

UCH-FC
MAG-Microb
R 741
C. 1

PARTICIPACION DE LAS CISTEINA DESULFURASAS DE *Escherichia coli*
EN LA RESISTENCIA A TELURITO DE POTASIO



Tesis
entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Magíster en Ciencias Biológicas, Mención Microbiología

Facultad de Ciencias

por

Diana Marcela Rojas Gómez

Junio, 2004

Director de Tesis : Dr. Claudio Vásquez

FACULTAD DE CIENCIAS

UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE MAESTRIA

Se informa a la escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Maestría presentada por la candidata

DIANA MARCELA ROJAS GOMEZ

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la tesis como requisito para optar al grado de Magíster en Ciencias Biológicas con mención en Microbiología, en el examen de defensa de Tesis rendido el día 4 de junio de 2004.

Director de Tesis:

Dr. Claudio Vásquez



.....


Comisión de Evaluación de la Tesis:

Dr. Margarita Carú


.....

Dr. Rosalba Lagos


.....

AGRADECIMIENTOS

- Quiero agradecer al Servicio Alemán de Intercambio Académico (DAAD) por el apoyo económico brindado para la realización de esta tesis.
- Agradezco a mi director de tesis Claudio Vásquez, por su confianza y voluntad para dirigir mi trabajo.
- A todos mis compañeros del Laboratorio del Laboratorio de Biología Molecular, Facultad de Química y Biología, Universidad de Santiago de Chile por su compañía y colaboración.
- A mis amigos..... por su voto de confianza en mi.

INDICE DE MATERIAS

INDICE DE FIGURAS.....	v
INDICE DE TABLAS.....	vi
ABREVIATURAS.....	vii
RESUMEN.....	viii
ABSTRACT.....	ix
1. INTRODUCCION	1
2. HIPOTESIS	9
3. OBJETIVO GENERAL.....	9
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	9
5. MATERIALES Y MÉTODOS.....	10
5.1 Cepas bacterianas, plasmidios y condiciones de cultivo.....	10
5.2 Determinación de halos de inhibición del crecimiento.....	11
5.3 Características de las cepas y plasmidios de <i>E. coli</i> utilizados en esta Tesis.....	11
5.4 Extracción de DNA cromosomal.....	11
5.5 Extracción de DNA plasmidial.....	14
5.6 Partidores y condiciones de PCR.....	14
5.7 Digestión de DNA con enzimas de restricción	16
5.8 Ligación del DNA.....	16
5.9 Purificación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa	16
5.10 Electroforesis de DNA en geles de agarosa	17

5.11 Transformación de <i>E. coli</i>	17
5.12 Ensayo de complementación de <i>E. coli</i> mutantes en desulfurasas	18
5.13 Mutagénesis.....	18
5.14 Secuenciación de DNA.....	18
6. RESULTADOS.....	19
6.1 Clonamiento de los tres genes de desulfurasas de <i>E. coli</i>	19
6.2 Construcción de cepas de <i>E. coli</i> mutantes en los genes de desulfurasas	20
6.3 Determinación de halos de inhibición del crecimiento en presencia de K_2TeO_3	29
6.4 Determinación de requerimientos nutricionales	38
7. DISCUSION	40
8. CONCLUSIONES	46
9. REFERENCIAS.....	47

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de desulfuración de la cisteína.....	5
Figura 2. Organización de los “clusters” génicos <i>iscS</i> , <i>suf</i> y <i>csdA-ygdKL</i> de <i>E. coli</i>	7
Figura 3. Interacciones entre proteínas <i>Isc</i>	7
Figura 4. Clonamiento de las cisteína desulfurasas de <i>E. coli</i> en el vector de expresión pBAD.....	21
Figura 5. Comprobación del clonamiento de los genes <i>csdA</i> , <i>csdB</i> e <i>iscS</i> de <i>E. coli</i> en el vector pBAD.....	22
Figura 6. Estrategia para la delección génica según el método descrito por Datsenko y Wanner (2000).....	24
Figura 7. Productos de PCR en cepas de <i>E. coli</i> mutantes por reemplazo en los genes de desulfurasas.....	26
Figura 8. Comprobación de las mutaciones por reemplazo en los genes de desulfurasas.....	27
Figura 9. Curva de crecimiento de las cepas de <i>E. coli</i> que portan mutaciones en las desulfurasas.....	28
Figura 10. Tiempo generacional (tg) de las cepas de <i>E. coli</i> mutantes en los genes de desulfurasas.....	28
Figura 11. Halos de inhibición del crecimiento en cepas mutantes complementadas con el gen <i>csdA</i>	31
Figura 12. Halos de inhibición del crecimiento en cepas mutantes complementadas con el gen <i>csdB</i>	32

Figura 13. Halos de inhibición del crecimiento en cepas mutantes complementadas con el gen <i>iscS</i>	33
Figura 14. Halos de inhibición del crecimiento de las diferentes cepas de <i>E. coli</i> en presencia de K_2TeO_3 en condiciones anaeróbicas.....	36
Figura 15. Halos de inhibición del crecimiento en presencia de K_2TeO_3	37

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Plasmidios de <i>E. coli</i> empleados y construídos en esta Tesis.....	12
Tabla 2. Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas y generadas en esta Tesis.....	13
Tabla 3. Secuencia nucleotídica de los partidores utilizados en esta Tesis para la amplificación de DNA mediante PCR.....	15
Tabla 4. Halos de inhibición del crecimiento de las diferentes cepas de <i>E. coli</i> en presencia de K_2TeO_3 en condiciones aeróbicas.....	30
Tabla 5. Halos de inhibición del crecimiento de las diferentes cepas de <i>E. coli</i> en presencia de K_2TeO_3 en condiciones anaeróbicas.....	35
Tabla 6. Requerimiento de tiamina y ácido nicotínico por parte de las diferentes cepas de <i>E. coli</i> estudiadas en esta Tesis.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA	ácido desoxiribunucleico
kb	kilobases
mA	miliamperios
PAGE	electroforesis en geles de poliacrilamida
pb	pares de bases
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
TAE	tris, ácido acético, etilendiaminotetraacético
SDS	dodecilsulfato de sodio
V	voltios
Ω	ohm
°C	grados Celsius

RESUMEN

La falta de similitud entre los diferentes determinantes de resistencia a telurito de potasio analizados a la fecha ha dificultado la postulación de un mecanismo de resistencia a este tóxico. La idea más actualizada es que ésta sería multifuncional y que diferentes rutas metabólicas podrían contribuir al mecanismo de resistencia.

Resultados recientes del laboratorio han sugerido la participación del gen *iscS* de *Geobacillus stearothermophilus* V en la resistencia de *Escherichia coli* a K_2TeO_3 . Dado que una mutante de *E. coli* K12 con una inserción en el gen *iscS* crece, el objetivo de esta Tesis fue identificar cual de las otras dos cisteína desulfurasas presentes en esta bacteria, CSD y CsdB, puede(n) reemplazar al producto del gen *iscS* en el fenómeno. Así, se construyó mutantes de *E. coli* en los genes de las desulfurasas CSD, CsdB e *iscS* y se clonó sus genes estructurales en un vector de expresión. Se determinó la resistencia a K_2TeO_3 de las cepas mutadas y complementadas con los genes recombinantes. Los resultados obtenidos sugieren fuertemente que CsdB es la proteína que está involucrada, además de *iscS*, en la resistencia basal de *E. coli* a K_2TeO_3 . CsdB es a su vez capaz de complementar defectos en la síntesis de ácido nicotínico en cepas *iscS*⁻ y *csdB*⁻.

ABSTRACT

No universal bacterial potassium tellurite resistance mechanism has been proposed to date and it seems to involve diverse biochemical mechanisms.

Work previously carried out in our laboratory has shown that the product of the *iscS* gene from *Geobacillus stearothermophilus* V, a cysteine desulfurase, confers tellurite resistance in *Escherichia coli* K-12. Mutants in *iscS* are hypersensitive to tellurite and grow poorly even in rich media. Since *E. coli* has three cysteine desulfurases, *IscS*, *CsdB* and *CSD*, we examined the sensitivity to tellurite in *E. coli* mutant cells in these three genes and in strains which were complemented with the homologous and/or paralog genes. It was found that the expression of the *csdB* gene mediates basal tellurite resistance in *E. coli* and therefore behaves as an alternative pathway to *IscS*. *CsdB* complements also the auxotrophic requirements of *iscS*⁻ and *csdB*⁻ *E. coli* for nicotinic acid.

1. INTRODUCCIÓN

Los metales pesados se han convertido en un tema de actualidad tanto en aspectos ambientales como de salud pública. Ciertos metales y metaloides (o algunos de sus derivados oxidados) son de interés biológico por su toxicidad como por ejemplo Ag^+ , AsO_2^{2-} , AsO_4^{2-} , Cd^{2+} , Co^{2+} , CrO_4^{2-} , Cu^{2+} , Hg^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} , Sb^{3+} , SeO_3^{2-} , TeO_3^{2-} , TeO_4^{2-} y Zn^{2+} (Beveridge y cols., 1997; Westenberg y Guerinot, 1997; Silver, 1998; Taylor, 1999).

El objeto de este trabajo se enmarcó en el interés del laboratorio por telurito de potasio, compuesto que tiene una largo historial como agente antimicrobiano y que también ha sido utilizado en procedimientos microbiológicos como un agente de selección para el aislamiento de bacterias como *Corynebacterium diphtheriae*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* y *Shigella spp.*, entre otras.

Aunque el telurio es un elemento escaso en la naturaleza, su uso creciente en la industria metalúrgica, química y electrónica lo ha convertido en un contaminante ambiental de importancia y puede encontrarse en altas concentraciones cerca de sitios de descarga de desechos (Taylor, 1999).

El telurio (Te) se encuentra en forma natural como teluritos y teluratos (TeO_3^{2-} y TeO_4^{2-}) que son tóxicos para la mayoría de los microorganismos. En su estado elemental, Te^0 , este elemento aparentemente no es tóxico.

Se ha sugerido que la toxicidad del telurito deriva de su fuerte carácter oxidante, lo que podría interferir en muchos aspectos metabólicos de la célula.

Según Tomás y Kay (1986), el telurito de potasio (K_2TeO_3) entra a la célula por medio de un transportador de fosfato y de acuerdo a Avazéri y cols. (1997) ésta sal sería reducida parcialmente en la cara citoplasmática de la membrana interna de la célula por la nitrato reductasa, enzima que sería responsable de la resistencia basal de *E. coli* a K_2TeO_3 (Avazéri y cols., 1997).

Actividades reductoras de telurito han sido también comunicadas por otros autores (Chiong y cols., 1988; O'Gara y cols., 1997; Moscoso y cols., 1998). Por otro lado, Trutko y cols. (1998) también han demostrado que la citocromo oxidasa terminal de bacterias Gram negativas posee actividad telurito reductasa.

Si la concentración de K_2TeO_3 es lo suficientemente alta como para superar la primera línea de defensa representada por la nitrato reductasa, el glutatión y/u otros tioles reducidos del citosol podrían participar en la reducción de K_2TeO_3 generando telurio metálico (Te^0) y como producto lateral, radicales superóxido (O_2^-) (Taylor, 1999; Tantaleán y cols., 2003).

En organismos aeróbicos estos radicales O_2^- se generan normalmente durante la respiración por autooxidación de componentes de la cadena respiratoria. Estos reactivos radicales son rápidamente convertidos a O_2 y H_2O_2 por superóxido dismutasas (SODs) (Gardner y Fridovich, 1991). Cuando los niveles de O_2^- superan ciertos límites, éstos resultan extremadamente tóxicos para las células por génesis de daño oxidativo.

Uno de los blancos de los radicales superóxido son centros [Fe-S] que forman parte de enzimas y proteínas esenciales para el metabolismo celular.

