

UCH-FC  
MAG-Microbiología  
A185  
C.I



**ESTUDIO DE LAS RODANASAS DE LA BACTERIA GRAM-NEGATIVA**  
**QUIMIOLITOAUTOTROFICA *ACIDITHIOBACILLUS FERROOXIDANS* ATCC 23270 Y**  
**CARACTERIZACIÓN DE LA TIOSULFATO: AZUFRE TRANSFERASA P11.**

TESIS

ENTREGADA A LA UNIVERSIDAD DE CHILE

EN CUMPLIMIENTO PARCIAL DE LOS REQUISITOS

PARA OPTAR AL GRADO DE

MAGISTER EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN MICROBIOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS

POR

MAURICIO ACOSTA GRINOK

ENERO DEL 2008

DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS A. JEREZ

Facultad de Ciencias

Universidad de Chile



INFORME DE APROBACIÓN

TESIS DE MAGISTER

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

Mauricio Acosta Grinok

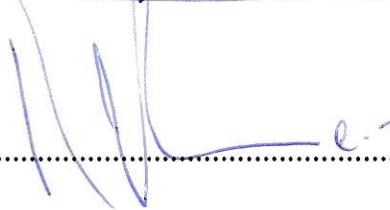
Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Tesis como requisito para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Microbiología, en el examen de Defensa de Tesis rendido el día 13 de diciembre de 2007.

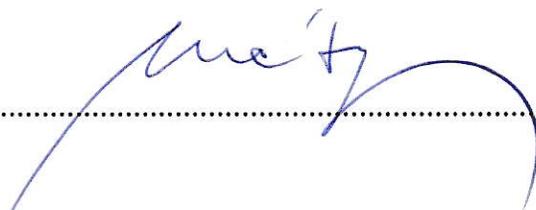
Director de Tesis:

Dr. Carlos A. Jerez.....

Comisión de Evaluación de la Tesis

Dr. Rosalba Lagos.....

Dr. Romilio Espejo.....

Dr. Claudio Vásquez.....



“Omnia tempus habent, et momentum suum cuique negotio sub caelo:  
tempus nascendi et tempus moriendi, tempus plantandi et tempus evellendi  
quod plantatum est, tempus occidendi et tempus sanandi, tempus destruendi  
et tempus aedificandi” (Ec 3, 1-3)

## AGRADECIMIENTOS

Esta es la última etapa de un proceso que culmina, para llegar a este punto conté con la ayuda de muchas personas e instituciones. Sé que no puedo nombrar a todas ellas, pero tampoco puedo dejar de mencionarlas, así que nombraré solo algunas:

Alex González, Alvaro Orell, Andrés Villa, Carolina Farah y su familia, Claudio Navarro, DAAD, Dr. Carlos Jerez, Dr. Nicolas Guilliani, Dr. Victor Cifuentes, Felipe Gordillo, Fernando Pagliai, Francisco Chávez, Francisco Ramosellez, Irma I. Grinok, José P. Acosta, José Ponce, Juan Araos, Lissette Valenzuela, Mario Vera, Pablo Ramírez, Sergio Álvarez, Simón Beard, Ricardo Cabrera y otras muchas que intervinieron y que no los nombro aquí. Muchas gracias a todos.

## LISTA DE FIGURAS



		Pag.
Figura 1.	Modelo de la vía ramificada de oxidación del tiosulfato	8
Figura 2.	Modelo de oxidación del azufre siguiendo la vía del tetrionato	11
Figura 3.	Motivos estructurales conservados en la superfamilia rodanasa fosfatasa Cdc25.	14
Figura 4.	Organización de las proteínas más representativas con dominio rodanasa, según se describen en la base de datos PFAM	15
Figura 5.	Mecanismo de la actividad tiosulfato: azufre transferasa	18
Figura 6.	Modelo del metabolismo disimilatorio del azufre en <i>Wolinella succinogenes</i>	24
Figura 7.	Esquema simplificado del metabolismo disimilatorio del azufre en <i>A. ferrooxidans</i>	26
Figura 8.	Modelo de oxidación disimilatoria del azufre y algunos de sus compuestos reducidos en <i>A. ferrooxidans</i>	33
Figura 9.	Secuencia aminoacídica deducida de las proteínas putativas con dominio rodanasa presentes en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270	50
Figura 10.	Alineamiento de las proteínas putativas con dominio rodanasa presentes en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270 con proteínas representativas de la superfamilia rodanasa fosfatasa CDC25	54
Figura 11.	Comparación de la estructura secundaria de las proteínas putativas con dominio rodanasa de <i>A. ferrooxidans</i> con proteínas representativas de la superfamilia Rodanasa/Fosfatasa tipo CDC25	55
Figura 12.	Comparación de la región catalítica de acuerdo con las propiedades de los residuos de aminoácidos	57
Figura 13.	Estructura del sitio catalítico de la rodanasa GlpE de <i>E. coli</i> .	60
Figura 14.	Entorno de los genes putativos que codifican proteínas con dominios rodanasa presentes en el genoma inconcluso de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270	67
Figura 15.	Comparación de los contextos genómicos similares al operón putativo P11 de <i>A. ferrooxidans</i>	75
Figura 16.	Comparación de contextos genómicos similares al operón putativo P16 de <i>A. ferrooxidans</i>	76
Figura 17.	Alineamiento de algunas de proteínas del operón putativo P16 de <i>A. ferrooxidans</i>	78

Figura 18.	Comparación de los contextos genómicos de genes similares al operón putativo P28 de <i>A. ferrooxidans</i>	79
Figura 19.	Alineamiento de proteínas similares a la P28 encontradas en la base de datos del NCBI	82
Figura 20.	Amplificación del gen <i>p14</i> de <i>A. ferrooxidans</i> y comprobación de la presencia del inserto en el plásmido de clonación	83
Figura 21.	Digestión y clonación del gen <i>p14</i>	86
Figura 22.	Inducción de la expresión del gen recombinante <i>p14</i>	87
Figura 23.	Amplificación de los genes <i>p11</i> , <i>p14.3</i> , <i>p16.2</i> y <i>p28</i> , que codifican para las rodanasas de <i>A. ferrooxidans</i>	88
Figura 24.	Digestión de los plásmidos pGEM-T que llevan insertos los genes <i>p11</i> , <i>p14.3</i> , <i>p16.2</i> y <i>p28</i>	89
Figura 25.	Determinación de la presencia del inserto de interés y su correcta orientación mediante PCR en las colonias de los clones transformados con los plásmidos pET <i>p11</i> y pET <i>p16.2</i>	89
Figura 26.	Determinación de la presencia y la orientación de los insertos <i>p28</i> y <i>p14.3</i>	90
Figura 27.	Esquema de clonación de los genes de algunas rodanasas de <i>A. ferrooxidans</i>	91
Figura 28.	Inducción de la sobreexpresión de los genes recombinantes de algunas de las rodanasas de <i>A. ferrooxidans</i>	92
Figura 29.	Actividad tiosulfato: azufre transferasa en las cepas recombinantes de <i>E. coli</i> expresando algunos de los genes de <i>A. ferrooxidans</i>	93
Figura 30.	Proceso de purificación de las proteínas recombinantes P11 y P16.2 mediante una columna de afinidad.	95
Figura 31.	Efecto de diferentes factores sobre la actividad enzimática de la proteína recombinante P11 de <i>A. ferrooxidans</i>	97
Figura 32.	Efecto de diferentes sales y concentraciones de las mismas sobre la actividad tiosulfato: azufre transferasa de la proteína recombinante P11 de <i>A. ferrooxidans</i>	101
Figura 33.	Efecto de diferentes factores sobre la actividad TST de la proteína recombinante P16.2 de <i>A. ferrooxidans</i>	104
Figura 34.	Propiedades de la cinética de la proteína recombinante P11 con cianuro de potasio y tiosulfato de sodio como sustratos para la actividad tiosulfato: azufre transferasa	108

## LISTA DE TABLAS

		Pág.
<i>Tabla 1.</i>	Principales compuestos inorgánicos de azufre de importancia biológica	5
<i>Tabla 2.</i>	Rodanasas de <i>E. coli</i>	30
<i>Tabla 3.</i>	Cepas de <i>E. coli</i> empleadas en esta Tesis para la clonación de los genes que codifican las rodanasas de <i>A. ferrooxidans</i>	35
<i>Tabla 4.</i>	Plásmidos empleados en la propagación y expresión de los genes	35
<i>Tabla 5.</i>	Partidores utilizados para las reacciones de amplificación de los genes	37
<i>Tabla 6.</i>	Genes putativos que codifican para proteínas con dominio rodanasa presentes en el genoma de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270	47
<i>Tabla 7.</i>	Características generales de las proteínas putativas con dominio rodanasa presentes en el genoma de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270	49
<i>Tabla 8.</i>	Características generales de rodanasas presentes en algunos microorganismos	52
<i>Tabla 9.</i>	Purificación de las proteínas recombinantes P11 y P16.2	96
<i>Tabla 10.</i>	Parámetros cinéticos de algunas tiosulfato: azufre transferasas	110

## LISTA DE ABREVIATURAS

**Ap:** Ampicilina

**BSA:** Albumina de suero bovino

**Cm:** Cloranfenicol

**DO<sub>600</sub>:** Densidad óptica a 600 nm

**DTT:** Ditionitrito

**EDTA:** Ácido etilendiaminotetraacético

**IPTG:** Isopropiltio-β-D-galactósido

**K<sub>cat</sub>:** Constante catalítica

**K<sub>m</sub>:** Kanamicina

**K<sub>m</sub>:** Constante de Michaelis-Menten

**LB:** Medio de cultivo Luria Bertani

**MOPS:** Ácido 3-(N-morpholino)propanosulfónico

**MST:** Mercaptopiruvato: azufre transferasa

**NCBI:** Centro Nacional de Información en Biotecnología (“National Center for Biotechnology Information”)

**PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa

**pI:** punto isoelectrico

**SDS:** Dodecil sulfato de sodio

**SDS-PAGE:** Electroforesis monodimensional en geles de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio.

**TAE:** Tris-acetato EDTA

**TIGR:** Instituto de Investigaciones Genómicas (“The Institute for Genomic Research”)

**Tris:** 2-Amino-2-hidroximetil-1,3-propanodiol

**TST:** Tiosulfato: azufre transferasa

**V<sub>max</sub>:** Velocidad máxima

**X-Gal:** 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido

## RESUMEN

El azufre es uno de los tres elementos más abundantes, junto al nitrógeno y el carbono. Además, es un elemento no metálico esencial para los seres vivos debido a su versatilidad química. El amplio rango de estados de oxidación del azufre es aprovechado por algunos microorganismos para utilizarlo como aceptor o dador de electrones.

*Acidithiobacillus ferrooxidans* es una bacteria Gram-negativa capaz de utilizar el azufre y sus compuestos reducidos de azufre como fuente de electrones. Dada la fisiología de *A. ferrooxidans*, es posible que requiera de proteínas capaces de movilizar los átomos de azufre sea en metabolismo desasimilatorio o asimilatorio de este elemento.

El dominio rodanasa es un módulo estructural ampliamente distribuido entre los seres vivos, que puede abarcar toda la extensión de la proteína o bien, encontrarse repetido, en cuyo caso el dominio C-terminal corresponde al dominio activo. Además, el dominio rodanasa puede encontrarse en proteínas con múltiples dominios. Aunque algunos miembros de esta familia de proteínas actúan como transferasas de azufre, no se conoce cuál es, específicamente, su función fisiológica. En base a estas observaciones, se piensa que las enzimas con actividad azufre transferasa podrían estar involucradas en la transferencia de azufre para la biosíntesis de algunos cofactores que contienen azufre y en el metabolismo disimilatorio del azufre.

En este trabajo identificamos cinco nuevos genes, que codifican para proteínas con dominios rodanasas y que están presentes en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC23270. Todas las secuencias mostraron el dominio rodanasa excepto la proteína P28 que posee, además del dominio rodanasa en la región C-terminal, un dominio ANK en la N-terminal.

A fin de entender las posibles funciones fisiológicas de las rodanasas de *A. ferrooxidans*, se realizó un análisis comparativo del contexto genómico. La comparación del contexto genómico de algunas de las rodanasas de *A. ferrooxidans* indica que algunas de ellas podrían estar involucradas en la oxidación del azufre (P21 y P11), la fijación del nitrógeno (P28), y la resistencia contra condiciones de estrés (P16).

Se demostró que las proteínas recombinantes P11, P16.2 y P28 poseen actividad tiosulfato: azufre transferasa (TST). Además, las rodanasas recombinantes con cola de histidinas P11 y P16.2 se purificaron mediante cromatografía de afinidad a metal y posteriormente fueron caracterizadas. Se determinaron los parámetros para la actividad TST, la velocidad máxima, la constante de Michaelis - Menten y la constante catalítica. Los valores de  $K_m$  fueron  $18,62 \pm 3,5$  mM y  $39,59 \pm 6,1$  mM para el tiosulfato y el cianuro, respectivamente.

En base al contexto genómico y la actividad enzimática se puede concluir que la proteína P11 podría participar en la oxidación del azufre o en la síntesis o reparación de grupos Fe-S de otras proteínas.

## ABSTRACT

Sulfur is one of the three most abundant elements in nature. In addition, it is an essential nonmetal element for life due to his chemical versatility. Some microorganisms have taken advantage of the wide range of oxidation of sulfur and use it as acceptor or electron donor.

*Acidithiobacillus ferrooxidans* is a Gram-negative bacterium able to use elemental sulfur and sulfur reduced compounds as electron source. Because of the physiology of *A. ferrooxidans*, it is possible that it requires proteins able to mobilize sulfur atoms for the assimilatory or the dissimilatory sulfur metabolism.

Rhodanese domain is a structural module found in eubacteria, eukaryotes and archaea. The rhodanese domain can comprise the whole structure of a protein or alternatively it is found as tandem repeated modules in which the C-terminal domain displays the properly structured active site. Additionally, rhodanese domain is found as a member of many multidomain proteins. Although some members of this family of proteins show sulfurtransferase activity *in vitro*, their specific physiological functions remain unknown. These observations led to the hypothesis that enzymes with sulfurtransferase activity might be involved in sulfur transfer for biosynthesis of some sulfur-containing cofactors and the dissimilatory sulfur oxidation.

In this work we identified, in the *A. ferrooxidans* ATCC23270 genome, five new genes encoding for proteins with rhodanese domains. All the sequences showed here had a single rhodanese domain, except protein P28 that was predicted to contain an N-terminal ankyrin domain and a C-terminal rhodanese domain.

To understand the possible physiological role of the rhodanases of *A. ferrooxidans*, a comparative bioinformatics analysis of the genomic context was developed. Comparison of the genomic context indicates that some of them could be involved in the oxidation of sulfur (P11 and P21), the fixation of nitrogen (P28) and resistance against stressing conditions (P16).

We have demonstrated that the recombinant proteins P11, P16.2 and P28 have thiosulfate: sulfur transferase activity (TST). Furthermore, the His-tagged recombinant proteins P11 and P16.2 were purified using immobilized metal affinity chromatography and they were characterized.

The parameters for TST activity, maximum velocity, Michaelis – Menten constant and catalytic constant of P11 were determined. The  $K_m$  values of  $18.62 \pm 3.5$  mM and  $39.59 \pm 6.1$  mM were obtained for thiosulfate and cyanide, respectively.

On the basis of its genomic context and enzymatic activity we can conclude that P11 protein may be participate in sulfur oxidation or in the synthesis or repair of Fe-S clusters for other proteins.

<b>Introducción .....</b>	<b>5</b>
1.1 Importancia del azufre en los seres vivos .....	5
1.2 Metabolismo desasimilatorio del azufre en bacterias .....	6
1.2.1. Vía ramificada de la oxidación del tiosulfato .....	7
1.2.2. Vía del tetrionato.....	10
1.3 La superfamilia rodanasa fosfatasa Cdc25 .....	13
1.3.1. Actividad Enzimática de las Proteínas Rodanasa .....	17
1.3.2. Papeles fisiológicos propuestos para las rodanasas .....	21
1.3.3. Rodanasas de <i>E. coli</i> .....	29
1.4 La bacteria <i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i> .....	31
1.4.1. Oxidación del azufre y sus compuestos reducidos por <i>A. ferrooxidans</i>	31
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>35</b>
Cepas bacterianas empleadas .....	35
Técnicas de biología molecular .....	36
Extracción de DNA genómico .....	36
Reacción en cadena de la polimerasa.....	36
Reacción de PCR en colonia.....	36
Electroforesis de DNA en geles de agarosa.....	38
Verificación de la pureza y cuantificación del DNA .....	38
Purificación de plasmidios .....	38
Digestión de DNA con enzimas de restricción .....	39
Reacciones de ligación del DNA .....	39
Transformación de <i>E. coli</i> con plasmidios.....	39

Técnicas microbiológicas.....	40
Medios y condiciones de cultivo.....	40
Selección de transformantes <i>E. coli</i> JM109.....	41
Conservación de las cepas .....	41
Inducción la expresión de las rodanasas recombinantes.....	41
Técnicas bioquímicas.....	42
Purificación de las rodanasas recombinantes.....	42
Preparación de muestras de proteínas y electroforesis en geles de poliacrilamida .....	43
Determinación de la concentración de proteínas .....	43
Medición de la actividad tiosulfato: azufre transferasa .....	43
Caracterización enzimática .....	44
Estudio de la cinética enzimática.....	44
Técnicas bioinformáticas .....	45
Búsqueda <i>in silico</i> de los genes putativos de las rodanasas en el genoma de <i>A. ferrooxidans</i> .....	45
Alineamiento de secuencias.....	46
<b>Resultados y Discusión .....</b>	<b>47</b>
Identificación de los genes que codifican para proteínas con dominio rodanasa presentes en el genoma de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270.....	47
Determinación de las características generales de las proteínas putativas con dominio rodanasa presentes en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270 .....	48

Características de las proteínas con dominio de la familia Rodanasa presentes en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270 .....	53
Análisis de los sitios catalíticos y predicción de la actividad enzimática de las rodanasas de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270 .....	58
Características generales del sitio activo de las rodanasas de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270 .....	58
Determinantes de la actividad enzimática de las rodanasas.....	59
Proteínas tipo mercaptopiruvato: azufre transferasa de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270 .....	62
Proteínas tipo tiosulfato: azufre transferasa de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC12270 .....	63
Proteínas de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270 de tipo desconocido .....	63
Conclusión .....	66
Entorno genético de los genes que codifican rodanasas en <i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270.....	67
Detección y comparación de los contextos genéticos conservados.....	74
Comparación del contexto genético del gen <i>p11</i> .....	74
Comparación del contexto genético del gen <i>p16</i> .....	75
Comparación del contexto genético del gen <i>p28</i> .....	79
Conclusión .....	83
Clonación de los genes de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270.....	84
Amplificación, clonación y expresión del gen recombinante <i>p14</i> de <i>A. ferrooxidans</i> .....	84

Clonación de los genes <i>p11</i> , <i>p14.3</i> , <i>p16.2</i> y <i>p28</i> .....	87
Actividad tiosulfato: azufre transferasa de las cepas recombinantes	92
Purificación de las proteínas recombinantes P11 y P16.2 .....	95
Caracterización de la actividad enzimática de la proteína recombinante	
P11 de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270 .....	96
Conclusión .....	103
Caracterización de la actividad enzimática de la proteína recombinante	
P16.2 de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC 23270 .....	103
Conclusión .....	106
Caracterización de la cinética enzimática de la proteína recombinante P11	
de <i>A. ferrooxidans</i> ATCC23270 .....	106
Conclusión .....	110
<b>Conclusines</b> .....	<b>112</b>
<b>Bibliografía.</b> .....	<b>117</b>

## Introducción

### 1.1 Importancia del azufre en los seres vivos

El azufre es uno de los tres elementos más abundantes, junto al nitrógeno y el carbono. Además, es un elemento no metálico esencial para los seres vivos debido a su versatilidad química. Puede pasar de un estado reducido -2, como sulfuro, a un estado oxidado +6, como sulfato (Tabla 1). Por esta razón algunos microorganismos, denominados quimiolitótrofos, lo utilizan como aceptor o dador de electrones para obtener energía (Suzuki, 1974; Brüser y col., 2000).

Tabla 1. Principales compuestos inorgánicos de azufre de importancia biológica (Brüser y col., 2000)

<b>Compuesto</b>	<b>Formula</b>	<b>Estado de oxidación</b>
<b>Sulfuro</b>	$\text{HS}^-$	-2
<b>Polisulfuros</b>	$^-\text{S}(\text{S})_n\text{S}^-$	-1 S terminal y 0 S intermedio
<b>Tiosulfato</b>	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$	-1 S sulfano y +5 S sulfona
<b>Politionatos</b>	$^-\text{O}_3\text{S}(\text{S})_n\text{SO}_3^-$	0 S intermedio y +5 S sulfona
<b>Azufre elemental</b>	Anillos de $\text{S}_n$	0
<b>Bisulfito</b>	$\text{HSO}_3^-$	+4
<b>Sulfato</b>	$\text{SO}_4^{2-}$	+6

La incorporación del azufre en los seres vivos se realiza siguiendo dos estrategias diferentes. Por un lado, el sulfuro se adiciona a un aceptor activado en la biosíntesis de la cisteína, metionina, coenzima A y otros tioles biológicamente importantes. Por otro lado, la biosíntesis de los grupos Fe-S, cofactores como tiamina, biotina, ácido lipoico y

modificaciones tiólicas de los tRNAs requiere de una especie activa de azufre llamada azufre sulfano (R-S-SH) en lugar de sulfuro. El persulfuro de azufre es producido enzimáticamente por las proteínas IcsS, SufS y rodanasas.

Las moléculas más comunes que poseen azufre sulfano son, el azufre elemental ( $S_8$ ), persulfuros (R-S-S), polisulfuros (R-S<sub>n</sub>-R), politionatos ( $SO_3-S_n-SO_3^-$ ), tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ) y alquiltiosulfonato ( $RS(O)_2S^-$ ) (Westley y Westley, 1991; Claiborne y col., 1999; Brüser y col., 2000).

## 1.2 Metabolismo desasimilatorio del azufre en bacterias

El amplio rango de oxidación del azufre es aprovechado por algunos microorganismos que lo utilizan como aceptor o dador de electrones. La oxidación del azufre por microorganismos puede aportar 8 moles de electrones por mol de compuesto de azufre oxidado que es mucho más productivo en comparación al mol de electrones por mol de ión ferroso oxidado. Los electrones tomados del azufre son utilizados para generar potencial electroquímico de membrana, para la síntesis de ATP o la reducción del  $NAD^+$  (Kelly, 1999; Brüser y col., 2000).

Como dador de electrones, el azufre así como sus compuestos inorgánicos reducidos son oxidados por diversos mecanismos hasta sulfato ( $SO_4^{2-}$ ). La oxidación del tiosulfato ocupa un lugar central, alrededor de la cual se puede organizar los demás procesos de oxidación en vías principales.

Actualmente, se cree que existen tres vías completamente diferentes de oxidación del tiosulfato. En la primera vía un complejo multienzimático presente en el periplasma convierte el tiosulfato a sulfato. Mientras que la segunda, llamada vía ramificada de la

oxidación del tiosulfato, implica la oxidación por separado del azufre sulfano y el azufre sulfona del tiosulfato. En la tercera, la vía del tetrionato, el tiosulfato es oxidado a tetrionato y desde aquí sigue la oxidación hasta sulfato.

Para los propósitos de esta Tesis se analizarán la vía ramificada de oxidación del tiosulfato y la vía del tetrionato ya que *A. ferrooxidans* carece de la vía del complejo multienzimático.

### **1.2.1. Vía ramificada de la oxidación del tiosulfato**

El modelo de la vía ramificada de la oxidación del tiosulfato, hasta el momento, se estableció para fotótrofos de la subclase  $\gamma$  proteobacterias y para proteobacterias quimiolitótrofas obligadas de la clase  $\beta$  (Brüser y col., 2000). Básicamente, luego de la ruptura del enlace S-S del tiosulfato, el azufre sulfano se acumula en forma de  $[S^0]$  y posteriormente es oxidado, mientras que el azufre sulfona es inmediatamente oxidado hasta sulfato (Schedel y Trüper, 1980). Las enzimas que participarían de este proceso pueden ser, la tiosulfato azufre transferasa (TST) que puede transferir el azufre sulfano a un transportador orgánico como el glutatión o cadenas de polisulfuros (Alexander y Volini, 1987), o puede ser la tiosulfato reductasa (TR) cuya actividad está definida por la formación de sulfito y sulfuro a partir de tiosulfato, a veces su actividad depende de la presencia de tioles orgánicos como glutatión o ácido lipoico (Brüser y col., 2000).

Como resultado de la actividad TST o TR se produce sulfito (Figura 1) el que puede ser posteriormente oxidado por una sulfito: aceptor oxidoreductasa (SOR) que oxida el sulfito a sulfato (Figura 1) a la vez que reduce un citocromo (Hooper y DiSpirito, 1985;



El azufre almacenado en el periplasma (Figura 1) puede ser transportado al citoplasma para su oxidación (Pott y Dahl, 1998). Se cree que el transporte a través de la membrana es mediante moléculas orgánicas que pudieran aceptar un grupo sulfhidrilo liberado de las cadenas de polisulfanos del periplasma, aunque no se ha postulado ninguna enzima para esta actividad (Brüser y col., 2000). Una vez que el pertiol está en citoplasma es liberado reductivamente como sulfuro, mediante un sistema de heterodisulfuro reductasas (Dahl y col., 2005). El sistema completo de transporte de sulfuros, polisulfuros o polisulfanos periplásmicos al citoplasma (Figura 1) fue denominado sistema de transporte de sulfuro (SCS) por Brüser y colaboradores (2000).

El sulfuro liberado en el citoplasma sirve como sustrato para la actividad catalítica (Figura 1) de una sulfito reductasa reversa (SRR). En la bacteria *Allochromatium vinosum* se encuentra el operón *dsr* que contiene los genes de una sulfito reductasa disimilatoria, y también para una heterodisulfuro reductasa, que apoya el modelo SCS. Además, en este microorganismo se comprobó que la SRR es esencial para la oxidación de azufre almacenado en el periplasma (Pott y Dahl, 1998).

