. J., HAMMERSTAD, J. M., JESPERSEN, L. L., ULSTRUP, J. (1996) "Solution structure of reduced plastocyanin from the blue-green alga *Anabaena variabilis*." Biochemistry; 35: 7021-7031.
- BALKWILL D. L., KIEFT T. L., TSUKUDA T., KOSTANDARIDES H. M., ONSTOTT T. C., MACNAUGHTON S., BOWNAS J., FREDRICKSON J. K. (2004). "Identification of iron-reducing *Thermus* strains as *Thermus scotoductus*." Extremophiles; 8: 37-44.
- BARRETT M. L., HARVEY I., SUNDARARAJAN M., SURENDRAN R., HALL J. F., ELLIS M. J., HOUGH M. A., STRANGE R. W., HILLIER I. H., HASNAIN S. S. (2006). "Atomic resolution crystal structures, EXAFS and quantum chemical studies of rusticyanin and its two mutants provide insight into its unusual properties." Biochemistry; 45: 2927.

- BEINERT H., (1997) "Copper A of cytochrome c oxidase, a novel, long-embattled, biological electron-transfer site" European Journal of Biochemistry; 245: 521-532.
- BERMAN H. M., WESTBROOK J., FENG Z., GILLILAND G., BHAT T. N., WEISSIG H., SHINDYALOV I. N., BOURNE P. E. (2000) "The Protein Data Bank." Nucleic Acids Research; 28: 235-242.
- BOND C. S., BLANKENSHIP R. E., FREEMAN H. C., GUSS J. M., MAHER M. J., SELVARAJ F. M., WILCE M. C., WILLINGHAM K. M. (2001) "Crystal structure of auracyanin, a "blue" copper protein from green thermophilic photosynthetic *Chloroflexus aurantiacus*". Journal of Molecular Biology; 306: 47-67.
- BOTUYAN M. V., TOY-PALMER A., CHUNG J., BLAKE R. C. 2nd, BEROZA P., CASE D. A., DYSON H.J. (1996) "NMR solution structure of Cu(I) rusticyanin from *Thiobacillus ferrooxidans*: structural basis for the extreme acid stability and redox potential." Journal of Molecular Biology; 263 (5): 752–767.
- CASTRESANA J., MOREIRA D. (1999). "Respiratory Chains in the Last Common Ancestor of Living Organisms." The Journal of Molecular Evolution; 49: 453-460.
- CAVA F., ZAFRA O., MAGALON A., BLASCO F., BERENGUER J. (2004). "A New Type of NADH Dehydrogenase Specific for Nitrate Respiration in the Extreme Thermophile *Thermus thermophilus*." The Journal of Biological Chemistry; 279 (44): 45369-45378.
- COX J. C., AASA R., MALMSTRÖM B. J. (1978) "EPR studies on the blue copper protein, rusticyanin: A protein involved in Fe²⁺ oxidation at pH 2.0 in *Thiobacillus ferro-oxidans*" FEBS Letters; 93 (1): 157-160.
- DELANO W. L. (2002). "The PyMOL Molecular Graphics System" <<http://pymol.sourceforge.net/>>.
- DENNISON C., HARRISON M. D., LAWLER A. T. (2003). "Alkaline transition of phytocyanins: a comparison of stellacyanin and umecyanin." Biochemistry Journal; 371: 377-383.
- DIETRICH L. E. P., TICE M. M., NEWMAN D. K. (2006). "The co-evolution of life and Earth" Current Biology; 16 (11): 395 – 400.

- DODD F. E., ABRAHAM Z. H. L., EADY R. R., HASNAIN S. S. (2000) "Structures of oxidized and reduced azurin II from *Alcaligenes xylosoxidans* at 1.75 Å resolution." Acta Crystallographica; 56: 690.
- EDDY S. R. (1998) "Profile hidden Markov models." Bioinformatics 14:755-763.
- EINSLE O., MEHRABIAN Z., NALBANDYAN R., MESSERSCHMIDT A. (2000) "Crystal structure of plantacyanin, a basic blue cupredoxin from spinach." Journal of Biological Inorganic Chemistry; 5: 666-672.
- ESWAR N., MARTI-RENOM MA, MADHUSUDHAN MS, ERAMIAN D, SHEN MY, PIEPER U, SALI A.(2007) "Comparative protein structure modeling using MODELLER" Current protocols in protein science; 2 (2): 9.
- FALB M., MÜLLER K., KÖNIGSMAIER L., OBERWINKLER T., HORN P., VON GRONAU S., GONZALEZ O., PFEIFFER F., BORNBERG-BAUER E., Oesterhelt D. (2008). "Metabolism of halophilic archaea." Extremophiles; 12: 177-196.
- FURSOV M. Y., OSHCHEPKOV D. Y., NOVIKOVA O. S. (2009). "UGENE: interactive computational schemes for genome analysis". Proceedings of the Fifth Moscow International Congress on Biotechnology; 3: 14-15.
- GIUDICI-ORTICONI M. T., GUERLESQUIN F., BRUSCHI M., NITSCHKE W. (1999) "Interaction-induced redox switch in the electron transfer complex rusticyanin-cytochrome c(4)." The Journal of Biological Chemistry; 274 (43): 30365-30369.
- GONCEARENCO A., BEREZOVSKY I. N. (2010) "Prototypes of elementary functional loops unravel evolutionary connections between protein functions." Bioinformatics; 26 (18): 497-503.
- GUSS, J. M., MERRITT, E. A., PHIZACKERLEY, R. P., FREEMAN, H. C. (1996) "The structure of a phycocyanin, the basic blue protein from cucumber, refined at 1.8 Å resolution." Journal of Molecular Biology; 262: 686-705.
- HAEHNEL W., JANSEN T., GAUSE K., KLÖSGEN R. B., STAHL B., MICHL D., HUVERMANN B., KARAS M., HERRMANN R. G. (1994). "Electron transfer from plastocyanin to photosystem I." EMBO Journal; 13 (5): 1028–1038.

- HOUGH M. A., HALL J. F., KANBI L. D., HASNAIN S. S. (2001) "Structure of the M148Q mutant of rusticyanin at 1.5 Å: a model for the copper site of stellacyanin." Acta Crystallographica; 57(3): 355-360.
- KARPLUS K. (2009) "SAM-T08, HMM-based protein structure prediction." Nucleic Acid Research; 37: 492-497.
- KATOH K., MISAWA K., KUMA K., MIYATA T. (2002). "MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform." Nucleic Acids Research; 30 (14): 3059–3066.
- KATZMAN S., BARRETT C., THILTGEN G., KARCHIN R., KARPLUS K. (2008) "Predict-2nd: a tool for generalized protein local structure prediction" Bioinformatics; 24(21): 2453-2459.
- KOCH M., VELARDE M., HARRISON M. D., ECHT S., FISCHER M., MESSERSCHMIDT A., DENNISON C. (2005) "Crystal structures of oxidized and reduced stellacyanin from horseradish roots." Journal of the American Chemical Society; 127: 158-166.
- KOCZYK G., BEREZOVSKY I. N. (2008) "Domain Hierarchy and closed Loops (DHcL): a server for exploring hierarchy of protein domain structure" Nucleic Acids Research; 36 (2): 239-245.
- LI C., YANAGISAWA S., MARTINS B. M., MESSERSCHMIDT A., BANFIELD M. J., DENNISON C. (2006). "Basic requirements for a metal-binding site in a protein: The influence of loop shortening on the cupredoxin azurin." Proceedings of the National Academy of Sciences; 103 (19): 7258-7263.
- LIEBERMAN R. L., ARCIERO D. M., HOOPER A. B., ROSENZWEIG A. C. (2001) "Crystal structure of a novel red copper protein from *Nitrosomonas europaea*." Biochemistry; 40: 5674-5681.
- LIU B., CHEN Y., DOUKOV T., SOLTIS S. M., STOUT C. D., FEE J. A. (2009) Combined microspectrophotometric and crystallographic examination of chemically reduced and X-ray radiation-reduced forms of cytochrome ba3 oxidase from *Thermus thermophilus*: structure of the reduced form of the enzyme. Biochemistry; 48: 820-826.

- LIU Y., YIN H., LIANG Y., SHEN L., LIU Y., FU X., BABA N., ZENG W., QIU G., LIU X. (2011) "Changes in the composition of an acid mine drainage microbial community upon successive transfers in medium containing low-grade copper sulfide" Bioresource Technology; 102 (20): 9388-9394.
- MALMSTRÖM B. G., LECKNER J. (1998). "The chemical biology of copper" Current Opinion in Chemical Biology; 2: 286–292.
- MANEG O., LUDWIG B., MALATESTA F. (2003). "Different Interaction Modes of Two Cytochrome-c Oxidase Soluble CuA Fragments with Their Substrates" The Journal of Biological Chemistry; 278: 46734-46740.
- MERUANE G., VARGAS T. (2003). "Bacterial oxidation of ferrous-iron by *Acidithiobacillus ferrooxidans* in the pH range 2.5–7.0" Hydrometallurgy; 71: 149-158.
- MESSERSCHMIDT A., PRADE L., KROES S. J., SANDERS-LOEHR J., HUBER R., CANTERS G. W. (1998). "Rack-induced metal binding vs. flexibility: Met121His azurin crystal structures at different pH." Biochemistry; 95: 3443-3448.
- MONLEÓN D., RIBES F., JIMÉNEZ H. R., MORATAL J. M., CERDA B. (2004). "NMR and homology modeling studies of copper (II)-halocyanin from *Natronobacterium pharaonis* bacteria." Inorganica Chimica Acta; 357: 1111–1118.
- MURESANU L., PRISTOVSEK P., LOEHR F., MANEG O., MUKRASCH M. D., RUETERJANS H., LUDWIG B., LUECKE C. (2006) "The electron transfer complex between cytochrome c552 and the CuA domain of the *Thermus thermophilus* ba3 oxidase, a combined NMR and computational approach." Journal of Biological Chemistry; 281: 14503-14513.
- OHMURA N., SASAKI K., MATSUMOTO N., SAIKI H. (2002) "Anaerobic Respiration Using Fe³⁺, S₀, and H₂ in the Chemolithoautotrophic Bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*" Journal of Bacteriology; 184 (8): 2081-2087.
- OSHIMA T., IMAHORI K. (1974). "Description of *Thermus thermophilus* (Yoshida and Oshima) comb. nov., a Nonsporulating Thermophilic Bacterium from a Japanese Thermal Spa." International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology; 24 (1): 102-112.