Ejemplos de ello son la fumarasa (Liochev y Fridovich, 1993), aconitasa (Gardner y Fridovich, 1991) y algunas dihidroxiácido deshidratasas (Kuo y cols., 1987), entre otras. La oxidación de los centros [Fe-S] presentes en estas proteínas conduce a su desintegración y con ello a una pérdida concomitante de la actividad enzimática (Flint y cols., 1993).

Adicionalmente la oxidación de estos centros libera hierro, el cual en presencia de H_2O_2 puede catalizar la reacción de Fenton generando radicales hidroxilo (OH^\cdot) que a su vez dañan indiscriminadamente otros componentes celulares (Imlay y Linn, 1988). Estudios genéticos y de secuenciación de genomas de diferentes bacterias han permitido identificar por lo menos cinco tipos de determinantes de resistencia a K_2TeO_3 (Te^R) diferentes, los que se encuentran codificados tanto en plasmidios como en el cromosoma bacteriano. Sin embargo, no se ha encontrado relación entre unos y otros a nivel de sus secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos (Taylor, 1999).

Entre los primeros se encuentra el operón *ter*, presente en los plasmidios pMER610 de *Alcaligenes* (Jobling y Ritchie, 1987) y R478 de *Serratia marcescens* (Whelan y Colleran, 1992). También a esta clase pertenecen el operón *kilAtelAB* del plasmidio RK2, presente en un amplio rango de huéspedes (Bradley, 1985), y otros determinantes presentes en los plasmidios pHH1508a de *Klebsiella aerogenes* (Bradley y cols., 1982; Yan y Taylor, 1987; Walter y cols., 1991) y pTE53 de *E. coli* (Burian y cols., 1998).

Ejemplos de determinantes Te^R codificados en el cromosoma bacteriano incluyen el operón *tehAtehB* de *E. coli* (Walter y Taylor, 1992), el gen *tmp* de

Pseudomonas syringae (Cournoyer y cols., 1998), los genes *trg* y *trgB* de *Rhodobacter sphaeroides* (O'Gara y cols., 1997), el gen *tehB* de *S. pneumoniae* (Liu y Taylor, 1999) y otros genes de *Bacillus subtilis* (Kumano y cols., 1997).

La falta de similitud entre los diferentes determinantes Te^r ha dificultado la postulación de un mecanismo universal de resistencia, por lo que se han propuesto mecanismos iniciales que tratan de explicar el fenómeno de resistencia bacteriana a K_2TeO_3 . Estos incluyen una reducción del ingreso del ión a la célula, un eflujo aumentado de éste desde el interior, una volatilización de formas alquiladas de Te y finalmente la reducción del tóxico (Taylor, 1999). Ninguno de ellos cuenta sin embargo con evidencia experimental suficiente que lo sinde como único responsable de la resistencia observada.

Recientemente ha prosperado más bien la hipótesis que la resistencia bacteriana a K_2TeO_3 sería de carácter multifuncional y que diferentes rutas metabólicas podrían contribuir directa o indirectamente con sus sustratos y/o sus productos al mecanismo de resistencia. En apoyo a esta hipótesis, estudios con mutantes metabólicas han sugerido que enzimas del metabolismo primario como DsbA y DsbB (responsables de la formación de uniones disulfuro), nitrato reductasa, superóxido dismutasa, glutatión reductasa, tioredoxina reductasa, cisteína sintetasa o algunos de sus metabolitos (glutatión, glutaredoxina, tioredoxina, cisteína, entre otros) podrían estar involucrados en la resistencia a este tóxico (Avazéri y cols., 1997; Cournoyer y cols., 1998; Turner y cols., 1999; Vásquez y cols., 2001).

Resultados recientes del laboratorio sugieren la participación del gen *iscS* de *Geobacillus stearothermophilus* V que codifica la desulfurasa IscS en la resistencia a K_2TeO_3 exhibida por *E. coli* cuando este gen es expresado en este huésped heterólogo (Tantaleán y cols., 2003).

En este sentido, varias sulfotransferasas o desulfurasas -denominadas NifS o IscS según provengan o no de organismos fijadores de nitrógeno, respectivamente- participan en el ensamble y reparación de centros [Fe-S]. Estas enzimas catalizan la desulfuración del aminoácido L-cisteína para formar L-alanina y azufre elemental (S^0) el que es transferido a un residuo de cisteína del sitio activo formando un enlace persulfuro. Luego de su reducción este S^0 es liberado e incorporado -con la participación de otras proteínas intermediarias- a un centro [Fe-S] (Zheng y cols., 1993) (Fig. 1).

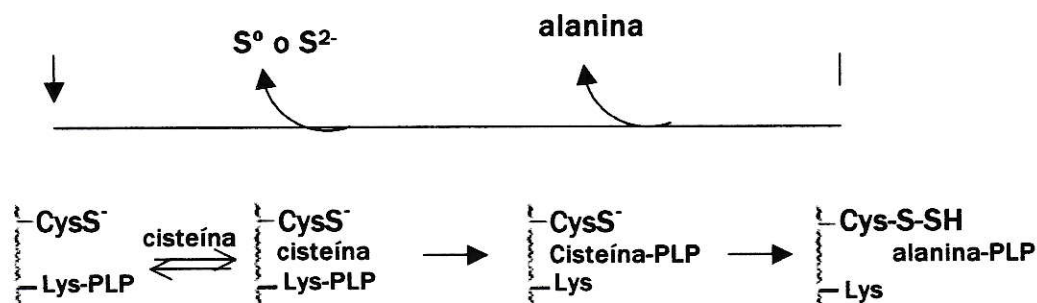


Figura 1. Mecanismo de desulfuración de la cisteína. El aminoácido sustrato forma una base de Schiff con el cofactor piridoxal fosfato (PLP) y su átomo de azufre es selectivamente transferido a un residuo nucleofílico (cisteinato) en la proteína generando un enlace persulfuro (Loiseau y cols., 2003).

El análisis del genoma de *E. coli* K-12 (www.tigr.org) reveló la presencia de tres parálogos de cisteína-desulfurasas: IscS, codificada por el gen *iscS* (a 57.3 min); CsdB, codificada por el gen *csdB* o *sufS* (a 37.9 min) y CSD (cisteína sulfinato desulfinasas), codificada por el gen *csdA* (a 63.4 min). CsdB y CSD presentan un 45% de identidad en sus secuencias de aminoácidos en tanto que IscS posee aproximadamente 20% y 22% de identidad en su secuencia de aminoácidos con respecto a CsdB y CSD, respectivamente. Todas estas proteínas presentan actividad cisteína desulfurasa y se ha demostrado que los aminoácidos Cys328 de IscS, Cys364 de CsdB y Cys358 de CSD funcionan como el residuo catalítico (Kurihara y cols., 2003). Estas enzimas han sido purificadas, caracterizadas y aparte de la reacción de desulfuración, todas catalizan la deselenación de selenocisteína con una eficiencia variable (Mihara y cols. 1999). Estas proteínas también estarían involucradas en la formación de centros [Fe-S] de al menos 12 proteínas sustrato diferentes (Mihara y cols., 1997).

Por otro lado los genes que especifican componentes esenciales para la maduración de centros [Fe-S] están organizados en "clusters", los que incluyen los genes de desulfurasas (Fig. 2).

La función de las proteínas presentes en estos "clusters" son interdependientes: la delección de un gen ocasiona la pérdida de función de las proteínas restantes (Tokumoto y Takahashi, 2001). Estas proteínas pueden asociarse entre sí formando complejos diméricos y triméricos (Fig. 3).

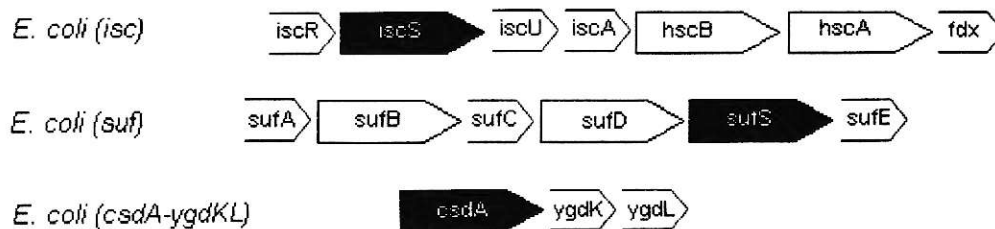


Figura 2. Organización de los “clusters” génicos *iscS*, *suf* y *csdA-ygdKL* de *E. coli* (Mihara y cols., 2002).

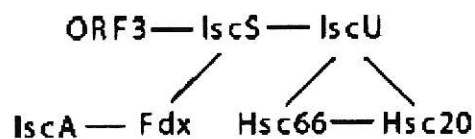


Figura 3. Interacciones entre proteínas Isc. Las líneas indican interacciones demostradas *in vitro*. (Mihara y cols., 2002).

La relevancia metabólica de las desulfurasas de *E. coli* ha sido demostrada a través de estudios genéticos y/o bioquímicos. Un ejemplo de ello lo constituye la enzima *IscS*, que se encuentra involucrada en la biosíntesis de tiamina y ácido nicotínico (Lauhon y Kambampati, 2000), en la modificación de nucleósidos de uridina en el tRNA (Lauhon, 2002), en el paso final de la biosíntesis de biotina y de ácido lipoico y en la movilización de selenio *in vivo* (Mihara y cols., 2002). Los requerimientos de ácido nicotínico, isoleucina y valina por parte de mutantes *iscS⁻* se deben más probablemente a la deficiencia

en proteínas con centros [Fe-S] (Schwartz y cols., 2000; Mihara y cols., 2002). Las tres desulfurasas de *E. coli* pueden además movilizar azufre desde cisteína para la biosíntesis de molibdopterina *in vitro*, siendo CSD la más eficiente en esta reacción (Mihara y cols., 2000).

Con estos antecedentes es posible suponer que la recuperación de centros [Fe-S] mediante la acción de desulfurasas de algunas enzimas y proteínas dañadas podría también representar un mecanismo de resistencia a K_2TeO_3 . En este sentido, trabajos anteriores realizados en nuestro laboratorio demostraron que una mutante de *E. coli* K12 con una inserción en el gen *iscS* (*iscS*⁻) crece más lento y es hipersensible a telurito de potasio con respecto a la cepa silvestre (Tantaleán y cols., 2003).

Dado lo anteriormente expuesto, la hipótesis del presente trabajo de Tesis fue: “la sobreexpresión de una de las otras dos cisteína desulfurasas de *E. coli* (CSD ó CsdB) (o las dos) puede revertir el fenotipo de sensibilidad a telurito de potasio en mutantes *iscS*⁻ recuperando de este modo el nivel basal de resistencia a K_2TeO_3 exhibido por la cepa silvestre”.

2. HIPOTESIS

Las desulfurasas CSD, CsdB e IscS de *E. coli* participan en la resistencia basal de esta bacteria a telurito de potasio.

3. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general de esta Tesis se enmarcó en la identificación de cual(es) cisteína desulfurasa(s) es(son) capaz(ces) de complementar la mutación *iscS*⁻ y recuperar el nivel de resistencia basal de *E. coli* a K₂TeO₃.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Para concretar el objetivo general fue necesario satisfacer los siguientes objetivos específicos:

1.- Construir cepas de *E. coli* K12 que contuviesen interrupciones en los genes *csdA*, *csdB* e *iscS* y determinar el nivel de resistencia y/o sensibilidad de estas células mutadas a K₂TeO₃.

2.- Clonar los genes *csdA*, *csdB* e *iscS* de *E. coli* en un vector de expresión y determinar el nivel de resistencia y/o sensibilidad a K₂TeO₃ de las células mutadas obtenidas en el objetivo 1 cuando son transformadas con los genes homólogos y/o parálogos clonados.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cepas bacterianas, plasmidios y condiciones de cultivo.