Así, el azufre sulfano liberado del tiosulfato es oxidado en el citoplasma, a partir de sulfito mediante una vía paralela a la existente en el periplasma (Figura 1; Brüser y col., 2000). La oxidación de sulfito en el citoplasma es dependiente de AMP y se realiza en dos etapas. Primeramente se forma adenosina-5'-fosfosulfato (o adenililsulfato, APS) mediante la acción de una APS reductasa reversa (Figura 1). El aceptor de los electrones generados por la APS reductasa reversa no es conocido, aunque se piensa que los electrones podrían pasar directamente a las quinonas de la membrana citoplasmática (Brüser y col., 2000).

El sulfato es liberado de la APS por la acción de una ATP-sulfurilasa o bien una adenilil: fosfato adenil transferasa (APAT, Figura 1). La ATP-sulfurilasa transferiría el pirofosfato al grupo AMP del APS generando ATP y sulfato. Por su parte, la APAT transfiere el AMP del APS a un fosfato, generando ADP y sulfato como productos de la reacción. Aparentemente, ambas enzimas son activas al mismo tiempo y sin que esto signifique una pérdida de eficiencia (Brüser y col., 2000).

### **1.2.2. Vía del tetrionato**

La vía del tetrionato se ha postulado para tiobacilos aerobios autótrofos agrupados en las  $\gamma$ -proteobacterias y para autótrofos facultativos de la clase  $\alpha$ -proteobacterias. La evidencia más fuerte a favor de la existencia de esta vía es que, previo a la oxidación del tiosulfato, aparecen cantidades estequiométricas de tetrionato (Kelly y col., 1997). Al parecer la funcionalidad del sistema está relacionada al pH del medio. Así, en *A. vinosum* la formación de tetrionato es mucho mayor cuando crece en condiciones ácidas (Hensen y col., 2006).

La tiosulfato deshidrogenasa (TD, Figura 2) responsable del fenómeno, se purificó de varios tiobacilos para los cuales se ha postulado la vía del tetrionato. La localización celular de la enzima TD es periplásmica (Visser y col., 1996).

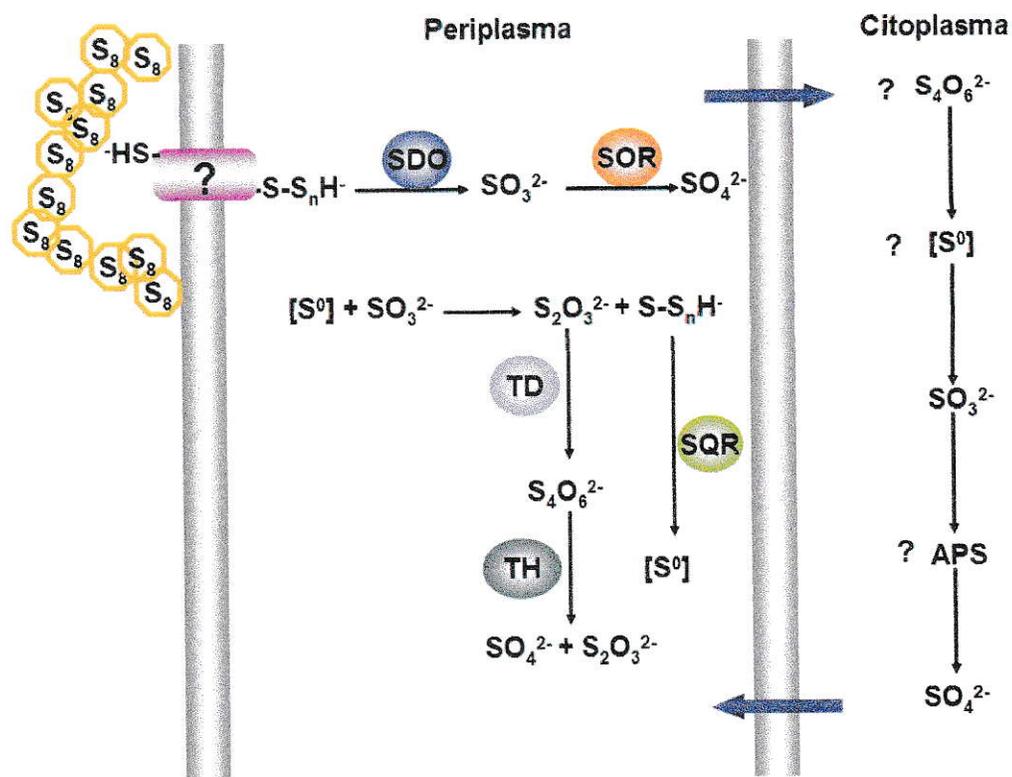
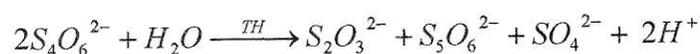


Figura 2. Modelo de oxidación del azufre siguiendo la vía del tetrionato. El azufre elemental es activado e introducido de forma desconocida al periplasma (?). La azufre dioxigenasa (SDO) oxida los polisulfuros hasta sulfito y éste, puede ser oxidado hasta sulfato por la enzima sulfito oxidoreductasa (SOR) o bien reaccionar con otras especies de azufre para generar tiosulfato. La enzima tiosulfato deshidrogenasa (TD) oxida el tiosulfato y genera tetrionato que, a su vez, es oxidado hasta sulfato y tiosulfato por la tetrionato hidrolasa (TH). Los polisulfuros o politionatos serían oxidados por la sulfuro: quinona oxidoreductasa (SQR). Si el tetrionato es transportado hasta el citoplasma, su oxidación seguiría un mecanismo similar a la vía ramificada del tiosulfato. Las flechas negras indican reacciones enzimáticas, mientras que las azules el movimiento de las moléculas.

La enzima que metaboliza el tetrionato, la tetrionato hidrolasa (TH, Figura 2) ha sido purificada y caracterizada (De Jong y col., 1997; Bugaytsova y Lindstrom, 2004).

La TH cataliza la siguiente reacción:



La oxidación del azufre elemental podría estar asociada a una cadena transportadora de electrones en la membrana, aunque la oxidación de éste es rara en microorganismos de la vía del tetrionato (Kelly, 1999).

Por mucho tiempo se pensó que algún tiol orgánico, como glutatión o ácido lipoico estaría involucrado en la oxidación del azufre en los tiobacilos. Se cree que el azufre reacciona con el tiol orgánico y de esta manera se inicia su oxidación (Stuedel y col., 1987; Pronk y col., 1990). Recientemente, se describió la actividad de una azufre dioxigenasa que requiere de glutatión para llevar adelante la oxidación de azufre elemental, el producto de su actividad es sulfito (Rohwerder y Sand, 2003).

En las bacterias con la vía ramificada de oxidación del tiosulfato, el azufre almacenado consiste en polisulfuros orgánicos (Prange y col., 1999), mientras que en bacterias de la vía del tetrionato éste se encuentra principalmente como politionatos y algo de azufre elemental (Prange y col., 2002). Esto indicaría que la oxidación del azufre elemental se realiza de forma diferente entre las especies de la vía ramificada del tiosulfato y las bacterias acidófilas poseedoras de la vía del tetrionato.

Se han descrito dos proteínas sulfuro: quinona oxidoreductasas (SQR) en los miembros autótrofos quimiolitótrofos oxidadores de azufre (Figura 2). Ambas son citocromos tipo C. Entonces, la oxidación del sulfuro podría ocurrir en el periplasma, del mismo modo que en la vía ramificada de oxidación del tiosulfato (Brüser y col., 2000).

En *A. ferrooxidans*, el primer producto de oxidación (dependiente de glutatión) del azufre es sulfito (Figura 2). La evidencia experimental indica que el sulfito es un intermediario en la oxidación del azufre en microorganismos con la vía del tetrionato (Brüser y col., 2000; Rohwerder y Sand, 2003). Posiblemente los tiobacilos acidófilos

## Introducción



poseen una enzima que oxida sulfito a sulfato (SOR), que se localizaría en el periplasma (Figura 2; Sugio y col., 1992; Rohwerder y Sand, 2003).

La dependencia de glutatión por parte de la azufre dioxigenasa indica la existencia de un mecanismo de activación previa a la oxidación del azufre (Figura 2), aún desconocido.

Si los polisulfuros se forman a partir del azufre elemental, entonces la vía del tetrionato puede semejar a la vía ramificada de oxidación del tiosulfato. Las sulfito reductasas periplásmicas adicionales podrían indicar que el sulfito se forma allí o se transporta hasta ese lugar (Brüser y col., 2000).

Las células poseedoras de la vía del tetrionato han mostrado ser capaces de oxidar rápidamente los sulfuros (Pronk y col., 1990).

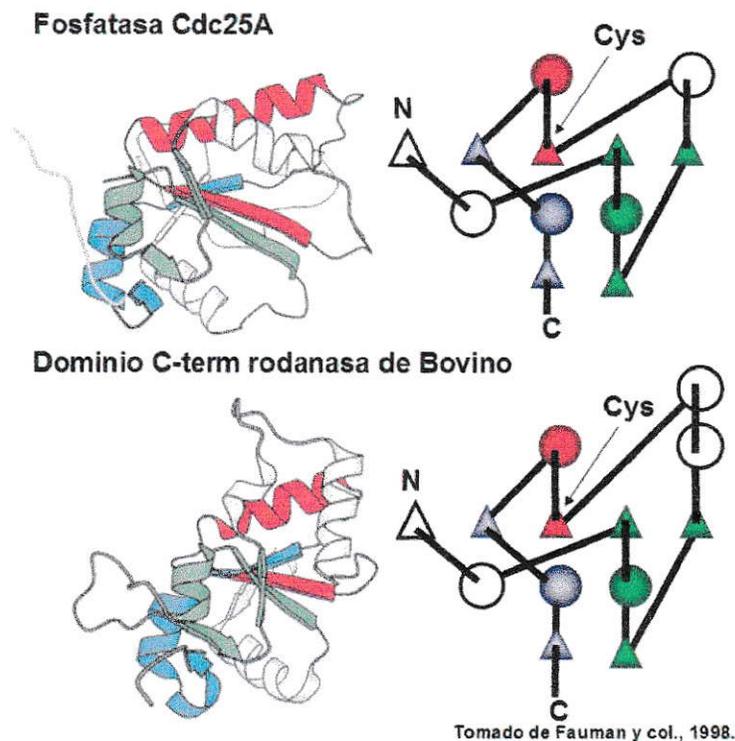
Finalmente, las mayores diferencias entre la vía ramificada y la del tetrionato, parecen estar dadas por el medio en el cual los microorganismos habitan ya que los mecanismos de oxidación son semejantes, pero se desconoce si esta semejanza incluye el origen de las proteínas que participan.

La información sobre TR y TST es escasa para la vía del tetrionato, aunque en el caso de las TST se ha reportado actividad en *A. ferrooxidans* y posteriormente fue clonado un gen que codificaría para una enzima con el dominio de proteína característico (Gardner y Rawlings, 2000; Ramírez y col., 2002).

### **1.3 La superfamilia rodanasa fosfatasa Cdc25**

La superfamilia de las rodanasas y fosfatasas tipo Cdc25 poseen un módulo estructural conservado. Los genes que las codifican están ampliamente distribuidos entre

los seres vivos (Bordo y Bork, 2002). Estructuralmente, este módulo consta de un lazo como sitio activo y dos motivos estructurales conservados, denominados CH2A y CH2B (Fauman y col., 1998). CH2A consiste en estructura en forma de lámina-hélice-lámina, mientras que CH2B está formada por una lámina  $\beta$  seguida de una hélice  $\alpha$  (Figura 3)



**Figura 3.** Motivos estructurales conservados en la superfamilia rodanasa fosfatasa Cdc25. Arriba y a la de derecha se encuentran las estructuras tridimensionales de la fosfatasa Cdc25A. Abajo, el dominio C-terminal de la rodanasa de bovino. Del lado izquierdo se muestra un esquema de la estructura de las proteínas. Se destacan los motivos estructurales conservados CH2A en verde, CH2B en azul y el sitio catalítico en rojo. Además se señala la localización de la cisteína en el sitio catalítico. Tomado de Fauman y col. (1998)

El dominio rodanasa puede abarcar toda la proteína o encontrarse en combinación con otro dominio (Figura 4). En general, cuando se encuentran dos dominios rodanasa, el dominio C-terminal es activo mientras que el N-terminal es inactivo (Bordo y Bork,

2002) aunque esta regla no siempre se cumple, pudiendo encontrarse proteínas con dos dominios activos (Ravot y col., 2005).

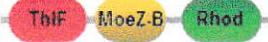
Organización de las proteínas	Secuencias
	1423
	364
	92
	75
	71
	39
	37
	33
	22
	14

Figura 4. Organización de las proteínas más representativas con dominio rodanasa, según se describen en la base de datos PFAM. Rhod, dominio rodanasa; ThiF, enzima activadora de la ubiquitina E1; MoeZ-B, dominio MoeZ/MoeB; DSPc, fosfatasa de especificidad dual; Lactamasa\_B, superfamilia de metalo-beta-lactamasas; Pyr\_Redox\_2, piridina nucleotido-disulfuro oxidoreductasa; Pyr\_Redox, Piridina nucleotido-disulfuro oxidoreductasa; Pyr\_redox\_dim, Piridina nucleotido-disulfuro oxidoreductasa (dominio de dimerización); HTH, proteína reguladora bacteriana (familia *arsR*); M-inducer\_phosp, fosfatasa inductora de la mitosis; SirA, proteína tipo SirA (es un regulador de la respuesta de un sistema de dos componentes); PB4505, PB19787 y PB3352, dominios conservados de función desconocida.

La comparación de las estructuras de las rodanasas de bovino con la de *Azotobacter vinelandii* muestra que están compuestas de dos dominios rodanasa que, a pesar de la escasa similitud de las secuencias aminoacídicas, presentan una estructura tridimensional parecida (Bordo y col., 2000a). Cada dominio de la rodanasa de bovino presenta una topología  $\alpha/\beta$  (Figura 3), con láminas  $\beta$  paralelas rodeadas de hélices  $\alpha$  al modo de un sándwich (Ploegman y col., 1978; Bordo y col., 2000a). El origen de estas proteínas con dos dominios rodanasa estaría en la duplicación de los genes, donde la estructura tridimensional se mantuvo debido a la presión evolutiva (Ploegman y col., 1978).

Se observó que también en las fosfatasas Cdc25A y Cdc25B tenían una igual estructura tridimensional igual a las rodanasas (Figura 3). Además, en el sitio catalítico se encuentra una Cys en una posición conservada. El sitio catalítico de las fosfatasas está formado por un lazo de 7 residuos aminoacídicos, mientras que en las rodanasas se encuentran seis residuos. Esto permitiría acomodar un átomo de fósforo en las fosfatasas o uno de azufre en las rodanasas (Reynolds y col., 1999).

Las proteínas con un solo dominio rodanasa también presentan sitios catalíticos activos con un lazo de seis residuos. Tal es el caso de la GlpE y PspE de *E. coli*, que poseen actividad tiosulfato azufre transferasa y un único dominio rodanasa (Spallarossa y col., 2001; Adams y col., 2002). Además, se demostró que la eliminación del dominio rodanasa N-terminal de la RhdA de *A. vinelandii* no afectó el plegamiento ni la catálisis del dominio C-terminal activo (Melino y col., 2004).

La amplia distribución del dominio rodanasa entre los seres vivos y la variedad de combinaciones en las que se encuentra sugieren una gran versatilidad bioquímica que le permite participar en muchos y variados procesos biológicos.

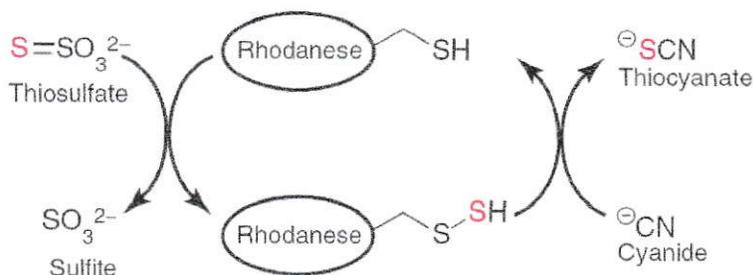
### **1.3.1. Actividad enzimática de las proteínas rodanasa**

Las proteínas de la familia de las rodanasas están caracterizadas como proteínas que transfieren un átomo de azufre desde una molécula dadora hasta otra receptora (Westley y col., 1983). Las actividades enzimáticas mejor conocidas son las tiosulfato: azufre transferasas (TST) y las mercaptopiruvato: azufre transferasas (MST). Aunque menos estudiado, también son capaces de realizar la transferencia de otros tipos de átomos como selenio, arsénico o fósforo. En la mayoría de las rodanasas se desconocen los sustratos naturales, razón por la cual la determinación de sus funciones fisiológicas sigue siendo especulativa.

#### **1.3.1.1. Tiosulfato: azufre transferasas**

Estas rodanasas catalizan la transferencia de un átomo de azufre sulfano desde el tiosulfato a una molécula de cianuro generando tiocianato y sulfito como productos (Figura 5) se conocen como tiosulfato: azufre transferasas.

También pueden utilizar tiosulfanos ( $\text{RSO}_2\text{S}^-$ ), polisulfuros ( $\text{RSS}^-$ ) y tiocisteínas como dadores de átomos de azufre y como aceptores de átomos de azufre, sulfito, sulfinatos y compuestos tiólicos (Abdolrasulnia y Wood, 1979; Westley, 1981).



**Figura 5.** Mecanismo de la actividad *in vitro* tiosulfato: azufre transferasa. El átomo de azufre sulfano del tiosulfato se une transitoriamente a la cisteína del sitio activo de la rodanasa. Finalmente, el azufre sulfano se transfiere a una molécula aceptora, en este caso el cianuro. Tomado de Mueller (2006).

Datos de cinética enzimática mostraron que la catálisis se realiza por un mecanismo de doble desplazamiento, mediante un enlace covalente entre el azufre del grupo sulfhidrilo de la cisteína en el sitio catalítico y el azufre sulfano del dador (Figura 5). En esta etapa se produce la liberación del primer producto de la reacción, el sulfito. Seguidamente, la enzima persulfurada se une al aceptor del átomo de azufre y le transfiere el azufre sulfano, formando el segundo producto de la reacción, tiocianato (cuando se emplea cianuro como aceptor *in vitro* del azufre, Figura 5). De este modo, la enzima pasa de un estado libre de azufre a un intermediario persulfurado y luego a la forma libre inicial (Westley y Schlesinger, 1974; Westley y Heyse, 1971).

El análisis de la estructura, así como estudios con inhibidores demostró la participación de las cargas positivas de los residuos de aminoácidos en el sitio catalítico para la unión del sustrato cargado negativamente (Westley y Heyse, 1971; Ploegman y col., 1978). Los aminoácidos Arg 186 y Lys 249 de la TST de bovino, podrían otorgar la carga positiva necesaria para la unión del tiosulfato y posteriormente, ayudar a polarizar el enlace S-S del tiosulfato a fin de facilitar la captura del azufre por un grupo

nucleofílico, en este caso el sulfhidrilo de la Cys 247 presente en el sitio catalítico (Ploegman y col., 1978). Además, con proteínas mutantes se demostró la relación entre la disminución de la actividad enzimática y la sustitución de la Arg 186, lo que resaltó su importancia en la catálisis (Weng y col., 1978).

Además de la TST de bovino, otras rodanasas se encontraron en diferentes tejidos de animales, plantas y en diversas especies de bacterias. En el caso de *Arabidopsis thaliana* las búsquedas en su genoma dieron por resultado 18 genes que codificarían para proteínas con dominios rodanasa (Hatzfeld y Saito, 2000). Tres de los productos génicos se caracterizaron como TST con un solo dominio de proteína (Hatzfeld y Saito, 2000; Bauer y Papenbrock, 2002). Se han identificado otras rodanasas, sean los genes o las proteínas, desde diferentes microorganismos como *Azotobacter vinelandii* (Colnaghi y col., 1996; Bordo y col., 2000a), *Acinetobacter calcoaceticus* (Aird y col., 1987), *Pseudomonas aeruginosa* (Cipollone col., 2006) y *E. coli* (Alexander y Volini, 1987).

El gen *rhda* de *A. vinelandii* codifica para una proteína con dos dominios rodanasa, organización que comparte con la TST de bovino la que exhibe 22 % de similitud de secuencia aminoacídica. La comparación de las estructuras cristalinas de la Rhda y la TST de bovino muestran la conservación de la estructura tridimensional así como de la Cys del sitio activo, no así otros componentes del sitio catalítico (Colnaghi y col., 1996; Bordo y col., 2001).

En *E. coli*, los trabajos con el regulón *glp* demostraron que el gen *glpE* codifica para una rodanasa de 12 kDa (Ray y col., 2000). Además, se demostró que la proteína GlpE posee actividad TST y que utiliza el mismo mecanismo de doble desplazamiento empleado por la TST de bovino. Aunque la similitud de secuencias de las GlpE y la TST

de bovino es baja, la estructura tridimensional está conservada tanto con respecto a la rodanasa de bovino como en la RhdA de *A. vinelandii* (Bordo y col., 2000a; Spallarossa y col., 2001). El rol fisiológico de la GlpE no ha sido esclarecido. En el trabajo de Ray y col. (2000) se mostró que podría interaccionar con tioredoxina 1 como aceptor de átomos de azufre, indicando la posibilidad que proteínas similares podrían ser sustratos de la GlpE.

### 1.3.1.2. Mercaptopiruvato: azufre transferasas

La mercaptopiruvato: azufre transferasa (MST) es una enzima miembro de la familia de las transferasas. Esta enzima utiliza 3-mercaptopiruvato como el dador de azufre, en lugar del tiosulfato. Los aceptores del átomo de azufre pueden ser cianuro, tioles, sulfito y sulfinato (Roy y Trudinger 1970; Jarabak, 1981). La reacción catalizada es la siguiente:



Aunque la MST fue descubierta en 1953, el progreso en su estudio ha sido mucho menor que el de su contraparte TST debido a la inestabilidad del sustrato (Wood y Fiedler, 1953). Del mismo modo que la actividad TST, las MSTs se encuentran ampliamente diseminadas entre los seres vivos.

La MST de rata se purificó (Nagahara y col., 1995) y estudios posteriores con la enzima recombinante lograron su caracterización enzimática (Nagahara y Nishino, 1996). La comparación de secuencias de las proteínas TST de bovino y la MST de rata mostró un 60 % de identidad (Nagahara y Nishino, 1996). La conservación es mayor en el sitio catalítico. Así, se encuentra la Cys 246 activa y la Arg 185, según la numeración

relativa a la TST. No obstante, otros residuos importantes como la Arg 247 y Lys 248 en la TST, son reemplazados por Gly y Ser en la MST.

Se demostró, con mutaciones en el sitio activo, que una TST puede ser parcialmente convertida a MST mediante sustituciones de los residuos de Arg y Lys por Gly y Ser respectivamente (Nagahara y col., 1995). Por su parte, las MST pueden disminuir su actividad MST y aumentar la TST luego de sustituir los residuos de Gly y Ser por los de Arg y Lys (Nagahara y Nishino, 1996). En base estos antecedentes, se puede concluir que las TSTs y MSTs son interconvertibles en su actividad enzimática y que ésta, a su vez, está influenciada por ciertos residuos presentes en el sitio catalítico que determinan la selección del sustrato (Nagahara y col., 1995).

Se identificaron y caracterizaron otras MSTs en *A. thaliana*. Una de ellas se encuentra localizada en el citoplasma, mientras que la otra es mitocondrial (Nakamura y col., 2000; Papenbrock y Schmidt, 2000).

La MST de *E. coli* se caracterizó bioquímicamente en un primer momento y posteriormente se determinó que el gen *sseA* era responsable de codificar la proteína (Vachek y Wood, 1972; Hama y col., 1994). La SseA presenta el motivo CSGVTA en el sitio catalítico, el cual es idéntico al encontrado en eucariontes, sugiriendo que este motivo favorece la unión del 3-mercaptopiruvato en lugar de tiosulfato (Colnaghi y col., 2001).

### **1.3.2. Papel fisiológico propuesto para las rodanasas**

Se han realizado muchos estudios sobre la cinética de azufre transferasas de diferentes organismos. Sin embargo, la función fisiológica de la mayoría de éstas

permanece desconocida. Se especula que estarían involucradas en la destoxificación del cianuro, la formación de cofactores que contienen azufre, formación o reparación de los grupos Fe-S, biosíntesis de tionucleótidos, metabolismo del selenio y metabolismo disimilatorio del azufre.

#### **1.3.2.1. Biosíntesis de cofactores que contienen azufre**

Algunas de las moléculas más importantes que contienen azufre, por ejemplo la tiamina, la biotina, la molibdopterina y el ácido lipoico, son moléculas importantes para los seres vivos, ya que están involucradas en actividades enzimáticas clave. Aunque se han estudiado en profundidad las vías de biosíntesis de estos cofactores, algunos aspectos continúan desconocidos, como el mecanismo por el cual el azufre es incorporado en algunos de ellos.

La presencia de un dominio rodanasa en la región C-terminal de la ThiI de *E.coli*, una enzima requerida para la síntesis de tiamina y tionucleótidos, y en MoeB, una sulfurasa sintasa de molibdopterina ampliamente distribuida entre los seres vivos, indican que las rodanasas están involucradas en la biosíntesis de estos cofactores.

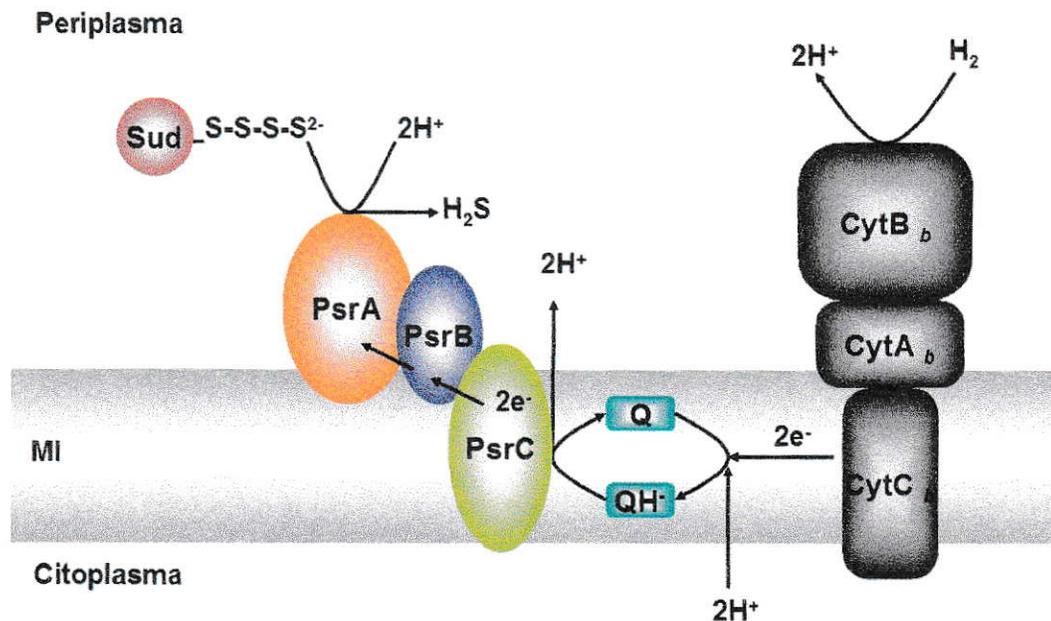
Un componente del complejo vitamínico B es la tiamina o vitamina B1. La tiamina es precursora de la tiamina pirofosfato, un cofactor de enzimas involucradas en la transquetolación de carbohidratos y decarboxilación de  $\alpha$ -ceto ácidos (Kluger, 1987) el metabolismo de carbohidratos y la síntesis de la cadena lateral de los aminoácidos (Begley y col., 1999; Xi y col., 2001).