- ORELL A., NAVARRO C. A., ARANCIBIA R., MOBAREC J. C., JEREZ C. A. (2010). "Life in blue: Copper resistance mechanisms of bacteria and Archaea used in industrial biomining of minerals" Biotechnology Advances; 28: 839-848.
- PETERSEN T. N., BRUNAK S., VON HEIJNE G., NIELSEN H. (2011) "SignalP 4.0: discriminating signal peptides from transmembrane regions." Nature Methods; 8 (10): 785-786.
- PRUESSE E., QUAST C., KNITTEL K., FUCHS B., LUDWIG W., PEPLIES J., GLÖCKNER F. O. (2007). "SILVA: a comprehensive online resource for quality checked and aligned ribosomal RNA sequence data compatible with ARB " Nucleic Acids Research; 35 (21): 7188-7196.
- QUATRINI R., APPIA-AYME C., DENIS Y., JEDLICKI E., HOLMES D. S. (2009). "Extending the models for iron and sulfur oxidation in the extreme Acidophile *Acidithiobacillus ferrooxidans*." BioMed Central Genomic; 10: 394.
- REMMERT M., BIEGERT A., HAUSER A., SÖDING J. (2012)"HHblits: lightning-fast iterative protein sequence searching by HMM-HMM alignment" Nature Methods; 9, 173–175.
- RONQUIST F., HUELSENBECK J. P. (2003). "MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models." Bioinformatics; 19:1572-1574.
- SCHÄFER G., PURSCHKE W. G., GLEISSNER M., SCHMIDT C. L. (1996). "Respiratory chains of archaea and extremophiles" Biochimica et Biophysica Acta, 1275: 16-20.
- SCHRUM J. P., ZHU T. F., SZOSTAK J. W. (2010) "The origins of cellular life." Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2 (9): a002212.
- SCHWARTZMAN D. W., LINEWEAVER C. H. (2004). "The hyperthermophilic origin of life revisited." Thermophiles; 32 (2): 168-171.
- SÖDING J., BIEGERT A., LUPAS A. N. (2005) "The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction." Nucleic Acids Research; 33, 244-248.
- SUGIO T., WAKABAYASHI M., KANAO T., TAKEUCHI F., (2008), "Isolation and Characterization of *Acidithiobacillus ferrooxidans* Strain D3-2 Active in Copper

Bioleaching from a Copper Mine in Chile”, Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry; 72 (4): 998-1004.

- SUKUMAR N., MATHEWS F. S., LANGAN P., DAVIDSON V. L. (2010) "A joint x-ray and neutron study on amicyanin reveals the role of protein dynamics in electron transfer." Proceedings of the National Academy of Sciences; 107: 6817-6822.
- TAMURA K., PETERSON D., PETERSON N., STECHER G., NEI M., KUMAR S. (2011) "MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods." Molecular Biology and Evolution; 28: 2731-2739.
- VALDÉS J., PEDROSO I., QUATRINI R., DODSON R. J., TETTELIN H., BLAKE R., EISEN J. A., HOLMES D. S. (2008). "Acidithiobacillus ferrooxidans metabolism: from genome sequence to industrial applications" BioMed Central Genomics; 9: 597.
- VALDÉS J., CÁRDENAS J. P., QUATRINI R., ESPARZA M., OSORIO H., DUARTE F., LEFIMIL C., SEPULVEDA R., JEDLICKI E., HOLMES D. S. (2010). "Comparative genomics begins to unravel the ecophysiology of bioleaching." Hydrometallurgy; 104 (3-4): 471-476.
- VIVEKANANDAN A., ANISHETTY S., GAUTAM P. (2004). "Functionally specified protein signatures distinctive for each of the different blue copper proteins." BioMed Central Bioinformatics 5: 127.
- WALTER R. L., EALICK S. E., FRIEDMAN A. M., BLAKE 2nd. R.C., PROCTOR P., SHOHAM M. (1996) " Multiple wavelength anomalous diffraction (MAD) crystal structure of rusticyanin: a highly oxidizing cupredoxin with extreme acid stability." Journal of Molecular Biology; 263: 730-751.
- XIE Y., INOUE T., MIYAMOTO Y., MATSUMURA H., KATAOKA K., YAMAGUCHI K., NOJINI M., SUZUKI, S., KAI, Y. (2004) "Structural reorganization of the copper binding site involving thr15 of mavicyanin from *Cucurbita pepo medullosa* (zucchini) upon reduction." Journal of Biochemistry; 137: 455-461.
- ZENG J., GENG M., LIU Y., XIA L., LIU J., QIU G. (2007) "The sulfhydryl group of Cys138 of rusticyanin from *Acidithiobacillus ferrooxidans* is crucial for copper binding." Biochimica et Biophysica Acta. 1774 (4): 519-525.

- ZHANG Y., GLADYSHEV V. N. (2010). "General Trends in Trace Element Utilization Revealed by Comparative Genomic Analyses of Co, Cu, Mo, Ni, and Se." Journal of Biological Chemistry; 285 (5): 3393-3405.
- ZHAO F., SLADE R. C., VARCOE J. R. (2009) "Techniques for the study and development of microbial fuel cells: an electrochemical perspective" Chemical Society Reviews 38: 1926-1939.

ANEXOS

Anexo 1

Resultados de la tercera iteración de PSI-blast con la secuencia de rusticianina madura.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value
CCA63066.1	rusticyanin precursor [uncultured bacterium]	152	152	100%	9,00E-47
YP_004784314.1	rusticyanin [Acidithiobacillus ferrivorans SS3] >gb A	149	149	100%	1,00E-45
YP_004783009.1	rusticyanin [Acidithiobacillus ferrivorans SS3] >gb A	148	148	98%	2,00E-45
YP_004784176.1	rusticyanin [Acidithiobacillus ferrivorans SS3] >gb A	147	147	98%	8,00E-45
YP_934454.1	unnamed protein product [Azoarcus sp. BH72] >em	106	106	70%	2,00E-29
ZP_08933243.1	blue (type 1) copper domain protein [Thioalkalimicro	106	106	72%	4,00E-29
YP_001790301.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Lept	105	105	71%	6,00E-29
NP_394955.1	rusticyanin [Thermoplasma acidophilum DSM 1728]	105	105	82%	8,00E-29
YP_001409345.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Xan	103	103	86%	3,00E-28
NP_886246.1	unnamed protein product [Bordetella parapertussis	103	103	74%	4,00E-28
ACK38175.1	rusticyanin B [Acidithiobacillus ferrivorans]	102	102	78%	5,00E-28
NP_881852.1	unnamed protein product [Bordetella pertussis Toh	103	103	74%	7,00E-28
YP_002490064.1	unnamed protein product [Methylobacterium nodula	101	101	87%	1,00E-27
NP_111971.1	rusticyanin [Thermoplasma volcanium GSS1] >dbj E	101	101	87%	2,00E-27
YP_003157271.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [De	101	101	72%	2,00E-27
YP_996440.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Ver	101	101	71%	2,00E-27
ZP_04765613.1	blue (type 1) copper domain protein [Acidovorax de	100	100	72%	3,00E-27
ZP_09753883.1	putative copper-binding protein [Burkholderiales ba	100	100	74%	4,00E-27
YP_002552674.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Ac	100	100	72%	4,00E-27
YP_004379835.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Pse	100	100	92%	5,00E-27
YP_004489168.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [De	100	100	72%	5,00E-27
YP_001563932.1	blue (type1) copper domain-containing protein [De	100	100	72%	6,00E-27
YP_986835.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Aci	100	100	71%	6,00E-27
ACB12989.1	putative blue (type 1) copper domain protein [Aqua	98.9	98.9	73%	2,00E-26
YP_001419481.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Xan	98.9	98.9	65%	2,00E-26
CBA30406.1	hypothetical protein Csp_C23390 [Curvibacter puta	98.9	98.9	73%	2,00E-26
CBK52899.1	rusticyanin type B [Acidithiobacillus ferrivorans] >er	97.7	97.7	72%	2,00E-26
ZP_09712581.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Pse	98.5	98.5	72%	3,00E-26
YP_001899401.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Ra	98.1	98.1	92%	3,00E-26
YP_002973584.1	blue (type 1) copper domain protein [Ralstonia pick	98.1	98.1	71%	3,00E-26
YP_003981758.1	copper binding protein, plastocyanin/azurin family p	98.1	98.1	91%	3,00E-26
YP_001409272.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Xan	98.1	98.1	65%	3,00E-26
YP_434213.1	putative copper-binding protein [Hahella chejuensis	97.7	97.7	73%	4,00E-26
YP_145678.1	putative oxydoreductase [Ralstonia metallidurans C	97.7	97.7	94%	4,00E-26
ZP_07025775.1	blue (type 1) copper domain protein [Afipia sp. 1NL	97.7	97.7	82%	4,00E-26
ZP_08406917.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Hyl	98.1	98.1	72%	4,00E-26
EGP46069.1	putative blue copper protein [Achromobacter xyloso	98.1	98.1	91%	5,00E-26
YP_001633210.1	copC2 gene product [Bordetella petrii DSM 12804]	97.7	97.7	73%	5,00E-26