La cepa de *E. coli* DH5 α [*endA1 recA1 relA1 gyrA96 hsdR17(r_k⁻, m_k⁺) phoA supE44 thi-1 Δ (*lacZYA-argF*)U169 Φ 80 Δ (*lacZ*)M15 F-] fue comprada a Promega®, en tanto que las cepas PK6311[Km^R (Δ *iscS*::*Kan*^R) Tet^R (*zff-208*::Tn10)] y su isógena parental RZ4500 (MG1655/*lacZ* Δ 145) fueron cedidas gentilmente por la Dra. Patricia Kiley (University of Wisconsin Medical School, Wisconsin, USA).*

El crecimiento de estas cepas y sus derivadas se realizó en medio LB con la siguiente composición (g/l): triptona, 10, extracto de levadura, 5, NaCl, 5, pH 7,0 ajustado con NaOH (Sambrook y cols., 1989). Las incubaciones se realizaron a 37°C con agitación. Para el crecimiento en medio sólido se agregó agar (DIFCO) a una concentración final de 2% (p/v). Para el crecimiento en presencia de K₂TeO₃ se utilizó un volumen apropiado de una solución stock estéril de K₂TeO₃ (1M) hasta alcanzar la concentración deseada. Cuando fue necesario el medio LB se suplementó con isopropil tio- β -D-galactopiranosido (IPTG) a una concentración final de 1mM, ampicilina (100 μ g/ml), tetraciclina (10 μ g/ml), kanamicina (40 μ g/ml) o cloranfenicol (50 μ g/ml). Las soluciones stock de antibióticos se prepararon a una concentración de 10 mg/ml y se mantuvieron a -20°C.

Los ensayos de auxotrofia se realizaron en microplacas conteniendo medio mínimo M9 (Na₂HPO₄.7H₂O, 50 mM, KH₂PO₄, 22 mM, NaCl, 8,5 mM,

NH₄Cl, 18 mM) suplementado con glucosa (0,4%), MgSO₄ (2 mM), CaCl₂ (0,1 mM), leucina (0,01 %) y según el caso con tiamina (2 µg/ml) y/o ácido nicotínico (12,5 µg/ml).

5.2 Determinación de halos de inhibición del crecimiento

El halo de inhibición del crecimiento en presencia de K₂TeO₃ de una cepa particular se determinó depositando 25 µg K₂TeO₃ en un disco estéril de papel filtro colocado sobre el agar recientemente inoculado en una placa de Petri. Las placas conteniendo medio LB y los aditivos necesarios fueron incubadas durante toda la noche a 37°C. Los diámetros de los halos de inhibición fueron determinados en tres puntos diferentes y los ensayos se realizaron por duplicado.

5.3 Características de las cepas y plasmidios de *E. coli* utilizados en esta Tesis.

Las características más relevantes de los plasmidios y de las cepas de *E. coli* utilizadas y generadas en esta Tesis se indican en las Tablas 1 y 2, respectivamente.

5.4 Extracción de DNA cromosomal

Las células de *E. coli* fueron crecidas en 5 ml de medio LB hasta una DO₆₀₀ de 0.8. El cultivo se centrifugó a 4.500 x g durante 10 min.

Tabla 1

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

	Características relevantes	Referencia
pBAD	Vector de expresión, lleva el promotor regulable del operón ara, 4.1 kb, Amp ^R .	Promega
pBAD/ <i>csdA</i>	Derivado de pBAD, lleva inserto el gen <i>csdA</i> , Amp ^R .	Esta Tesis
pBAD/ <i>csdB</i>	Derivado de pBAD, lleva inserto el gen <i>csdB</i> , Amp ^R .	Esta Tesis
pBAD/ <i>iscS</i>	Derivado de pBAD, lleva inserto el gen <i>iscS</i> , Amp ^R .	Esta Tesis

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

Cepa	Características relevantes	Referencia
DH5 α	Huésped general.	Promega
DH5 α /pBAD	DH5 α que porta el plasmidio pBAD, Amp ^R .	Esta Tesis
DH5 α /pBAD/ <i>csdA</i>	DH5 α que porta el plasmidio pBAD/ <i>csdA</i> , Amp ^R .	Esta Tesis
DH5 α /pBAD/ <i>csdB</i>	DH5 α que porta el plasmidio pBAD/ <i>csdB</i> , Amp ^R .	Esta Tesis
DH5 α /pBAD/ <i>iscS</i>	DH5 α que porta el plasmidio pBAD/ <i>iscS</i> , Amp ^R .	Esta Tesis
DH5 α <i>csdA</i> ::Kn	DH5 α que lleva inserto un cassette de resistencia a Kan en el gen <i>csdA</i>	Esta Tesis
DH5 α <i>csdB</i> ::Kn	DH5 α que lleva inserto un cassette de resistencia a Kan en el gen <i>csdB</i>	Esta Tesis
DH5 α <i>iscS</i> ::Kn	DH5 α que lleva inserto un cassette de resistencia a Kan en el gen <i>iscS</i>	Esta Tesis



Posteriormente el DNA cromosomal se extrajo de acuerdo al procedimiento descrito por Sambrook y cols. (1989).

5.5 Extracción de DNA plasmidial

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

5.6 Partidores y condiciones de PCR

Las condiciones de PCR fueron las siguientes: DNA templado, 4 ng, dNTPs, 200 μ M, partidores directos y reversos, 1 μ M de cada uno, tampón de PCR, 10 μ l y 2,5 unidades de Taq polimerasa, ambos de Perkin-Elmer, USA. Luego de desnaturar a 94°C por 5 min la amplificación se llevó a cabo por 25 ciclos a 94°C por 30 seg, "annealing" del partidor a 45°C por 30 seg y extensión a 72°C por 1 min. Una incubación final a 72°C por 10 min permitió una completa extensión de los fragmentos. Los oligonucleótidos utilizados en esta Tesis están referidos en la Tabla 3.

Tabla 3

**Secuencia nucleotídica de los partidores utilizados en esta Tesis para la
amplificación de DNA mediante PCR**

PARTIDOR	ORIENTACIÓN	SECUENCIA 5' → 3'	Amplificado
P1	Directa	GGAGTACCATGAACGTTTTTAATCCCGCGCAGTTTCGCGC	Wanner <i>csdA</i>
P2	Reversa	GTTTGTCCATTAATCCACCAATAATTCCAGCGCGCGGTCAA	Wanner <i>csdA</i>
P3	Directa	GGTGCAAGATGATTTTTTCCGTCGACAAAGTGCGGGCCGA	Wanner <i>csdB</i>
P4	Reversa	CTCCCTGTTATCCCAGCAAACGGTGAATACGTTGCAGGCC	Wanner <i>csdB</i>
P5	Directa	ATTGAGTGATGTACGGAGTTTATAGAGCAATGATGAAATTACC	Wanner <i>iscS</i>
P6	Reversa	GATACCGATTAATGATGAGCCCATTCGATGCTGTTTCAGAT	Wanner <i>iscS</i>
P7	Directa	AGCCGAGGAGTACCCCATGGATGAACGTTTTTAATCCCGCGCAGTT	ORF <i>csdA</i>
P8	Reversa	GAATTGCGGGTTTGGAAATTCTCATTAAATCCACCAATAATTCCAGCG	ORF <i>csdA</i>
P9	Directa	CCAGGAGGTGCAAGCCATGGATGATTTTTTCCGTCGACAAAGTGCG	ORF <i>csdB</i>
P10	Reversa	GCCATAGTGCCCTCCGAATTCCTGTTATCCCAGCAAACGGTGAATAC	ORF <i>csdB</i>
P11	Directa	CCTGATTCCGATACCCATGGCGATTAATGATGAGCCCATTCGATGC	ORF <i>iscS</i>
P12	Reversa	CAAGGAACCAGGCTGAATTCGTGATGTACGGAGTTTATAGAGCAAT	ORF <i>iscS</i>

5.7 Digestión de DNA con enzimas de restricción

Las digestiones de DNA con las enzimas *EcoRI* y *NcoI* se realizaron empleando los tampones, temperatura y el tiempo recomendados por el fabricante (New England Biolabs, USA). Para 1 µg de DNA se empleó 10 U de enzima en un volumen final de 20 µl. La verificación de la digestión y la resolución de los fragmentos se realizó por electroforesis en geles de agarosa.

5.8 Ligación del DNA

La ligación de segmentos de DNA a vectores de clonamiento y/o expresión se realizó en un volumen final de 20 µl que contuvo 5 µl de fragmento amplificado (50 ng), 1 µl de solución de plasmidio (10 ng), 1 µl de DNA ligasa de fago T4 (3 U/µl) y 2 µl de tampón de ligación 10X, ambos de New England Biolabs, USA. La mezcla de reacción se incubó a 15°C toda la noche. Se utilizó un volumen de 3 µl de reacción de ligación para transformar 50 µl de células competentes de la cepa de *E. coli* DH5 α .

5.9 Purificación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa

Para recuperar fragmentos amplificados de DNA desde geles de agarosa se siguió el protocolo de QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen, Darmstadt, Alemania). Este método se basa en la escisión de la banda presente en el gel de agarosa y su solubilización en presencia de una resina que une el DNA, el que es posteriormente eluído con 50 µl de H₂O precalentada a 65°C.

5.10 Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Las preparaciones de DNA cromosomal o plasmidial se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa (1-1,5%, SeaKem, USA) preparada en tampón TAE. Las muestras de DNA se mezclaron con solución de carga (Tris-HCl 10 mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,25 %, SDS 0,1%, glicerol 30%). Como estándar de peso molecular se utilizó "1 kb ladder" de Invitrogen, USA. La tinción del gel se realizó por inmersión en una solución de bromuro de etidio durante 1 min. Las bandas se visualizaron bajo luz ultravioleta (320 nm) en un transiluminador Fotodyne, USA.

5.11 Transformación de *E. coli*

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

5.12 Ensayo de complementación de *E. coli* mutantes en desulfurasas

Para complementar las mutaciones en los genes de desulfurasas, las cepas mutantes fueron transformadas con los plasmidios conteniendo los genes homólogos y/o sus parálogos (Tabla 1). Las células transformantes fueron seleccionadas por la adquisición de resistencia a ampicilina, kanamicina y/o cloranfenicol, según el caso. Las características fenotípicas evaluadas en la cepa transformada fueron nivel de sensibilidad a K_2TeO_3 y requerimiento de tiamina y/o ácido nicotínico para crecer en medio mínimo M9.

5.13 Mutagénesis

La mutación de los genes *csdA*, *csdB* e *iscS* de *E. coli* se realizó por el procedimiento descrito por Datsenko y Wanner (2000).

5.14 Secuenciación de DNA

La secuenciación de DNA fue encargada a una empresa externa. Cuando fue necesario, la secuenciación de fragmentos de DNA menores se llevó a cabo en el laboratorio por el método de los dideoxinucleótidos utilizando principalmente el kit CircumVent DNA sequencing kit de New England BioLabs (USA) y α - ^{32}P dATP o α - ^{35}S dATP.

6. RESULTADOS

Para comprobar la hipótesis planteada en esta Tesis se diseñó una estrategia experimental con tres puntos principales a desarrollar: a) clonar los genes de las tres desulfurasas en vectores de expresión, b) construir cepas mutantes en los tres genes y c) complementar las cepas mutadas con los genes clonados en vectores de expresión. En estas cepas se evaluó la resistencia a telurito de potasio y requerimientos nutricionales.

6.1 Clonamiento de los tres genes de desulfurasas de *E. coli*

Para clonar los tres genes de desulfurasas de *E. coli* se analizó la secuencia del genoma de esta bacteria (disponible en www.tigr.org) y se diseñó partidores apropiados para amplificarlos por PCR (Tabla 3).