### 1.3.2.2. Las rodanasas y el metabolismo disimilatorio del azufre

Diversos autores han teorizado respecto a la participación de rodanasas en el metabolismo disimilatorio del azufre en bacterias, proponiendo varios modelos donde es posible su participación.

La proteína periplasmática Sud de *Wolinella succinogenesis* es una rodanasa con actividad polisulfuro: azufre transferasa (Kreis-Kleinschmidt y col., 1995). Sud se relaciona con la obtención de energía al participar en el acoplamiento de la fosforilación oxidativa con la reducción del azufre (Figura 6). La proteína es capaz de unir moléculas de polisulfuros de más de diez átomos. Se postula que transfiere o expone la cadena  $S_nS^{2-}$  al sitio activo de la polisulfuro reductasa (Klimmek y col., 1998).

La polisulfuro reductasa es un complejo conformado por PsrA, PsrB y PsrC. La PsrC es el componente hidrofóbico del complejo. Su función consiste en traspasar los electrones desde las quinonas reducidas a PsrB y al mismo tiempo expulsar  $2H^+$  al medio externo. PsrB es una proteína con grupos Fe-S, que es un intermediario en el traspaso de los electrones desde PsrC hasta PsrA (Figura 6). Finalmente, PsrA, una molibdo proteína que reduce secuencialmente los átomos de azufre del polisulfuro hasta  $H_2S$  (Figura 6) (Dietrich y Klimmek, 2002; Prisner y col., 2003; Lin y col., 2004).



Adaptado de Dietrich y Klimmek (2002) y Laska y col. (2003)

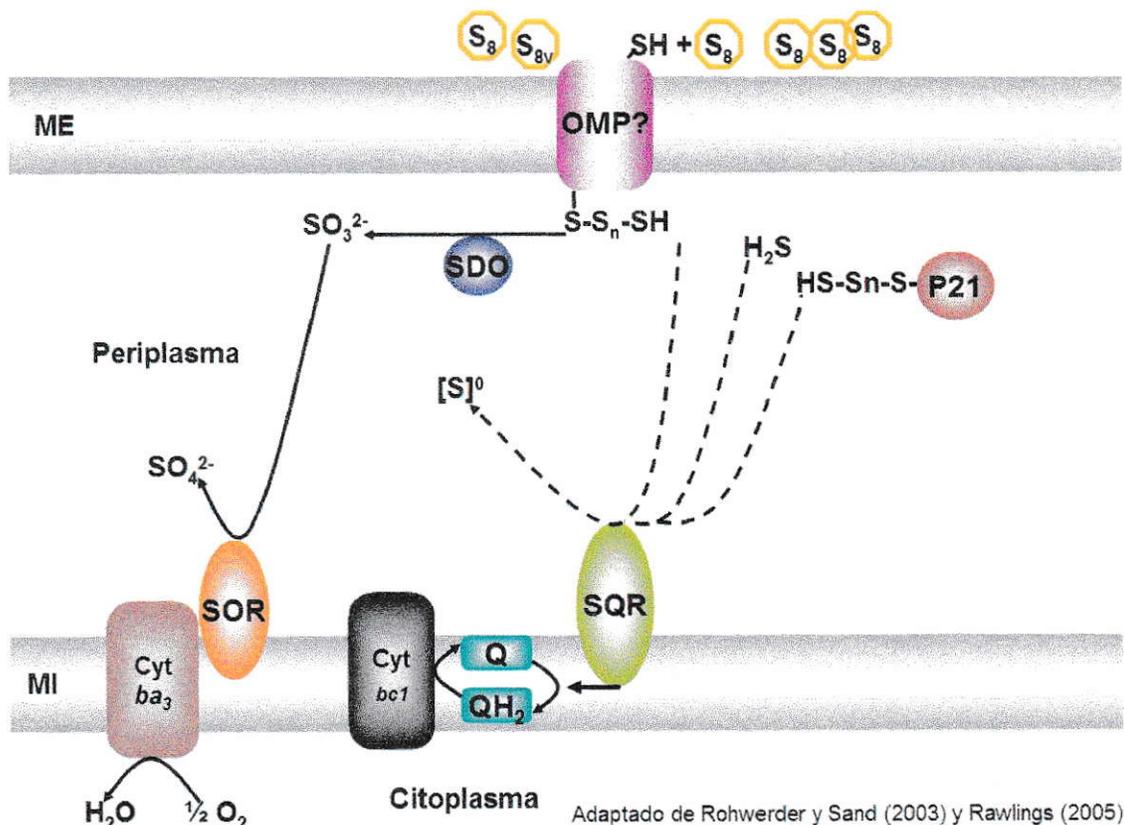
**Figura 6.** Modelo del metabolismo disimilatorio del azufre en *Wolinella succinogenes*. La utilización del azufre se inicia con la captura de electrones del  $H_2$  por un citocromo tipo *b* y finaliza con la liberación de  $H^+$  y  $H_2S$  en el periplasma. Sud, polisulfuro; azufre transferasa; PsrA, molibdo proteína de la polisulfuro reductasa; PsrB proteína con grupos Fe-S de la polisulfuro reductasa; PsrC, proteína de membrana de la polisulfuro reductasa; Q y QH-, quinolonas en estado oxidado y reducido respectivamente; CytB<sub>b</sub>, A<sub>b</sub> y C<sub>b</sub> citocromos tipo b; MI, membrana interna.

La estructura tridimensional de la polisulfuro: azufre transferasa corresponde a un dímero de dos subunidades idénticas de 15 kDa. El sitio de unión del sustrato posee carga positiva proporcionada por los residuos de Arg46, Arg67' (de la subunidad adyacente), Lys90 y Arg94, lo que le permite interactuar con el polisulfuro cargado negativamente. Posee un solo residuo de cisteína (Cys89) localizado en el sitio catalítico, que junto con los demás residuos Arg46, Arg67, Lys90 y Arg94 son esenciales para la actividad enzimática (Lin y col., 2004). La localización relativa de dichos residuos está conservada entre las rodanasas.

En la bacteria acidófila *Acidithiobacillus ferrooxidans* se identificó una proteína de 21 kDa (P21) cuyo nivel aumenta cuando el microorganismo es crecido en presencia de azufre elemental y sus compuestos reducidos comparadas con las células crecidas en presencia de  $\text{Fe}^{2+}$  (Ramírez y col., 2002; Ramírez y col., 2004). La proteína P21 se identificó como un miembro de la familia de las rodanasas. Esta proteína posee una señal de exportación tipo Sec, que permite su exportación al espacio periplásmico (Ramírez y col., 2002). El gen *p21* forma parte de una unidad transcripcional donde se encuentran otros genes posiblemente implicados en la oxidación del azufre (Acosta y col., 2005).

La proteína recombinante P21 no mostró actividad azufre transferasa, aunque las condiciones fisiológicas y de estudio utilizadas no parecen compatibles entre sí (Ramírez y col., 2002). Se puede especular que tiene una función similar a la Sud de *W. succinogenes*, transfiriendo moléculas de polisulfuros a enzimas capaces de oxidarlo como la SQR (Figura 7). Otro estudio demostró la presencia de polisulfuros en el periplasma de *A. ferrooxidans* durante la oxidación del azufre elemental (Prange y col., 2002).

Asimismo se determinó que la enzima azufre dioxigenasa (SDO) de *A. ferrooxidans* requería de la presencia de un polisulfuro orgánico para oxidar el azufre hasta sulfito. Este hecho da pie a pensar en la necesidad de un sistema que permita la internalización del azufre elemental insoluble en forma de un sulfuro soluble mediante la acción de una o varias proteínas especializadas (Figura 7; Rhowerder y Sand, 2003).



**Figura 7.** Esquema simplificado del metabolismo disimilatorio del azufre en *A. ferrooxidans*. S<sub>8</sub>, azufre elemental; OMP?, proteína de membrana externa; SDO, azufre dioxigenasa; Cyt *ba*<sub>3</sub>, citocromo tipo *ba*<sub>3</sub>; SOR, sulfito: oxidoreductasa; SQR, sulfuro: quinona oxidoreductasa; Cyt *bc*<sub>1</sub>, citocromo tipo *bc*<sub>1</sub>; P21, rodanasa P21; MI, membrana interna; ME, membrana externa; Q y QH<sub>2</sub>, quinonas oxidada y reducida respectivamente. Las líneas continuas representan las reacciones posibles *in vivo*, mientras que las discontinuas representan reacciones hipotéticas.

El sulfito generado por la SDO puede ser oxidado hasta sulfato por la acción de la SOR la cual transferiría los electrones hasta un citocromo *ba*<sub>3</sub> que se encargaría de la reducción final del oxígeno (Rawlings, 2005).

Asimismo, tanto sulfuros como polisulfuros podrían ser oxidados por la SQR dando lugar a [S]<sup>0</sup>. Los electrones serían utilizados para reducir las quinonas, que a su vez, los traspasan a un complejo de citocromo *bc*<sub>1</sub>. El [S]<sup>0</sup> producido no precipita como S<sup>8</sup>,

posiblemente, debido a la intervención de otras enzimas. Haciendo un paralelo con la Sud de *W. succinogenes*, la fuente de los polisulfuros podría implicar la participación de la rodanasa P21.

El complejo  $bc_1$  recibe los electrones de las quinonas reducidas y los transfiere hasta una oxidasa terminal. Es posible que un citocromo *c* y una proteína Fe-S de alto potencial traspasen los electrones hasta la oxidasa, donde tiene lugar la reducción del oxígeno (Bruscella y col., 2007).

Aunque muchas proteínas involucradas en la oxidación del azufre y sus compuestos reducidos han sido identificadas, aún no se comprende la relación que existe entre las actividades que realizan. Esto se debe, en gran parte, a la dificultad de trabajar a nivel genético con *A. ferrooxidans*.

### 1.3.2.3. Tionucleósidos en los RNA de transferencia

Hasta el momento, se conocen 10 nucleótidos modificados con azufre, de los cuales la 4-tiouridina ( $s^4U$ ), la 2-tiocitosina ( $s^2C$ ), la 5-metilaminometil-2-tiouridina ( $mm^5s^2U$ ) y la 6-N-dimetil-2-metiltioadenosina ( $ms^2i^6A$ ) se encuentran en *E. coli*.

La formación de la  $s^4U$  requiere de las enzimas IscS y ThiI. El proceso consiste en la formación de una cisteína persulfurada en el sitio activo de la IscS, la cual es luego transferida a la cisteína 456 del sitio activo rodanasa de ThiI (Mueller y col., 1998; Kambampati y Lauhon, 1999). Los estudios con mutantes de sustitución demostraron que la Cys 456 presente en el sitio activo del dominio rodanasa de la ThiI es esencial para la actividad enzimática (Palenchar y col., 2000, Mueller y col., 2001). El

mecanismo *in vivo* por el cual la proteína ThiI con el enlace de disulfuro interno se reactiva mediante reducción es desconocido (Mueller, 2006)

#### 1.3.2.4. Formación de grupos Fe-S

Los centros Fe-S se encuentran en proteínas que cumplen funciones como la transferencia de electrones, reacciones enzimáticas de oxidoreducción, reacciones que no involucran oxidoreducción y procesos de censado (Beinert y col., 1997). Los grupos Fe-S más comunes son los tipos [2Fe-2S] y [4Fe-4S].

Existen tres vías principales para el ensamblado de centros Fe-S; *nif*, *isc* y *suf*. Las tres vías son el resultado de la diversificación desde una vía ancestral más general.

Las proteínas NifS y NifU están relacionadas con el ensamblado de los grupos Fe-S de la nitrogenasa de *A. vinelandii* (Jacobson y col., 1989). En este caso, la vía *nif* se inicia con la cisteína desulfurasa NifS, que cataliza la transferencia de un átomo de azufre desde la L-cisteína hasta una cisteína conservada en su sitio activo, creando de este modo un residuo persulfurado que sirve como dador de azufre para la síntesis del grupo Fe-S (Zheng y col., 1993; Zheng y Dean, 1994; Zhen y col., 1994). La proteína NifU sirve como andamio para la formación del grupo Fe-S recibiendo los átomos de azufre de NifS (Yuvaniyama y col., 2000). Además, NifU posee un centro Fe-S que permitiría estabilizar el centro Fe-S de la nitrogenasa mientras se forma. El dominio N-terminal de NifU es similar a la proteína IscU de la vía *isc*.

Bajo condiciones reductoras, posiblemente generada por una ferredoxina, el azufre persulfuro se libera desde NifS y se combina con la fuente de Fe y genera el grupo Fe-S para la nitrogenasa.

Por otra parte, el sistema *isc* a diferencia del sistema dedicado a la maduración de la nitrogenasa Nif, posee un espectro más amplio en la biosíntesis de grupos Fe-S (Nakamura y col. 1999). El grupo de genes que codifican las proteínas Isc en *A. vinelandii*, *E. coli*, *Haemophilus influenzae* y *Pseudomonas aeruginosa* está compuesto de *iscR*, *iscS*, *iscU*, *iscA*, *iscB*, *hscB*, *hscA* y *fdx* (Zheng y col., 1998). Sus genes homólogos se encuentran en todos los genomas bacterianos, lo que indica que los productos génicos *isc* son importantes en todos ellos. IscS es homóloga a NifS y muestra actividad cisteína desulfurasa con un mecanismo general de reacción similar de transferencia del azufre desde la cisteína hasta el sitio blanco. El papel de IscS no solo se limitaría al ensamblado de los grupos Fe-S, sino que se extiende a proveer de azufre para la biosíntesis de tiamina, molibdopterina y tionucleótidos (Lauhon y Kambampati, 2000; Lauhon, 2002; Kambampati y Lauhon, 2003).

Por su parte, la proteína IscU presenta similitud con el dominio N-terminal de NifU. Así mismo, IscU sirve de andamio para el ensamblaje del grupo Fe-S. Las proteínas NifA e IscA podrían servir también como base para el ensamblado del grupo Fe-S (Zheng y col., 1998).

### **1.3.3. Rodanasas de *E. coli***

En *E. coli* se encuentran 9 genes que codifican para proteínas con dominio rodanasa (Tabla 2). Los productos génicos GlpE, PspE, ThiI y YibN (Ray y col., 2000, Palenchar y col., 2000; Adams y col., 2002; Ahmed, 2003) poseen actividad TST y una de ellas, la SseA, posee actividad MST (Colnaghi y col, 2001).

Las proteínas GlpE y PspE se han purificado y estudiado en detalle. La proteína GlpE es una proteína soluble del citoplasma y el gen que lo codifica forma parte del regulón *glp* de *E. coli*. Por su parte el gen que codifica para la proteína PspE se encuentra en el operón de estrés por fago *psp* de *E. coli* (Brissette y col., 1991; Model y col., 1997). La proteína PspE es exportada al periplasma mediante el sistema Sec.

Cuando las proteínas PspE y GlpE fueron purificadas se encontraban tanto en forma de moléculas libres de azufre como persulfuradas. Los estudios de inhibición de la actividad TST con aniones mostraron que la PspE es más sensible que la GlpE.

Tabla 2. Rodanasas de *E. coli*.

<b>Proteína</b>	<b>Actividad Enzimática</b>	<b>Función</b>
GlpE <sup>a</sup>	Tiosulfato: azufre transferasa	<b>Desconocida</b>
SseA <sup>b</sup>	Mercaptopiuvato: azufre transferasa	<b>Desconocida</b>
PspE <sup>c</sup>	Tiosulfato: azufre transferasa	<b>Desconocida</b>
YceA <sup>d</sup>	Desconocida	<b>Permite el crecimiento a temperaturas superiores a 30 °C</b>
YnjE <sup>d</sup>	Desconocida	<b>Desconocida</b>
YgaP <sup>e</sup>	Tiosulfato: azufre transferasa	<b>Desconocida</b>
YbbB <sup>f</sup>	Seleno transferasa	<b>Síntesis 4-selenouridina</b>
YibN <sup>d</sup>	Desconocida	<b>Desconocida</b>
ThiI <sup>g</sup>	Azufre transferasa tiamina y 4-tiouridina	<b>Síntesis de tiamina y 4-tiouridina</b>

En las columnas se indican el nombre de proteínas, la actividad enzimática descrita y la posible fusión fisiológica, si se conoce. a, Ray y col. (2000); b, Spallarossa y col. (2003); c, Adams y col. (2002); d, Jutabha (2001); e, Hamed (2003); f, Wolfe y col. (2003) y g, Palenchar y col. (2000).

#### **1.4 La bacteria *Acidithiobacillus ferrooxidans***

*Acidithiobacillus ferrooxidans* es una  $\gamma$  proteobacteria acidófila (pH 2-5), considerada como autótrofa obligada, capaz de utilizar el ión ferroso y una variedad de compuestos reducidos de azufre como dadores de electrones y oxígeno como el aceptor final de los mismos. Crece bien en aerobiosis pero puede hacerlo también en anaerobiosis utilizando el ión férrico como aceptor de electrones y compuestos reducidos de azufre como dadores (Rawlings, 2002). Además, esta bacteria posee un metabolismo muy versátil que le permite fijar carbono mediante el ciclo de Calvin y, en condiciones de microaerofilia, fijar nitrógeno (Mackintosh, 1978).

Por mucho tiempo se pensó que *A. ferrooxidans* era la principal bacteria en los procesos de biominería realizados a menos de 40 °C. Actualmente, se sabe que esta bacteria no es favorecida en su crecimiento donde el ión férrico es más abundante que el ferroso. No obstante, continúa como un actor importante en aquellas operaciones de biominería de uranio, cobre y, en general, donde las concentraciones de ión ferroso son superiores a las de su contraparte oxidada (Rawlings y col., 1999).

##### **1.4.1. Oxidación de azufre y sus compuestos reducidos por *A. ferrooxidans***

La oxidación de azufre elemental y sus compuestos reducidos toma componentes de la vía ramificada de oxidación del tiosulfato y la vía del tetrionato. Aunque, es la bacteria mejor documentada, no hay pruebas de la interacción que pudiera existir entre los componentes que participarían en la oxidación del azufre y que, en último término, defina una vía de oxidación disimilatoria del azufre.

La primera reacción enzimática para la oxidación de azufre elemental está a cargo de enzima azufre dioxigenasa (SDO), la cual se ha detectado en bacterias del género *Acidithiobacillus*, así como en otras bacterias quimiolitótrofas (Rhowerder y Sand, 2003). Antes de ser oxidado, el azufre elemental debe ser transportado hasta el periplasma de la bacteria y por lo tanto, se piensa que existe una proteína localizada en la membrana externa y que posee grupos tioles capaces de atacar el anillo formado por azufre elemental y transportarlo hacia el periplasma en forma de una cadena de polisulfuro (Figura 8; Rhowerder y Sand, 2003). El polisulfuro sería oxidado a sulfito por la SDO y posteriormente, el sulfito sería oxidado a sulfato por la enzima sulfito: aceptor oxidoreductasa (SOR) reduciendo un citocromo (Figura 8; Hooper y DiSpírito, 1985; Rohwerder y Sand, 2003, Quatrini y col., 2006). La SOR se localizaría en la cara periplasmática de la membrana interna (Brüser y col., 2000).

Además de la oxidación de azufre elemental y de sulfito, se ha detectado la oxidación mediada por enzimas del tiosulfato y del tetrionato (Figura 8). El tiosulfato es oxidado a tetrionato por la tiosulfato deshidrogenasa (TD). Esta enzima se localizaría en la cara periplásmica de la membrana interna. En el caso específico de *A. ferrooxidans* la TD está formada por la fusión de los genes *doxD* y *doxA* (Müller y col., 2004). En esta bacteria se encuentran dos copias del gen *doxDA*. Una de ellas se encuentra en el mismo operón del gen *p21* (Ramírez y col., 2002; Acosta y col., 2005).

En este contexto, cuál podría ser la función de la proteína P21? Se podría pensar que desempeña una función similar a la Sud de *W. succinogenes*, esto es, transfiriendo moléculas de polisulfuros a enzimas capaces de oxidarlo como la SQR (Figura 8). El problema más grave para la definición del rol de la proteína P21 es que no se ha



Por otro lado, el tetrionato es oxidado a tiosulfato y sulfato por la acción de la tetrionato hidrolasa (TTH; Tano y col, 1996; De Jong y col., 1997). Tanto la enzima TD como la TTH aportarían electrones para la reducción de quinonas (Hooper y DiSpirito, 1985; Quatrini y col., 2006).

Dada la gran distribución y diversidad de las rodanasas y, considerando, la participación de la proteína Sud de *W. succinogenes* en el metabolismo disimilatorio del azufre, se propone que algunas de las rodanasas de *A. ferrooxidans* podrían estar involucradas en la oxidación del azufre o bien en otros procesos relevantes para la bacteria.

En esta Tesis se estudió las rodanasas de *A. ferrooxidans* a fin de determinar el o los posibles papeles que desempeñan en su fisiología celular

## Materiales y Métodos

### Cepas bacterianas empleadas

Además de la cepa ATCC 23270 de *A. ferrooxidans*, las cepas de *E. coli* empleadas están indicadas en la Tabla 3, y los plásmidos en la Tabla 4.

Tabla 3. Cepas de *E. coli* empleadas en esta Tesis para la clonación de los genes que codifican las rodanasas de *A. ferrooxidans*. Se indican algunas de las características más relevantes y el propósito de las mismas.

Cepa	Características	Función
<i>E. coli</i> JM109	<i>endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17, relA1, supE44, Δ(lac-proAB), [F', traD36, proAB, lacIqZΔM15]</i>	Propagación de plásmidos
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	F., <i>ompT, hsdS<sub>B</sub> (r<sub>B</sub>, m<sub>B</sub>), dcm, gal, λ(DE3)</i>	Expresión de genes inducida por IPTG

Tabla 4. Plásmidos empleados en la propagación y expresión de los genes recombinantes en *E. coli*. Se indican algunas de las características más relevantes y el propósito de las mismas.

Plásmidos	Características	Función
pGEM-T Easy (Pomega®)	Vector T con resistencia a Ap	Propagación del inserto de interés
pET 21 b (+) (Novagen)	Vector de expresión, resistencia a Ap, codifica una cola de His en C-terminal	Expresión controlada de genes recombinantes
pET 28 a (+) (Novagen)	Vector de expresión, resistencia a Km, codifica una cola de His en C y N-terminal	Expresión controlada de genes recombinantes
pGEM-Tp11	Derivado del pGEM-T con el inserto p11	Propagar el inserto de interés
pGEM-Tp14.3	Derivado del pGEM-T con el inserto p14.3	Como arriba
pGEM-Tp16.2	Derivado del pGEM-T con el inserto p16.2	Como arriba
pGEM-Tp28	Derivado del pGEM-T con el inserto p28	Como arriba
pETp11	Derivado del pET 28 a (+) con el inserto p11	Expresar gen recombinante
pETp14	Derivado del pET 21 b (+) con el inserto p14	Como arriba
pETp14.3	Derivado del pET 28 a (+) con el inserto p14.3	Como arriba
pETp16.2	Derivado del pET 28 a (+) con el inserto p16.2	Como arriba
pETp28	Derivado del pET 28 a (+) con el inserto p28	Como arriba

## **Técnicas de biología molecular**

### **Extracción de DNA genómico**

Para obtener el DNA genómico de *A. ferrooxidans* se centrifugó 40 ml de un cultivo con una densidad celular de  $5 \times 10^8$  cel/ml a  $10.000 \times g$  por 10 min a 4 °C. Se lavó las células tres veces en una solución diluida de ácido sulfúrico pH 2,5. Para extraer el DNA cromosómico se usó el sistema Wizard Genomic de Promega<sup>®</sup>, siguiendo las recomendaciones del fabricante para bacterias Gram-negativas.

### **Reacción en cadena de la polimerasa**

La amplificación por PCR de los genes blanco se realizó con los partidores listados en la Tabla 5. Las reacciones de PCR se realizaron con el termociclador TGradient (Whatman Biometra<sup>®</sup>). La mezcla para la reacción de PCR contenía: 250 ng de cada partidor, 4 mM de dXTP, 5 µg de DNA cromosomal de *A. ferrooxidans* ATCC23270, DMSO 5 % y 1 U de polimerasa *Pfu* (GeneCraft<sup>®</sup>) en un volumen final de 50 µl. Durante el PCR se realizó una desnaturación inicial de 3 min a 95 °C, 20 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 52-60 °C y 30 s a 72 °C, para terminar una extensión final de 3 min a 72 °C.

### **Reacción de PCR en colonia**

Se determinó la orientación de los insertos en los clones recombinantes mediante PCR en colonia (Campbell y Choy, 2001). Se picaron colonias recombinantes al azar y se resuspendieron en 50 µl de agua. Se tomó 2 µl de la resuspensión bacteriana y se agregó la mezcla compuesta por 2 ng/µl partidor reverso de las rodanasas, 2 ng/µl del partidor T7, 0,08 mM de dXTP, 0,5 % de DMSO, 0,5X amortiguador de PCR (250 mM

KCl, 50 mM Tris-HCl pH 9,0, 0,5 % Triton X-100 y 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>) y 0,4 U de *Taq* polimerasa (Promega®). El volumen final de reacción fue 10 µl. Para evitar la variación del volumen debida a la evaporación, se adicionó una gota de aceite de silicona a cada tubo.

La reacción de PCR se realizó de la siguiente manera, 3 min a 95 °C, seguidos de 40 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C, 30 s a 72 °C, y para finalizar 3 min a 72 °C.