ZP_08947411.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Aci	96.6	96.6	73%	6,00E-26
YP_001188142.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Pse	97.3	97.3	69%	6,00E-26
EFV86900.1	copper tolerance protein [Achromobacter xylosoxid	97.3	97.3	91%	8,00E-26
CBK52901.1	rusticyanin type B [Acidithiobacillus ferrivorans]	96.2	96.2	66%	8,00E-26
YP_004474296.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Ps	97.3	97.3	92%	9,00E-26
ZP_03544296.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Co	96.9	96.9	93%	1,00E-25
YP_129194.1	copper tolerance protein [Photobacterium profundu	96.9	96.9	76%	1,00E-25
YP_002947541.1	blue (type 1) copper domain protein [Variovorax pa	96.9	96.9	73%	1,00E-25
YP_001353514.1	blue copper protein [Janthinobacterium sp. Marseill	96.9	96.9	72%	1,00E-25
ACD03845.1	Rusticyanin [Thiobacillus prosperus]	97.3	97.3	92%	1,00E-25
AAP42068.1	unknown [Xanthomonas euvesicatoria]	96.6	96.6	74%	1,00E-25
ZP_09298883.1	copper binding protein, plastocyanin/azurin family p	96.6	96.6	72%	1,00E-25
YP_004631476.1	copper-binding protein [Oligotropha carboxidovor	96.2	96.2	87%	2,00E-25
YP_001020832.1	oxidoreductase [Methylibium petroleiphilum PM1] >	96.9	96.9	72%	2,00E-25
ZP_09330514.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Aci	95.4	95.4	72%	2,00E-25
YP_004416969.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Pus	96.2	96.2	72%	2,00E-25
YP_002890940.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Th	96.2	96.2	72%	2,00E-25
ZP_09475080.1	putative Copper tolerance protein (Cupredoxin) [Br	95.4	95.4	64%	3,00E-25
YP_004052804.1	azurin [Marivirga tractuosa DSM 4126] >gb ADR206	95.8	95.8	90%	4,00E-25
ZP_09714388.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Sp	96.6	96.6	99%	6,00E-25
ZP_09646414.1	putative copper-binding protein [Bradyrhizobium sp	94.6	94.6	65%	6,00E-25
YP_002290594.1	copper tolerance protein [Oligotropha carboxidovor	95.0	95.0	87%	6,00E-25
BAL12886.1	copper tolerance protein [Bradyrhizobium japonicu	94.6	94.6	65%	6,00E-25
YP_001099872.1	unnamed protein product [Herminiimonas arsenicox	95.0	95.0	67%	7,00E-25
YP_004634336.1	copper-binding protein [Oligotropha carboxidovor	94.6	94.6	65%	8,00E-25
CBA29880.1	hypothetical protein Csp_A14370 [Curvibacter puta	93.9	93.9	73%	9,00E-25
ZP_01440770.1	putative copper-containing oxidoreductase signal p	93.1	93.1	64%	1,00E-24
YP_004416264.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Pus	92.3	92.3	65%	1,00E-24
YP_002553637.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Ac	93.5	93.5	73%	2,00E-24
ZP_09091640.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Me	93.9	93.9	92%	2,00E-24
YP_005092654.1	unnamed protein product [Oceanimonas sp. GK1] >	93.5	93.5	72%	2,00E-24
YP_004619330.1	hypothetical protein Rta_22150 [Ramlibacter tatao	95.0	95.0	87%	2,00E-24
ZP_08404056.1	blue (type 1) copper domain protein [Rubrivivax be	93.5	93.5	73%	2,00E-24
ZP_09623004.1	blue (type 1) copper domain protein [Cupriavidus b	93.1	93.1	72%	3,00E-24
YP_571387.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Rho	93.1	93.1	94%	3,00E-24
ZP_07673870.1	copper tolerance protein [Ralstonia sp. 5_7_47FAA	93.1	93.1	73%	3,00E-24
YP_001541742.1	hypothetical protein Cmaq_1935 [Caldivirga maqui	94.6	94.6	96%	4,00E-24
YP_002891008.1	transposase Tn3 family protein [Thaueria sp. MZ1T]	92.7	92.7	71%	4,00E-24
YP_001045845.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Rho	92.7	92.7	90%	6,00E-24
YP_746291.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Nit	92.3	92.3	84%	7,00E-24

ZP_08874939.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Ver	92.3	92.3	71%	7,00E-24
YP_004389327.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Ali	91.9	91.9	71%	8,00E-24
YP_986891.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Aci	91.9	91.9	96%	8,00E-24
CCG00296.1	azurin [uncultured Flavobacteriia bacterium]	91.9	91.9	83%	8,00E-24
ZP_09432186.1	putative Copper tolerance protein (Cupredoxin) [Br	91.6	91.6	64%	1,00E-23
YP_746279.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Nit	91.9	91.9	72%	1,00E-23
ZP_01898889.1	Hypothetical copper tolerance protein [Moritella sp.	91.6	91.6	83%	1,00E-23
YP_004126100.1	blue (type 1) copper domain protein [Alicyclophilus c	91.6	91.6	71%	1,00E-23
ZP_03266724.1	blue (type 1) copper domain protein [Burkholderia s	90.8	90.8	70%	1,00E-23
YP_986940.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Aci	91.2	91.2	73%	2,00E-23
ZP_08415195.1	Blue (Type 1) copper domain protein precursor [Rho	91.2	91.2	63%	2,00E-23
ZP_01062087.1	azurin [Leeuwenhoekiella blandensis MED217] >gb	91.2	91.2	83%	2,00E-23
YP_001990115.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Rho	91.2	91.2	72%	2,00E-23
ZP_04762053.1	blue (type 1) copper domain protein [Acidovorax de	90.8	90.8	96%	2,00E-23
NP_251497.1	unnamed protein product [Pseudomonas aeruginos	91.2	91.2	96%	3,00E-23
ZP_01440306.1	putative copper-containing oxidoreductase signal p	91.6	91.6	64%	3,00E-23
ZP_09420332.1	putative Copper tolerance protein (Cupredoxin) [Br	90.4	90.4	64%	3,00E-23
ZP_04929113.1	hypothetical protein PACG_01730 [Pseudomonas a	91.2	91.2	96%	3,00E-23
YP_001892447.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Ra	90.0	90.0	73%	4,00E-23
YP_259085.2	unnamed protein product [Pseudomonas fluoresce	90.4	90.4	63%	4,00E-23
YP_550293.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Pol	90.4	90.4	86%	4,00E-23
AEO74639.1	putative copper-binding protein [Pseudomonas aer	90.8	90.8	96%	4,00E-23
ZP_05842960.1	blue (type 1) copper domain protein [Rhodobacter	89.6	89.6	65%	4,00E-23
YP_354771.1	unnamed protein product [Rhodobacter sphaeroide	90.0	90.0	63%	6,00E-23
YP_004156527.1	oxidoreductase [Variovorax paradoxus EPS] >gb Al	89.6	89.6	75%	6,00E-23
ZP_05078063.1	copper tolerance protein [Rhodobacterales bacteri	90.8	90.8	91%	6,00E-23
EHS33815.1	hypothetical protein O1O_25894 [Pseudomonas ae	90.0	90.0	96%	6,00E-23
YP_002439868.1	unnamed protein product [Pseudomonas aeruginos	90.4	90.4	96%	6,00E-23
ZP_01366267.1	hypothetical protein PaerPA_01003411 [Pseudomo	89.6	89.6	96%	7,00E-23
ZP_09052359.1	hypothetical protein HMPREF1030_01445 [Pseudor	89.6	89.6	96%	9,00E-23
ZP_07794111.1	putative copper-binding protein [Pseudomonas aer	89.2	89.2	96%	9,00E-23
YP_001818956.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Op	88.9	88.9	78%	9,00E-23
YP_004127356.1	blue (type 1) copper domain protein [Alicyclophilus c	88.9	88.9	72%	1,00E-22
ZP_02152613.1	hypothetical protein OIH45_06680 [Oceanibulbu	90.4	90.4	93%	1,00E-22
NP_384693.1	copper-containing oxidoreductase signal peptide p	88.9	88.9	64%	1,00E-22
EGM21891.1	putative copper-binding protein [Pseudomonas aer	88.9	88.9	96%	1,00E-22
CAZ89691.1	putative blue (type 1) copper domain protein, puta	89.6	89.6	91%	1,00E-22
YP_004388076.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Ali	88.9	88.9	72%	1,00E-22
YP_002520371.1	Blue (Type 1) copper domain protein precursor [Rho	88.9	88.9	62%	1,00E-22
CAC45159.2	Putative copper-containing oxidoreductase signal p	88.5	88.5	64%	2,00E-22