Se ensayó la inserción directa de los genes en el plasmidio de expresión pBAD, el cual contiene un promotor regulable por arabinosa. Para ello se diseñó partidores con sitios de corte *Nco*I en el extremo 5' y *Eco*RI en el 3'. Así, para el clonamiento en este vector el producto de PCR de los tres genes y el plasmidio pBAD fueron digeridos con estas dos enzimas para crear extremos cohesivos entre el plasmidio y los genes. Luego de ligar, el producto se utilizó para transformar células competentes de *E. coli* DH5 α y se seleccionó por resistencia a ampicilina.

Se obtuvo recombinantes en pBAD para los tres genes de desulfurasas. Un esquema de las características del plasmido pBAD y el tamaño esperado de uno de los plasmidios recombinantes obtenidos se muestran en la Fig. 4. La comprobación del clonamiento se llevó a cabo mediante digestión con la enzima de restricción *NcoI*, que lineariza el vector. Como los genes *csdA* e *iscS* no contienen sitios de reconocimiento para esta endonucleasa, el tamaño esperado del producto de digestión corresponde en ambos casos al vector más el inserto en cuestión (~ 5.680 pb). El gen *csdB* en cambio, contiene un sitio *NcoI* interno que genera fragmentos 791 y 403 pb. Por consiguiente, al digerir el plasmidio recombinante pBAD/*csdB* con *NcoI* se obtuvo dos fragmentos de ~400 y 5.200 pb (Fig. 5).

Otra forma de comprobar el clonamiento fue mediante PCR utilizando como molde el plasmidio purificado y como partidores los mismos utilizados para amplificar el ORF. En los tres casos se obtuvo el amplificado de 1.200 pb (Fig. 5, carriles 3,5 y 7).

6.2 Construcción de cepas de *E. coli* mutantes en los genes de desulfurasas

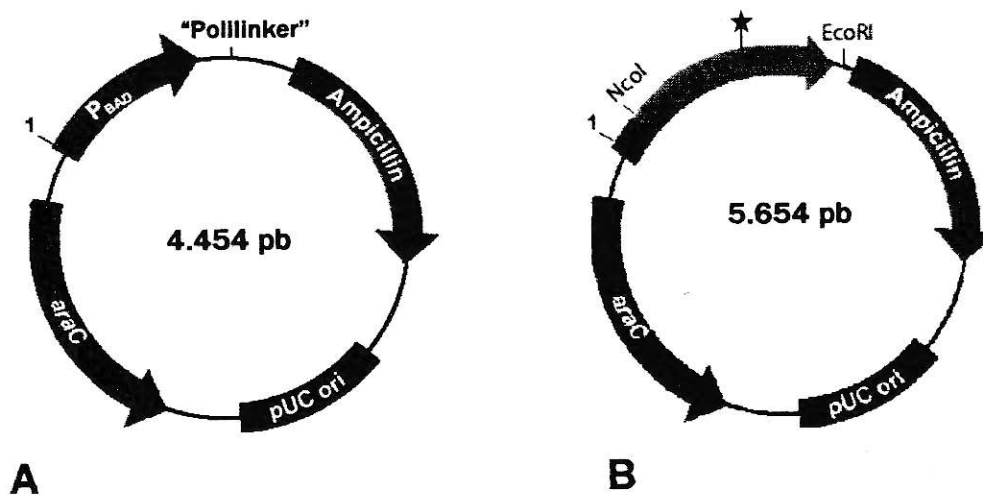
Estas mutantes fueron obtenidas por reemplazo de los genes *iscS*, *csdA* o *csdB* insertando un cassette de resistencia a kanamicina en el ORF de cada uno de estos genes de *E. coli* DH5 α . Con este fin se utilizó la metodología descrita por Datsenko y Wanner (2000), en la cual una secuencia cromosomal

Se obtuvo recombinantes en pBAD para los tres genes de desulfurasas. Un esquema de las características del plasmido pBAD y el tamaño esperado de uno de los plasmidios recombinantes obtenidos se muestran en la Fig. 4. La comprobación del clonamiento se llevó a cabo mediante digestión con la enzima de restricción *Nco*I, que lineariza el vector. Como los genes *csdA* e *iscS* no contienen sitios de reconocimiento para esta endonucleasa, el tamaño esperado del producto de digestión corresponde en ambos casos al vector más el inserto en cuestión (~ 5.680 pb). El gen *csdB* en cambio, contiene un sitio *Nco*I interno que genera fragmentos 803 y 403 pb. Por consiguiente, al digerir el plasmidio recombinante pBAD/*csdB* con *Nco*I se obtuvo dos fragmentos de ~800 y 4.800 pb (Fig. 5).

Otra forma de comprobar el clonamiento fue mediante PCR utilizando como molde el plasmidio purificado y como partidores los mismos utilizados para amplificar el ORF. En los tres casos se obtuvo el amplificado de 1.200 pb (Fig. 5, carriles 3,5 y 7).

6.2 Construcción de cepas de *E. coli* mutantes en los genes de desulfurasas

Estas mutantes fueron obtenidas por reemplazo de los genes *iscS*, *csdA* o *csdB* insertando un cassette de resistencia a kanamicina en el ORF de cada uno de estos genes de *E. coli* DH5 α . Con este fin se utilizó la metodología descrita por Datsenko y Wanner (2000), en la cual una secuencia cromosomal



★ Sitio de corte interno *NcoI* en el gen *csdB*, que se localiza a 803 pb del sitio de inicio de la traducción.

Figura 4. Clonamiento de las cisteína desulfurasas de *E. coli* en el vector de expresión pBAD. A, vector sin el inserto, B, pBAD conteniendo el gen de desulfurasa.

Algunas características de pBAD: región O₂ del promotor de arabinosa (bases 4-19); región O₁ del promotor de arabinosa (bases 161-182); sitio de unión a CAP (bases 203-216); región I₁ e I₂ de arabinosa (bases 213-251); promotor mínimo de arabinosa (bases 248-276); sitio de unión al ribosoma (bases 324-339).

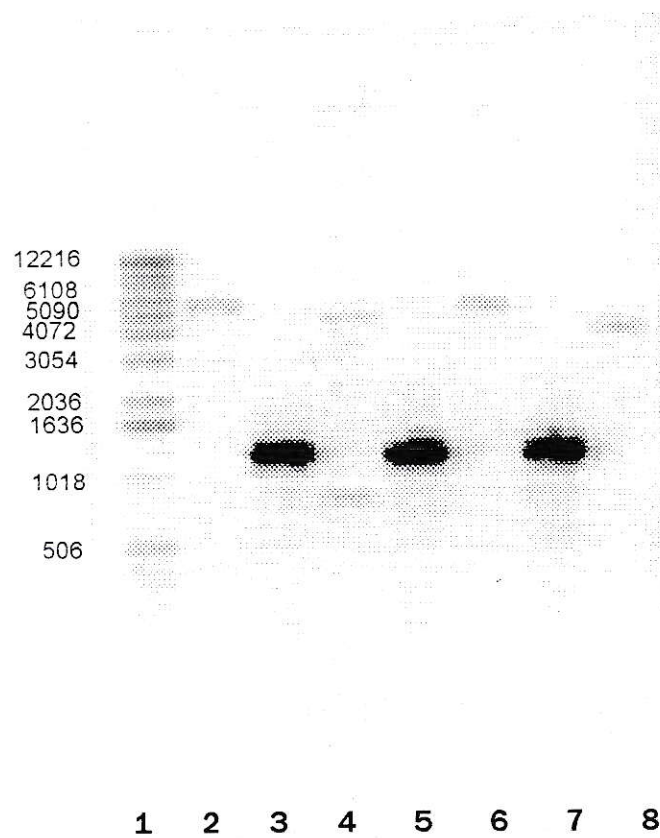
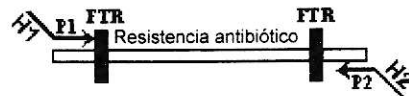


Figura 5. Comprobación del clonamiento de los genes *csdA*, *csdB* e *iscS* de *E. coli* en el vector pBAD. Los plasmidios recombinantes fueron digeridos con la enzima de restricción *NcoI* o utilizados como molde para amplificar el gen con su promotor. **1**, marcadores de peso molecular (1 kb "ladder", Invitrogen. N° catálogo: 15615-016). **2**, digestión de pBAD/*csdA*. **3**, PCR del gen *csdA*. **4**, digestión de pBAD/*csdB*. **5**, PCR del gen *csdB*. **6**, digestión del pBAD/*iscS*. **7**, PCR del gen *iscS*. **8**, digestión de pBAD.

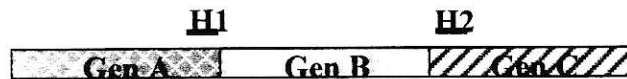
determinada es reemplazada por el gen de resistencia a un antibiótico particular. Este cassette de resistencia es generado por PCR utilizando partidores que contienen una región de homología de 36 nucleótidos con el gen a escindir.(H1 y H2). A su vez, este gen de resistencia contiene regiones invertidas de reconocimiento de la recombinasa FLP (FTR, Fig. 6).

Los productos de PCR fueron utilizados para transformar *E. coli* DH5 α que contiene el gen de la recombinasa Red del fago lambda clonado en un plasmidio de expresión. El sistema Red incluye los genes, γ , β y *exo* que codifican para las proteínas Gam, Bet y Exo, respectivamente. La proteína Gam es capaz de inhibir la actividad de exonucleasa V de RecBCD del hospedero. De esta forma, Bet y Exo tienen acceso a los extremos del DNA del gen de resistencia y promueven la recombinación en las regiones de homología (H1 y H2). Finalmente, la selección de transformantes se realiza por adquisición de resistencia al antibiótico particular. Un resumen de la estrategia utilizada y los respectivos partidores mutagénicos se muestran en la Fig. 6.y en la Tabla 3, respectivamente.

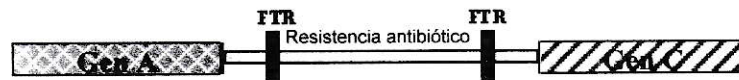
La inserción del cassette de resistencia a kanamicina en los genes de desulfurasas fue comprobado mediante PCR, utilizando DNA genómico de las cepas mutadas y partidores complementarios a secuencias río arriba y río abajo del gen. El tamaño esperado para los amplificados de las cepas mutadas es menor que para las cepas silvestres debido a que el cassette de resistencia a kanamicina es de menor tamaño que el ORF para las desulfurasas. Por lo tanto,



Paso 1: amplificación por PCR del gen de resistencia a kanamicina flanqueado por regiones invertidas de reconocimiento de la recombinasa FLP (FTR).



Paso 2: transformación en una cepa de *E. coli* expresando la recombinasa λ Red.



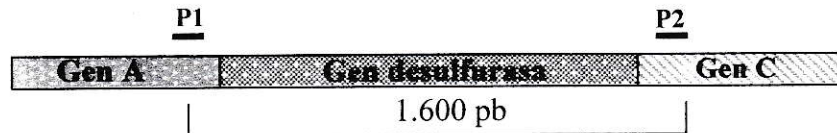
Paso 3: selección de transformantes por adquisición de resistencia al antibiótico.

Figura 6. Estrategia para la delección génica según el método descrito por Datsenko y Wanner (2000). H1 y H2 representan regiones de homología con el gen a escindir. P1 y P2 son sitios de “priming”.