Tabla 5. Partidores utilizados para las reacciones de amplificación de los genes blanco en el DNA genómico de *A. ferrooxidans* y para la determinación de la orientación del inserto en los plásmidos pGEM-T, pET-21b(+) y pET-28a(+). Se indican el nombre del partidor y su secuencia nucleotídica.

<b>Partidor</b>	<b>Secuencia</b>
<b>T7</b>	<b>5'-gAAATTAATACgACTCACTAT-3'</b>
<b>p11F</b>	<b>5'-CATATgTACggATTTCAGgAAATC-3'</b>
<b>P11R</b>	<b>5'-TCAACTggACAACgTggACCAAg-3'</b>
<b>P14NTER-NdeI</b>	<b>5'-gTTTTTAgTCATATggggAAggTCATgg-3'</b>
<b>P14CTER-XhoIHT</b>	<b>5'-TAggCTCCggCTCTCgAgggAAACgAC-3'</b>
<b>P14.3F</b>	<b>5'-TCAGgTCATATgTCCCACC-3'</b>
<b>P14.3R</b>	<b>5'-CCAgCCTACgCCgAgAG-3'</b>
<b>P16.2F</b>	<b>5'-CATATgAgTACCgAAACgATTTTg-3'</b>
<b>P16.2R</b>	<b>5'-CTACTTgTTCTTCCAgggCAgg-3'</b>
<b>P28F</b>	<b>5'-CATAgAATACCCgCTCCTTT-3'</b>
<b>P28R</b>	<b>5'-TCAGgTAAggCTTTTATCCgC-3'</b>

### **Electroforesis de DNA en geles de agarosa**

El DNA se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa en amortiguador TAE 0,5X (20 mM Tris-acetato pH 8,0 y 0,5 mM EDTA). La concentración de los geles fue de 0,8 % para los amplificados por PCR y 1 % para las purificaciones de DNA. Las muestras de DNA se mezclaron con solución de carga que consistió de 0,25 % azul de bromofenol y 40 % sacarosa. La tinción se realizó durante 10 min en una solución de TAE 0,5X con bromuro de etidio a una concentración de 0,5 µg/ml. Las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz UV.

### **Verificación de la pureza y cuantificación del DNA**

Los plasmidos y el DNA genómico de *A. ferrooxidans* se cuantificaron midiendo la absorbancia a 260 nm y se determinó su pureza mediante la relación entre la absorbancia a 260 y 280 nm de las muestras.

### **Purificación de plásmido**

A partir de cultivos (5 ml) de *E. coli* JM109 pGEM-T (Promega®) o pET (Novagen®) con el inserto de interés crecidos durante la noche, se aisló DNA plasmidial con el sistema de purificación de Wizard Plus Minipreps de Promega®. Cuando se requirió una mayor cantidad de plasmidio, cultivos de 50 ml de *E. coli* JM109 pET21b(+) o *E. coli* JM109 pET28a(+) se usaron para extraer DNA plasmidial con el sistema de purificación de DNA Wizard Plus Midipreps de Promega®.



### **Digestión de DNA con enzimas de restricción**

Las digestiones del DNA plasmidial se realizaron de acuerdo a lo indicado por el proveedor (Fermentas®). 10 µg de pGEM-Tp14 o pET21 b (+) se digirieron con 60 U de las enzimas de restricción *NdeI* o *XhoI* durante 2 h a 37 °C. Posteriormente, las enzimas se inactivaron 20 min a 65 °C.

Los fragmentos generados se separaron en un gel de agarosa desde donde se purificaron los fragmentos correspondientes al gen recombinante y al plasmido pET21b(+).

Se digirió 10 µg de pGEM-T con el inserto *p11* o *p16.2* con 60 U de *NdeI* y *EcoRI* según las recomendaciones del fabricante (Fermentas®), y 5 µg de pET28 a (+) con 60 U de *NdeI* y *EcoRI*. En el caso de los genes *p14.3* y *p28* se realizó el mismo procedimiento que para los genes *p11* y *p16.2*, excepto que, los plásmidos fueron digeridos con *NdeI* y *SalI*.

### **Reacciones de ligación del DNA**

Para las reacciones de ligación se utilizó 0,1 pmol del vector digerido y 0,4 pmol del inserto. Se utilizó la DNA ligasa T4 (Promega®) según las instrucciones del fabricante.

Las reacciones de ligación se desarrollaron durante 12-16 h a 16 °C. Finalmente, la enzima se inactivó a 65 °C por 10 min.

### **Transformación de *E. coli* con plásmidos**

Las células competentes se prepararon según el protocolo de Inoue (Sambrook y Russell, 2001.). Las células competentes se incubaron en baño de hielo, junto a la

reacción de ligación, por 30 min. Luego, se realizó un traspaso a un baño de agua a 42 °C por 1 min y finalmente se incubó por 5 min en baño de hielo. Se utilizó 100 µl de células competentes y 0,1 pmol de DNA para cada transformación. Posteriormente, se adicionó 1 ml de medio LB suplementado con 20 mM glucosa y 20 mM Mg<sup>2+</sup>. Se creció el cultivo a 37 °C con agitación por 60 min. Posteriormente, se sembró las células en placas con agar LB con el antibiótico apropiado. En el caso de las transformantes con el plasmido pGEM-T se empleó placas con agar LB suplementado con Ap, IPTG y X-Gal.

## **Técnicas microbiológicas**

### **Medios y condiciones de cultivo**

*A. ferrooxidans* ATCC23270 se creció en medio 71 DSMZ a 30 °C con agitación. El medio 71 DSMZ contuvo 3 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,5 g/l MgSO<sub>4</sub>.7H<sub>2</sub>O, 3 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0,25 g/l CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O. Luego de esterilizar en autoclave la solución de sales, se adicionó una solución de K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub> esterilizada por filtración hasta una concentración final de 5 g/l.

Para los experimentos de clonación y expresión de proteínas recombinantes se usaron las cepas de *E. coli* JM109 y BL21(DE3), respectivamente. Las cepas de *E. coli* se crecieron a 37 °C en medio LB con agitación. Las cepas con plasmidos se crecieron con el antibiótico apropiado. Se utilizó ampicilina (Ap) a una concentración de 100 µg/ml y kanamicina (Km) a 50 µg/ml. Cuando se requirió, se utilizó 1 mM de isopropiltio-β-D-galactósido (IPTG) y 80 µg/ml de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactósido (X-Gal) (Sambrook y Russell, 2001). Para la preparación de placas con medio sólido, se adicionó agar (1,5 % p/v) al medio LB.

**Selección de transformantes *E. coli* JM109**

En el caso de las cepas *E. coli* JM109 transformadas con el plásmido pGEM-T (Promega®) se realizó la selección de los transformantes según las instrucciones del fabricante. Las células transformantes se aislaron en placas LB suplementadas con Ap, IPTG y X-Gal.

Se determinó la orientación del inserto en los clones positivos mediante PCR de colonias.

**Conservación de las cepas**

Las células crecidas en medio LB hasta una densidad óptica a 600 nm de 0,6 se guardaron congeladas a -80 °C luego de agregar glicerol hasta una concentración final de 15% (vol/vol).

**Inducción la expresión de las rodanasas recombinantes**

Se realizaron cultivos de las cepas de *E. coli* BL21(DE3)pET por 12 h, posteriormente se diluyeron 1:50 en LB con el antibiótico apropiado y se crecieron a 37 °C con agitación. Al crecer el cultivo hasta una  $DO_{600nm} \approx 0,6$  se adicionó 0,5 mM de IPTG. Se continuó el crecimiento 2 h a 37 °C. Posteriormente, las células se colectaron por centrifugación a 4 °C, 8.000 x g, 15 min.

## Técnicas bioquímicas

### Purificación de las rodanasas recombinantes

Todos los procesos de purificación se realizaron a 4 °C, a menos que se indique lo contrario. Todas las proteínas recombinantes estudiadas poseen una cola de histidina.

Las células se resuspendieron en amortiguador de unión (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 5 mM imidazol y 500 mM NaCl) hasta conseguir una suspensión celular de 50 mg/ml. Seguidamente, se rompieron las células en una celda French. Se aplicó una presión de 6 ton/m<sup>2</sup>. El extracto celular se centrifugó a 4 °C, 10.000 x g, 45 min. Seguidamente, se tomó la fase soluble y se filtró con una membrana de PVDF de 0,45 µm (Millipore®). El filtrado se aplicó a una columna de Ni<sup>2+</sup> previamente activada (siguiendo la instrucciones del fabricante Novagen®) y posteriormente equilibrada en amortiguador de unión. La columna se lavó con 10 volúmenes del mismo amortiguador de unión. Para eliminar las proteínas unidas inespecíficamente a la columna se aplicó 6 volúmenes de amortiguador de lavado (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 40 mM imidazol y 500 mM NaCl). La proteína de interés se liberó de la columna con un amortiguador de elusión (20 mM Tris-HCl pH 7,9, 500 mM NaCl) con concentraciones crecientes de imidazol (60, 80 y 100 mM imidazol).

Para determinar las fracciones que contenían la proteína de interés se realizó la electroforesis en condiciones denaturantes en geles de poliacrilamida. Posteriormente, se juntó las fracciones que contienen la proteína recombinante y se procedió a cambiar el amortiguador mediante diafiltración con membranas Centriprep 10 kDa de corte (Millipore®). En el caso de la proteína recombinante P11 se utilizó una membrana con un

corte de 3 kDa. El proceso de diafiltración se realizó 3 veces para permitir la completa sustitución del amortiguador de elusión por 50 mM Tris-HCl pH 8,5.

Posteriormente, se cuantificó la proteína purificada y se adicionó 50 % glicerol, 1 mM EDTA, 1 mM DTT y se almacenó a -20°C.

### **Preparación de muestras de proteínas y electroforesis en geles de poliacrilamida**

Los geles se prepararon según la técnica descrita por Laemmli (1970). Las muestras se resuspendieron en amortiguador de muestra (0,5 M Tris-HCl pH 6,8, SDS,  $\beta$ -mercaptoetanol, azul de bromofenol y 30 % <sup>vol</sup>/<sub>vol</sub> glicerol) y se calentaron 15 min a 100 °C. Para el análisis de las proteínas se usó un gel concentrador con acrilamida: bisacrilamida al 3 % y un separador al 15 %. Las electroforesis se realizaron a 200 V.

Las proteínas se fijaron y se tiñeron con una solución de azul de Coomassie al 2% en metanol al 50 % y ácido acético al 7 % por 30 min. Luego se destiñeron mediante lavados sucesivos con una solución de metanol al 20 % y ácido acético al 7 %.

### **Determinación de la concentración de proteínas**

Se utilizó el método de cuantificación de proteínas según Bradford, provisto por Pierce® en su versión de microensayos. Como proteína patrón se utilizó BSA.

### **Medición de la actividad tiosulfato: azufre transferasa**

El ensayo estándar para la medición de la actividad TST se realizó según se describió previamente (Westley, 1981; Alexander y Volini, 1987) con mínimas modificaciones. Se utilizó tiosulfato 50 mM como donador de azufre, en 50 mM Tris-HCl pH 8,5. La reacción se inició con la adición de KCN 50 mM como aceptor de azufre. La reacción se

detuvo agregando 10 % HCHO. La reacción colorimétrica se desarrolló adicionando 1 volumen de solución de nitrato férrico [100 g  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , 200 ml de 65 %  $\text{HNO}_3$  por 1.500 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ]. Se midió la absorbancia de la mezcla de reacción a 460 nm (Westley, 1981). Como control negativo de la reacción se utilizó una muestra con BSA.

La unidad de actividad enzimática se definió como  $U = \mu\text{g de SCN}^- \cdot \text{ml}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$  y la actividad específica (AE) =  $\text{Umg}^{-1}$  de proteína total.

### **Caracterización enzimática**

Las enzimas purificadas se estudiaron a fin de determinar las condiciones óptimas de su actividad TST, para lo cual se utilizó el protocolo estándar de actividad enzimática donde se varió la temperatura, presencia y concentración de sales, glicerol, DTT, tipo de amortiguador y pH.

### **Estudio de la cinética enzimática**

La cinética se estudió variando la concentración de los sustratos utilizados en el ensayo de la actividad TST.

Los datos cinéticos se obtuvieron y graficaron de acuerdo con la ecuación de Michaelis-Menten  $V = \frac{V_{\max} * [S]}{[S] + K_m}$ . Para ello se empleó el programa Prims 4.03 para Windows (GraphPad Software®).

También se calculó la constante catalítica ( $K_{\text{cat}}$ ). La  $K_{\text{cat}}$  se definió como la cantidad de sustrato convertida a producto por una molécula de enzima por unidad de tiempo ( $V_{\max}/[E]$ ). Para calcular el peso molecular de la proteína recombinante P11 se consideró

la presencia de la cola de histidinas. Por lo tanto, la proteína recombinante pesa 13,91 kDa. También se asumió que cada proteína presenta un sitio catalítico.

## **Técnicas bioinformáticas**

### **Búsqueda *in silico* de los genes putativos de las rodanasas en el genoma de *A. ferrooxidans***

Utilizando las secuencias deducidas de las proteínas P21, P16 y P14, (Ramírez y col., 2002) se procedió a realizar búsquedas de secuencias con tBLASTn (Altschul y col., 1990) del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC23270 suministrado por TIGR (<http://www.tigr.org/>).

Una vez obtenidos los resultados de las búsquedas, se analizó las secuencias de nucleótidos para identificar los marcos abiertos de lectura al que pertenecerían. Para esto se utilizó el programa ORF Finder del NCBI, con la asignación de codones de tipo bacteriano.

Una vez determinado el marco abierto de lectura, se efectuó la búsqueda de dominios en los productos génicos putativos. Una vez determinadas las secuencias que poseían dominios rodanasa, se realizó una caracterización informática con la secuencia deducida de aminoácidos. Para ello se utilizó la herramienta ProtParam (<http://us.expasy.org/cgi-bin/protparam>).

Posteriormente se utilizaron las secuencias de las rodanasas putativas para realizar una nueva ronda de búsquedas en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC23270. Los resultados de las búsquedas se analizaron en busca de nuevas secuencias de posibles rodanasas.

Una vez identificados todos los genes putativos para rodanasas en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC23270, se analizó la secuencia deducida de sus productos génicos en busca de señales de exportación, regiones de transmembrana, patrones conservados dentro del dominio rodanasa y presencia de otros dominios mediante las herramientas Pfam (Finn y col., 2006), PROSITE (Hulo y col., 2006) y Smart (Letunic y col., 2006).

La estructura secundaria de las proteínas de interés se analizó mediante el sistema Consensus Secondary Structure Prediction (Combet y col., 2000).

### **Alineamiento de secuencias**

Los alineamientos múltiples se realizaron con el programa ClustalW (<http://www.ch.embnet.org/wwwtmp/sq.27157.aln>). Para ello, se utilizaron los siguientes parámetros:

Matriz; BLOSUM 30

Penalizaciones por apertura de un espacio; 10

Penalización por la extensión del espacio; 0,05

Penalizaciones por espacios en los extremos de las secuencias; 10

Penalización por la extensión de los espacios; 0,05

Los alineamientos de pares de secuencias se realizaron con el programa ClustalX con los siguientes parámetros:

Matriz; Gonnet 250

Penalización por apertura de un espacio; 10

Penalización por la extensión del espacio; 0,1

## Resultados y Discusión

### Identificación de los genes que codifican para proteínas con dominio rodanasa presentes en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC23270

Para identificar los genes que codifican proteínas con dominio rodanasa se realizó la búsqueda informática mediante BLAST en el genoma no anotado, en ese momento, de *A. ferrooxidans* ATCC 23270. Para esto, se empleó las secuencias de proteínas deducidas a partir de los genes putativos *p14*, *p16* y *p21* (Ramírez y col, 2002). Como resultado de la búsqueda se obtuvo un total de 8 secuencias que corresponderían a genes que codifican para proteínas con dominio rodanasa (Tabla 6).

**Tabla 6.** Genes putativos que codifican para proteínas con dominio rodanasa presentes en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC23270.

Gen	Tamaño (pb)	TIGR	Anotación
<i>p11</i>	330	Afe 0544	Rhodanese-like domain protein
<i>p14</i>	399	Afe 2509	Rhodanese-like domain protein
<i>p14.3</i>	402	Afe 2978	Conserved hypothetical protein
<i>p15</i>	399	Afe 2875	Rhodanese-like domain protein
<i>p16</i>	426	Afe 0739	Rhodanese-like domain protein
<i>p16.2</i>	450	---	No anotado
<i>p21</i>	777	Afe 2979	Sulfur/pyrite/thiosulfate/sulfide-induced protein
<i>p28</i>	783	Afe 1582	Ankyrin repeat protein/rhodanese-like domain protein

No anotado, indica que el gen no ha sido identificado en la base de datos del TIGR.

Una vez que finalizó la anotación del genoma de *A. ferrooxidans* por parte del TIGR se confirmó la mayoría de los resultados obtenidos. Sin embargo, en el caso de la *p16.2* el genoma anotado por TIGR no aparece su marco abierto de lectura (Tabla 6).

### **Determinación de las características generales de las proteínas putativas con dominio rodanasa presentes en *A. ferrooxidans* ATCC23270**

Una vez identificados los genes que codificarían para proteínas con dominio rodanasa, se procedió al análisis de la secuencia aminoacídica deducida. Para esto, se buscaron dominios de proteínas, los motivos conservados y señales de exportación de proteínas.

El resultado del análisis mostró que las proteínas putativas estudiadas poseen, al menos, un dominio rodanasa. Además, la P21 posee una señal de exportación tipo Sec. La P16 mostró una región de transmembrana y, finalmente, la P28 posee, junto al dominio rodanasa, un dominio ANK (Tabla 7).

Una vez identificados los genes que codificarían las proteínas con dominio rodanasa de *A. ferrooxidans*, se determinó la localización del dominio rodanasa dentro de la secuencia de aminoácidos, si estaban presentes otros dominios (Figura 9), así como la presencia de otras características relevantes como las señales de exportación de proteínas y regiones de transmembrana (Tabla 7).

**Tabla 7.** Características generales de las proteínas putativas con dominio rodanasa presentes en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC23270.

	MW	pI	Otros	Dominios	Sitio activo	Actividad	Localización
<b>P11</b>	<b>11,7</b>	<b>9,1</b>	<b>No</b>	<b>Rhod</b>	<b>CLSGGR</b>	<b>¿?</b>	<b>Cit</b>
<b>P14</b>	<b>14,5</b>	<b>4,8</b>	<b>No</b>	<b>Rhod</b>	<b>CDSGTR</b>	<b>¿?</b>	<b>Cit</b>
<b>P14.3</b>	<b>14,3</b>	<b>4,8</b>	<b>No</b>	<b>Rhod</b>	<b>CGSGNR</b>	<b>MST?</b>	<b>Cit</b>
<b>P15</b>	<b>15,2</b>	<b>6,2</b>	<b>No</b>	<b>Rhod</b>	<b>CRSGHR</b>	<b>TST</b>	<b>Cit</b>
<b>P16</b>	<b>15,6</b>	<b>9,3</b>	<b>RTM</b>	<b>Rhod</b>	<b>CASGMR</b>	<b>MST?</b>	<b>Mem</b>
<b>P16.2</b>	<b>16,3</b>	<b>6,5</b>	<b>No</b>	<b>Rhod</b>	<b>CRTGGR</b>	<b>TST</b>	<b>Cit</b>
<b>P21</b>	<b>23,8</b>	<b>9,4</b>	<b>Sec</b>	<b>Rhod</b>	<b>CPTGQL</b>	<b>¿?</b>	<b>Per</b>
<b>P28</b>	<b>28,6</b>	<b>5,8</b>	<b>No</b>	<b>Rhod, ANK</b>	<b>CYHGNA</b>	<b>TST</b>	<b>Cit</b>

Se indica el peso molecular en kDa; pI, el punto isoeléctrico; Sec, señal de exportación tipo Sec; RTM, región de transmembrana; Rhod, dominio rodanasa; ANK, dominio ankirina; Sitio catalítico, secuencia aminoacídica del sitio catalítico de la rodanasa; Cit, citoplasma; Mem, membrana; Per, periplasma.

El análisis de las secuencias de las proteínas de *A. ferrooxidans* mostró que todas ellas poseen un dominio rodanasa (Figura 9). En el caso de la P28 el dominio rodanasa se localiza en la región N-terminal de la proteína, mientras que en el C-terminal se encontró repetidos ankirina (ANK). Los repetidos ankirina consisten en una de secuencia conservada repetitiva que permitiría a las proteínas que la contienen, interaccionar entre si o con otras proteínas (Sedgwick y Smerdon, 1999).

```

>P11
MYGFQEITADQLKALREQGGAFTLIDVRSPGEVARGVIDGARHLPLHLLPMSVQQMDKSQPLVFYCLSGGRSAQAA
AFAASQGFQVVLNLRGGISAWVNRRGFPLVQLSS
>P14
MGKVMGKSLADFIRAARRQIREIDCDTLEDWLRSRDDVLVVDVREASFLDGHLPGAIHVPRGYLEALADPDYGH
HPELAVARDRVVLYCDSGTRSALAAVTLQEMGFTEVYNLGGGINVWDAEDKPVVS
>P14.3
MSHLIKEATCQQALAAALGDRDSVVIDVRCQEEYALYGQIAGAHLIPWKLIRDDALVDNQHFHREVKNAVSNCKGGL
GGFKLYFICGSGNRSCDAAECALDMLGDDGYEVYNVVGIDEWVCSGLPTSPAALSA
>P15
MTKSVINLAPQDAFHFLQKNPQAVLIDVRSEMEFLFVGHPEALTIPWRDDPDWEINPDFLCRVRRATSLNRPVLL
ICRSGHRSLEAGQYLQANGFSAVYNVAHGFEGLNDQHRRSSLNGWRFDGLPWEQI
>P16
MDHKILFFIESQWPLLLGAVALIIMIFKGPLTRRAAGIHEVDPATAVQLINHEDAVIIDVREQKEWSQGHLPGARH
IPLGDLPKYMQDLEKHRGHHIICQCASGMRSSRAAASLKAGFDKIYSLRGGIGAWRSAGLPVEK
>P16.2
MSTETILQEAQKRAQAAGKRHAGDLTPEEAHAVLRDHPKAILIDVRSHPELDFSGFVEGCCHVPWQLYPGMTPNPD
FDAELRGKAQPDLLLLLRCRTGGRSLAAAEHLAGLGYSCYNVVGFEGKHDAGQGRKVDGWKASGLPWKKNK
>P21
MFKRLANAAPFALVGMFLGLSVSVASADDSGNQAAQVLNARMEKFFADQKPFYGTYYTDRSLLLAISKDPSK
YALIDIRTPTYHDFFCGVHSNKHVCTGRGWQRIYGAQGHVPGAQNIPYLNLPAAIKSDSIPKNKTVILMCPTGQL
SNQTAGVLRMLGYDAYALRGGVNGWKKAGYPIVIGKEPGTMAQACHFWQTCWRQFYDNPQAH
>P28
MNTRSFHRIDVHKARELLQRPDTVLLDCRHPSDFRAGHIAGASPLGDYNADDHVLNIAKHREPVLIYCYHGNASQMR
AQLFADFGFAEVYSLDGGYEAWRKVHTPANSQLTEALQCWLMAQEFPAADIHARTRDGVTPIMRAAGEGDPPARVAE
LLAAGADPHQRNNDGNQALWFACVSENLDTLDLLVAVGAHLNHQNDNGATCLMYAASAGKTAVVERLLAFGADRSL
LSLDDFTALDMAANLECLNLLRETPRIKAVT

```

**Figura 9.** Secuencia aminoacídica deducida de las proteínas putativas con dominio rodanasa presentes en *A. ferrooxidans* ATCC 23270. En negrita se indica la extensión del dominio rodanasa; en verde, se muestra el patrón conservado Rhodanese\_1: [FY]-x(3)-H-[LIV]-P-G-A-x(2)-[LIVF]; en rojo, el patrón Rhodanese\_2: [AV]-x(2)-[FY]-[DEAP]-G-[GSA]-[WF]-x-E-[FYW] según la base de datos PROSITE; en azul, el dominio ANK según la base de datos Pfam. En la secuencia de la P21 el rectángulo azul señala un posible sitio de unión del grupo Fe-S.

Además, todas las secuencias analizadas presentaban los patrones conservados de secuencias conservadas Rhodanese\_1 y Rhodanese\_2 de la base de datos PROSITE. Estos patrones conservados de secuencia se encuentran en todas las secuencias de proteínas que pertenecen a la familia rodanasa (Hulo y col., 2006). Sin embargo, en las rodanasas putativas de *A. ferrooxidans* los patrones de secuencia se encontraron solo parcialmente conservados (Figura 9). Este hecho se puede justificar considerando que los patrones se construyeron en base a secuencias de rodanasas caracterizadas

bioquímicamente. De forma preliminar, se puede concluir que las secuencias analizadas poseen dominios de la familia rodanasa. En vista de lo cual, este trabajo contribuye a ampliar el conocimiento sobre esta ampliamente distribuida y bioquímicamente versátil superfamilia de proteínas.

La búsqueda de señales de exportación y motivos conservados en las proteínas putativas (Tabla 7), dió por resultado que P21 posee una señal de exportación tipo Sec y que además en el extremo C-terminal se encontró el motivo C-x-x-W-x-x-C (Figura 9), reportado anteriormente (Ramírez y col, 2002). Por su parte, la P16 presentó una sección hidrofóbica en el extremo N-terminal. Posiblemente, esta sección formaría una región de transmembrana. Las restantes secuencias no mostraron señales de exportación ni regiones de transmembrana, por lo que se encontrarían solubles en el citoplasma de *A. ferrooxidans*. Entonces, la P21 sería la única proteína exportada al periplasma, según reportaron Ramírez y col. (2002) y la P16 se podría encontrar anclada a la membrana interna de *A. ferrooxidans*, mediante la sección hidrofóbica de su cadena polipeptídica.

Por otro lado, el tamaño de las proteínas de *A. ferrooxidans* se mantiene uniforme (Tabla 7) entre  $15 \pm 1$  kDa, con tres excepciones, las proteínas P11, P21 y P28.