YP_001239425.1	copper tolerance protein [Bradyrhizobium sp. BTAi1	88.1	88.1	64%	2,00E-22
YP_004243887.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Vu	90.0	90.0	81%	2,00E-22
YP_790372.1	unnamed protein product [Pseudomonas aeruginos	89.2	89.2	96%	2,00E-22
NP_378394.1	sulfocyanin [Sulfolobus tokodaii str. 7] >dbj BAK54	89.2	89.2	81%	2,00E-22
YP_981496.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Pol	90.0	90.0	86%	2,00E-22
ZP_03520199.1	blue (type 1) copper domain protein [Rhizobium etl	88.1	88.1	80%	2,00E-22
YP_768024.1	copC gene product [Rhizobium leguminosarum bv. v	88.1	88.1	64%	2,00E-22
EHH03895.1	copper tolerance protein [Agrobacterium tumefacie	88.1	88.1	85%	2,00E-22
YP_001242335.1	copper tolerance protein (cupredoxin) [Bradyrhizob	87.7	87.7	65%	2,00E-22
NP_378393.1	sulfocyanin [Sulfolobus tokodaii str. 7] >dbj BAK54	89.2	89.2	81%	2,00E-22
ZP_01225556.1	copper binding protein [Aurantimonas manganoxyc	87.7	87.7	64%	2,00E-22
YP_002540620.1	copper-containing oxidase [Agrobacterium radioba	86.9	86.9	64%	3,00E-22
CCF00576.1	putative copper oxidase, possibly exported [Sinorh	87.7	87.7	64%	3,00E-22
NP_768849.1	copC gene product [Bradyrhizobium japonicum USD	87.7	87.7	64%	3,00E-22
ZP_08273251.1	blue (type 1) copper domain protein [Oxalobactera	87.3	87.3	94%	3,00E-22
ZP_02154955.1	putative copper oxidase [Oceanibulbus indolifex HE	88.1	88.1	61%	3,00E-22
YP_001347717.1	hypothetical protein PSPA7_2350 [Pseudomonas a	88.1	88.1	96%	3,00E-22
ZP_01038107.1	putative copper-containing oxidoreductase signal p	87.7	87.7	61%	4,00E-22
ZP_06878189.1	hypothetical protein PaerPAb_11205 [Pseudomona	87.7	87.7	96%	4,00E-22
EGP55786.1	copper tolerance protein [Agrobacterium tumefacie	86.9	86.9	85%	4,00E-22
AAF32271.1	CopC [Aeromonas veronii bv. Sobria]	87.3	87.3	90%	5,00E-22
ZP_00963604.1	hypothetical protein NAS141_00605 [Sulfitobacter	88.5	88.5	63%	6,00E-22
NP_356651.1	copper tolerance protein [Agrobacterium tumefacie	86.5	86.5	65%	6,00E-22
ABC68313.1	copper-binding protein [Pseudomonas chlororaphis	87.3	87.3	81%	7,00E-22
ZP_01227198.1	putative copper containing protein [Aurantimonas r	86.5	86.5	64%	7,00E-22
YP_973565.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Pol	86.9	86.9	73%	7,00E-22
YP_002822925.1	copper oxidase, possibly exported [Sinorhizobium f	86.5	86.5	64%	8,00E-22
YP_470023.1	copper-containing oxidase [Rhizobium etli CFN 42]	86.5	86.5	64%	8,00E-22
EGP55536.1	copper tolerance protein [Agrobacterium tumefacie	86.5	86.5	65%	8,00E-22
YP_165195.1	hypothetical protein SPOA0368 [Ruegeria pomeroy	86.5	86.5	65%	8,00E-22
YP_002546511.1	copper tolerance protein [Agrobacterium vitis S4] >	86.5	86.5	96%	8,00E-22
YP_004444181.1	copper tolerance protein [Agrobacterium sp. H13-3	86.2	86.2	65%	9,00E-22
ZP_05026207.1	Copper binding protein, plastocyanin/azurin family	85.8	85.8	66%	1,00E-21
ZP_01881463.1	copper tolerance protein [Roseovarius sp. TM1035]	86.2	86.2	61%	1,00E-21
ZP_08522000.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Aer	86.2	86.2	90%	1,00E-21
YP_001868284.1	hypothetical protein Npun_R4997 [Nostoc punctifor	86.2	86.2	89%	1,00E-21
ZP_09670228.1	azurin blue-copper protein [Gillisia limnaea DSM 15	86.2	86.2	83%	2,00E-21
ZP_08811606.1	blue (Type 1) copper domain protein [Desulfosporo	87.7	87.7	94%	2,00E-21
NP_435810.1	copper oxidase [Sinorhizobium meliloti 1021] >gb A	85.8	85.8	64%	2,00E-21
ZP_03507150.1	putative copper-containing oxidase protein [Rhizob	85.4	85.4	64%	2,00E-21

ABZ07390.1	putative copper-binding protein, plastocyanin/azurin	86.2	86.2	96%	2,00E-21
YP_001313744.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Sinorhizobium	85.4	85.4	93%	2,00E-21
ZP_00956003.1	hypothetical protein EE36_01545 [Sulfitobacter sp.	86.9	86.9	63%	2,00E-21
NP_841532.1	copper-containing oxidoreductase signal peptide protein	85.0	85.0	86%	2,00E-21
ZP_09086693.1	Copper tolerance protein [Mesorhizobium amorphae	85.4	85.4	61%	2,00E-21
ZP_08257532.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Candidatus	86.9	86.9	95%	3,00E-21
ZP_09294446.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Mesorhizobium	85.0	85.0	84%	3,00E-21
YP_002278136.1	blue (type 1) copper domain protein [Rhizobium leguminosarum	84.6	84.6	79%	3,00E-21
YP_002823035.1	copper oxidase, possibly exported [Sinorhizobium lotum	84.6	84.6	64%	3,00E-21
YP_002546506.1	copper tolerance protein [Agrobacterium vitis S4] >	84.6	84.6	92%	3,00E-21
ZP_09705128.1	sulfocyanin [Metallosphaera yellowstonensis MK1]	85.4	85.4	81%	4,00E-21
YP_004688921.1	cupredoxin-like protein [Roseobacter litoralis Och 1	85.8	85.8	89%	4,00E-21
ZP_09327409.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Candidatus	84.6	84.6	88%	5,00E-21
YP_004352986.1	hypothetical protein PSEBR_a1771 [Pseudomonas fluorescens	84.6	84.6	95%	5,00E-21
EEZ92491.1	blue (type 1) copper domain protein [Candidatus Pseudomonas	85.8	85.8	99%	5,00E-21
ZP_01629152.1	hypothetical protein N9414_20225 [Nodularia spumosa	84.6	84.6	66%	5,00E-21
EHS52117.1	blue (type 1) copper domain protein [Rhizobium sp.	84.2	84.2	64%	5,00E-21
NP_344287.1	quinol oxidase-2, sulfocyanin (blue copper protein)	84.6	84.6	79%	7,00E-21
ZP_08142781.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Pseudomonas	84.2	84.2	62%	8,00E-21
YP_004410335.1	sulfocyanin [Metallosphaera cuprina Ar-4] >gb AEB1	84.6	84.6	81%	8,00E-21
ZP_01049823.1	Azurin [Dokdonia donghaensis MED134] >gb EAQ3	83.8	83.8	92%	8,00E-21
AEG03152.1	blue (type 1) copper domain protein [Sinorhizobium	83.8	83.8	64%	8,00E-21
YP_002915652.1	sulfocyanin [Sulfolobus islandicus M.16.4] >gb ACR1	84.2	84.2	79%	9,00E-21
YP_002830406.1	sulfocyanin [Sulfolobus islandicus M.14.25] >ref YP_002830406.1	84.2	84.2	79%	9,00E-21
YP_001187722.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Pseudomonas	83.8	83.8	62%	1,00E-20
ZP_05741884.1	hypothetical protein SCH4B_3070 [Silicibacter sp. T	84.6	84.6	64%	1,00E-20
ADX86320.1	sulfocyanin [Sulfolobus islandicus REY15A]	83.8	83.8	79%	1,00E-20
ZP_08550477.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Salinibacterium	82.7	82.7	75%	1,00E-20
YP_001636176.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Candidatus	82.7	82.7	63%	1,00E-20
YP_002833151.1	sulfocyanin [Sulfolobus islandicus L.S.2.15] >ref YP_002833151.1	83.8	83.8	79%	2,00E-20
ZP_00961603.1	hypothetical protein ISM_17445 [Roseovarius nubiferox	83.5	83.5	64%	2,00E-20
AEV63960.1	copper-binding protein [Pseudomonas fluorescens Pf0-1]	83.1	83.1	95%	2,00E-20
ZP_09328437.1	blue (type1) copper domain-containing protein, par	80.8	80.8	54%	2,00E-20
ZP_06387080.1	blue (type 1) copper domain protein [Sulfolobus solfataricus	83.8	83.8	66%	2,00E-20
YP_001190424.1	unnamed protein product [Metallosphaera sedula D	83.1	83.1	81%	3,00E-20
YP_003146709.1	azurin [Kangiella koreensis DSM 16069] >gb ACV26	81.9	81.9	70%	3,00E-20
YP_349582.1	copper-binding protein [Pseudomonas fluorescens Pf0-1]	82.3	82.3	63%	3,00E-20
YP_004430544.1	azurin [Krokinobacter sp. 4H-3-7-5] >gb AEE19276	81.9	81.9	85%	4,00E-20
ZP_08667184.1	Blue (Type 1) copper domain protein [Candidatus N	83.5	83.5	95%	4,00E-20
YP_003902144.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Vulcanisa	83.1	83.1	77%	5,00E-20