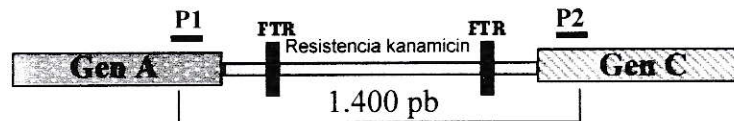
el tamaño esperado para los fragmentos amplificados a partir de las cepas mutantes es de 1.400 pb en lugar de los 1.600 pb para la silvestre. En la Fig. 7 se esquematiza la inserción del cassette de kanamicina en el sitio correspondiente al ORF de la desulfurasas. Se muestra además los tamaños de los fragmentos esperados al amplificar con partidores que flanquean el gen a mutar, tanto en la cepa silvestre como en la cepa mutada. Los resultados experimentales se muestran en la Fig. 8.

La observación que mutantes de *E. coli iscS*⁻ presentan retardo en el crecimiento (Tantaleán y cols., 2003) nos llevó a estudiar la curva de crecimiento en medio LB (en ausencia de telurito) y el tiempo generacional de todas las mutantes de desulfurasas obtenidas (Figs. 9 y 10). La mutante *csdA*⁻ no presentó un cambio drástico en la velocidad de crecimiento y el tiempo generacional fue similar a la cepa silvestre (105 y 101 min, respectivamente). Con respecto a la cepa *csdB*⁻ se observó un tiempo generacional ligeramente aumentado con respecto a la cepa silvestre (113 min). Sin embargo, al analizar la curva de crecimiento de esta cepa se pudo observar que existe un mayor tiempo de fase lag (Fig. 9).

Los resultados obtenidos con la cepa *iscS*⁻ fueron los esperados, ya que esta cepa presentó un retardo en la velocidad de crecimiento con un tiempo generacional de 154 min (Fig. 10).



A. Cepa silvestre



B. Cepa mutada por delección

Figura 7. Productos de PCR en cepas de *E. coli* mutantes por reemplazo en los genes de desulfurasas. A, producto de PCR (1.600 pb) en la cepa silvestre. B, producto de PCR (1.400 pb) en la cepa mutante por delección. P1 y P2 son los partidores utilizados para la amplificación.

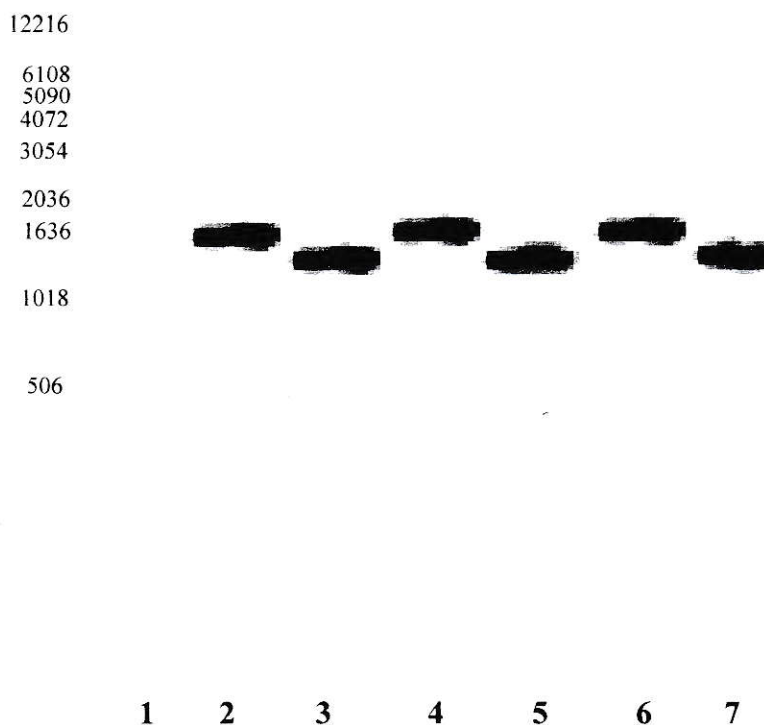


Figura 8. Comprobación de las mutaciones por reemplazo en los genes de desulfurasas. DNA cromosomal de las cepas mutantes fue utilizado como templado para amplificar por PCR los genes correspondientes utilizando los partidores específicos definidos para cada región promotora y terminadora (Tabla 3). **1**, marcadores de peso molecular (1 kb "ladder", Invitrogen). **2**, PCR del gen *csdA* en la cepa silvestre. **3**, PCR del gen *csdB* en la cepa *csdA*⁻. **4**, PCR del gen *csdB* en la cepa silvestre. **5**, PCR del gen *csdB* en la cepa *csdB*⁻. **6**, PCR del gen *iscS* en la cepa silvestre. **7**, PCR del gen *iscS* en la cepa *iscS*⁻.

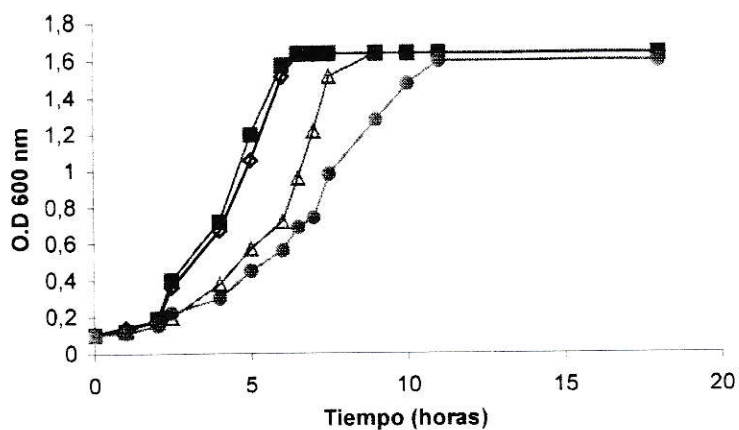


Figura 9. Curva de crecimiento de las cepas de *E. coli* que portan mutaciones en las desulfurasas. ■, *E. coli*/pBAD. ◇, *E. coli*/*csdA*::Kn. Δ, *E. coli*/*csdB*::Kn. ●, *E. coli*/*iscS*::Kn.

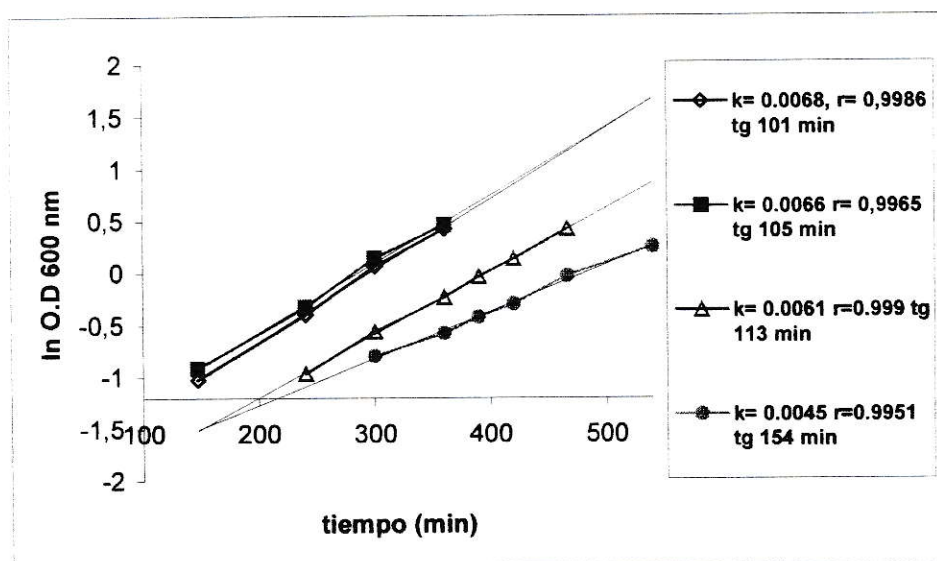


Figura 10. Cálculo del tiempo generacional (tg) de las cepas de *E. coli* mutantes en los genes de desulfurasas. ■, *E. coli*/pBAD. ◇, *E. coli*/*csdA*::Kn. Δ, *E. coli*/*csdB*::Kn. ●, *E. coli*/*iscS*::Kn. K, pendiente, r, coeficiente de linealidad.

6.3 Determinación de halos de inhibición del crecimiento en presencia de K_2TeO_3

Los halos de inhibición del crecimiento en presencia de K_2TeO_3 determinados en condiciones aeróbicas para las diferentes cepas estudiadas en esta Tesis se muestran en la Tabla 4. El halo de inhibición para cepas controles que contenían solamente el vector pBAD fue determinado en dos condiciones: sin inducción e inducidas con arabinosa 0.2%.

En las Figs. 11-13 se encuentra graficado el porcentaje del área del halo de inhibición con respecto a la cepa silvestre para cada gen de desulfurasa. En esta figuras se puede observar mejor la participación de cada desulfurasa en la resistencia basal a telurito de potasio en *E. coli*. En la Fig. 11 por ejemplo, se observa que la complementación con el gen *csdA* no mostró un efecto en la recuperación de la resistencia a telurito de potasio. El área del halo de inhibición fue similar entre las cepas mutantes transformadas con el gen *csdA* y la cepa mutada *csdA*⁻. Todas las cepas mutadas presentaron una mayor sensibilidad a telurito de potasio que la cepa silvestre.

Por el contrario, en las Figs. 12 y 13 se observa que la expresión de los genes *csdB* e *iscS* en las cepas mutadas carentes de ellos provocó una reversión parcial o total en la resistencia basal a K_2TeO_3 al disminuir el área del halo de inhibición en las cepas *csdB*⁻ e *iscS*⁻. Sin embargo, la expresión de los genes *csdB* o *iscS* en la cepa *csdA*⁻ no ocasionó efectos en la sensibilidad a K_2TeO_3 , ya que se observa un área de inhibición del crecimiento muy similar al de la cepa mutada (Tabla 4).

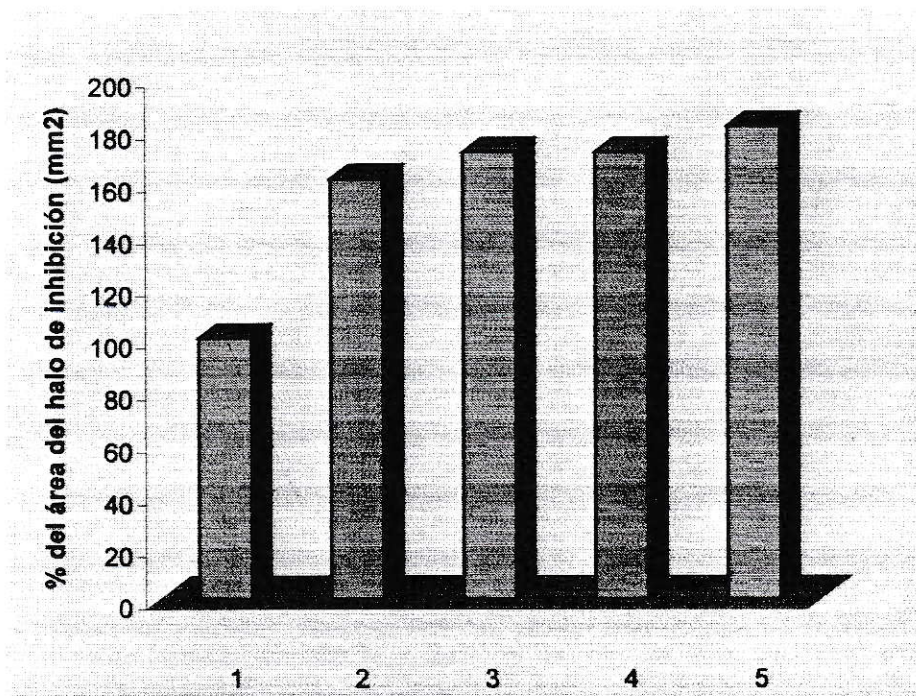


Figura 11. Área de los halos de inhibición del crecimiento en cepas mutantes complementadas con el gen *csdA*. 1, DH5 α 2, DH5 α (*csdA*::Kn). 3, DH5 α (*csdA*::Kn)/pBAD/*csdA*. 4, DH5 α (*csdB*::Kn)/pBAD/*csdA*. 5, DH5 α (*iscS*::Kn)/pBAD/*csdA*.