El análisis del punto isoeléctrico mostró que la P21 posee un  $pI = 9,36$ , tal como se esperaba para una proteína que se encontraría en un ambiente ácido como el periplasma de *A. ferrooxidans*. Otras proteínas que no serían exportadas, como la P11 y la P16, también muestran un valor de su punto isoeléctrico muy elevado para una proteína del citoplasma (Tabla 8). En el caso de la proteína YgaP de *E. coli* (que posee actividad

TST), también que posee una región de transmembrana, sin embargo su pI es de 6,4 (Ahmed, 2003).

Por su parte, la P11 es la más pequeña de las proteínas putativas analizadas y posee un pI de 9,1. El análisis de la secuencia polipeptídica no reveló la presencia de ningún tipo de señal de exportación. Tampoco se encontraron regiones de transmembrana. Por lo que se concluye que la P11 sería una proteína soluble de citoplasma.

Las razones fisiológicas por las cuales las proteínas P11 y P16.2 presentan un punto isoeléctrico elevado podrían ser que esto permitiría una mejor selectividad de sus sustratos, o bien, que facilitaría la interacción de las rodanasas con otra proteína.

**Tabla 8.** Características generales de rodanasas presentes en algunos microorganismos.

Microorganismo	Código	Tamaño	Masa	pI
<i>Acidothermus cellulolyticus</i>	Q2E0A9	279	31,7	5,44
<i>Actinobacillus pleuropneumoniae</i>	Q6T893	108	12,4	4,54
<i>Coxiella burnetii</i>	Q83DV5	107	12,4	5,75
<i>Photobacterium profundum</i>	Q6LVT0	110	12,4	4,22
<i>Photobacterium sp. SKA34</i>	Q2BYD2	108	12,2	4,29
<i>Picrophilus torridus</i>	Q6L0G6	153	17,9	9,29
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i>	O26719	286	32,2	4,52
<i>Mycobacterium bovis</i>	Q7TWT6	297	33,4	4,94
<i>Synechococcus PCC 7942</i>	P27477	320	35,1	9,40
<i>Vibrio alginolyticus</i>	Q1V650	106	11,8	4,48

Un segundo grupo de proteínas presenta valores de pI entre 4,75 y 6,49. En ninguna de estas proteínas se encontró regiones de transmembrana o señales de exportación.

Se puede decir que, las proteínas P11, P14, P14.3, P15, P16.2 y P28 se encontrarían solubles en el citoplasma de *A. ferrooxidans*.

### **Características de las proteínas con dominio de la familia Rodanasa presentes en *A. ferrooxidans* ATCC23270**

Con el fin de caracterizar las rodanasas codificadas en el genoma de *A. ferrooxidans*, se realizó el alineamiento de las secuencias deducidas de las proteínas con dominio rodanasa de *A. ferrooxidans* ATCC23270 con proteínas representativas de la superfamilia Rodanasa y fosfatasa tipo CDC25, cuya estructura tridimensional o características bioquímicas fueran conocidas. Se determinó la presencia de los dominios estructurales CH2A, CH2B (Figura 10) y el sitio catalítico (Fauman y col., 1998).

En la Figura 10 se puede ver que los alineamientos presentan tres bloques conservados. El primer bloque del lado N- terminal corresponde al motivo estructural conservado CH2A. En el bloque central se encuentra el sitio catalítico, una estructura en forma de pinza integrada por una hélice alfa, un lazo y una lámina beta. En él se puede apreciar la presencia del residuo de cisteína que sería responsable de la catálisis enzimática, y el tercer bloque corresponde al motivo estructural conservado CH2B.

Otros residuos relevantes en la familia de proteínas rodanasa (Bordo y col., 2000b), como los residuos de Asp9 y Arg11 (numeración de la GlpE, Figura 10) se encuentran conservados en las proteínas de *A. ferrooxidans*. Estos residuos estarían implicados en la estabilización del dominio rodanasa (Luo y col., 1994; Spallarossa y col., 2001).

Otra fuente de información para la identificación de las proteínas de la familia rodanasa es la comparación de las estructuras secundarias, la cual permite determinar la

conservación de estas estructuras en las proteínas. Mediante herramientas de predicción de la estructura secundaria de secuencias polipeptídicas, se predijo las estructuras de las regiones catalíticas de las rodanasas putativas de *A. ferrooxidans*, así como de proteínas representativas con dominio rodanasa (Figura 11).

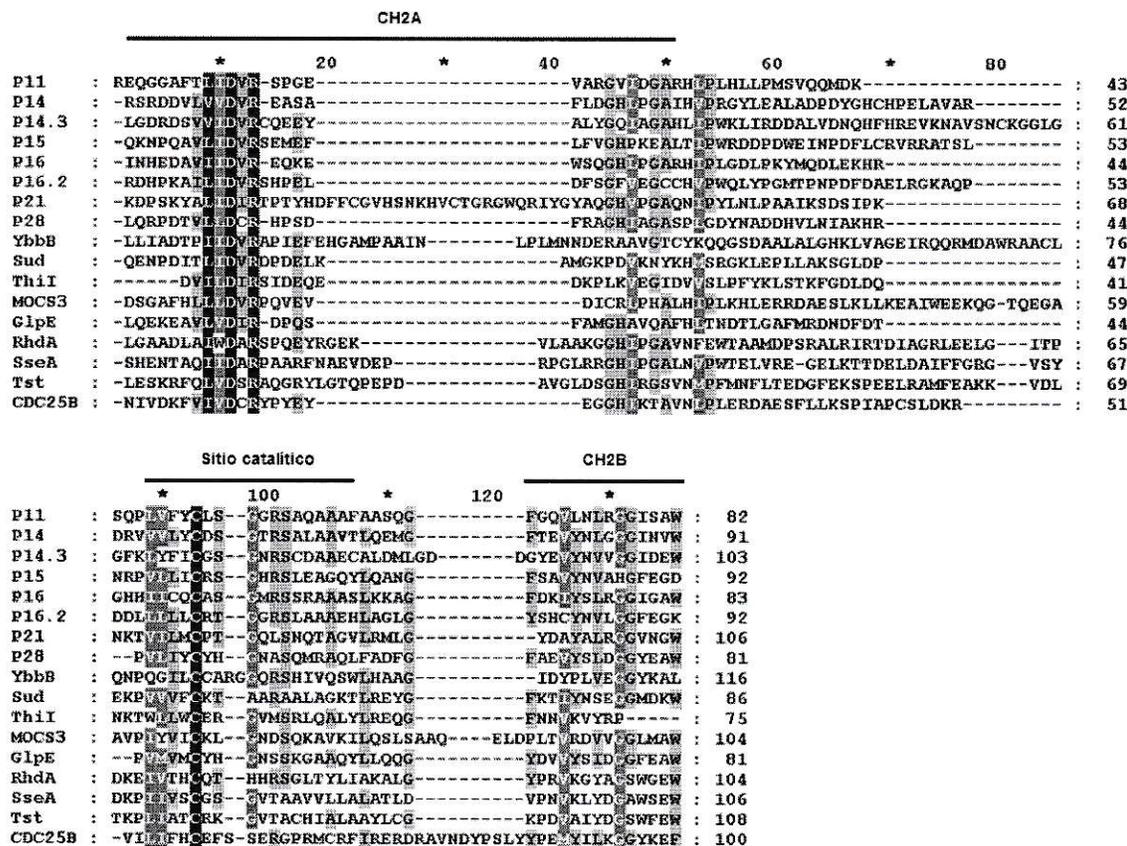


Figura 10. Alineamiento de las proteínas putativas con dominio rodanasa presentes en *A. ferrooxidans* ATCC23270 con proteínas representativas de la superfamilia rodanasa fosfatasa CDC25. P11, P14, P14.3, P15, P16, P16.2, P21 y P28 corresponden a las secuencias aminoacídicas deducidas de las proteínas con dominio rodanasa de *A. ferrooxidans* ATCC23270; GlpE, TST de *E. coli*; SseA, MST de *E. coli*; YbbB, seleno transferasa de *E. coli*; ThiI, dominio rodanasa de la proteína ThiI de *E. coli*; RhdA, dominio activo de la TST de *A. vinelandii*; Sud, polisulfuro: azufre transferasa de *W. succinogenes*; Tst, dominio catalítico de la TST de *B. taurus*; MOCS3 dominio rodanasa de MOCS3 de *H. sapiens*; CDC25B, fosfatasa tipo CDC25 de *H. sapiens*. CH2A y CH2B indican la ubicación de los correspondientes motivos estructurales conservados.

Sitio activo	#
GlpE	AFMRDNDFDTPVMVMCYHGNSSKGAAQYLLQOQGYD
SseA	FFGRGVSYDKPIIVSCGSGVTAADVLLALATLDVP
YbbB	AWRAACLQNPQGILCCARGGQRSHIVQSWLHAAGI
ThiI	TKFGDLQNKTWLLWCERGVMSRLQALYLREQGFN
Sud	LAKSGLDPEKPVVVFCKTAARAALAGKTLREYGFK
MOCS3	KQGTQEGAAVPIYVICKLGNDSSQKAVKILQSLSA
RhdA-C	LEELGITPDKEIVTHCQTHHRSGLTYLIAKALGY
CDC25B	IAPCSLDKRVILIFHCFFSSERGRMCRFIRERDR
Tst-C	FEAKKVDLTKPLIATCRKGVTAACHIALAAYLCGKP
P11	MSVQOMDKSQPLVIFYCLSGGRSAQAAAF AASQGF
P14	HP ELAVARDRVVLYCDSGTRSAALAAVTLQEMGFT
P14.3	SNCKGGLGGFKLYFICGSGNRS CDAAE CALDMLGD
P15	RVRRATSLNRPVLLICRS GHRSLEAGQYLQANGFS
P16	MQDLEKHRGHHIICQ CASGMRS SRAAASLKKAGFD
P16.2	ELRGKAQPDDLLLLL CRTGGRSLAAA EHLA GLGYS
P21	IKSDS IPKNKTVIIMCPTGQLSNQTAGVLRMLGYD
P28	DHVLNIAKHRPVLYCYHGNASQMRAQLFADFGFA

Figura 11. Comparación de la estructura secundaria de las proteínas putativas con dominio rodanasa de *A. ferrooxidans* con proteínas representativas de la superfamilia Rodanasa/Fosfatasa tipo CDC25. En azul, hélices alfa; en rojo, lámina beta; en naranja, el lazo; en negro los residuos sin estructura secundaria definida. P11, P14, P14.3, P15, P16, P16.2, P21 y P28 corresponden a las secuencias aminoacídicas deducidas de las proteínas con dominio rodanasa de *A. ferrooxidans* ATCC23270; GlpE, TST de *E. coli*; SseA, MST de *E. coli*; YbbB, seleno transferasa de *E. coli*; ThiI, dominio rodanasa de la proteína ThiI de *E. coli*; RhdA, dominio activo de la TST de *A. vinelandii*; Sud, polisulfuro: azufre transferasa de *W. succinogenes*; Tst, dominio catalítico de la TST de *B. taurus*; MOCS3 dominio rodanasa de MOCS3 de *H. sapiens*; CDC25B, fosfatasa tipo CDC25 de *H. sapiens*. # indica la cisteína activa del sitio catalítico.

Asimismo, se realizó la comparación de las secuencias de los sitios catalíticos teniendo en consideración las propiedades fisicoquímicas de los residuos aminoacídicos (Figura 12). La idea fue obtener información que permitiera determinar la posible actividad enzimática de las proteínas putativas con dominio rodanasa de *A. ferrooxidans*.

Las estructuras secundarias de la región catalítica de las proteínas de *A. ferrooxidans* se encuentran conservadas en relación a las proteínas representativas aunque la estructura secundaria de la región N-terminal inmediatamente próxima a la Cys del sitio catalítico de la P16.2 no pudo ser predicha correctamente por las herramientas informáticas utilizadas. Esta sección es atípica, ya que consta de 5 Leu seguidas en el lado N-terminal de la Cys activa.

En términos generales, la estructura del sitio catalítico en forma de pinza de la región catalítica estaría formada por una lámina beta de entre 4 y 7 residuos hacia el lado amino de la Cys catalítica. El lazo, que definiría el tipo de sustrato que se une a la proteína, tiene un largo que oscila entre 4 y 7 residuos, pero es común una extensión de 5 residuos. La hélice alfa, hacia el C-terminal del lazo, posee una extensión uniforme en las rodanasas de *A. ferrooxidans* de más o menos 9 residuos.

La estructura secundaria consenso, prevista para la región que comprende el sitio activo se encuentra conservada en las rodanasas putativas de *A. ferrooxidans*, aunque la estructura secundaria de la región inmediatamente próxima a la Cys del sitio catalítico de la P16.2, como ya se mencionó, no pudo ser predicha por esta técnica.

Aún cuando las secuencias de proteínas no están muy conservadas entre las rodanasas, la predicción de la estructura secundaria ayudó a corroborar la presencia, la localización y extensión de los dominios estructurales conservados.

**A**

Sitio Activo.....	#
GlpE Eco.....	PVMVMCYHGNSSKGA
YbbB Eco.....	QGILCCARGGQRSHI
SseA Eco.....	PIIVSCGSGVTAADV
ThiI Eco.....	TWLLWCERGVMSRLQ
Sud Wsu.....	PVVVFCKTAARAALA
MOCS3 Hom.....	PIYVICKLGNDSSQKA
RhdA Azo C-term.....	EIVTHCQTHHRSGLT
Cdc25B Hom.....	ILIFHCEFSSEERGP
TST Bos C-term.....	PLIATCRKGVTAACHI
P11.....	PLVIFYCLSGGRSAQA
P14.....	VVVLCDGSTRSALA
P14.3.....	KLYFICGSGNRSQDA
P15.....	PVLLICRSGHRSLEA
P16.....	HIICQCSGMRSSRA
P16.2.....	LLLLICRTGGRSLAA
P21.....	TVIIMCPTGQLSNQT
P28RHOD.....	PVLIICYHGNASQMR

**B**

Sitio Activo.....	#
GlpE Eco.....	PVMVMCYHGNSSKGA
YbbB Eco.....	QGILCCARGGQRSHI
SseA Eco.....	PIIVSCGSGVTAADV
ThiI Eco.....	TWLLWCERGVMSRLQ
Sud Wsu.....	PVVVFCKTAARAALA
MOCS3 Hom.....	PIYVICKLGNDSSQKA
RhdA Azo C-term.....	EIVTHCQTHHRSGLT
Cdc25B Hom.....	ILIFHCEFSSEERGP
TST Bos C-term.....	PLIATCRKGVTAACHI
P11.....	PLVIFYCLSGGRSAQA
P14.....	VVVLCDGSTRSALA
P14.3.....	KLYFICGSGNRSQDA
P15.....	PVLLICRSGHRSLEA
P16.....	HIICQCSGMRSSRA
P16.2.....	LLLLICRTGGRSLAA
P21.....	TVIIMCPTGQLSNQT
P28RHOD.....	PVLIICYHGNASQMR

Figura 12. Comparación de la región catalítica de acuerdo con las propiedades de los residuos de aminoácidos. En A, los residuos hidrofóbicos (ALIVMW) se representan en rojo y los hidrofílicos (DEKNQRST) en azul. En la sección B, los residuos con carga positiva (KRH) están en azul, los de carga negativa (DE) en rosado, los aromáticos (FYW) en verde y los hidroxilo (STY) en amarillo. P11, P14, P14.3, P15, P16, P16.2, P21 y P28RHOD corresponden a las secuencias deducidas de las proteínas con dominio rodanasa de *A. ferrooxidans* ATCC23270; GlpE, TST de *E. coli*; SseA, MST de *E. coli*; YbbB, seleno transferasa de *E. coli*; ThiI, dominio rodanasa de la proteína ThiI de *E. coli*; RhdA, dominio activo de la TST de *A. vinelandii*; Sud, polisulfuro: azufre transferasa de *W. succinogenes*; TST, dominio catalítico de la TST de *B. taurus*; MOCS3 dominio rodanasa de MOCS3 de *H. sapiens*; CDC25B, fosfatasa tipo CDC25 de *H. sapiens*. # indica la cisteína activa del sitio catalítico.

## **Análisis de los sitios catalíticos y predicción de la actividad enzimática de las rodanasas de *A. ferrooxidans* ATCC23270**

### **Características generales del sitio activo de las rodanasas de *A. ferrooxidans* ATCC23270**

Un segmento de aproximadamente 4 residuos del lado amino de la Cys activa de las rodanasas de *A. ferrooxidans*, en general está formado por residuos hidrofóbicos (Figura 12A). Esta sección correspondería a una lámina beta, que se localiza en el eje central de la proteína y al cual se encuentra unido el lazo del sitio catalítico. En el lazo, se encuentran residuos hidrofílicos, lo que indica que esta sección se encontraría expuesta en la superficie de la proteína, permitiendo la interacción del sitio activo con los sustratos.

Las proteínas P14, P15 y P16.2 poseen un aminoácido cargado en el lado carboxilo de la Cys catalítica (Cys+1). En la posición Cys+2 se encuentra un residuo aromático, Thr o una Ser (excepto las proteínas P21 y P28). En Cys+3 se encuentra una Gly, la cual se encuentra conservada en la mayoría de las rodanasas y tendría una función estructural. En el extremo distal del lazo de las proteínas P14, P14.3, P15 y P16.2 se encuentra un residuo de Arg (posición Cys+5).

Los estudios de la estructura tridimensional indican que el lazo del sitio catalítico adopta la forma de una U (Bordo y col., 2000a; Bordo y col., 2000b; Spallarossa y col., 2004). Se puede pensar que eventualmente la Arg queda en una posición cercana a la Cys activa, y podría participar en la polarización del enlace del átomo de azufre del

sustrato dador o bien, ocultaría la carga negativa de la Cys persulfurada y permitiría de esta forma la unión del segundo sustrato, el aceptor del azufre.

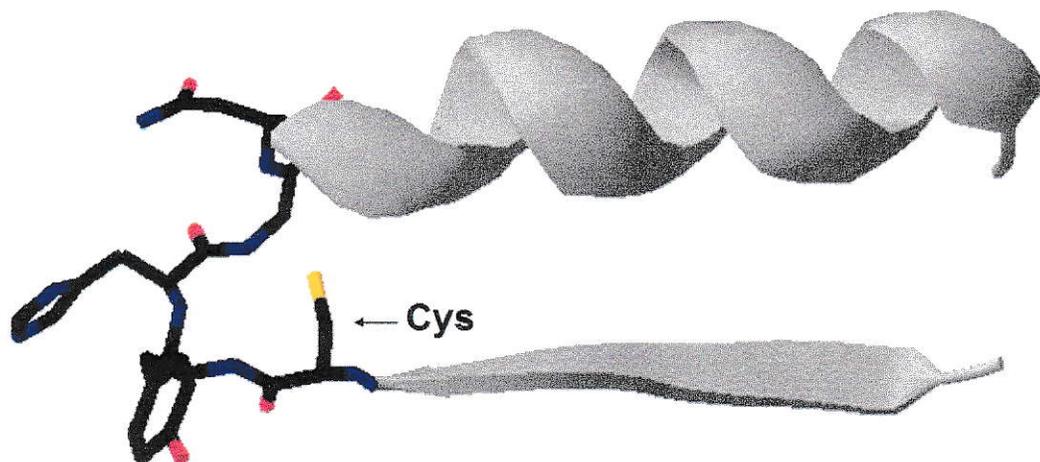
Las proteínas P11, P14 y P28 presentan una Tyr en la posición Cys-1. Este residuo se encontró en posiciones similares de los dominios rodanasa inactivos de la SseA de *E. coli* y la TST de bovino (Bordo y Bork, 2002). Sin embargo, la evidencia estructural indica que el residuo localizado en Cys-1 no tiene participación en la actividad enzimática dado que no quedaría expuesto en la superficie de la proteína (Bordo y col., 2000a; Bordo y col., 2000b; Spallarossa y col., 2001; Lin y col., 2004; Spallarossa y col., 2004).

#### **Determinantes de la actividad enzimática de las rodanasas**

Se realizó el análisis de la secuencia de la región catalítica de las rodanasas de *A. ferrooxidans* y se las comparó con otras proteínas bioquímicamente caracterizadas a fin de predecir su actividad enzimática. A pesar de la amplia distribución de las rodanasas, sólo han quedado establecidas dos categorías funcionales, en las que se pueden agrupar en términos de actividad catalítica. Debido a su mejor comprensión, la predicción de la actividad enzimática se limita a las actividades mercaptopiruvato: azufre transferasa y tiosulfato: azufre transferasa. Aunque existen otras actividades enzimáticas, se desconocen las bases de la selección del sustrato.

El análisis de la estructura tridimensional del sitio catalítico de las rodanasas muestra que está rodeado por un fuerte campo eléctrico de carga positiva debido a la organización de los residuos del lazo (Figura 13) y los grupos cargados positivamente. Los seis grupos amino de las cadenas principales de los residuos, apuntan hacia el centro

catalítico, proveyendo el espacio y la carga electrostática necesaria para unir un anión (Figura 13; Bordo y col., 2000b). Por lo tanto, la contribución de las cadenas laterales a la carga electrostática del sitio activo no es muy relevante, como lo sugiere la variabilidad de los residuos presentes en el lazo del sitio catalítico (Figura 10). Sin embargo, su participación es muy importante en la selección y direccionamiento del sustrato de la enzima.



**Figura 13.** Estructura del sitio catalítico de la rodanasa GlpE de *E. coli*. Se muestra la estructura secundaria de los residuos que flanquean el lazo donde se localiza la cisteína activa. Carbono, negro; nitrógeno, azul; oxígeno, rojo y azufre, amarillo.

Los análisis mediante mutaciones puntuales demostraron que la presencia de un residuo hidrofóbico no afectó la unión del mercaptopiruvato pero si la unión del tiosulfato. Por el contrario, la presencia de un residuo cargado positivamente incrementó la afinidad por el tiosulfato (Colnaghi y col., 2001).

Otros estudios con mutantes indican que los residuos en la posición Cys+1 y Cys+2 son críticos para la determinación de la actividad TST o MST de las rodanasas. El reemplazo de un residuo positivo en la posición Cys+2 (Lys) en la TST de bovino por Ser, disminuyó la actividad TST de la proteína estudiada (Nagahara y col., 1995). En lugar de Lys en la posición Cys+2, en las MST se encuentra una Ser. El resultado de la sustitución de Lys sugiere que la interacción electrostática entre la carga negativa del átomo de oxígeno del tiosulfato y la positiva de Lys podría ser importante en la transferencia del átomo de azufre del tiosulfato para formar el intermediario persulfurado (Nagahara y col., 1995).

En las enzimas con actividad TST se observó que en general, en el lazo del sitio catalítico se encuentran dos residuos polares y cargados positivamente (Spallarossa y col., 2001). Por el contrario, en el lazo de las proteínas con actividad MST no se encontrarían residuos cargados (Bordo y Bork, 2002). Del estudio de las proteínas caracterizadas, se sugiere los patrones C-R-x-G-[R/T] y C-G-[S/T]-G-V-T para identificar a las proteínas con actividad TSTs y MSTs, respectivamente (Bordo y Bork, 2002; Spallarossa y col., 2004). Aunque, es una buena base para evaluar la posible actividad enzimática, también existen excepciones como la GlpE de *E. coli* y la RhdA de *A. vinelandii*, las cuales no se ajustan al patrón descrito para las proteínas con actividad TST.

Por otra parte, mediante estudios comparativos entre las rodanasas, se ha visto que el largo del lazo del sitio catalítico permitiría diferenciar entre las proteínas capaces de unir moléculas de azufre o selenio (lazo de 6 residuos) de aquellas que unen fósforo o

arsénico (lazo de 7 residuos) (Bordo y Bork, 2002). La predicción de la estructura secundaria del sitio catalítico muestra que todas las rodanasas de *A. ferrooxidans* presentan un lazo corto del tipo esperado para las azufre (o seleno) transferasas (Figura 11).

#### **Proteínas tipo mercaptopiruvato: azufre transferasa de *A. ferrooxidans* ATCC23270**

La proteína P14.3 presenta residuos similares a los reportados para las MSTs. Los primeros cuatro residuos del lazo (CGSG) de la P14.3 son idénticos a los de la SseA de *E. coli*. En la posición Cys+4 se encuentra una Asn, seguida de una Arg. Como la Asn posee una cadena lateral polar, capaz de interactuar con una molécula polar o cargada, mientras que la Arg es un residuo polar y cargado positivamente, que se encuentra conservado en otras rodanasas de *A. ferrooxidans* y de otros microorganismos. Por lo que resulta difícil definir, mediante el análisis de su secuencia, si tiene un papel funcional en la catálisis o más bien estructural. Sin embargo, las características presentadas por la P14.3 la acercan mucho más a una enzima con actividad MST.

La proteína P16 presenta algunas características similares a la P14.3. Sin embargo, la P16 posee una Ala en lugar de la Gly en la posición Cys+1, un residuo igualmente pequeño, posee un grupo metilo que proporciona el carácter hidrofóbico, similar al de la Gly de la P14.3. En la posición Cys+4 se encuentra una Met, la cual puede considerarse equivalente a un residuo alifático como la Val de la SseA, ya que el azufre de la Met es muy poco reactivo e hidrofóbico. En resumen, las características del sitio activo de la

P16 la hacen más parecida a la SseA que la P14.3. Se puede esperar, entonces, que la P16 presente actividad MST.

#### **Proteínas tipo tiosulfato: azufre transferasa de *A. ferrooxidans* ATCC12270**

Las proteínas P15 y P16.2 poseen un residuo positivo en la posición Cys+1 como en la rodanasa TST de bovino.

Las proteínas P15 y P16.2 presentan características de proteínas con actividad TST, ya que ambas poseen un residuo cargado positivamente en la posición Cys+1, lo cual puede considerarse un requisito fundamental para la actividad TST (Bordo y Bork, 2002). Seguidamente, se encuentran residuos pequeños o hidrofóbicos, Ser (P15) y Thr (P16.2). La principal diferencia se encuentra en la posición Cys+4. En la P15 se encuentra una His, mientras que en la P16.2 se encuentra una Gly. Aunque, esto no afectaría la posibilidad de que ambas se desempeñen como tiosulfato: azufre transferasas.

Por su parte, la proteína P28 no se ajusta al patrón esperado para las TST. Sin embargo, presenta un sitio catalítico casi idéntico al de la GlpE de *E. coli*, una TST bien estudiada (Ray y col., 2000; Spallarossa y col., 2001). Esto permite suponer que la proteína de *A. ferrooxidans* tiene actividad TST. Además, se puede pensar que ambas proteínas utilizan el mismo sustrato *in vivo*.