YP_004714873.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Pse	81.9	81.9	62%	6,00E-20
ZP_08528099.1	copper oxidase [Agrobacterium sp. ATCC 31749] >	81.5	81.5	64%	6,00E-20
YP_004688920.1	cupredoxin-like protein [Roseobacter litoralis Och 1	82.3	82.3	61%	6,00E-20
YP_001802596.1	hypothetical protein cce_1180 [Cyanotheca sp. ATC	80.8	80.8	77%	7,00E-20
BAL53196.1	blue (type1) copper domain-containing protein [unc	80.8	80.8	63%	8,00E-20
ZP_00964733.1	putative copper oxidase, possibly exported [Sulfito	81.5	81.5	79%	8,00E-20
ZP_05059164.1	Copper binding protein, plastocyanin/azurin family	85.4	85.4	91%	9,00E-20
ADX84707.1	blue (type 1) copper domain protein [Sulfolobus isk	81.9	81.9	66%	1,00E-19
ZP_02188746.1	copper-binding protein [alpha proteobacterium BAL	81.2	81.2	90%	1,00E-19
ZP_01881464.1	hypothetical protein RTM1035_00250 [Roseovarius	81.9	81.9	86%	1,00E-19
YP_001818686.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Op	81.2	81.2	85%	1,00E-19
YP_003390896.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Sp	84.6	84.6	96%	1,00E-19
YP_002828861.1	blue (type 1) copper domain protein [Sulfolobus isk	81.5	81.5	66%	1,00E-19
ZP_02154956.1	hypothetical protein OIH45_17881 [Oceanibulbu	81.5	81.5	86%	1,00E-19
ZP_01739821.1	hypothetical protein MELB17_11659 [Marinobacter	81.2	81.2	92%	1,00E-19
YP_001541297.1	hypothetical protein Cmaq_1483 [Caldivirga maqui	81.9	81.9	82%	1,00E-19
ZP_09703936.1	Sulfocyanin (SoxE) [Metallosphaera yellowstonensi	81.5	81.5	87%	2,00E-19
ZP_01038108.1	hypothetical protein ROS217_03150 [Roseovarius s	80.8	80.8	61%	2,00E-19
YP_003087289.1	azurin [Dyadobacter fermentans DSM 18053] >gb	80.0	80.0	85%	2,00E-19
ZP_09703737.1	plastocyanin [Metallosphaera yellowstonensis MK1	81.2	81.2	66%	2,00E-19
YP_002463939.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Ch	79.6	79.6	63%	2,00E-19
ZP_04057121.1	azurin [Capnocytophaga gingivalis ATCC 33624] >	80.0	80.0	86%	2,00E-19
YP_002837125.1	blue (type 1) copper domain protein [Sulfolobus isk	81.2	81.2	66%	2,00E-19
YP_002914072.1	blue (type 1) copper domain protein [Sulfolobus isk	81.2	81.2	66%	2,00E-19
YP_002871218.1	hypothetical protein PFLU1577 [Pseudomonas fluor	80.0	80.0	92%	3,00E-19
ZP_07774167.1	uncharacterized copper-binding protein [Pseudomc	80.0	80.0	93%	3,00E-19
YP_002831569.1	blue (type 1) copper domain protein [Sulfolobus isk	80.8	80.8	66%	3,00E-19
ZP_09329698.1	blue (type1) copper domain-containing protein, par	77.7	77.7	54%	3,00E-19
ZP_01253842.1	Azurin [Psychroflexus torquis ATCC 700755] >gb E	79.2	79.2	87%	4,00E-19
YP_957419.1	copper-binding protein [Marinobacter aquaeolei VT	79.6	79.6	60%	4,00E-19
NP_485063.1	unnamed protein product [Nostoc sp. PCC 7120] >	79.6	79.6	66%	4,00E-19
ZP_08202719.1	azurin [Capnocytophaga sp. oral taxon 338 str. FO	79.2	79.2	71%	4,00E-19
ZP_09158576.1	copper-binding protein [Marinobacter manganoxyd	79.6	79.6	60%	4,00E-19
YP_324178.1	unnamed protein product [Anabaena variabilis ATC	78.8	78.8	66%	5,00E-19
ZP_09158296.1	copper-binding protein [Marinobacter manganoxyd	78.8	78.8	71%	6,00E-19
ZP_07113113.1	conserved exported hypothetical protein [Oscillato	78.5	78.5	65%	6,00E-19
ZP_09712003.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Pse	78.8	78.8	62%	7,00E-19
YP_172280.1	unnamed protein product [Synechococcus elongatu	78.5	78.5	66%	7,00E-19
YP_003085514.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Dy	81.9	81.9	92%	1,00E-18
YP_004316921.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Sp	78.5	78.5	87%	1,00E-18

YP_004410193.1	sulfocyanin [Metallosphaera cuprina Ar-4] >gb AEB	78.8	78.8	82%	1,00E-18
ZP_00964732.1	hypothetical protein NAS141_01646 [Sulfitobacter	78.1	78.1	64%	1,00E-18
ZP_01013009.1	uncharacterized copper-binding protein [Maritimba	78.1	78.1	62%	1,00E-18
YP_002828467.1	sulfocyanin [Sulfolobus islandicus M.14.25] >gb AC	78.8	78.8	81%	1,00E-18
YP_004740186.1	Azurin [Capnocytophaga canimorsus Cc5] >gb AEK	77.7	77.7	87%	2,00E-18
YP_001748550.1	blue copper domain-containing protein [Pseudomon	77.7	77.7	75%	2,00E-18
YP_004693329.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Nit	77.3	77.3	85%	2,00E-18
ZP_03724054.1	blue (type 1) copper domain protein [Diplosphaera	77.7	77.7	85%	2,00E-18
ZP_08819851.1	azurin [Bizionia argentinensis JUB59] >gb EGV4339	77.7	77.7	87%	2,00E-18
YP_002913600.1	sulfocyanin [Sulfolobus islandicus M.16.4] >gb ACR	78.5	78.5	81%	2,00E-18
YP_002831107.1	sulfocyanin [Sulfolobus islandicus L.S.2.15] >ref YP	78.5	78.5	81%	2,00E-18
YP_002842353.1	sulfocyanin [Sulfolobus islandicus M.16.27] >gb AC	78.1	78.1	81%	2,00E-18
YP_002377863.1	blue-copper-protein-like protein [Cyanothecce sp. P	76.9	76.9	66%	2,00E-18
YP_002841712.1	sulfocyanin [Sulfolobus islandicus Y.N.15.51] >gb A	78.1	78.1	81%	2,00E-18
YP_004990635.1	unnamed protein product [Owenweekesia hongkong	77.3	77.3	100%	3,00E-18
YP_003890048.1	blue-copper-protein-like protein [Cyanothecce sp. P	76.5	76.5	66%	3,00E-18
YP_002836499.1	sulfocyanin [Sulfolobus islandicus Y.G.57.14] >gb A	77.7	77.7	81%	3,00E-18
YP_001734539.1	blue-copper-protein-like protein [Synechococcus sp	76.5	76.5	64%	3,00E-18
YP_876891.1	hypothetical protein CENSYa_1982 [Cenarchaeum	77.3	77.3	95%	3,00E-18
ADP95948.1	copper-binding protein [Marinobacter adhaerens H	76.9	76.9	60%	3,00E-18
ADX84379.1	sulfocyanin [Sulfolobus islandicus REY15A] >gb AD	77.7	77.7	81%	3,00E-18
ZP_01727882.1	hypothetical protein CY0110_23556 [Cyanothecce s	76.5	76.5	77%	3,00E-18
YP_477240.1	hypothetical protein CYB_0999 [Synechococcus sp.	76.1	76.1	64%	3,00E-18
YP_001543535.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Hel	77.7	77.7	96%	4,00E-18
YP_004275640.1	unnamed protein product [Pedobacter saltans DSM	76.9	76.9	88%	4,00E-18
YP_001276694.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Ros	76.5	76.5	63%	4,00E-18
YP_003386724.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Sp	80.4	80.4	92%	4,00E-18
NP_375952.1	sulfocyanin [Sulfolobus tokodaii str. 7] >dbj BAK54	76.9	76.9	80%	4,00E-18
ZP_05042814.1	hypothetical protein ADG881_2337 [Alcanivorax sp	75.8	75.8	62%	4,00E-18
YP_256841.1	sulfocyanin, blue copper protein [Sulfolobus acidoc	76.9	76.9	80%	4,00E-18
ZP_08986453.1	hypothetical protein FJSC11DRAFT_2659 [Fischerell	76.1	76.1	84%	4,00E-18
YP_003185776.1	unnamed protein product [Alicyclobacillus acidocald	76.5	76.5	74%	5,00E-18
Q53765.1	RecName: Full=Sulfocyanin; AltName: Full=Blue cop	76.9	76.9	80%	5,00E-18
YP_001187723.1	hypothetical protein Pmen_2232 [Pseudomonas me	76.5	76.5	63%	5,00E-18
ZP_06897948.1	plastocyanin/azurin family copper-binding protein [76.5	76.5	62%	5,00E-18
YP_002840914.1	blue (type 1) copper domain protein [Sulfolobus isl	76.9	76.9	66%	5,00E-18
AEJ44563.1	hypothetical protein TC41_2669 [Alicyclobacillus aci	76.1	76.1	74%	6,00E-18
YP_004655180.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Ru	79.6	79.6	94%	6,00E-18
ZP_03493024.1	hypothetical protein AaLAA1DRAFT_0610 [Alicycloba	76.1	76.1	74%	6,00E-18
ZP_09525793.1	azurin [Myroides odoratimimus CCUG 10230] >gb E	76.1	76.1	69%	6,00E-18