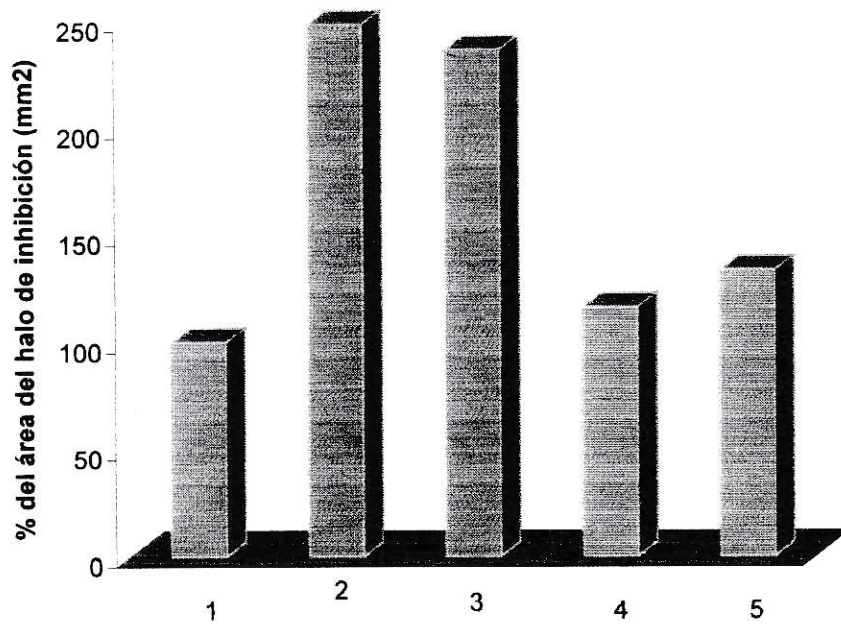


Figura 12. Área de los halos de inhibición del crecimiento en cepas mutantes complementadas con el gen *csdB*. 1, DH5α 2, DH5α(*csdB*::Kn). 3, DH5α(*csdA*::Kn)/pBAD/*csdB*. 4, DH5α(*csdB*::Kn)/pBAD/*csdB*. 5, DH5α(*iscS*::Kn)/pBAD/*csdB*.

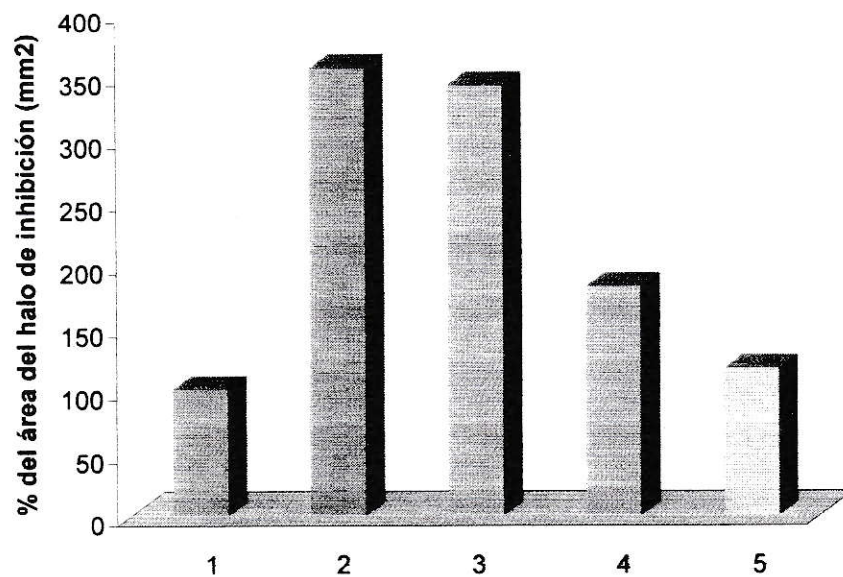


Figura 13. Área de los halos de inhibición del crecimiento en cepas mutantes complementadas con el gen *iscS*. 1, DH5α. 2, DH5α(*iscS*::Kn). 3, DH5α(*csdA*::Kn)/pBAD/*iscS*. 4, DH5α(*csdB*::Kn)/pBAD/*iscS*. 5, DH5α(*iscS*::Kn)/pBAD/*iscS*.

Como se había comentado en la Introducción, es posible que el K_2TeO_3 produzca daño oxidativo en la célula. Si esto es cierto, en condiciones anaeróbicas no se debiese observar efecto de este tóxico en las cepas mutadas ni en las cepas complementadas. Por consiguiente, para determinar la influencia del oxígeno en la resistencia a K_2TeO_3 se calculó el área de los halos de inhibición del crecimiento en condiciones anaeróbicas para cepas en las que se observó reversión del fenotipo de resistencia basal a K_2TeO_3 (mostrados en negrita en la Tabla 4).

Los resultados mostraron que no existe un efecto significativo en la reversión del fenotipo de resistencia basal a K_2TeO_3 dado que en todos los casos el área de inhibición observada para la cepa silvestre resultó muy similar con la de sus derivadas mutadas o con las cepas mutantes complementadas con los genes *csdB* o *iscS*. Por lo tanto, en condiciones anaeróbicas no existe un efecto de inhibición del crecimiento por parte del K_2TeO_3 y además no es posible complementar el fenotipo con la expresión de las diferentes desulfurasas en *E. coli*. Estos resultados se muestran en la Tabla 5 y en la Fig. 14.

En la Fig. 15 se muestra como ejemplo los halos de inhibición de crecimiento para las cepas silvestre, *csdB*⁻ y para ésta última complementada con el gen homólogo.

Tabla 5

Halos de inhibición del crecimiento de las diferentes cepas de *E. coli* en presencia de K_2TeO_3 en condiciones anaeróbicas

CEPA	Diámetro halo de inhibición (mm)	Área del halo de inhibición (mm ²)	% del área del halo de inhibición con respecto a la cepa silvestre (mm ²)
DH5 α /pBAD	24	452	100
DH5 α (<i>csdB::Kn</i>)	25	491	109
DH5 α (<i>csdB::Kn</i>)/pBAD/ <i>csdB</i> inducido con arabinosa	25	491	109
DH5 α (<i>csdB::Kn</i>)/pBAD/ <i>csdB</i> sin inducción	25	491	109
DH5 α (<i>csdB::Kn</i>)/pBAD/ <i>iscS</i> inducido con arabinosa	25	491	109
DH5 α (<i>csdB::Kn</i>)/pBAD/ <i>iscS</i> sin inducción	26	531	117
DH5 α (<i>iscS::Kn</i>)	26	531	117
DH5 α (<i>iscS::Kn</i>)/pBAD/ <i>csdB</i> inducido con arabinosa	26	531	117
DH5 α (<i>iscS::Kn</i>)/pBAD/ <i>csdB</i> sin inducción	25	491	109
DH5 α (<i>iscS::Kn</i>)/pBAD/ <i>iscS</i> inducido con arabinosa	26	531	117
DH5 α (<i>iscS::Kn</i>)/pBAD/ <i>iscS</i> sin inducción	26	531	117

Los valores representan la media de tres determinaciones independientes.

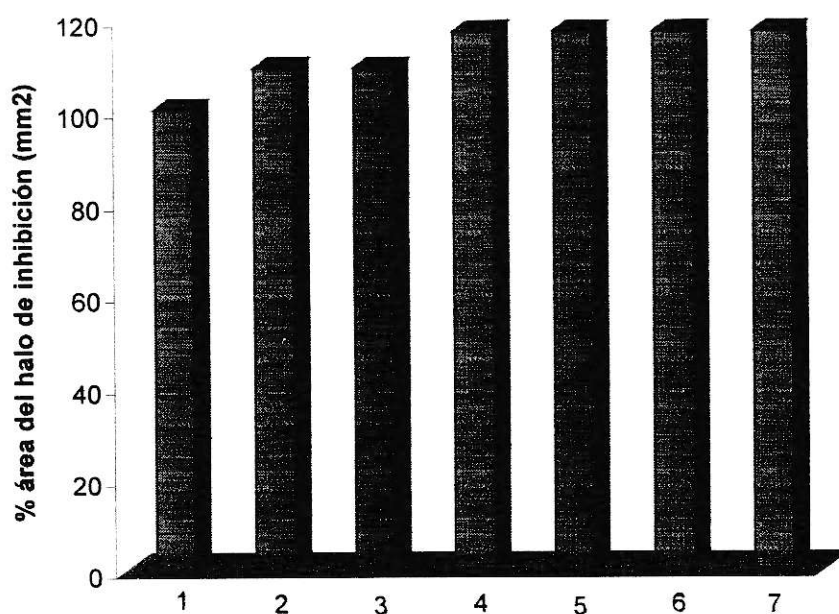


Figura 14. Área de los halos de inhibición del crecimiento de las diferentes cepas de *E. coli* en presencia de K_2TeO_3 en condiciones anaeróbicas. 1, DH5 α 2, DH5 α (*csdB::Kn*). 3, DH5 α (*csdB::Kn*)/pBAD/*csdB* .4, DH5 α (*csdB::Kn*)/pBAD/*iscS* 5, DH5 α (*iscS::Kn*). 6, DH5 α (*iscS::Kn*)/pBAD/*csdB* 7. DH5 α (*iscS::Kn*)/pBAD/*iscS*.

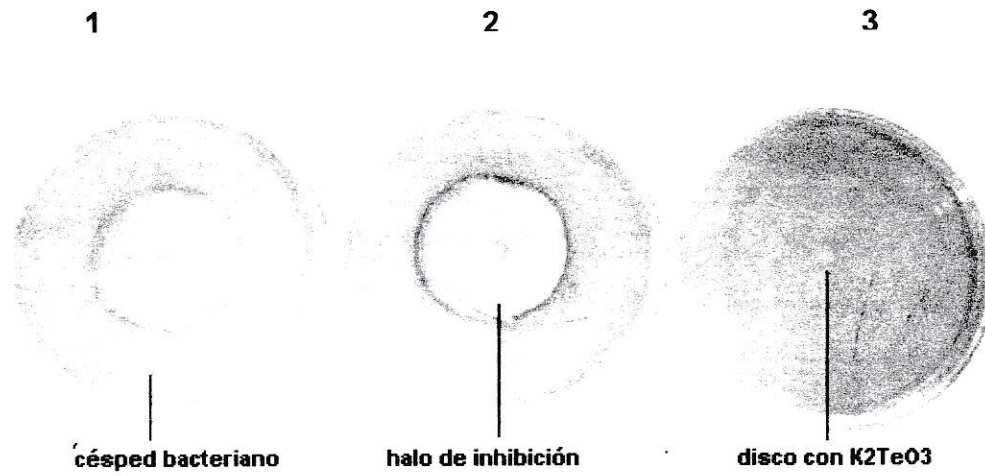


Figura 15. Halos de inhibición del crecimiento en presencia de K_2TeO_3 . 1, DH5 α . 2, DH5 α (*csdB::Kn*)/pBAD/*csdB*. 3, DH5 α (*csdB::Kn*)

6.4 Determinación de requerimientos nutricionales

Las desulfurasas están involucradas en diversos procesos metabólicos como la biosíntesis de las vitaminas ácido nicotínico y tiamina. Dados estos antecedentes, en esta Tesis se determinó la influencia de la expresión de las desulfurasas en las diferentes cepas mutantes con respecto a los requerimientos de tiamina y ácido nicotínico. De este modo, se determinó la capacidad de crecimiento de las diferentes cepas en medio mínimo en presencia o ausencia de estas dos vitaminas. Los resultados mostraron que la desulfurasa CSD no está involucrada en los requerimientos de ninguna de las dos vitaminas, es decir, no requiere la presencia de ninguna de las dos para crecer en medio mínimo. Tampoco la complementación con *csdA* eliminó la auxotrofia para ninguno de los dos nutrientes en las cepas mutantes. En cambio se demostró que CsdB está relacionada con los requerimientos de ácido nicotínico, ya que su expresión elimina la auxotrofia en cepas que requieren esta vitamina para el crecimiento, aparte del hecho que la cepa mutante *csdB* es incapaz de crecer en ausencia de ácido nicotínico (Tabla 6).