#### **Proteínas de *A. ferrooxidans* ATCC23270 de tipo desconocido**

La proteína P11 posee en la posición Cys+1 un residuo alifático hidrofóbico (Leu) que podría participar en el reconocimiento de un sustrato apolar. Aunque, hasta el

momento no se han caracterizado proteínas con una Leu en dicha posición, otras proteínas como la GlpE y la SseA de *E. coli* también presentan un residuo apolar en la misma posición relativa. Seguidamente se encuentra una Ser, que acerca la P11 a la proteína SseA. Posteriormente, se encuentran dos residuos de Gly, el primero de ellos en posición Cys+3, es un elemento estructural conservado en el lazo catalítico de las rodanasas. Aunque la Gly no es un residuo de gran tamaño, se encuentra entre los más apolares. Finalmente, en la posición Cys+5 se encuentra una Arg que aporta una carga positiva y polaridad.

El lazo del sitio activo de la P11 no presenta residuos con cadenas laterales cargadas en las posiciones Cys+1 o Cys+2, por lo que la posibilidad que presente actividad TST es baja. Por otro lado, la P11 tampoco se ajusta bien al patrón de residuos presentes en las proteínas con actividad MST.

La P14 posee un sitio activo con un residuo de Asp (Cys+1, polar y cargado negativamente) seguido de una Ser, un aminoácido pequeño y capaz de formar puentes de hidrógeno. Posteriormente se encuentra una Gly, un componente conservado del sitio activo con una función principalmente estructural. Luego, está una Thr (un residuo pequeño y levemente polar). En la posición Cys+5 se encuentra una Arg, polar y cargada positivamente.

Las características que se destacan del sitio catalítico de la P14 serían la polaridad (Asp, Ser, Thr y Arg) y la carga negativa (Asp, en Cys+1). Posiblemente, los residuos de Asp y de Arg queden en una posición frente a frente, dada la estructura que se observa en los sitios activos conocidos. Esto podría implicar una participación conjunta en la

formación del enlace sulfano en la Cys activa, como ocurre en la ThiI de *E. coli* (Palenchar y col., 2000). La proteína P14 tiene alguna semejanza, en su sitio catalítico, con la ThiI de *E. coli* y con CDC25B por el residuo de carga negativa en la posición Cys+1. En el caso de ThiI, también posee un residuo de Arg en la posición Cys+2 que compensaría, de esta forma, la carga negativa del residuo de Glu. Además, la CDC25B posee otro Glu en la posición Cys+5. De este modo, la P14 no presenta características que permitan agruparla entre las MSTs o las TSTs.

La proteína P21 presenta un sitio catalítico poco común, en Cys+1 se encuentra una Pro, cuyas propiedades más destacables son su hidrofobicidad y rigidez estructural. Seguidamente se encuentra una Thr, un residuo polar pequeño. Considerando que la P21 se encontraría en un ambiente ácido ( $\text{pH} \approx 2$ ), el oxígeno de la cadena lateral de la Thr se encontraría desprotonado, aportando carga negativa al sitio catalítico. En la posición Cys+3 se encuentra la Gly conservada, seguida de una Gln, un residuo polar, y finalmente se encuentra una Leu, un residuo alifático apolar. En conjunto, se puede pensar que el sitio catalítico presenta residuos apolares y polares de manera alternada. A partir de la información obtenida en base a la secuencia aminoacídica y el hecho que se encuentra en un ambiente ácido, se puede pensar que no se trata de una proteína con actividad TST o MST.

Finalmente, hay que destacar la conservación de los residuos en las rodanasas de *A. ferrooxidans* del lado carboxilo de la Cys hasta una distancia de 11 residuos a partir del sitio activo (Figura 12). Se puede deducir el siguiente patrón conservado C-x-[S/T]-G-x-R-S-x (2)-A-A. En la posición Cys+2 se encontraría un residuo hidrofílico, mientras que

en la posición Cys+5 se encuentra, generalmente un residuo con carga positiva. Por lo que resulta en un interesante grupo de proteínas relacionadas entre si. Entonces, las variaciones estarían vinculadas a la actividad enzimática, como la selección del sustrato, y finalmente con el rol de la proteína en la fisiología celular de *A. ferrooxidans*.

### **Conclusión**

Se comparó la estructura secundaria predicha de las proteínas putativas de *A. ferrooxidans* en la región correspondiente al sitio catalítico. De esta manera, se comprobó que las proteínas estudiadas presentarían una organización de la estructura secundaria similar al de las proteínas de la superfamilia Rodanasa Fosfatasa tipo CDC25 (Figura 11).

Los resultados de los análisis informáticos indican que las proteínas putativas estudiadas de *A. ferrooxidans* presentan un dominio rodanasa. La comparación de las secuencias de proteínas de las rodanasas de *A. ferrooxidans* mostró que las proteínas son muy similares entre si y que, además, presentan secciones conservadas con otras rodanasas. Esto, se confirmó mediante la comparación de la estructura secundaria que reveló la presencia de los motivos estructurales conservados en las proteínas de *A. ferrooxidans*.

En lo que se refiere a la deducción de la actividad catalítica de las proteínas estudiadas se determinó que algunas de ellas presentan un sitio catalítico similar al de las TST, (P15, P16.2 y P28) mientras que la P14.3 y la P16 presentan rasgos de enzimas MST. Sin embargo no se pudo predecir, en base a la comparación de las propiedades del sitio catalítico, la posible actividad enzimática de las proteínas P11, P14 y P21.

**Entorno genético de los genes que codifican rodanasas en *A. ferrooxidans* ATCC23270**

Como resultado de las búsquedas realizadas en el genoma de *A. ferrooxidans* se identificaron seis nuevos genes putativos que codificarían para proteínas con dominios rodanasas, además de *p21*, *p16* y *p14* (Figura 14). El análisis realizado al entorno de los genes putativos muestra que, solamente, *p16.2* no formaría parte de un operón (Figura 14). Los restantes genes formarían parte de posibles unidades transcripcionales de, por lo menos, dos genes.

Río arriba del gen *p11* (Figura 14) se encuentra el gen *moaA* que codificaría para la proteína MoaA que participa en la biosíntesis del cofactor de molibdeno. Río abajo del gen *p11* se encuentran *sirA*, *hyp1*, *hdrC*, *hdrB* y *hdrA*. Estos siete genes podrían formar parte de una unidad transcripcional.

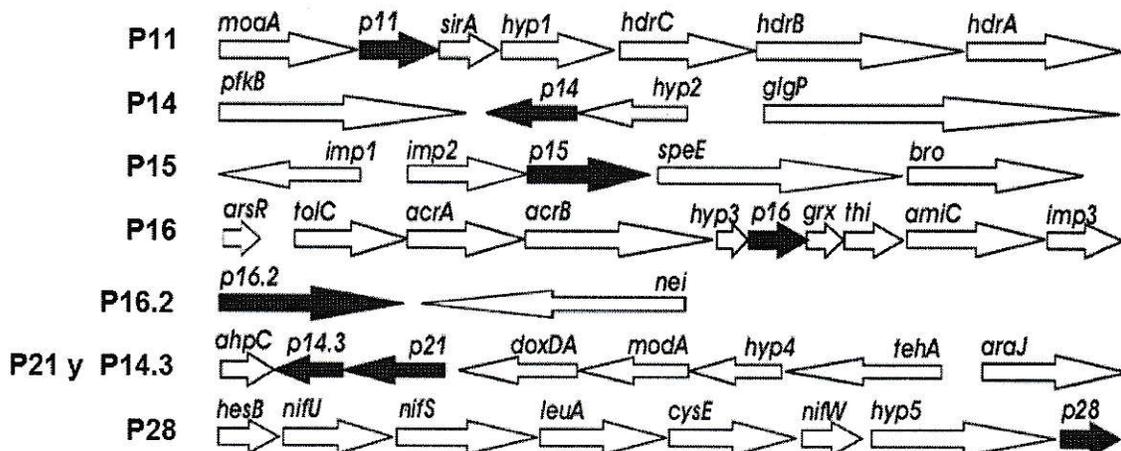


Figura 14. Entorno de los genes putativos que codifican proteínas con dominios rodansa presentes en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC23270. Acosta y col. (2005)

Se sabe que el precursor Z es sintetizado por las proteínas MoaA y MoaC (Hänzelmann y Schindelin, 2004). Por su parte, la molibdopterina forma parte de los sitios catalíticos de numerosas enzimas con actividad óxido-reductora como la polisulfuro reductasa y la sulfito oxidasa. Aunque, no existe evidencia de una interacción directa entre la proteína MoaA y una rodanasa, estas últimas pueden participar como dadores de átomos de azufre en la biosíntesis de molibdopterina (Matthies y col., 2004).

El gen *sirA* codifica para un miembro de la familia de proteínas SirA, que consiste en los reguladores de la respuesta en los sistemas de dos componentes. Los sistemas de dos componentes constan de una proteína quinasa sensora, usualmente localizada en la membrana, la cual fosforila al regulador de la respuesta (generalmente un regulador transcripcional) que, en este caso, sería la proteína SirA. Los genes que codifican para sistemas de dos componentes no siempre se encuentran en el mismo locus por lo que resulta complejo determinar la contraparte de cada componente localizado. Además, no es infrecuente que un componente pueda interactuar con otros no directamente relacionados (Pernestig y col., 2001; Oshima y col., 2002; Teplitski y col., 2003; Zhou y col., 2003).

Por su parte, el gen *hyp1* codifica para una proteína conservada de función desconocida relacionada con DsrE de *A. vinosum*. La DsrE es una proteína soluble localizada en el citoplasma, forma parte de un complejo de proteínas involucrado en la oxidación del azufre (Dahl y col., 2005). La función exacta de DsrE es desconocida,

pero se cree que participa en la oxido-reducción de tioles o disulfuros (Fomenko y Gladyshev, 2002).

Los genes *hdrC*, *hdrB* y *hdrA* codifican para las subunidades C, B y A de la heterodisulfuro reductasa (Schäfer y col., 1999). Aunque, estas proteína se encuentran caracterizadas en arqueas metanogénicas, algunos componentes forman parte de otros sistemas de oxido-reducción con el objetivo de obtener energía. En este caso, la proteína DsrK, que forma parte del sistema desasimilarotio de oxidación del azufre en *A. vinosum*, es una fusión de las proteínas HdrB y HdrC (Pott y Dahl, 1998; Dahl y col., 2005).

Resumiendo, los productos génicos de *hyp1*, *hdrA*, *hdrB* y *hdrC* podrían estar involucrados en la oxidación del azufre, lo cual se encuentra apoyado por la evidencia bibliográfica (Pott y Dahl, 1998; Schäfer y col, 1999; Fomenko y Gladyshev, 2002; Dahl y col., 2005). Además, esto se apoya en que los genes del operón P11 se expresan al crecer *A. ferrooxidans* en presencia de compuestos reducidos de azufre (Acosta y col., 2005). En este contexto, la posible función de SirA puede ser la de actuar como regulador de la expresión de otros genes implicados en la oxidación de los compuestos de azufre.

El gen *p14* formaría una pequeña unidad transcripcional con el gen *hyp2*. El producto del gen *p14* muestra un alta similitud a la polisulfuro: azufre transferasa de *W. succinogenes*. Sin embargo, la semejanza no se extiende al sitio catalítico de la P14.

Río arriba y en la misma dirección del gen *p14*, se encuentra un gen hipotético (*hyp2*) cuyo producto génico está involucrado en la adhesión a la célula huésped en otros

microorganismos. No se conoce qué función podría tener esta proteína en microorganismos de vida libre. No se puede establecer una vinculación funcional entre las proteínas codificadas por los genes *p14* e *hyp2*.

A pesar que el gen *p14.3* se encuentra muy cerca de *p21*, los experimentos para determinar la extensión del operón demostraron que la *p14.3* no se expresa con el operón del gen *p21* en las condiciones estudiadas (Acosta y col., 2005).

Río arriba del gen *p15* (Figura 14) se encuentra el gen *imp2*, que codifica para una proteína de membrana interna desconocida que también presenta una posible señal de exportación tipo Tat. Río abajo, está el gen *speE* que codifica para la espermidina sintasa. La espermidina es una poliamina que puede influir en la síntesis de DNA, RNA, proteínas y en la formación de biopelículas (Tabor y Tabor, 1985; Igarashi y Kashiwagi, 2000; Yoshida y col., 2004; Patel y col., 2006). En la misma orientación y río abajo se encuentra el gen *bro* que codifica para una proteína de la familia BRO, la cual está integrada por proteínas de unión al DNA (Bideshi y col, 2003). La información que disponemos no permite determinar si algunos de los productos génicos del operón P15 interactúan entre si, o bien actúan independientemente en vías metabólicas diferentes.

El gen *p16* podría formar parte de una unidad transcripcional que constaría de 9 genes. Río abajo del gen *p16* (Figura 14) se encuentran los genes *grx*, que codificaría para una glutaredoxina, *thi*, que codificaría una tioredoxina (Holmgren, 1989), *amiC*, para una N-acetilmuranoil-L-alanina amidasa (Bernhardt y De Boer, 2003) y finalmente *imp3*, para una proteína integral de membrana semejante a una hemolisina tipo 3 (Baida y Kuzmin, 1995). Inmediatamente río arriba del gen *p16* y en la misma orientación, se

encuentra el gen *arsR*, que codifica para una proteína miembro de la familia ArsR, el represor del sistema de resistencia al arsénico. Esta proteína se disocia del DNA en presencia del metal permitiendo la expresión de los genes que regula (San Francisco y col., 1990). También, río arriba del gen *p16* se encuentran los genes *tolC*, que codifica para un componente de la membrana externa de una bomba de eflujo, mientras que *acrA* y *acrB*, codificarían para los componentes de una bomba de eflujo de cationes o drogas y que serviría como un sistema de defensa contra estos agentes en bacterias Gram-negativas (Andersen, 2003). Seguidamente, se encuentra el gen *hyp3*, que codificaría para una proteína hipotética conservada de función desconocida. Además, la proteína Hyp3 presentaría una señal de exportación tipo Sec.

Los genes que se encuentran en el contexto del gen *p16*, sugieren que las proteínas que codifican podrían formar parte de un sistema de defensa contra condiciones de estrés, posiblemente oxidativo, o bien, participar en la homeostasis óxido-reductora de la célula, tal como se ha reportado para una proteína MST (Nagahara y col., 2007).

El contexto genómico del gen *p16.2* (Figura 14) muestra que este no forma parte de ningún operón, ya que no se encuentra ningún gen en la misma orientación. Por lo tanto, no se puede deducir el posible contexto fisiológico para la enzima.

El gen *p21* se encuentra río abajo de los genes *doxDA*, *modA*, *hyp4* y *tehA* (Figura 14). Varios de los genes del operón *p21* estarían relacionados al metabolismo desasimilatorio del azufre (Ramírez y col., 2002; Ramírez y col., 2004). Río abajo del gen *p21* se encuentra el gen *p14.3*, que codifica para una de las proteínas con dominio rodanasa. Río arriba del gen *p21* orientados en la misma dirección se encuentran los

genes *tehA*, que codifica para un transportador de C4-dicarboxilatos (Janausch y col., 2002), posteriormente se encuentra *hyp4*, que codifica para una proteína hipotética de función desconocida, seguidamente el gen *modA*, que codifica para un componente periplásmico de un sistema de transporte tipo ABC cuyo sustrato, posiblemente, es molibdeno y finalmente, el gen *doxDA* codifica una fusión de las proteínas DoxD y DoxA. Las proteínas DoxD y DoxA conformarían una quinol oxidasa terminal similar a la que se encuentra en el citoplasma de *A. ambivalens* (Müller y col., 2004). Posiblemente, el gen *p14.3* no forma parte de una unidad transcripcional junto al gen *p21*, debido a que hasta el momento, no se ha podido comprobar su coexpresión, como es el caso de los otros componentes del supuesto operón (Acosta y col., 2005). La información que disponemos respecto de los productos génicos del operón P21 permite especular que algunos de ellos pudieran participar en el metabolismo desasimilatorio del azufre, como las proteínas DoxDA y P21.

El gen *p28*, se encuentra al final de un posible operón (Figura 14) que estaría involucrado en la fijación de nitrógeno, donde se encuentra el gen *hesB*, que se expresa sólo en condiciones de fijación de nitrógeno aunque, su función es desconocida (Dombrecht y col., 2002). Los genes *nifU* y *nifS* codificarían las proteínas NifU y NifS, requeridas para la formación de la holoenzima nitrogenasa en *A. vinelandii* (Yuvaniyama y col., 2000; Frazzon y col., 2002). NifS es una cisteína desulfurasa que aporta los átomos de azufre requeridos para la formación del grupo Fe-S de la nitrogenasa. Por su parte, NifU complementa el trabajo de NifS aportando los átomos de Fe y sirviendo como andamio para la formación del grupo Fe-S de la nitrogenasa

(Yuvaniyama y col., 2000). Seguidamente, se encuentra el gen *leuA*, que codifica una proteína relacionada con el transporte de aminoácidos y su metabolismo (Evans y col., 1991), *cysE*, que codifica serina acetiltransferasa; *nifW*, codifica para una proteína accesoria de la nitrogenasa. Finalmente, el gen *hyp5* que codifica para una proteína hipotética que posee dominios McbC. La proteína McbC forma parte del complejo enzimático microcina B17 sintasa de *E. coli*. Específicamente, está encargada de ciclar la cadena polipeptídica de la premicrocina B17 (Liu, 1994; Li y col., 1996). El dominio McbC está emparentado con proteínas óxido reductoras como la nitrato reductasa (Kobori y col., 2001). El contexto genómico apunta a que *hyp5* codificaría para una proteína relacionada con la oxidación o reducción de compuestos nitrogenados en lugar de la biosíntesis de polipéptidos tipo microcina.

El contexto genómico del gen *p28* sugiere su participación en la biosíntesis o reparación de grupos Fe-S (Pagani y col., 1984). La bacteria *A. ferrooxidans* es capaz de fijar nitrógeno (Mackintosh, 1978). Además, en un trabajo teórico basado en el análisis del genoma de *A. ferrooxidans* resultó en un posible modelo de regulación de la asimilación del azufre, su conexión con la fijación del nitrógeno, y la formación de grupos Fe-S (Valdes y col., 2003). Los autores del modelo encontraron tres operones involucrados en la fijación del nitrógeno. Uno de ellos corresponde al contexto del gen *p28*, aunque Valdes y col. (2003) no lo identifican como un gen que codifica para una rodanasa.



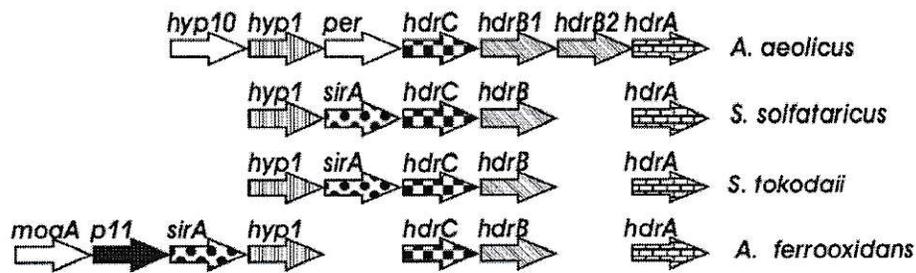
### **Detección y comparación de los contextos genéticos conservados**

Se obtienen diferentes tipos de información mediante la comparación de los genomas de los procariotas que se pueden utilizar para dilucidar la función de proteínas no caracterizadas. Primero, las fusiones de dominios desconocidos (o genes) con dominios (o genes) funcionalmente caracterizados, ubican la función del dominio (o gen) desconocido en un proceso similar al del dominio conocido. Segundo, el agrupamiento de genes en operones, usualmente implica una expresión genética coordinada y los contextos genéticos conservados son una fuerte indicación de interacción funcional, especialmente, a través de interacciones físicas de los productos génicos.

#### **Comparación del contexto genético del gen *p11***

Se encontró que *Aquifex aeolicus*, una bacteria hipertermófila que oxida azufre (Deckert y col., 1998; Urich y col., 2004) y dos arqueas, *Sulfolobus solfataricus*, que posee elementos genéticos que harían posible el uso de compuestos reducidos de azufre como dadores de electrones (She y col., 2001; Müller y col., 2004) y *Sulfolobus tokodaii*, que oxida compuestos reducidos de azufre (Kawarabayasi y col., 2001) poseen contextos genómicos similares al operón putativo P11 de *A. ferrooxidans* (Figura 15).

La comparación del operón P11 agrupa a los productos génicos *hyp1*, *hdrC*, *hdrB* y *hdrA* como un posible grupo funcional involucrado en la oxidación de compuestos de azufre. Asimismo, el producto de *sirA* sería un elemento importante, que podría controlar la expresión de otros componentes relacionados al sistema de oxidación de los compuestos reducidos de azufre.



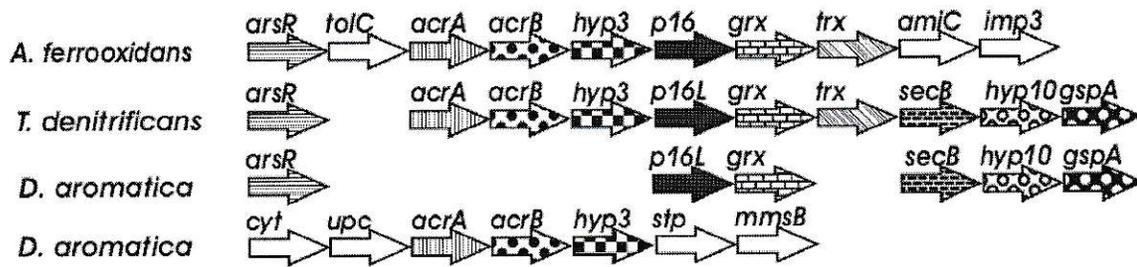
**Figura 15.** Comparación de los contextos genómicos similares al operón putativo P11 de *A. ferrooxidans*. El patrón de relleno indica genes homólogos, mientras que los sin relleno, no presentan similitud con otras secuencias presentes en el contexto genómico comparado.

Los productos de los genes *moaA* y *p11* no parecen estar directamente involucrados en el metabolismo energético. Sin embargo, podrían participar en la formación de cofactores imprescindibles para las enzimas involucradas en llevar adelante la oxidación de los compuestos de azufre.

### Comparación del contexto genético del gen *p16*

La búsqueda de contextos genómicos similares al operón putativo P16 de *A. ferrooxidans* dió por resultado tres contextos similares localizados en los genomas de *Thiobacillus denitrificans* y en *Dechloromonas aromatica* (Figura 16).

Los contextos de *A. ferrooxidans* y *T. denitrificans* son casi idénticos, mientras que en *D. aromatica* se encuentran dos conjuntos de genes localizados en diferentes regiones del genoma.



**Figura 16.** Comparación de contextos genómicos similares al operón putativo P16 de *A. ferrooxidans*. El patrón de relleno similar señala genes homólogos, mientras los sin relleno, no presentan similitud con otras secuencias presentes en los contextos genómicos.

Llama la atención la presencia de un gen que codifica para un regulador transcripcional tipo ArsR. Los genes, bajo el control de ArsR, serían los tipos *p16* y *grx*. Usualmente, los reguladores tipo ArsR se encuentran codificados inmediatamente río arriba del operón cuya expresión regulan (Rensing, 2005). En esencia un regulador tipo ArsR se encuentra unido al DNA bloqueando la expresión de los genes de respuesta al estrés. Cuando el ligando se une al represor, este se separa del DNA permitiendo la transcripción de los genes. Generalmente, actúan como ligandos de ArsR iones metálicos cuya concentración intracelular sea potencialmente peligrosa para el equilibrio oxidoreductor del citoplasma.

El análisis de la secuencia de la proteína P16 indica que se trataría de una enzima con actividad MST, mientras que Grx sería una glutaredoxina. Se ha visto que ambos tipos de proteínas podrían participar en el mantenimiento de la homeostasis oxidoreductora de la célula (Nagahara y col., 2007).

Del mismo modo, algunos sistemas de transporte se activan como respuesta a condiciones de estrés por agentes dañinos para la célula. Uno de estos sistemas es el

## Resultado y Discusión

RND (Resistencia-Nodulación-División celular) del cual forma parte el sistema AcrAB (Saier y col, 1994). El sistema Acr responde a diversos  $\gamma$ -solventes orgánicos, detergentes, colorantes, antibióticos lipofílicos (Nikaido, 1999) e incluso metales pesados (Gupta y col., 1999). La proteína AcrAB también comprende un ortólogo de TolC en la membrana externa que interactúa con el complejo de membrana interna (Tikhonova y Zgurskaya, 2004). El sistema AcrAB-TolC tiene la capacidad de exportar directamente una molécula desde el citoplasma hasta el espacio extracelular (Zgurskaya y Nikaido, 1999). Usualmente los genes que codifican los componentes de la membrana interna como de la externa se encuentran en un mismo operón (Andersen y col., 2001).

Un tercer elemento, posiblemente involucrado en la respuesta al estrés es el producto del gen *hyp3*, que consiste en un polipéptido de 7 kDa aproximadamente y que posee, además una señal de exportación tipo Sec (Figura 17A). Aunque, las proteínas tipo Hyp3 no presentan relación con ningún dominio de proteínas conocido, estas se encuentran codificadas en varios microorganismos y están altamente conservadas (Figura 17A). Por lo tanto, constituiría una nueva familia de proteínas desconocidas. Su pequeño tamaño y el hecho de que la señal de exportación abarca 1/3 de Hyp3 hacen pensar que podría tener una función reguladora.