YP_693084.1	copC gene product [<i>Alcanivorax borkumensis</i> SK2]	76.1	76.1	62%	7,00E-18
CAC16938.1	SynEII protein [synthetic construct]	75.8	75.8	80%	7,00E-18
ZP_09593174.1	blue (type 1) copper domain protein [Opitutaceae b	76.1	76.1	89%	7,00E-18
EHO06485.1	azurin [<i>Myroides odoratimimus</i> CCUG 12901]	76.1	76.1	69%	7,00E-18
YP_001191060.1	unnamed protein product [<i>Metallosphaera sedula</i> D	76.5	76.5	65%	9,00E-18
YP_002461709.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Ch	75.4	75.4	65%	1,00E-17
NP_343834.1	quinol oxidase-2, sulfocyanin (blue copper protein)	76.1	76.1	81%	1,00E-17
YP_004293297.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Nit	75.0	75.0	62%	1,00E-17
ZP_09592128.1	blue (type 1) copper domain protein [Opitutaceae b	75.4	75.4	83%	1,00E-17
YP_474533.1	hypothetical protein CYA_1075 [<i>Synechococcus</i> sp.	75.0	75.0	99%	1,00E-17
YP_411275.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Nit	75.0	75.0	63%	1,00E-17
YP_001433184.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Ros	75.0	75.0	62%	1,00E-17
ZP_01052661.1	copper binding protein, plastocyanin/azurin family [75.4	75.4	76%	1,00E-17
1QHQ_A	Chain A, Auracyanin, A Blue Copper Protein From Th	74.2	74.2	85%	2,00E-17
ACX90592.1	sulfocyanin [<i>Sulfolobus solfataricus</i> 98/2]	75.8	75.8	80%	2,00E-17
YP_001516382.1	unnamed protein product [<i>Acaryochloris marina</i> MB	74.6	74.6	94%	2,00E-17
YP_004772162.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Cy	76.9	76.9	70%	2,00E-17
YP_001656736.1	blue-copper-protein-like protein [<i>Microcystis aerugi</i>	74.2	74.2	66%	2,00E-17
YP_002521622.1	halocyanin -like protein [<i>Thermomicrobium roseum</i>	74.6	74.6	65%	2,00E-17
ZP_09248884.1	hypothetical protein ACCM5_16468 [<i>Acaryochloris s</i>	74.2	74.2	64%	2,00E-17
ZP_01117450.1	azurin precursor [<i>Polaribacter irgensii</i> 23-P] >gb EA	74.6	74.6	90%	2,00E-17
ZP_09620880.1	hypothetical protein LDG_7292 [<i>Legionella drancou</i>	74.2	74.2	90%	2,00E-17
ZP_08008497.1	hypothetical protein HMPREF1013_05117 [<i>Bacillus s</i>	75.0	75.0	90%	3,00E-17
ZP_01892186.1	copper-binding protein [<i>Marinobacter algicola</i> DG89	74.2	74.2	60%	3,00E-17
ZP_07719012.1	auracyanin A [<i>Algoriphagus</i> sp. PR1] >gb EAZ8197.	74.2	74.2	65%	3,00E-17
YP_001581519.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Nit	75.4	75.4	95%	3,00E-17
YP_001667939.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Pse	74.2	74.2	75%	3,00E-17
YP_002771753.1	hypothetical protein BBR47_22720 [<i>Brevibacillus br</i>	75.0	75.0	63%	4,00E-17
YP_002482307.1	hypothetical protein Cyan7425_1576 [<i>Cyanothece</i>	73.8	73.8	92%	4,00E-17
YP_256346.1	hypothetical protein Saci_1747 [<i>Sulfolobus acidoca</i>	74.2	74.2	81%	4,00E-17
YP_609211.1	copper-binding protein [<i>Pseudomonas entomophila</i>	73.8	73.8	63%	4,00E-17
ZP_07835336.1	hypothetical protein ThesuDRAFT_1856 [<i>Thermaer</i>	73.1	73.1	93%	4,00E-17
ZP_02930868.1	probable cytochrome c precursor [<i>Verrucomicrobiu</i>	77.7	77.7	98%	5,00E-17
ZP_08142951.1	plastocyanin/azurin family copper binding protein [73.8	73.8	97%	5,00E-17
YP_003997400.1	azurin [<i>Leadbetterella byssophila</i> DSM 17132] >gb	73.8	73.8	69%	5,00E-17
YP_003089064.1	membrane-bound dehydrogenase domain-containi	77.3	77.3	89%	5,00E-17
YP_003896936.1	copC gene product [<i>Halomonas elongata</i> DSM 2581	73.4	73.4	63%	5,00E-17
ZP_05055938.1	Copper binding protein, plastocyanin/azurin family	73.1	73.1	72%	6,00E-17
YP_004825359.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Rh	73.1	73.1	67%	6,00E-17
YP_003290487.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Rh	73.1	73.1	67%	6,00E-17

ZP_02929217.1	hypothetical protein VspiD_21250 [Verrucomicrobiu	73.1	73.1	67%	6,00E-17
YP_002569830.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Ch	73.4	73.4	64%	6,00E-17
ZP_05361356.1	copper resistance protein A [Acinetobacter radiores	76.5	76.5	98%	7,00E-17
YP_003085083.1	membrane-bound dehydrogenase domain-containi	76.9	76.9	71%	7,00E-17
YP_001635554.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Ch	73.8	73.8	64%	8,00E-17
YP_004102487.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Th	72.7	72.7	74%	8,00E-17
YP_001411628.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Pa	73.1	73.1	63%	8,00E-17
YP_002463164.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Ch	73.1	73.1	98%	1,00E-16
ZP_09444012.1	cytochrome C oxidase subunit II, periplasmic doma	75.8	75.8	98%	1,00E-16
YP_001194758.1	unnamed protein product [Flavobacterium johnsoni	72.3	72.3	87%	1,00E-16
YP_004449835.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Ha	75.8	75.8	91%	1,00E-16
ZP_03130757.1	blue (type 1) copper domain protein [Chthoniobact	75.4	75.4	73%	2,00E-16
ZP_03968473.1	azurin [Sphingobacterium spiritivorum ATCC 33300	72.3	72.3	72%	2,00E-16
ZP_07079854.1	azurin [Sphingobacterium spiritivorum ATCC 33861	71.9	71.9	72%	2,00E-16
ZP_04295685.1	hypothetical protein bcere0007_29140 [Bacillus cer	71.1	71.1	90%	2,00E-16
ADR61088.1	Plastocyanin/azurin family copper binding protein [I	71.9	71.9	79%	2,00E-16
YP_004459045.1	sulfocyanin [Acidianus hospitalis W1] >gb AEE9474	72.3	72.3	79%	2,00E-16
ZP_04262935.1	hypothetical protein bcere0014_30300 [Bacillus cer	71.1	71.1	90%	2,00E-16
ZP_08818680.1	copper binding s, plastocyanin/azurin family protei	71.5	71.5	69%	2,00E-16
ZP_04175381.1	hypothetical protein bcere0030_30450 [Bacillus cer	70.8	70.8	90%	2,00E-16
2AAN_A	Chain A, Auracyanin A: A "blue" Copper Protein Fro	71.1	71.1	65%	3,00E-16
CAC38041.1	copper-tolerance protein [Pseudomonas fluorescen	70.0	70.0	42%	3,00E-16
ZP_04198240.1	hypothetical protein bcere0026_29790 [Bacillus cer	70.8	70.8	90%	3,00E-16
ZP_04171986.1	hypothetical protein bmyco0001_52790 [Bacillus m	70.8	70.8	90%	3,00E-16
YP_001645826.1	hypothetical protein BcerKBAB4_3015 [Bacillus weil	70.4	70.4	90%	3,00E-16
YP_001268891.1	hypothetical protein Pput_3583 [Pseudomonas put	71.1	71.1	75%	3,00E-16
YP_004096027.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Ba	72.3	72.3	65%	4,00E-16
YP_004271519.1	membrane-bound dehydrogenase domain-containi	75.0	75.0	90%	4,00E-16
ZP_06387595.1	sulfocyanin [Sulfolobus solfataricus 98/2]	70.8	70.8	74%	4,00E-16
ZP_03630601.1	membrane-bound dehydrogenase domain protein [75.0	75.0	97%	4,00E-16
ZP_08959166.1	putative copper-binding protein [Halomonas sp. HA	70.8	70.8	61%	5,00E-16
YP_001636825.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Ch	70.4	70.4	65%	6,00E-16
NP_744308.1	plastocyanin/azurin family copper binding protein [I	70.4	70.4	75%	6,00E-16
YP_004102128.1	hypothetical protein Tmar_1288 [Thermaerobacter	70.0	70.0	65%	6,00E-16
YP_004273105.1	unnamed protein product [Pedobacter saltans DSM	72.7	72.7	69%	6,00E-16
YP_076981.1	hypothetical protein STH3155 [Symbiobacterium th	69.6	69.6	65%	7,00E-16
ZP_03718622.1	hypothetical protein NEIFLAOT_00428 [Neisseria fla	73.4	73.4	96%	7,00E-16
ZP_08680711.1	plastocyanin/azurin family copper binding protein [S	71.5	71.5	88%	7,00E-16
ABL97819.1	hypothetical protein ALOHA_HF1049E08.0007 [unc	72.3	72.3	82%	8,00E-16
YP_004238345.1	unnamed protein product [Weeksella virosa DSM 1	70.0	70.0	89%	9,00E-16