Finalmente, el gen *iscS* está involucrado en los requerimientos para ambas vitaminas dada su incapacidad de crecer en ausencia de cualquiera de ellas. Por otro lado, su expresión elimina la auxotrofia para tiamina en cepas *iscS* (Tabla 6).

Tabla 6

Requerimiento de tiamina y ácido nicotínico por parte de las diferentes cepas de *E. coli* estudiadas en esta Tesis

Cepa	CRECIMIENTO EN MEDIO MÍNIMO M9			
	(-) tiamina (-) ac. nicotínico	(+) tiamina	(+) ac. nicotínico.	(+) tiamina (+) ac. nicotínico
DH5 α	+	+	+	+
DH5 α /pBAD	+	+	+	+
DH5 α (<i>csdA</i> ::Kn)	+	+	+	+
DH5 α (<i>csdA</i> ::Kn)/pBAD/ <i>csdA</i>	+	+	+	+
DH5 α (<i>csdA</i> ::Kn)/pBAD/ <i>csdB</i>	+	+	+	+
DH5 α (<i>csdA</i> ::Kn)/pBAD/ <i>iscS</i>	+	+	+	+
DH5 α (<i>csdB</i> ::Kn)	-	-	+	+
DH5 α (<i>csdB</i> ::Kn)/pBAD/ <i>csdA</i>	-	-	+	+
DH5 α (<i>csdB</i> ::Kn)/pBAD/ <i>csdB</i>	+	+	+	+
DH5 α (<i>csdB</i> ::Kn)/pBAD/ <i>iscS</i>	-	-	+	+
DH5 α (<i>iscS</i> ::Kn)	-	-	-	+
DH5 α (<i>iscS</i> ::Kn)/ pBAD/ <i>csdA</i>	-	-	-	+
DH5 α (<i>iscS</i> ::Kn)/ pBAD/ <i>csdB</i>	-	+	-	+
DH5 α (<i>iscS</i> ::Kn)/ pBAD/ <i>iscS</i>	-	-	+	+

Los valores representan la media de tres determinaciones independientes.

7. DISCUSION

A la fecha no se ha propuesto un mecanismo único de resistencia a telurito de potasio y, muy por el contrario, la evidencia experimental disponible indica que son varias las vías por las cuales la célula puede defenderse de los efectos tóxicos de esta sal. Tampoco son claros los mecanismos por los que el K_2TeO_3 resulta tóxico para la célula y se han postulado al menos tres aspectos aparentemente claves para ello. El primero se relaciona con su carácter de oxidante fuerte que puede ocasionar un daño oxidativo general (Summers y Jacoby, 1977). Segundo, el Te podría reemplazar al S o al Se en ciertas proteínas y/o metabolitos interfiriendo de este modo en su función biológica (Garberg y cols., 1999). Finalmente el telurito podría tener efectos marcados en el balance redox de la célula al alterar selectivamente algunos tioles importantes para ella (Turner y cols., 1999).

En el laboratorio nos hemos abocado los últimos años al estudio de la resistencia bacteriana a K_2TeO_3 focalizándonos en el aislamiento e identificación de determinantes Tel^R de *G. stearothermophilus* V. Uno de ellos resultó ser el producto del gen *iscS*, que especifica una cisteína desulfurasa. Es muy probable que la participación de esta enzima en el fenómeno de resistencia a telurito se deba a su capacidad para restaurar los centros [Fe-S] que han sido dañados por el K_2TeO_3 en proteínas claves para el metabolismo celular. Mutantes *iscS*⁻ de *E. coli* son sensibles a K_2TeO_3 y presentan un fenotipo de crecimiento muy lento (Takahashi y Tokumoto, 2002; Tantaleán y cols., 2003).

A pesar de ello sin embargo, esta delección no plantea un problema de letalidad para la célula y por tanto la predicción es que deben existir otros productos génicos que complementan la actividad de esta desulfurasa en las referidas mutantes.

Como se mencionó antes en esta Tesis, aparte de *IscS* existen otras dos desulfurasas en *E. coli*. Se trata de *CSD* y *CsdB*, que dado lo anteriormente expuesto, representan fuertes candidatos para suplir el rol potencial de la desulfurasa *IscS* en la resistencia observada a telurito de potasio. Con el fin de discriminar cual de estas dos desulfurasas está involucrada en resistencia al tóxico, en la presente Tesis se construyó cepas con delecciones precisas en los genes estructurales de las tres desulfurasas y se determinó cual de las mutantes resultantes fue más sensible a telurito. El dato conocido con anterioridad es que mutaciones en el gen *iscS* hacen a *E. coli* más sensible a esta sal que la cepa silvestre (Tantaleán y cols., 2003).

Los resultados obtenidos mostraron que la cepa *csdA*⁻ tiene una velocidad de crecimiento similar al de la cepa silvestre (*E. coli* DH5 α) o la que lleva el vector (*E. coli* DH5 α /pBAD).. Por el contrario, la cepa *csdB*⁻ presentó un ligera disminución en el tiempo generacional respecto a la cepa nativa. El resultado de Tantaleán y cols. (2003) relativo al lento crecimiento de cepas *iscS*⁻ fue también corroborado en esta Tesis (Figs. 9 y 10).

Por otro lado, los resultados obtenidos al determinar el diámetro de halos de inhibición del crecimiento en condiciones aeróbicas en presencia de K_2TeO_3

para las diferentes cepas de *E. coli* estudiadas permitieron concluir que la sensibilidad a telurito de potasio es $DH5\alpha(iscS::Kn) > DH5\alpha(csdB::Kn) > DH5\alpha(csdA::Kn)$ (Tabla 4). Los resultados del análisis de halos de inhibición del crecimiento en condiciones aeróbicas de las cepas mutadas y/o complementadas con los isógenos y/o los correspondientes parálogos clonados en el vector pBAD, permitieron observar complementación de la resistencia a K_2TeO_3 sólo con los genes *iscS* y *csdB* (Tabla 4).

Dado que la predicción inicial era que por lo menos la expresión de una de las desulfurasas aumentaría la resistencia de *E. coli* a telurito, los resultados obtenidos indican que la desulfurasa más probablemente involucrada en este fenómeno es (además de *IscS*), *CsdB*. Esta es una enzima que exhibe actividad L-selenocisteína liasa y L-cisteína desulfurasa, con una clara preferencia por L-selenocisteína como sustrato (Mihara y cols., 1999).

El gen estructural de *CsdB* forma parte del operón *sufABCDSE*, involucrado en una vía secundaria de ensamble de centros Fe-S]. La vía principal de ensamblaje está representada por el operón *isc*. Esto último fue demostrado genéticamente, en que la sobreexpresión de los productos del operón *sufABCDSE* (o mutaciones regulatorias del mismo) suprimen defectos de cepas con deleciones en el operón *isc* (Takahashi y Tokumoto, 2002). Adicionalmente se ha demostrado que *CsdB* participa en el ensamble del centro [Fe-S] de la ferredoxina *in vitro* (Kurihara y cols., 2003).

Se ha sugerido insistentemente que la toxicidad del telurito se debe a su capacidad oxidante. Esto iría acompañado de la génesis de radicales O_2^- , que ocurriría durante la reducción de telurito (Te^{+4}) a telurio elemental (Te^0) (Taylor, 1999). Estos radicales pueden desestabilizar centros [Fe-S] en diferentes proteínas o enzimas (Flint y cols., 1993) y son susceptibles de ser reconstituídos *in vitro* por diversas actividades enzimáticas (Flint, 1996; Takahashi y Tokumoto, 2002). De este modo, la recuperación de estos centros [Fe-S] por desulfurasas podría considerarse como un mecanismo de resistencia a dicho tóxico. Esta hipótesis es apoyada por los trabajos de Strain y cols. (1998), quienes demostraron que una mutación *sod 1* (deficiencia de la enzima superóxido dismutasa) en *Saccharomyces cerevisiae* puede ser complementada por el gen *nfs1p*, que codifica para la proteína Nfs1p. Esta es similar a las cisteína desulfurasas bacterianas NifS e IscS (Li y cols., 1999). La complementación en este caso estaría dada por la recuperación de centros [Fe-S] en proteínas dañadas por radicales O_2^- que no pueden ser dismutados a H_2O y H_2O_2 .

La idea de la génesis de radicales superóxido también queda fortalecida con los resultados obtenidos con los halos de inhibición del crecimiento en condiciones anaeróbicas (Tabla 5). En estos experimentos se observó que las cepas silvestres, mutadas y/o complementadas no presentaron mayor diferencia en los halos de inhibición del crecimiento, sugiriendo que la mayor toxicidad del telurito ocurre predominantemente en presencia de oxígeno.



En el marco de la hipótesis planteada y de los resultados obtenidos en esta Tesis, resulta muy interesante que CsdB tenga además relación con estrés oxidativo (Nachin y cols., 2001). Por lo tanto, es posible suponer que la enzima CsdB, siendo parte de un sistema reparador/recuperador de centros [Fe-S], intervenga secundariamente en resistencia a K_2TeO_3 .

Dado que la cepa *iscS⁻* posee en su genoma una copia silvestre del gen *csdB*, su complementación con el gen *csdB* podría explicarse por un efecto de dosis génica (multicopia). En este sentido, trabajos del grupo de Takahashi (2002) demostraron que la sobreexpresión de proteínas del operón *sufABCDESF* suprime una mutación *isc*, recuperándose de esta manera la actividad de restauración de centros [Fe-S]. Nuestros resultados muestran que la recuperación del nivel de resistencia basal a telurito en cepas *iscS::Kn* y *csdB::Kn* se presenta sólo cuando existe sobreexpresión de los genes *csdB* o *iscS* (Tabla 4).

Adicionalmente se evaluó los requerimientos de ácido nicotínico y de tiamina en condiciones aeróbicas por parte de las cepas que portan deleciones en los genes de las tres desulfurasas. Esta característica fenotípica también fue determinada en cepas complementadas con estos genes clonados independientemente en el vector de expresión pBAD (Tabla 6). Los resultados muestran que la auxotrofia para ácido nicotínico es revertida en cepas *iscS::Kn* transformadas con el gen *csdB* clonado en pBAD. Los requerimientos para ácido nicotínico en mutantes de *E. coli iscS⁻* han sido sustentados

principalmente por defectos en proteínas conteniendo centros [Fe-S]. El ácido quinolínico, precursor del NAD^+ , es sintetizado por un complejo de ácido quinolínico sintetasa que contiene proteínas con centros [Fe-S] lábiles en condiciones aeróbicas (Gardner y Fridovich, 1991). Si se tiene en cuenta que la sobreexpresión de *csdB* mejora la recuperación de centros [Fe-S], es posible entonces imaginar también que esta proteína podría tener un rol en la restauración de la vía de síntesis de tiamina en cepas incapaces de sintetizarla como consecuencia de un estrés causado, por ejemplo, por la presencia de tóxicos como telurito de potasio.