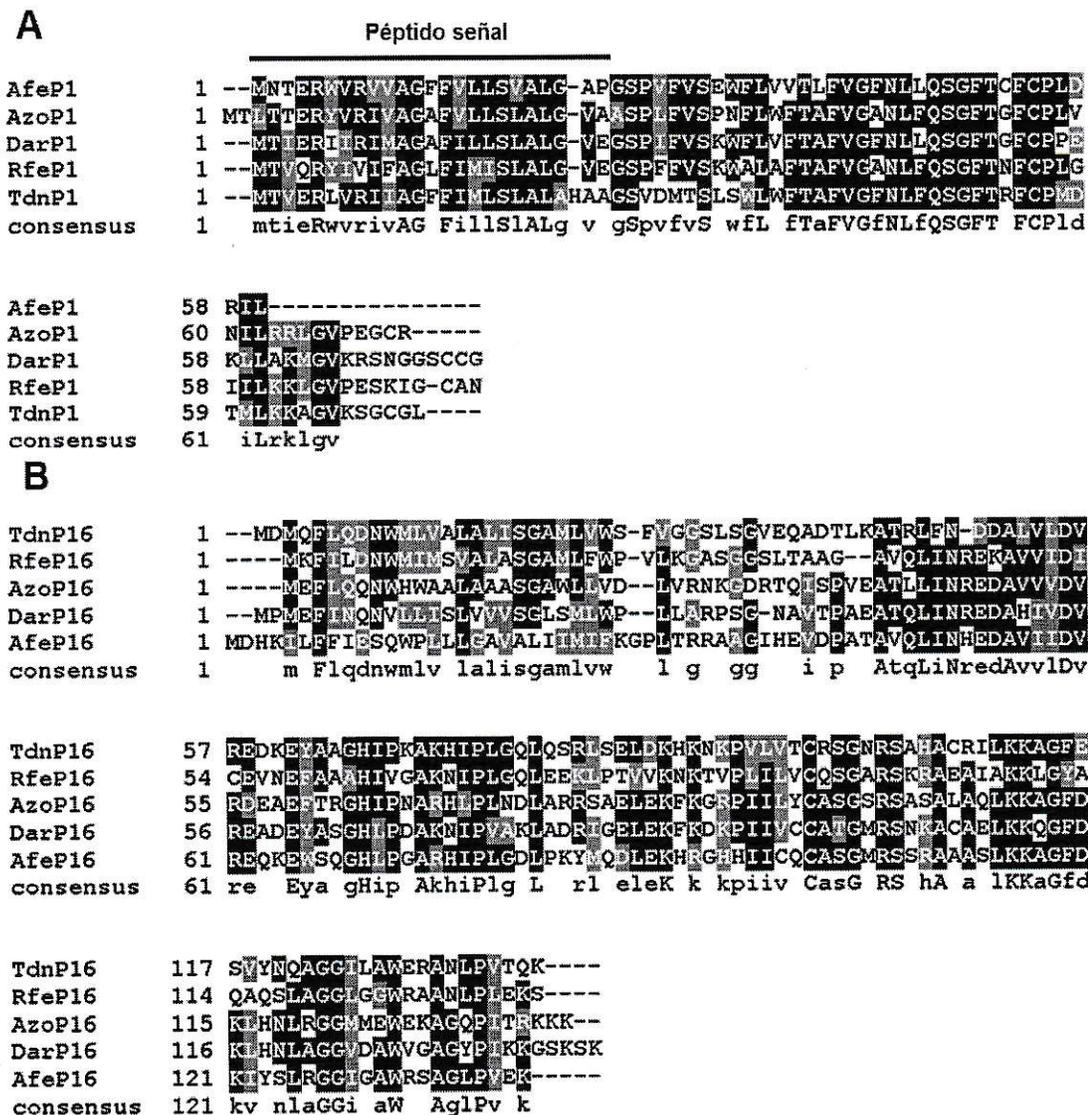
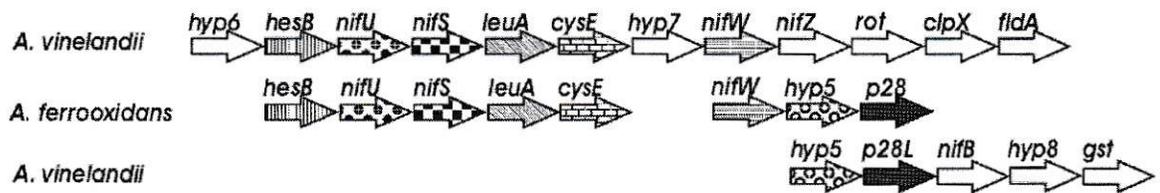


Figura 17. Alineamiento de algunas proteínas del operón putativo P16 de *A. ferrooxidans*. En A se muestra el alineamiento de secuencias similares a Hyp3. La barra indica la extensión del péptido señal para el sistema de exportación tipo Sec. AfeP1, es la proteína Hyp3 de *A. ferrooxidans*; AzoP1, proteína tipo Hyp3 de *A. vinelandii*; DarP1, corresponde a la proteína tipo Hyp3 de *Dechloromonas aromatica*; RfeP1, a *Rhodoferax ferrireducens*; TdnP1, a *Thiobacillus denitrificans*. En B, alineamiento de proteínas similares a la P16 de *A. ferrooxidans*. AfeP16, proteína P16 de *A. ferrooxidans*; TdnP16, proteína tipo P16 de *T. denitrificans*; RfeP16, a *R. ferrireducens*; AzoP16, a *A. vinelandii* y DarP16, a *D. aromatica*. Las letras con fondo negro resaltan los residuos idénticos, mientras que el gris, los similares. El consenso muestra, en letras mayúsculas, los residuos 100 % conservados y, las minúsculas, hasta 65 % de conservación.

El conjunto de la información referente al operón putativo P16 apunta a que sus productos se encontrarían involucrados en un sistema de respuesta al estrés, posiblemente causado por algún ión metálico como el cobre o el arsénico, considerando los ambientes en los que *A. ferrooxidans* puede crecer.

**Comparación del contexto genético del gen *p28***

En la Figura 18 se compara el contexto genómico del operón putativo P28 con otros similares encontrados en *A. vinelandii*. Los productos de los genes de *A. vinelandii* son conocidos por su participación en la formación de grupos Fe-S. Seis de los ocho genes, del contexto genómico del gen *p28*, se encuentran en la misma región del genoma de *A. vinelandii*. La comparación de los productos génicos mostró alto grado de identidad, el porcentaje de identidad se muestra entre paréntesis; HesB (40 %), NifU (56 %), NifS (66 %), LeuA (60 %), CysE (66 %), NifW (54 %), Hyp5 (44 %) y P28 (41 %) (Acosta y col., 2005).



**Figura 18.** Comparación de los contextos genómicos de genes similares al operón putativo P28 de *A. ferrooxidans*. El patrón de relleno similar señala a los homólogos, mientras que los sin relleno, no presentan similitud con otras secuencias presentes en el contexto genómico comparado. *A. ferrooxidans* representa el contexto genómico del operón P28. *A. vinelandii*, los grupos de genes que muestran similitud con el operón P28. Tomado de Acosta y col. (2005).

Se encontraron genes similares a *p28* e *hyp5* de *A. ferrooxidans* presentes en una región diferente del genoma de *A. vinelandii* asociados a un gen *nif* (Figura 18). Estos

resultados indican que posiblemente la proteína P28 se encuentra involucrada en la generación o reparación de grupos Fe-S, o bien, que participa como dadora de azufre, de un complejo para la formación de molibdopterina, tal como ocurre en humanos (Matthies y col., 2004).

El análisis del producto génico de *hyp5* reveló que se trata de una proteína con dos dominios conservados McbC. Este dominio de proteínas se encuentra en la proteína McbC de *E. coli*, la cual genera un enlace polipéptido durante la formación de la microcina B17 (Liu, 1994).

Aunque, no se encontraron otros genomas además de *A. vinelandii*, con una organización genética similar a la de *A. ferrooxidans*, sí se localizaron juntos genes similares a *p28* e *hyp5* en otros microorganismos (*P. naphthalenivorans* y *Azoarcus sp.*).

La figura 19A muestra un alineamiento entre las secuencias de las proteínas P28 de *A. ferrooxidans* y otras secuencias similares encontradas en la base de datos NCBI. Todas las proteínas mostradas en la figura 19A contienen cuatro repetidos ANK en la región C-terminal, lo cual está de acuerdo con el número de repetidos observado en otras proteínas (Sedgwick y Smerdon, 1999). El rol de los repetidos ANK consiste en la mediación de la interacción entre proteínas. Se considera que cumplen la misma función aún en proteínas de función desconocida (Sedgwick y Smerdon, 1999). El sitio catalítico del dominio rodanasa de las proteínas tipo P28 se encuentra altamente conservado, de lo que se puede deducir que el sustrato fisiológico y, probablemente, la función de la proteína serían similares (Figura 19A). Las proteínas similares a P28 fueron anotadas

como proteínas hipotéticas de función desconocida, por lo que aún no existe información experimental sobre ellas.

Si bien el contexto genético del gen *p28* se encuentra parcialmente conservado se debe notar que tanto en *A. ferrooxidans* como en *A. vinelandii* están ligados a genes cuyos productos están involucrados en la fijación de nitrógeno (Figura 18). Además, en coincidencia, las proteínas tipo P28 se encuentran en microorganismos capaces de fijar nitrógeno (se exceptúa a *P. naphthalenivorans*).

En cuanto al producto del gen *hyp5* de *A. ferrooxidans*, podría estar involucrado en un sistema de oxidoreducción. Como se indicó anteriormente, la proteína Hyp5 posee dos dominios McbC. Este dominio forma parte de una superfamilia de proteínas involucradas en procesos de oxidoreducción, especialmente nitrato reductasas. Por ello, y considerando su contexto, su función más probable sería la de oxidar o reducir compuestos nitrogenados, posiblemente durante el proceso de la fijación de nitrógeno.

A

Dominio Rodanasa

```

Brady 1 -----LDPRIKQKIDVCOAERKLLD-----LVPRFHEKDAENAHHTYCOHHCQGLSAKISGCTIRTPHLYCYKPKASQKACEDSPCFARVYSLDGGYEAQRORPAQ
Xantho 1 -----LPERIIPFCICPEASLHNGOC-----KALILKEDDQANVAACHESRNAYTSALSDYCGTTPACQPIYCYCHQASREACILSDPCFARVYSLDGGYEAQRORPAQ
Polar 1 -----LGGGPRKRIKAPLAKRIGOC-----KCALIKAKDAENASGDPGQVPLKCHQKQDQGLLEPRKPRKLYCYCHQASREACILSDPCFARVYSLDGGYEAQRORPAQ
Azoa 1 HTQTATPAFVTSVSGHSTIAADLPLKIPGCVLALAKDAENASGDPGQVPLKCHQKQDQGLLEPRKPRKLYCYCHQASREACILSDPCFARVYSLDGGYEAQRORPAQ
Buxe 1 -----LQCFVPRKRIKAPLAKRIGOC-----KALILKEDDQANVAACHESRNAYTSALSDYCGTTPACQPIYCYCHQASREACILSDPCFARVYSLDGGYEAQRORPAQ
Methy 1 -----LHLPKRIKAPLAKRIGOC-----KALILKEDDQANVAACHESRNAYTSALSDYCGTTPACQPIYCYCHQASREACILSDPCFARVYSLDGGYEAQRORPAQ
Azoto 1 -----HAPAKRIKAPLAKRIGOC-----KALILKEDDQANVAACHESRNAYTSALSDYCGTTPACQPIYCYCHQASREACILSDPCFARVYSLDGGYEAQRORPAQ
Burvi 1 -----LGGGPRKRIKAPLAKRIGOC-----KCALIKAKDAENASGDPGQVPLKCHQKQDQGLLEPRKPRKLYCYCHQASREACILSDPCFARVYSLDGGYEAQRORPAQ
P28 1 -----HWVPRKRIKAPLAKRIGOC-----KALILKEDDQANVAACHESRNAYTSALSDYCGTTPACQPIYCYCHQASREACILSDPCFARVYSLDGGYEAQRORPAQ
consensus 1      nr r frxitv eaa llqrr      pd lllpvrda sya ahl gqv lt n li rt r rPvllTCYgGnaSq yaqataDgFaeVyslDGGYeaW a va a
  
```

```

ANR 1 ANR 2 ANR 3
Brady 107 -----ANRCHLAAVAARPPDDDDLDHNNTPPLHRAQVYICVAHFRRLKACGATVAMNDGNNALMLACVCGHLDADDAIMVPAQGDIDRNNIDVCAIHLHYAASGSCAAV
Xantho 107 APL-----APIDALSSQVADHNSPPDGMETAEHNDPPLHRAQVYICVAHFRRLKACGATVAMNDGNNALMLACVCGHLDADDAIMVPAQGDIDRNNIDVCAIHLHYAASGSCAAV
Polar 108 -----GKDPPELAAVAARPPDDDDLDHNNTPPLHRAQVYICVAHFRRLKACGATVAMNDGNNALMLACVCGHLDADDAIMVPAQGDIDRNNIDVCAIHLHYAASGSCAAV
Azoa 121 EAARSGSTTRTASISPTLLEHIAAYSDPDDDDLDHNNTPPLHRAQVYICVAHFRRLKACGATVAMNDGNNALMLACVCGHLDADDAIMVPAQGDIDRNNIDVCAIHLHYAASGSCAAV
Buxe 108 -----SEALPELAAVAARPPDDDDLDHNNTPPLHRAQVYICVAHFRRLKACGATVAMNDGNNALMLACVCGHLDADDAIMVPAQGDIDRNNIDVCAIHLHYAASGSCAAV
Methy 103 GHL-----AAFLADVREHCHPG-EPRIKQKCTPLHRAQVYICVAHFRRLKACGATVAMNDGNNALMLACVCGHLDADDAIMVPAQGDIDRNNIDVCAIHLHYAASGSCAAV
Azoto 110 TAP-----DAAPSAKAAADVREHCHPG-EPRIKQKCTPLHRAQVYICVAHFRRLKACGATVAMNDGNNALMLACVCGHLDADDAIMVPAQGDIDRNNIDVCAIHLHYAASGSCAAV
Burvi 108 -----GSPPELAAVAARPPDDDDLDHNNTPPLHRAQVYICVAHFRRLKACGATVAMNDGNNALMLACVCGHLDADDAIMVPAQGDIDRNNIDVCAIHLHYAASGSCAAV
P28 106 N-----SQTLEAGCQDQKQKHPADPHATTDVPLHRAQVYICVAHFRRLKACGATVAMNDGNNALMLACVCGHLDADDAIMVPAQGDIDRNNIDVCAIHLHYAASGSCAAV
consensus 121 n s      v p LaaVL gf a v ar ahg tPLmkaA G div LIA Ga v a naDGNALMLACV ii lv aGi ldh Nd Gat LuyaaSsgkaev
  
```

```

ANR 3 ANR 4
Brady 219 GAHPLKAGALISAELGCTFDLHNAALKEGICLLEAAKATARPVPEVRF
Xantho 219 ERRLKAGADPRKIQKCHCALDAAALECDLLEAAATKEAQA-----
Polar 219 RTPLKLNADVTSKIPDQDFALDHAALKEGICLLEAA-----
Azoa 241 KALPEKAGADPRKIQKCHCALDAAALECDLLEAAATKEAQA-----
Buxe 219 GSALKAGADPRKIQKCHCALDAAALECDLLEAAALQLEA-----
Methy 211 VSLKAGADPRKIQKCHCALDAAALECDLLEAAALQLEA-----
Azoto 223 KCHPEKAGADPRKIQKCHCALDAAALECDLLEAAALQLEA-----
Burvi 219 KRALKAGADPRKIQKCHCALDAAALECDLLEAAALQLEA-----
P28 216 ERRLKAGADPRKIQKCHCALDAAALECDLLEAAALQLEA-----
consensus 241 v Lla gAp lrc DdfcAlDMAALkecl LLRh k
  
```

B

McbC-1

```

Pnap 1 PRRFIRGALITLLEPRND-----KVA SRKFTPAQNDQVATERISICLFEELSALFAKQLPDRVAVRNPSSGRLHPTVYVLLASGAVYVLDGFWHQRCHLEORARLT
Afer 1 PRRFIRGSRRIITLLEPRND-----KVFVFAAS-----AASVFFILDQAFDEGLGLANKKCGPDRVAVRNPSSGRLHPTVYVLLASGAVYVLDGFWHQRCHLEORARLT
Azoa 1 RRQMPNSAVLELIDSLQSPRAQRIKPEGAP-----PAPAQATLDMGALLDLSGLTAKKSLGPPDRVAVRNPSSGRLHPTVYVLLASGAVYVLDGFWHQRCHLEORARLT
Azot 1 PRRFIRGALITLLEPRND-----KVA SRKFTPAQNDQVATERISICLFEELSALFAKQLPDRVAVRNPSSGRLHPTVYVLLASGAVYVLDGFWHQRCHLEORARLT
consensus 1 PRRFIR Gap vplPllte e a i amavf l g i pqPatla igall LslqLtaK GPDRVAVR NPSSGRLHPTVYVLLASGAVYVLDGFWHQRCHLEORARLT
  
```

McbC-1

```

Pnap 112 PPIPLQTESSAPRLKQFSSNINREMKYGERFRYCOLDQKHAICALKRGAALGGRVAVLHDDLQALLGLDRASD-----DAREEEPAHRELLI-----PSEDFDQDP
Afer 107 -----DREO GSG-----MAYLSSVWREMKYGERFRYCOLDQKHAICALKRGAALGGRVAVLHDDLQALLGLDRASD-----DAREEEPAHRELLI-----PSEDFDQDP
Azoa 117 -----DLDPKRSRRLDQLSSNINREMKYGERFRYCOLDQKHAICALKRGAALGGRVAVLHDDLQALLGLDRASD-----DAREEEPAHRELLI-----PSEDFDQDP
Azot 118 -----HPA GGR-----PRMLLSSVWREMKYGERFRYCOLDQKHAICALKRGAALGGRVAVLHDDLQALLGLDRASD-----DAREEEPAHRELLI-----PSEDFDQDP
consensus 121 p gqsg prl vglSSvWREMKYGERFRYCOLDQKHAICALKRGAALGGRVAVLHDDLQALLGLDRASD-----DAREEEPAHRELLI-----PSEDFDQDP
  
```

McbC-2

```

Pnap 224 RMLPGRATGGQNRRLDPRPMYKPVVLEQNRKSRSS-HPTE-----APALDQARRLLPTEASSTALDRSRSAQRFDRRVERRLVPLLEALHPQTEGGHAPLDFGSGPPAV
Afer 212 RLPG-OMGQNRRLDPRPMYKPVVLEQNRKSRSS-HPTE-----PFPDPFARK-----KSGHTASTLDRSRSAQRFDRRVERRLVPLLEALHPQTEGGHAPLDFGSGPPAV
Azoa 232 RARLDRATGGQNTVDRPHEPRPIGEVAVARRDDDAARRILSVCTPATRKTADTEHPSALDRSRSAQRFDRRVERRLVPLLEALHPQTEGGHAPLDFGSGPPAV
Azot 231 LANEARDGHTASTDRPMYKPVVLEQNRKSRSS-HPTE-----APALDQARRLLPTEASSTALDRSRSAQRFDRRVERRLVPLLEALHPQTEGGHAPLDFGSGPPAV
consensus 241 Ra puaewGgaurIDprPmyQVvia va AsRr dmp p i lpp aara tatalqaadLir RRSARQFD e va ae fa lleaLnPrag LFDIwv ppri
  
```

McbC-2

```

Pnap 337 LNVLEDRVDEGLAPGAVLLAHPSEKAPALQALDILAVDQVYNSDFQVLEHVNTP--AAGTLKLSCHQVTRDAEAVYVALAEFTPREASLPHQVRELRREAGLEGQVLYLEAE
Afer 318 RPLVLRVYSLSSGLYVLRVDEEDVLEALHPDSEVYVATPHTLPLREKMSG--DRESTARLSCHQVTRDAEAVYVALAEFTPREASLPHQVRELRREAGLEGQVLYLEAE
Azoa 347 LNVLEDRVDEGLAPGAVLLAHPSEKAPALQALDILAVDQVYNSDFQVLEHVNTP--AAGTLKLSCHQVTRDAEAVYVALAEFTPREASLPHQVRELRREAGLEGQVLYLEAE
Azot 340 RNVLEDRVDEGLAPGAVLLAHPSEKAPALQALDILAVDQVYNSDFQVLEHVNTP--AAGTLKLSCHQVTRDAEAVYVALAEFTPREASLPHQVRELRREAGLEGQVLYLEAE
consensus 361 hvlEVrVveGLapGiyllprtaga pAlreaLa hI vwpVgqlyp lplrLl q e wltrllarLl CHQ IAR acFavard,feida ia g avrDlyeENGLIGelLYLEAE
  
```

McbC-2

```

Pnap 453 AALRGCTGICCFDDPVHLLGLSGPAPDMMVLRHVSGLDPPDERTHPRFDQETDSSVHRPFTPRAP
Afer 434 STGLRGCTGICCFDDPVHLLGLSG-----DNLQSLMHTVGLAETDRTLSLPPYRREKIDHRETS-----
Azoa 466 HGLRGCTGICCFDDPVHLLGLSG-----EAGTLMEHTVGLAETDRTLSLPPYRREKIDHRETS-----
Azot 457 RGLRGCTGICCFDDPVHLLGLSG-----GAGTLMEHTVGLAETDRTLSLPPYRREKIDHRETS-----
consensus 481 aLGLRGCTGICCFDDPVHLLGLsg gawGLMEHTVGL vDpRlEs PpYarre n sa
  
```

Figura 19. Alineamiento de proteínas similares a P28 (A) encontradas en la base de datos del NCBI. Las barras indican la extensión relativa del dominio rodanasa, así como de los repetidos ANK. Leyenda de la Figura 19 continúa en la página siguiente →

**Continuación de la leyenda de la Figura 19:** Brady, *Bradyrhizobium* sp. BTAi1; Xantho, *Xanthobacter autotrophicus*; Polar, *Polaromonas naphthalenivorans*; Azoa, *Azoarcus* sp. BH72; Buxe, *Burkholderia xenovorans*; Methy, *Methylococcus capsulatus*; Azoto, *Azotobacter vinelandii*; Burvi, *Burkholderia vietnamiensis* y P28, *Acidithiobacillus ferrooxidans*. En B se compara la secuencia aminoacídica de los productos génicos tipo Hyp5. Se indica la extensión de los dominios McbC. Azoa, *Azoarcus* sp. BH72; Azot, *Azotobacter vinelandii*; Pnap, *Polaromonas naphthalenivorans* y Afer, proteína Hyp5 de *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Las letras con fondo negro resaltan los residuos idénticos, mientras que el gris, los similares. El consenso muestra, en letras mayúsculas, los residuos 100 % conservados y, las minúsculas, hasta 65 % de conservación.

El conjunto de la información obtenida a partir de la comparación del contexto genómico como del análisis de las secuencias de las proteínas Hyp5 y P28, indican que podrían participar en el proceso de fijación del nitrógeno (Hyp5) o bien, indirectamente, mediante la formación o reparación de cofactores o grupos Fe-S de proteínas involucradas en la fijación del nitrógeno.

### **Conclusión**

Usualmente, los genes que codifican para rodanasas no presentan un contexto genómico conservado o solamente en el caso de microorganismos estrechamente emparentados. Por lo tanto, es difícil inferir el papel que cumplen en la fisiología celular basados únicamente en la comparación de los contextos genómicos. Con algunas excepciones presentadas aquí, la comparación de los contextos genómicos apoyados con el análisis de las proteínas codificadas por los genes en cuestión, han aportado información que permite predecir las posibles funciones o el rol fisiológico en el cual se verían involucradas algunas de las rodanasas de *A. ferrooxidans*, como la fijación de nitrógeno (P28), la respuesta al estrés (P16) y la oxidación de compuestos reducidos de

azufre (P11). Además, se han descubierto algunas proteínas sobre las cuales no existe información como la Hyp1 y la Hyp3 de los operones putativos P11 y P16, respectivamente.

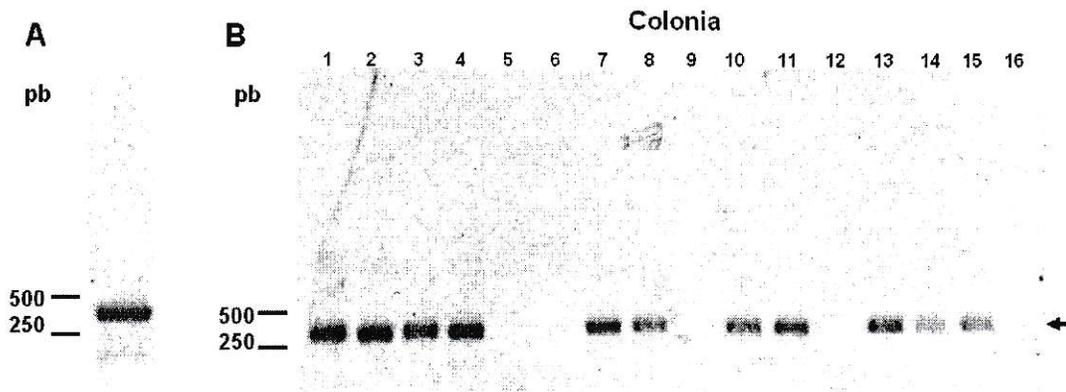
### **Clonación de los genes de *A. ferrooxidans* ATCC 23270**

#### **Amplificación, clonación y expresión del gen recombinante *p14* de *A. ferrooxidans***

Como se mencionó en la sección 1.3.5 la proteína P14 presenta un sitio catalítico atípico, que no se corresponde al esperado para una TST o una MST. Se decidió clonar y expresar el gen con el objeto de determinar la posible actividad enzimática de la proteína P14.

Mediante PCR se procedió a la amplificación del gen *p14* utilizando los partidores P14NTER-NdeI y P14CTER-XhoIHT. Como sustrato se utilizó DNA genómico extraído de *A. ferrooxidans*. El fragmento resultante de la amplificación tenía un tamaño de 390 pb (Figura 20A). Este fragmento, se purificó a partir de un gel de agarosa (1 %) y posteriormente se insertó en el vector pGEM-T Easy (pGEM-*Tp14*) que se utilizó para transformar la cepa de *E. coli* JM109.

La cepa con el vector pGEM-*Tp14* se creció en agar LB-Ap suplementado con IPTG y X-Gal durante la noche. A fin de corroborar la presencia y orientación del inserto *p14* dentro del plásmido se realizó PCR de colonias con los partidores P14NTER-NdeI y P14CTER-XhoIHT. Para ello, se seleccionaron colonias transformadas que presentaban una coloración blanca. Como resultado, se obtuvo que 11 de las 16 colonias examinadas presentaban el inserto *p14* en la orientación deseada (Figura 20B).