ZP_08493686.1	hypothetical protein MicvaDRAFT_0910 [Microcoleus	69.2	69.2	80%	9,00E-16
ZP_09704281.1	Sulfocyanin (SoxE) [Metallosphaera yellowstonensi	69.6	69.6	78%	2,00E-15
ZP_02737040.1	hypothetical protein GobsU_34822 [Gemmata obsc	73.1	73.1	98%	2,00E-15
ZP_07687154.1	blue (type 1) copper domain protein [Oscillochloris	70.4	70.4	62%	2,00E-15
ZP_04603668.1	hypothetical protein GCWU000324_03169 [Kingella	72.3	72.3	96%	2,00E-15
YP_004776739.1	membrane-bound dehydrogenase domain-containi	72.3	72.3	87%	2,00E-15
YP_004049219.1	unnamed protein product [Neisseria lactamica 020-	71.9	71.9	95%	2,00E-15
ZP_01738637.1	hypothetical protein MELB17_00490 [Marinobacter	68.1	68.1	89%	3,00E-15
ZP_05843308.1	conserved hypothetical protein [Rhodobacter sp. S'	68.4	68.4	93%	3,00E-15
ZP_05078392.1	Cytochrome C oxidase subunit II, periplasmic doma	71.5	71.5	98%	3,00E-15
XP_001702952.1	plastocyanin, chloroplast precursor [Chlamydomona	68.1	68.1	90%	4,00E-15
ZP_03264514.1	blue (type 1) copper domain [Burkholderia sp. H160	66.5	66.5	39%	4,00E-15
YP_003085848.1	membrane-bound dehydrogenase domain-containi	71.9	71.9	64%	4,00E-15
ZP_02929453.1	hypothetical protein VspiD_22430 [Verrucomicrobiu	71.9	71.9	64%	4,00E-15
ZP_05061517.1	copper-binding protein [gamma proteobacterium H	67.7	67.7	56%	4,00E-15
YP_003090621.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Pe	70.4	70.4	83%	4,00E-15
YP_004275988.1	unnamed protein product [Pedobacter saltans DSM	68.1	68.1	69%	4,00E-15
YP_004459051.1	hypothetical protein Ahos_1880 [Acidianus hospita	68.4	68.4	79%	4,00E-15
YP_004273104.1	unnamed protein product [Pedobacter saltans DSM	68.1	68.1	64%	5,00E-15
YP_003385374.1	dehydrogenase [Spirosoma linguale DSM 74] >gb A	71.5	71.5	96%	5,00E-15
ABA01106.1	chloroplast plastocyanin [Chlamydomonas incerta]	67.7	67.7	90%	5,00E-15
ZP_00958990.1	copper-binding protein, plastocyanin/azurin family p	67.7	67.7	63%	6,00E-15
ZP_09569160.1	membrane-bound dehydrogenase domain protein	71.1	71.1	64%	7,00E-15
AEN90378.1	hypothetical protein BMWSH_3496 [Bacillus megate	66.9	66.9	66%	7,00E-15
YP_003562174.1	cytochrome C oxidase subunit II, periplasmic doma	66.5	66.5	66%	8,00E-15
CCC97721.1	conserved exported protein of unknown function [A	67.3	67.3	76%	8,00E-15
ZP_06062488.1	copper resistance protein A [Acinetobacter johnson	70.4	70.4	98%	9,00E-15
XP_002946937.1	hypothetical protein VOLCADRAFT_79339 [Volvox c	66.9	66.9	90%	1,00E-14
ZP_02929685.1	hypothetical sulfocyanin [Verrucomicrobium spinosu	66.9	66.9	94%	1,00E-14
YP_003596892.1	cytochrome C oxidase subunit II, periplasmic doma	65.7	65.7	66%	1,00E-14
YP_004449966.1	membrane-bound dehydrogenase domain-containi	70.0	70.0	65%	2,00E-14
ZP_06726395.1	copper resistance protein A precursor [Acinetobact	69.2	69.2	99%	2,00E-14
ZP_01739822.1	copper resistance protein A [Marinobacter sp. ELB1	69.2	69.2	77%	2,00E-14
ZP_07228285.1	copper resistance protein A precursor [Acinetobact	66.1	66.1	96%	2,00E-14
ZP_08257221.1	Hypothetical protein Nlim_0993 [Candidatus Nitros	66.5	66.5	78%	2,00E-14
ZP_04661415.1	copper resistance protein A precursor [Acinetobact	69.2	69.2	99%	2,00E-14
ZP_09143993.1	Copper resistance protein A precursor [Acinetobact	68.8	68.8	98%	2,00E-14
NP_865052.1	azurin precursor [Rhodopirellula baltica SH 1] >emb	69.2	69.2	90%	3,00E-14
YP_445711.1	auracyanin A [Salinibacter ruber DSM 13855] >gb A	65.7	65.7	66%	3,00E-14
ZP_09219874.1	copper resistance protein CopA [Acinetobacter sp.	68.4	68.4	96%	3,00E-14

ABZ07724.1	putative copper binding protein, plastocyanin/azurin	65.7	65.7	94%	3,00E-14
YP_003571662.1	Azurin [Salinibacter ruber M8] >emb CBH24710.1	65.7	65.7	66%	3,00E-14
YP_004409890.1	hypothetical protein Mcup_1303 [Metallosphaera c	65.7	65.7	78%	3,00E-14
ABO13341.2	copper resistance protein A precursor [Acinetobact	68.4	68.4	99%	3,00E-14
YP_001190925.1	unnamed protein product [Metallosphaera sedula D	65.7	65.7	80%	4,00E-14
YP_003428974.1	unnamed protein product [Bacillus pseudofirmus O]	66.5	66.5	67%	4,00E-14
ZP_01738641.1	copper resistance protein A [Marinobacter sp. ELB1	68.1	68.1	77%	4,00E-14
EGF29617.1	membrane-bound dehydrogenase domain protein [68.8	68.8	89%	4,00E-14
YP_001085943.1	copper resistance protein A precursor [Acinetobact	68.4	68.4	99%	4,00E-14
EGZ26556.1	hypothetical protein PHYSODRAFT_477064 [Phytop	68.1	68.1	94%	4,00E-14
YP_344488.1	hypothetical protein Noc_2505 [Nitrosococcus ocea	66.9	66.9	90%	5,00E-14
YP_045424.1	copper resistance protein A precursor [Acinetobact	68.1	68.1	96%	5,00E-14
YP_075334.1	hypothetical protein STH1505 [Symbiobacterium th	65.7	65.7	64%	5,00E-14
ZP_03504518.1	blue (type 1) copper domain protein [Rhizobium etl	63.0	63.0	38%	5,00E-14
XP_002946905.1	hypothetical protein VOLCADRAFT_72905 [Volvox c	64.6	64.6	90%	6,00E-14
YP_003176840.1	unnamed protein product [Halomicrobium mukohat	64.2	64.2	86%	6,00E-14
ZP_03824039.1	copper resistance protein A precursor [Acinetobact	67.7	67.7	96%	7,00E-14
ZP_05823239.1	copper resistance protein A [Acinetobacter sp. RUH	67.7	67.7	96%	7,00E-14
YP_001547663.1	blue (type1) copper domain-containing protein [Hel	64.6	64.6	54%	7,00E-14
YP_004654883.1	membrane-bound dehydrogenase domain-containi	67.7	67.7	64%	1,00E-13
ZP_06691496.1	conserved hypothetical protein [Acinetobacter sp. S	66.9	66.9	98%	1,00E-13
ZP_06726858.1	copper resistance protein A [Acinetobacter haemol	66.9	66.9	96%	1,00E-13
YP_004653794.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Ru	65.7	65.7	69%	1,00E-13
ZP_09496381.1	azurin-containing protein [Flavobacteriaceae bacte	66.5	66.5	64%	1,00E-13
ZP_06064054.1	copper resistance protein A [Acinetobacter johnson	66.5	66.5	98%	1,00E-13
ZP_08553951.1	azurin [Salinisphaera shabanensis E1L3A] >gb EGM	63.4	63.4	90%	2,00E-13
YP_001698046.1	blue copper oxidase cueO [Lysinibacillus sphaericus	66.1	66.1	95%	2,00E-13
ZP_06070830.1	copper resistance protein A [Acinetobacter lwoffii S	66.5	66.5	96%	2,00E-13
ZP_05826104.1	copper resistance protein A [Acinetobacter sp. RUH	66.5	66.5	98%	2,00E-13
ZP_05042289.1	copper-resistance protein, CopA family [Alcanivorax	66.5	66.5	77%	2,00E-13
BAE00064.1	plastocyanin precursor [Pediastrum duplex]	63.4	63.4	93%	2,00E-13
YP_129215.1	hypothetical protein PBPR1002 [Photobacterium p	63.4	63.4	60%	2,00E-13
ZP_01219557.1	hypothetical protein P3TCK_15829 [Photobacterium	63.8	63.8	60%	2,00E-13
YP_256683.1	sulfocyanin [Sulfolobus acidocaldarius DSM 639] >g	63.0	63.0	65%	2,00E-13
ZP_06059253.1	copper resistance protein A [Acinetobacter calcoace	66.1	66.1	98%	2,00E-13
YP_003733503.1	Copper resistance protein A [Acinetobacter oleivor	66.1	66.1	98%	2,00E-13
ZP_08437873.1	copper-resistance protein, CopA family [Acinetobac	66.1	66.1	98%	2,00E-13
YP_001714893.1	copper resistance protein A [Acinetobacter bauman	66.1	66.1	98%	2,00E-13
YP_004038071.1	Copper binding protein, plastocyanin/azurin family	63.0	63.0	61%	2,00E-13
YP_003391096.1	dehydrogenase [Spirosoma linguale DSM 74] >gb A	66.5	66.5	90%	2,00E-13