8. CONCLUSIONES

- Se determinó el nivel de resistencia a telurito de potasio de cepas de *E. coli* mutantes en los genes *csdA*, *csdB* e *iscS*. Los resultados indicaron que el nivel de sensibilidad al tóxico es *iscS*⁻ > *csdB*⁻ > *csdA*⁻.
- Al complementar las cepas mutantes con los genes homólogos y/o parálogos de las diferentes desulfurasas se encontró que los genes *iscS* y *csdB* son relevantes en la respuesta celular a telurito de potasio.
- Desde un punto de vista nutricional se demostró que la expresión de *csdB* puede revertir el requerimiento de ácido nicotínico en cepas *csdB*⁻ e *iscS*⁻ y que el gen *iscS* complementa el requerimiento de tiamina en cepas *iscS*⁻.

9. REFERENCIAS

- Avazéri, C., R. Turner, J. Pommier, J. Weiner, G. Giordano y A. Verméglio. 1997. Tellurite reductase activity of nitrate reductase is responsible for the basal resistance of *Escherichia coli* to tellurite. *Microbiology* **143**:1181-1189.
- Beveridge, T., M. Hughes, H. Lee, K. Leung, R. Poole, I. Savvaidis, S. Silver y J. Trevors. 1997. Metal-microbe interactions: contemporary approaches. *Adv. Microb. Physiol.* **38**:177-243.
- Bradley, D. 1985. Detection of tellurite-resistance determinants in IncP plasmids. *J. Gen. Microbiol.* **131**:3135-3137.
- Bradley, D., V. Hughes, H. Richards y D. Datta. 1982. R plasmids of a new incompatibility group determine constitutive production of H pili. *Plasmid.* **7**:230-238.
- Burian, J., N. Tu, L. Klucar, L. Guller, G. Lloyd-Jones, S. Stuchlik, P. Fejdi, P. Siekel y J. Turna. 1998. *In vivo* and *in vitro* cloning and phenotype characterization of tellurite resistance determinant conferred by plasmid pTE53 of a clinical isolate of *Escherichia coli*. *Folia Microbiol. (Praha)* **43**:589-599.
- Cournoyer, B., S. Watanabe y A. Vivian. 1998. A tellurite-resistance genetic determinant from phytopathogenic *Pseudomonads* encodes a thiopurine methyl transferase: evidence of a widely-conserved family of methyltransferases. *Biochim. Biophys. Acta* **1397**:161-168.
- Chiong, M., E. González, R. Barra y C. Vásquez. 1988. Purification and biochemical characterization of tellurite-reducing activities from *Thermus thermophilus* HB8. *J. Bacteriol.* **170**:3269-3273.
- Datsenko, K. A. y B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:6640-6645.

- Flint, D. H. 1996. *Escherichia coli* contains a protein that is homologous in function and N-terminal sequence to the protein encoded by the *nifS* gene of *Azotobacter vinelandii* and that can participate in the synthesis of the Fe-S cluster of dihydroxy-acid dehydratase. *J. Biol. Chem.* **271**:16068-16074.
- Flint, D. H., J. F. Tuminello y M. H. Emptage. 1993. The inactivation of Fe-S cluster containing hydro-lyases by superoxide. *J. Biol. Chem.* **268**:22369-22376.
- Garberg P, L. Engman, V. Tolmachev, H. Lundqvist, R. G. Gerdes y I. A. Cotgreave. 1999. Binding of tellurium to hepatocellular selenoproteins during incubation with inorganic tellurite: consequences for the activity of selenium-dependent glutathione peroxidase. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* **31**:291-301.
- Gardner, P. R. e I. Fridovich. 1991. Superoxide sensitivity of the *Escherichia coli* aconitase. *J. Bacteriol.* **266**:19328-19333.
- Imlay, J. y S. Linn. 1988. Toxic DNA damage through the Fenton reaction *in vivo* and *in vitro*. *Science* **240**:640-642.
- Jobling, M. y D. Ritchie. 1987. Genetic and physical analysis of plasmid genes expressing inducible resistance to tellurite in *Escherichia coli*. *Molec. Gen. Genet.* **208**:288-293.
- Kumano, M., A. Tamakoshi y K. Yamane. 1997. A 32 kb nucleotide sequence from the region of the lyncomycin-resistance gene (22°-25°) of the *Bacillus subtilis* chromosome and identification of the site of the *lin-2* mutation. *Microbiology* **143**:2775-2782.
- Kuo, C. F., T. Mashino e I. Fridovich. 1987. α , β - Dihydroxyisovalerate dehydratase a superoxide-sensitive enzyme. *J. Biol. Chem.* **262**:4724-4727.

- Kurihara, T., H. Mihara, S. Kato, T. Yoshimura y N. Esaki. 2003. Assembly of iron-sulfur clusters mediated by cysteine desulfurases, IscS, CsdB and CSD, from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1647**:303-309.
- Lauhon, C. T. 2002. Requirement for IscS in biosynthesis of all thionucleosides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **184**:6820-6829.
- Lauhon, C.T. y R. Kambampati. 2000. The *iscS* gene of *Escherichia coli* is required for the biosynthesis of 4-thiouridine, thiamine, and NAD. *J. Biol. Chem.* **275**:20096–20103.
- Li, J., M. Kogan, S. A. Knight, D. Pain y A. Dancis. 1999. Yeast mitochondrial protein, Nfs1p, coordinately regulates iron-sulfur cluster proteins, cellular iron uptake, and iron distribution. *J. Biol. Chem.* **274**:33025–33034.
- Liochev, S. I. e I. Fridovich. 1993. Modulation of the fumarases of *Escherichia coli* in response to oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* **301**:379-384.
- Liu, M. y D. Taylor. 1999. Characterization of gram-positive tellurite resistance encoded by the *Streptococcus pneumoniae tehB* gene. *FEMS Microbiol. Lett.* **174**:385-392.
- Loiseau, L., S. Ollagnier-De-Choudens, L. Nachin, M. Fontecave y F. Barras. 2003. Biogenesis of Fe-S cluster by the bacterial Suf system: SufS and SufE form a new type of cysteine desulfurase. *J. Biol. Chem.* **278**:38352-38359.
- Mihara, H., S. Kato, G. M. Lacourciere, T. C. Stadtman, R. A. Kennedy, T. Kurihara, U. Tokumoto, Y. Takahashi y N. Esaki. 2002. The *iscS* gene is essential for the biosynthesis of 2-selenouridine in tRNA and the selenocysteine-containing formate dehydrogenase H. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:6679-6683.
- Mihara, H., T. Kurihara, T. Yoshimura y N. Esaki. 2000. Kinetic and mutational studies of three NifS homologs from *Escherichia coli*:

mechanistic difference between L-cysteine desulfurase and L-selenocysteine lyase reactions. *J. Biochem. (Tokyo)* **127**:559-567.

- Mihara, H., T. Kurihara, T. Yoshimura, K. Soda y N. Esaki. 1997. Cysteine sulfinatase desulfinase, a NIFS-like protein of *Escherichia coli* with selenocysteine lyase and cysteine desulfurase activities. *J. Biol. Chem.* **272**:22417-22424.
- Mihara, H., M. Maeda, T. Fujii, T. Kurihara, Y. Hata y N. Esaki. 1999. A *nifS*-like gene, *csdB*, encodes an *Escherichia coli* counterpart of mammalian selenocysteine lyase. Gene cloning, purification, characterization and preliminary x-ray crystallographic studies. *J. Biol. Chem.* **274**:14768-14772.
- Moscoso, H., C. Saavedra, C. Loyola, S. Pichuanes y C. Vásquez. 1998. Biochemical characterization of tellurite-reducing activities from *Bacillus stearothermophilus* V. *Res. Microbiol.* **49**:389-397.
- Nachin, L., M. El Hassouni, L. Loiseau, D. Expert y F. Barras. 2001. SoxR-dependent response to oxidative stress and virulence of *Erwinia chrysanthemi*: the key role of SufC, an orphan ABC ATPase. *Mol. Microbiol.* **39**:960-972.
- O'Gara, J., M. Gomelsky y S. Kaplan. 1997. Identification and molecular genetic analysis of multiple loci contributing to high-level tellurite resistance in *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:4713-4720.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2^a Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.
- Schwartz, C. J., O. Djaman, J. A. Imlay y P. J. Kiley. 2000. The cysteine desulfurase, IscS, has a major role in *in vivo* Fe-S cluster formation in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:9009-9014.
- Silver, S. 1998. Genes for all metals- a bacterial view of the Periodic Table. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **1**:1-12.

- Strain, J., C. R. Lorenz, J. Bode, S. Garland, G. A. Smolen, D. T. Ta, L. E. Vickery y V. C. Culotta. 1998. Suppressors of superoxide dismutase (*SOD1*) deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of proteins predicted to mediate iron-sulfur cluster assembly. *J. Biol. Chem.* **273**:31138–31144.
- Summers, A. y G. Jacoby. 1977. Plasmid determined resistance to tellurium compounds. *J. Bacteriol.* **129**:276-281.
- Takahashi, Y. y U. Tokumoto. 2002. A third bacterial system for the assembly of iron-sulfur clusters with homologs in archaea and plastids. *J. Biol. Chem.* **277**:28380-28383.
- Tantaleán, J. C., M. A. Araya, C. P. Saavedra, D. E. Fuentes, J. M. Pérez, I. L. Calderón, P. Youderian y C. Vásquez. 2003. The *Geobacillus stearothermophilus* *V iscS* gene, encoding cysteine desulfurase, confers resistance to potassium tellurite in *Escherichia coli* K12. *J. Bacteriol.* **185**:5831-5837.
- Taylor, D. 1999. Bacterial tellurite resistance. *Trends Microbiol.* **7**:111-115.
- Tokumoto, U. e Y. Takahashi. 2001. Genetic analysis of the *isc* operon in *Escherichia coli* involved in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *J. Biochem. (Tokyo)* **130**:63–71.
- Tomás, J. M. y W. W. Kay. 1986. Tellurite susceptibility and non-plasmid-mediated resistance in *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **30**:127–131
- Trutko, S. M., N. E. Suzina, V. I. Duda, V. K. Akimenko y A. M. Oronin. 1998. Involvement of the respiratory chain in potassium tellurite reduction in bacteria. *Dokl. Biochem.* **358**:8-15.
- Turner, R., J. Weiner y D. Taylor. 1999. Tellurite-mediated thiol oxidation in *Escherichia coli*. *Microbiology* **145**:2549-2557.

- Vázquez, C., C. Saavedra y E. González. (1991). Cloning the *Bst*VI restriction-modification system in *Escherichia coli*. *Gene* **102**, 83-85.
- Vázquez, C. C., Saavedra, C.P., Loyola, C.A., Araya, M. A., Pichuanes, S. 2001. The product of the *cysK* gene of *Bacillus stearothermophilus* V mediates potassium tellurite resistance in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol.* **43**:418-423.
- Walter, E. y D. Taylor. 1992. Plasmid-mediated resistance to tellurite: expressed and cryptic. *Plasmid* **27**:52-64.
- Walter, E., J. Weiner y D. Taylor. 1991. Nucleotide sequence and overexpression of the tellurite-resistance determinant from the IncHII plasmid pHH1508a. *Gene* **101**:1-7.
- Westenberg, D. y M. Guerinot. 1997. Regulation of bacterial gene expression by metals. *Adv. Genet.* **36**:187-238.
- Whelan, K. y E. Colleran. 1992. Restriction endonuclease mapping of the HI2 incompatibility group plasmid R478. *J. Bacteriol.* **174**:1197-1204.
- Yan, W. y D. Taylor, D. 1987. Characterization of transfer regions within the HII incompatibility group plasmid pHH1508a. *J. Bacteriol.* **169**:2866-2868.
- Zheng, L., R. H. White, V. L. Cash, R. F. Jack y D. R. Dean. 1993. Cysteine desulfurase activity indicates a role for NifS in metallocluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:2754-2758.