ZP_00964730.1	copper resistance protein A [Sulfitobacter sp. NAS-	66.1	66.1	79%	2,00E-13
YP_004865578.1	copper resistance protein A [Micavibrio aeruginosa	66.1	66.1	98%	2,00E-13
ABO11151.2	copper resistance protein A precursor [Acinetobact	66.1	66.1	98%	2,00E-13
YP_004997825.1	pcoA gene product [Acinetobacter calcoaceticus PH	65.7	65.7	98%	3,00E-13
YP_002379790.1	plastocyanin [Cyanotheca sp. PCC 7424] >sp B7KA	62.3	62.3	76%	3,00E-13
ZP_08435623.1	copper-resistance protein, CopA family [Acinetobac	65.7	65.7	98%	3,00E-13
A42418	auracyanin B1 - Chloroflexus aurantiacus	62.7	62.7	94%	3,00E-13
YP_004101297.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Th	62.3	62.3	63%	3,00E-13
ZP_05361756.1	copper resistance protein A [Acinetobacter radiores	65.7	65.7	96%	3,00E-13
ZP_01892185.1	Copper resistance protein A precursor [Marinobacte	65.7	65.7	77%	3,00E-13
ADP95947.1	copper-resistance protein, CopA family [Marinobact	65.7	65.7	77%	3,00E-13
YP_002318066.1	copper resistance protein A [Acinetobacter bauman	65.7	65.7	96%	3,00E-13
YP_001381429.1	CopA family copper resistance protein [Anaeromyx	65.7	65.7	87%	3,00E-13
YP_003759906.1	hypothetical protein Nwat_0629 [Nitrosococcus wa	64.6	64.6	88%	3,00E-13
ZP_01472688.1	plastocyanin precursor [Synechococcus sp. RS9916	61.9	61.9	76%	3,00E-13
YP_003526239.1	hypothetical protein Nhal_0672 [Nitrosococcus halc	64.6	64.6	90%	3,00E-13
ZP_00958992.1	copper resistance protein A [Roseovarius nubinhibe	65.4	65.4	77%	3,00E-13
ZP_04660669.1	Copper resistance protein A precursor [Acinetobact	65.4	65.4	98%	3,00E-13
ZP_09144957.1	copper resistance protein A precursor [Acinetobact	65.4	65.4	96%	4,00E-13
ZP_01079878.1	Plastocyanin, PetE [Synechococcus sp. RS9917] >g	61.5	61.5	72%	4,00E-13
YP_693083.1	copA gene product [Alcanivorax borkumensis SK2]	65.0	65.0	77%	4,00E-13
YP_957420.1	CopA family copper resistance protein [Marinobacte	65.0	65.0	77%	4,00E-13
NP_894280.1	plastocyanin [Prochlorococcus marinus str. MIT 931	61.5	61.5	90%	4,00E-13
YP_001083753.1	copper resistance protein A precursor [Acinetobact	65.0	65.0	98%	4,00E-13
ZP_06067630.1	copper resistance protein A [Acinetobacter junii SH	65.0	65.0	96%	5,00E-13
YP_291212.1	plastocyanin [Prochlorococcus marinus str. NATL2A	61.5	61.5	76%	5,00E-13
YP_001714981.1	copper resistance protein A [Acinetobacter bauman	65.4	65.4	96%	5,00E-13
YP_003886422.1	plastocyanin [Cyanotheca sp. PCC 7822] >gb ADN:	61.5	61.5	76%	5,00E-13
ZP_09158297.1	copper resistance protein A [Marinobacter mangan	65.0	65.0	77%	5,00E-13
YP_001014464.1	plastocyanin [Prochlorococcus marinus str. NATL1A	61.1	61.1	76%	5,00E-13
XP_002169317.1	PREDICTED: similar to F21D5.3 [Hydra magnipapilla	65.4	65.4	96%	5,00E-13
ZP_05827827.1	copper resistance protein A [Acinetobacter bauman	65.0	65.0	98%	5,00E-13
ZP_02929564.1	auracyanin A precursor [Verrucomicrobium spinosu	62.3	62.3	66%	6,00E-13
ZP_09208085.1	blue (type 1) copper domain-containing protein [Ca	61.1	61.1	62%	6,00E-13
ZP_02355210.1	hypothetical protein BokIE_07001 [Burkholderia ok	61.5	61.5	58%	6,00E-13
ZP_01857709.1	probable cytochrome c precursor [Planctomyces ma	65.0	65.0	87%	7,00E-13
XP_002946904.1	hypothetical protein VOLCADRAFT_86971 [Volvox c	61.5	61.5	92%	7,00E-13
YP_002049485.1	plastocyanin precursor [Paulinella chromatophora]	61.1	61.1	74%	7,00E-13
ZP_09364952.1	copper-binding protein [Vibrio ordalii ATCC 33509]	61.5	61.5	58%	7,00E-13
ZP_08007830.1	hypothetical protein HMPREF1013_04448 [Bacillus s	61.1	61.1	85%	7,00E-13
YP_004981477.1	unnamed protein product [Geobacillus thermoleovo	63.4	63.4	78%	7,00E-13
YP_001224476.1	plastocyanin [Synechococcus sp. WH 7803] >emb C	61.1	61.1	76%	7,00E-13
YP_003796919.1	hypothetical protein NIDE1237 [Candidatus Nitrosp	61.5	61.5	65%	8,00E-13
YP_001125718.1	copper tolerance protein [Geobacillus thermodenitr	61.9	61.9	81%	8,00E-13

Anexo 2

Secuencias de los lfe de las proteínas obtenidas por el análisis del lfe de rusticianina de *A. ferrooxidans* en SAM t08

PROTEÍNA	ORGANISMO	CODIGO PDB	SECUENCIA
Pseudoazurina	<i>A. cycloclastes</i>	1bqk	VKCTPHYGMGMVGV
Azurina	<i>A. denitrificans</i>	1a4aA	GEAYAYFCSFPGHWAMHKGLKLL
Pseudoazurina	<i>A. faecalis</i>	1py0A	PGAYLVKCTPHYAMGMIALIAVGD
Pseudoazurina	<i>A. faecalis</i>	1pazA	AYLVKCTPHYAMGMIALIAVGDSP
Pseudoazurina	<i>A. faecalis</i>	4pazA	AYLVKCTAHYAMGMIALIAVGDSP
Rusticianina	<i>A. ferrooxidans</i>	2calA	GTYYYVCQIPGMAATGMFGKIVVK
Rusticianina	<i>A. ferrooxidans</i>	1e30A	GTYYYVCQIPGHAATGQFGKIVVK
Plastocianina	<i>A. variabilis</i>	2gimA	PAGEYTFYCEPHRGAGMVGKITV
Azurina II	<i>A. xyloxydans</i>	2ccwA	AYFCSFPGHWAMMKGTL
Auracianina	<i>C. aurantiacus</i>	1qhqa	TYLYICTFPGHYLAGMKGLTL
Auracianina A	<i>C. aurantiacus</i>	2aanA	TYLYICTVPGHYPLMQGKLV
Mavicianina	<i>C. pepo</i>	1ws8A	TFYFLCGIPGHCQLGQKVEI
Plastocianina	<i>C. reinhardtii</i>	2pltA	GEYGYCEPHQAGMVGKIIV
Proteína básica de pepino	<i>C. sativus</i>	2cbpA	QSYFICNFPGHCQSGMKIAVN
Estellacianina de pepino	<i>C. sativus</i>	1jerA	ELGMHYFVCTVGTHTCSNGQKLSI
Plastocianina	<i>D. crassirhizoma</i>	1kdj	PGTYTFYCTPHKSANMKGLTLV
Pseudoazurina	<i>H. denitrificans</i>	3ef4A	YVLKCAPHYGMGMVVLV
Pseudoazurina	<i>M. extorquens</i>	1pmyA	FKCAPHYMMGMVAL
Azurina	<i>Methylomonas</i> sp.	1cuoA	YFCSYPGHFSMMRGT
Azurina	<i>P. aeruginosa</i>	3ft0A	KLKEGEQYMFCAAAAHAAMK
Azurina	<i>P. aeruginosa</i>	1jzga	MFFCTFPGHSALMKGTL
Azurina	<i>P. aeruginosa</i>	3fswA	FFCAAAAHAAMKGT
Azurina	<i>P. aeruginosa</i>	1xb3A	FFCTFPGHSALMKGT
Plastocianina	<i>P. laminosum</i>	2q5bA	YTYCAPHRGAGMVGKIT
Plastocianina	<i>P. laminosum</i>	3cvbA	AGTYTYCAPHRGAGMVGKITV
Plastocianina	<i>P. nigra</i>	1plc	GEYSFYCSPHQAGMVGKVTV
Plastocianina	<i>P. nigra</i>	1jxga	YSFYCSPHQAGMVGKV
Pseudoazurina	<i>P. pantotrophus</i>	3erxA	VKCTPHFGMGMVGL
Azurina	<i>P. putida</i>	1nwpA	FFCSFPGHISMMKGT
Plastocianina	<i>S. latifolia</i>	1bypA	KGTYKFYCAPHAGAGMVGKVTV
Plastocianina	<i>S. oleracea</i>	1ag6A	KGTYKFYCSPHQAGMVGKVTV
Plastocianina	<i>U. pertusa</i>	1iuzA	GVYGVYCEPHAGAGMKMTITVQ

Anexo 3

Número de láminas beta	Amioganin	Azurin	Maviojanin	Nitrosocyanin	Basic blue protein	Plantacyanin	Pastrocyanin	Umecyanin	Auracyanin b	Rustiojanin	Cytochrome oxidase	Número de aminoácidos de cada lámina beta.
1	2	6	3	17	5	5	6	3	6	3	2	
2	2	5	5	14	7	5	5	2	5	3	4	
3	3	8	4	5	4	4	4	4	8	3	3	
4	6	4	3	8	3	3	3	4	3	8	3	
5	2	2	5	5	7	5	5	3	4	3	4	
6	4	7	6	5	7	6	5	4	8	2	5	
7	6	4	6	7	7	6	5	6	6	4	4	
8	2	7	6	5	7	6	6	7	7	8	4	
9	2			6			6			3	5	
10	7									2	6	
11	6									8	7	
12	6									6		
13										6		
Promedio de aminoácidos en láminas beta	4,00	5,38	4,57	8,00	5,71	4,86	5,00	4,13	5,88	4,54	4,45	
Número de aminoácidos de la proteína	105	129	103	112	96	91	105	105	139	154	166	