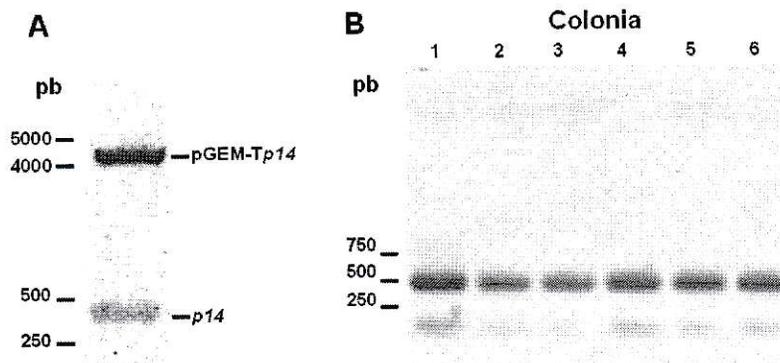


**Figura 20.** Amplificación del gen *p14* de *A. ferrooxidans* y comprobación de la presencia del inserto en el plásmido de clonación. A, amplificación por PCR de un fragmento de 390 pb correspondiente al gen *p14* de *A. ferrooxidans*. B PCR en colonias de la cepa *E. coli* JM109 transformada con el plásmido pGEM-*Tp14*. Los números señalan las colonias evaluadas en el correspondiente carril; la flecha indica el tamaño esperado del inserto; las barras indican el peso molecular en pares de bases.

Los clones positivos se sembraron en agar LB-Ap y se dejaron crecer durante toda la noche. Posteriormente, se realizó la extracción de pGEM-*Tp14*. Para ello, se crecieron los clones portadores del plásmido en medio LB-Ap. El inserto *p14* se liberó mediante la digestión del plásmido pGEM-*Tp14*. Este fragmento se insertó en el vector de expresión pET21b(+) para generar el plásmido pET*p14*. Una vez ligado el inserto *p14* al vector pET se transformó la cepa *E. coli* JM109. Se seleccionaron las células transformantes por su crecimiento en agar LB-Ap.

Para verificar que las células estaban efectivamente transformadas con el vector pET*p14* se realizó PCR de colonias con los partidores T7 y P14CTER-XhoIHT. De 32 colonias analizadas se obtuvieron 17 que llevaban el inserto *p14*. Luego, se purificó el plásmido pET*p14* y con él transformó la cepa de expresión *E. coli* BL21(DE3), que se

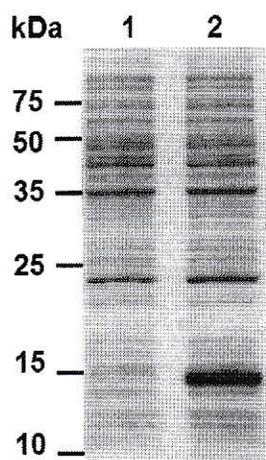
creció en agar LB-Ap. La transformación con el plásmido pET*p14* se confirmó mediante PCR de colonias (Figura 21B).



**Figura 21.** Digestión y clonación del gen *p14*. A, digestión del plásmido pGEM-*Tp14*. La banda correspondiente al plásmido se indica a la izquierda. Igualmente, se indica la correspondiente al fragmento liberado como *p14*. B, PCR de colonias *E. coli* BL21(DE3)pET*p14*.

Para verificar la expresión del gen *p14* en la cepa *E. coli* BL21(DE3)pET*p14*, los cultivos se crecieron en medio LB-Ap y se indujeron con IPTG. Se analizó, mediante electroforesis de proteínas los extractos crudos provenientes de células *E. coli* BL21(DE3)pET*p14* crecidas en ausencia o en presencia de IPTG y se observó la aparición de una banda la altura de 14 kDa correspondiente al peso teórico esperado para la proteína P14. Dicha banda no aparece en la cepa que no ha sido inducida (Figura 22).

En resumen, se clonó el gen *p14* de *A. ferrooxidans* en el vector de expresión pET*p14*. Se comprobó que la expresión del gen recombinante es inducida por IPTG. Como resultado de la inducción se observó la aparición de una banda con el peso molecular esperado para la proteína recombinante (Figura 22).



**Figura 22.** Inducción de la expresión del gen recombinante *p14* con IPTG de la cepa *E. coli* BL21(DE3)pET*p14*. Se corrió un gel SDS-PAGE (15 %) con el sobrenadante la centrifugación 10.000 x g de la cepa sin inducir (carril 1) y con IPTG (carril 2).

#### **Clonación de los genes *p11*, *p14.3*, *p16.2* y *p28***

Inicialmente, se hizo la clonación de los genes *p15*, *p16* y *p16.2* en el vector de expresión pCR-NT TOPO (Invitrogen®). Estos intentos para sobreexpresar los genes no fueron exitosos, excepto para *p15* lo que permitió la caracterización enzimática de la P15 recombinante (Ponce, 2007).

En vista de los resultados negativos con el vector pCR-NT TOPO, se utilizó otro sistema genético para lograr la expresión de los genes de interés. Para esto, se amplificaron por PCR los genes *p11*, *p14.3*, *p16.2* y *p28* (Figura 23) a partir del DNA genómico de *A. ferrooxidans*. Posteriormente, los fragmentos amplificados se separaron mediante electroforesis en gels de agarosa desde donde se extrajeron. Se midió la concentración del DNA purificado y se realizó la ligación con el vector de clonación pGEM-T Easy (Promega®).

Se transformó células de *E. coli* JM 109 con el plásmido pGEM-T una vez ligado el inserto. Luego, se determinó la presencia del inserto en el plásmido de las colonias transformadas mediante PCR de colonia con los partidores específicos para cada gen. Seguidamente, se efectuó la purificación del plásmido mediante minipreparaciones de DNA.

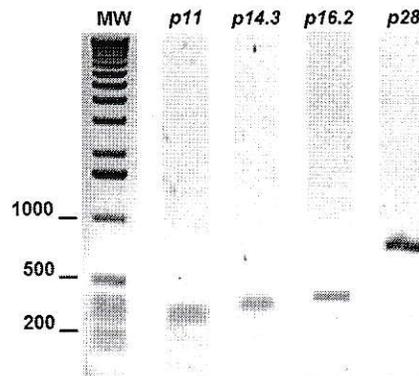


Figura 23. Amplificación de los genes *p11*, *p14.3*, *p16.2* y *p28*, que codifican para algunas rodanasas de *A. ferrooxidans*. Los genes se amplificaron mediante PCR. El peso molecular se indica en pares de bases.

Una vez purificados y cuantificados los plásmidos pGEM-T, se procedió a la digestión de cada uno para la liberación del inserto correspondiente (Figura 24). Esto permitió la ligación del inserto en un sólo sentido dentro del plásmido de expresión pET-28 a (+) (Novagen<sup>®</sup>), digerido de la misma manera, según el caso. El plásmido pET resultante se usó para transformar células *E. coli* JM109.

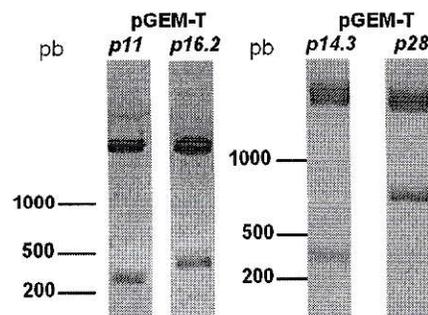


Figura 24. Digestión de los plásmidos pGEM-T que llevan insertos los genes *p11*, *p14.3*, *p16.2* y *p28*. Los insertos *p11* y *p16.2* fueron liberados mediante la digestión del DNA con las enzimas *NdeI* y *EcoRI*. Por su parte, los insertos *p14.3* y *p28* se liberaron usando las enzimas *NdeI* y *SalI*.

Para comprobar la presencia y la correcta orientación del inserto en los plásmidos se efectuó PCR de colonias con los partidores T7, P11R y P16.2R (Figura 25).

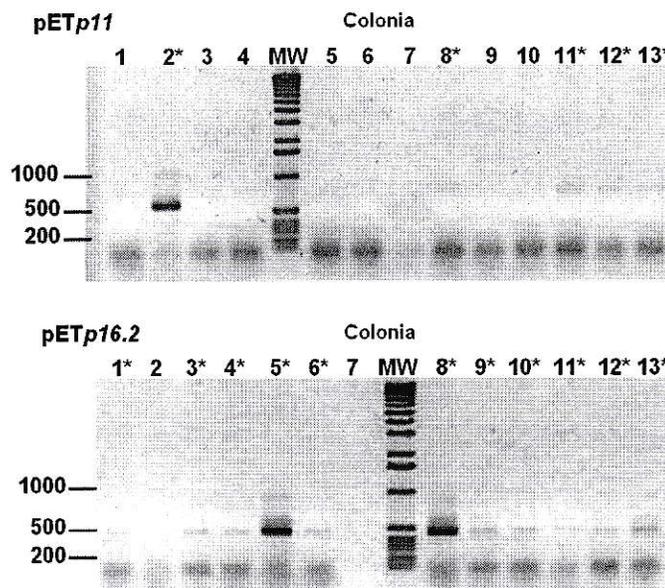


Figura 25. PCR de los clones transformados con los plásmidos pET*p11* y pET*p16.2*. Se emplearon los partidores T7 y P11R y P16.2R. Los clones positivos se indican con un asterisco. Se indica el peso molecular en pares de base.

Una vez determinada la orientación del inserto dentro del plásmido, se seleccionaron las colonias que poseían el plásmido con el inserto en la orientación correcta. Los plásmidos purificados se emplearon para transformar la cepa de expresión *E. coli* BL21(DE3) (Figuras 26 y 27).

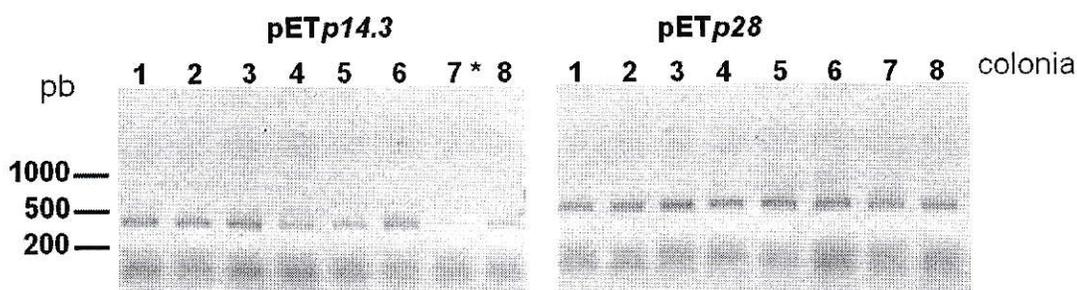
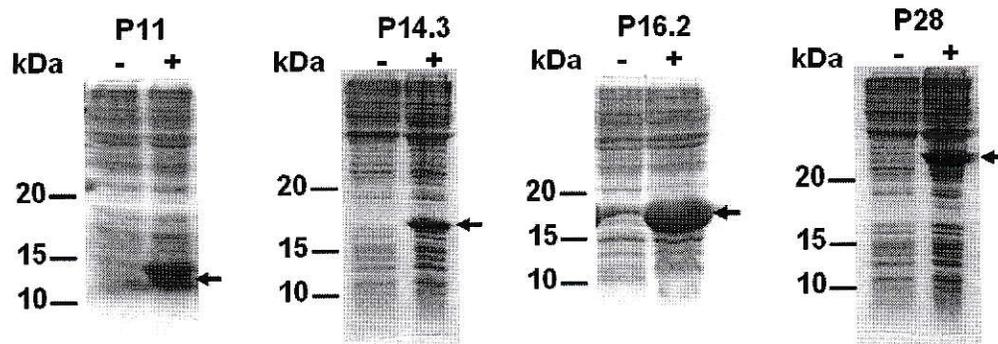


Figura 26. PCR de los clones transformados con los plásmidos pETp28 y pETp14.3 Se emplearon los partidores T7 P14.3R y P28R. Los números indican las colonias evaluadas. El único clon negativo se indica con un asterisco.

Luego de transformar las células se efectuó un ensayo para verificar la capacidad de expresar los genes recombinantes. Para ello, se crecieron la cepas en medio LB y al alcanzar una  $DO_{600} \approx 0,6$  se adicionó IPTG. Una vez transcurridas 2 h se colectó las células y se realizó una electroforesis de proteínas para verificar la inducción de la expresión. Se comprobó que todas las cepas *E. coli* BL21(DE3) eran capaces de expresar los genes recombinantes correspondientes (Figura 27).

Asimismo, se efectuó la verificación de la secuencia de nucleótidos de los insertos para descartar cualquier mutación accidental en los genes recombinantes y corroborar la secuencia entregada por la bases de datos del genoma de *A. ferrooxidans* ATCC23270. Se comprobó que la secuencia coincidía íntegramente con la entregada por la base de datos del TIGR, lo que descartó cualquier anomalía en la secuencia nucleotídica.





**Figura 28.** Inducción de la sobreexpresión de los genes recombinantes de algunas de las rodanasas de *A. ferrooxidans*. El sobrenadante a 10.000 x g del extracto de células se corrió en un SDS-PAGE (15%). Los signos - y + representan ausencia o la presencia de IPTG, respectivamente.

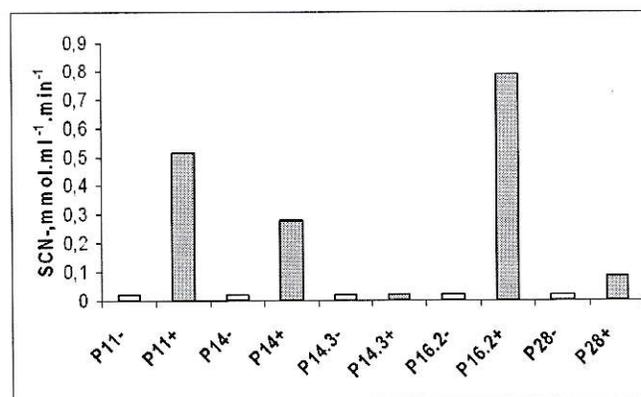
Además, los genes de las rodanasas de *A. ferrooxidans* clonados en *E. coli* se mostraron estables y la expresión de los mismos no tuvo efectos negativos en el crecimiento del hospedero en las condiciones estudiadas.

#### **Actividad tiosulfato: azufre transferasa de las cepas recombinantes**

Luego de inducir la expresión de los genes recombinantes se colectaron las células. Posteriormente, se obtuvo el extracto celular mediante sonicación. Luego, de determinar la concentración de proteínas, se realizó el ensayo de actividad enzimática para determinar qué proteínas recombinantes presentaban actividad TST (Figura 29). La concentración de proteínas empleada en los ensayos fue de 50  $\mu\text{g/ml}$  en condiciones estándares de medición.

La mayor actividad (en orden decreciente) se obtuvo con las proteínas P16.2, P11, P14 y P28 (Figura 29).

La cepa que produjo la proteína recombinante P14.3 mostró poca o ninguna actividad TST con respecto al control negativo (la misma cepa sin inducir la sobreexpresión del gen). Aunque faltan estudios más profundos, la escasa actividad mostrada por la proteína P14.3 en extractos crudos libres de células está de acuerdo con lo esperado a partir de los análisis de la secuencia y la deducción de su posible actividad enzimática (página 45).



**Figura 29.** Actividad TST en las cepas recombinantes de *E. coli* que expresan genes para rodanasas de *A. ferrooxidans*. El signo (-) representa a las células sin inducir y el (+) a las inducidas. Para los ensayos se empleó el sobrenadante 10.000 x g de los extractos de las células.

La proteína recombinante P28, llamativamente, no mostró el nivel de actividad TST como se esperaba a partir del análisis de la secuencia del sitio catalítico. Se han reportado actividades azufre transferasa menores en las proteínas con diferentes dominios en relación a aquellas que solo presentan dominios rodanasa (Palenchar y col., 2000; Matthies y col., 2004), aunque, se esperaba que el dominio ANK no tuviera mayor influencia sobre la actividad, dado su carácter puramente estructural. Tampoco se puede descartar un efecto negativo de la cola de histidinas en el extremo N-terminal, como se ha observado en otras proteínas. Sin embargo, en el caso de las rodanasas los estudios

realizados con proteínas con cola de histidinas, señalan un comportamiento idéntico con respecto a la proteína normal (Adams y col., 2002; Cipollone y col., 2004; Krepinski y Leimkühler, 2007). Por lo tanto, la causa por la que la actividad TST de la P28 sea menor a la esperada podría ser la presencia del dominio ANK. Para comprobar esta hipótesis, se debería producir una proteína P28 sin el dominio ANK y sin cola de histidinas.

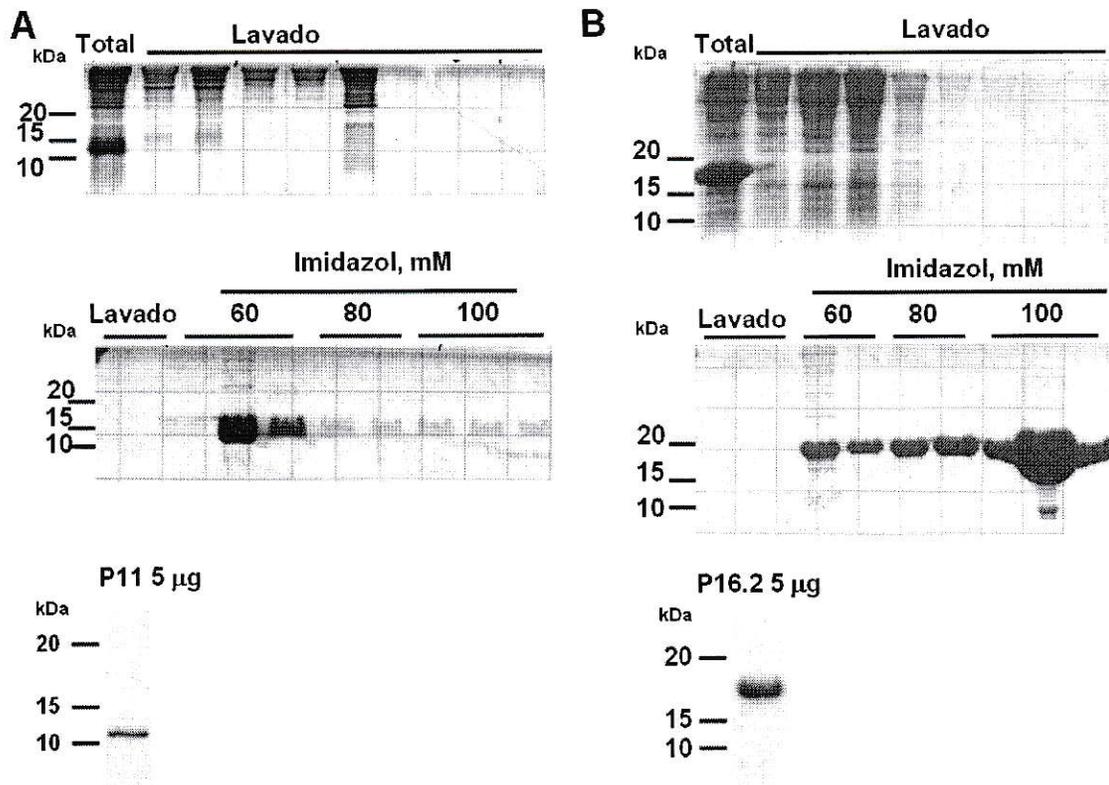
Por su parte, la P16.2 mostró la mayor actividad TST entre las cepas de *E. coli* examinadas. En principio, este resultado era el esperado luego del análisis del sitio catalítico (Acosta y col., 2005).

La cepa que sobre expresó el gen *p11* mostró el segundo nivel más alto de actividad TST después de la P16.2. Este resultado fue inesperado dado que el sitio catalítico presentó ciertas características (Figura 12) que hacían suponer un desempeño mucho menor (sección Proteínas de *A. ferrooxidans* ATCC23270 de tipo desconocido).

La cepa que sobreexpresó el gen *p14* mostró escasa actividad TST, pero en niveles claramente superiores al control negativo (Figura 29). El análisis del sitio catalítico y la predicción de la actividad enzimática indicaron que se trataría, posiblemente, de una mercaptopiruvato: azufre transferasa. Por lo tanto, se esperaba obtener escasa actividad TST. En este estudio no se ensayaron otras actividades enzimáticas fuera de la TST, por lo que no se puede concluir sobre otras actividades además de la TST a no ser como una suposición basada en los análisis *in silico* y en el resultado de la actividad TST obtenido con las rodanasas recombinantes de *A. ferrooxidans*.

### Purificación de las proteínas recombinantes P11 y P16.2

Las cepas *E. coli* BL21(DE3)pETp11 y *E. coli* BL21(DE3)pETp16.2 se crecieron en medio LB hasta  $DO_{600} \approx 0,6$  y luego se indujo a expresión de los genes recombinantes con IPTG por dos horas.



**Figura 30.** Purificación de las proteínas recombinantes P11 (A) y P16.2 (B) mediante una columna de afinidad. Se muestra, el extracto total de partida para la purificación y el lavado de la columna para la eliminación de proteínas unidas inespecíficamente. La elusión de las proteínas de interés se realizó con concentraciones crecientes de imidazol. Finalmente, las proteínas purificadas y estabilizadas se corrieron en un gel para verificar su pureza. Las barras indican el peso molecular en kDa.

Posteriormente, las células fueron colectadas y procesadas para la purificación de las proteínas recombinantes P11 y P16.2. La inspección visual de los geles de

poliacrilamida, mostró que las se obtuvieron en un grado de pureza de 90 % aproximadamente (Figura 30).

Las proteínas purificadas se concentraron y se realizó el cambio de amortiguador por 50 mM Tris-HCl pH 8,0 suplementado con 1 mM DTT y glicerol hasta una concentración final de 50 % vol/vol.

En la Tabla 9 se muestra el resultado de la purificación de las proteínas recombinantes P11 y P16.2.

Tabla 9. Purificación de las proteínas recombinantes P11 y P16.2. Fracción soluble sobrenadante 10.000 x g. U se define como la  $\mu\text{g}$  de  $\text{SCN}^-$ .min.ml.

**A**

Muestra	Proteína (mg)	U	U/mg
Fracción Soluble	718	16505	23,4
P11 purificada	32	1744	54,5

**B**

Muestra	Proteína (mg)	U	U/mg
Fracción Soluble	1659	108000	64,9
P16.2 purificada	110	30000	270,6

### **Caracterización de la actividad enzimática de la proteína recombinante P11 de *A. ferrooxidans* ATCC23270**

Las proteínas pueden volverse inestables cuando se extraen de su entorno nativo, el cual es diferente en cada compartimiento celular e incluso dependido de las condiciones fisiológicas. Si no se mantienen ciertas condiciones como el pH las proteínas purificadas pueden no funcionar adecuadamente o no permanecer en estado soluble. Las proteínas

podrían, entonces, perder su actividad enzimática como resultado de la desnaturalización, cambio del estado redox del sitio catalítico, la agregación y condiciones no óptimas de amortiguación del pH.

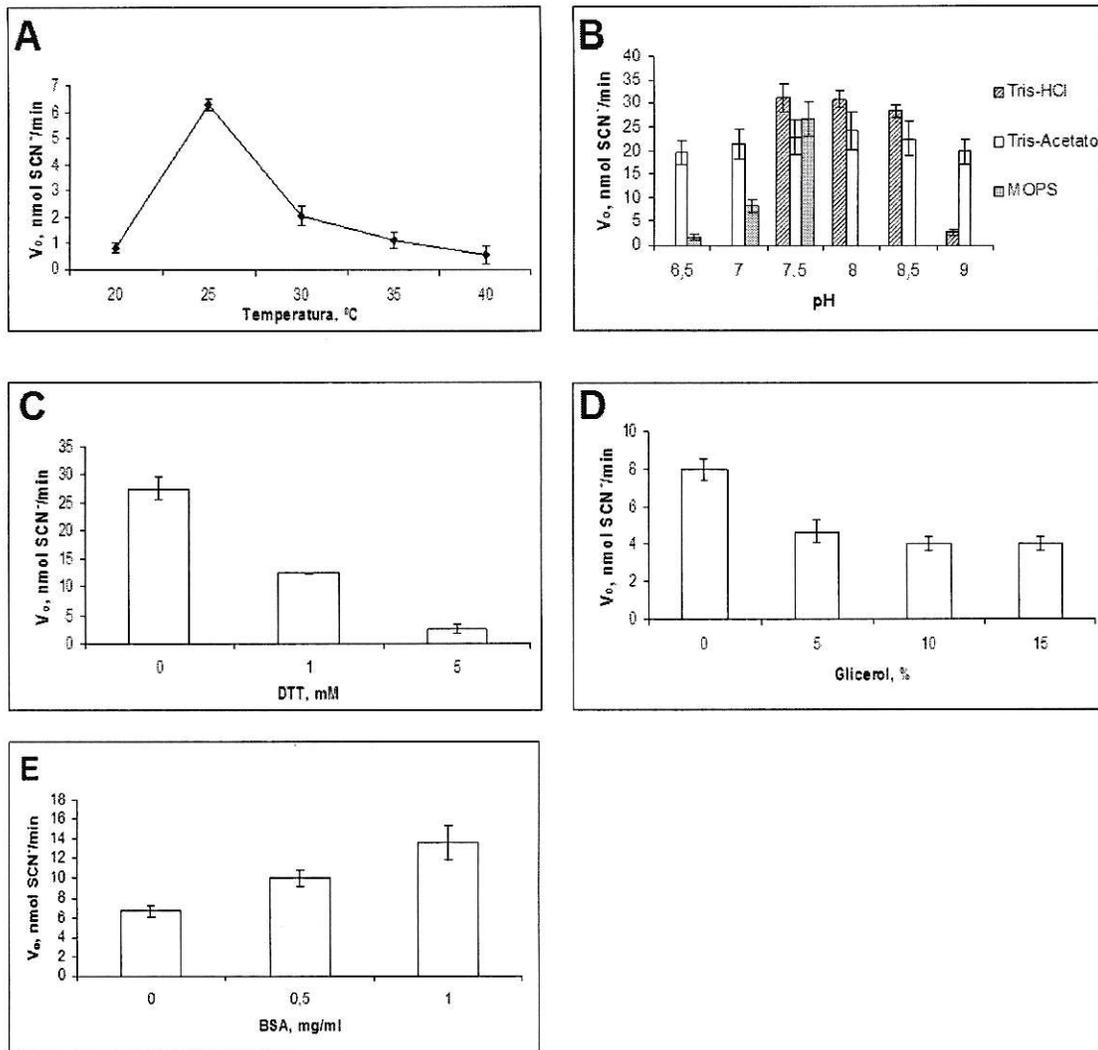


Figura 31. Actividad TST de la proteína recombinante P11 de *A. ferrooxidans*. A, actividad enzimática a diferentes temperaturas. B, actividad a diferentes pH y de amortiguadores de pH. C, efecto del agente reductor ditioneitol. D, efecto del glicerol. E, efecto del BSA. Las condiciones de ensayo fueron; A, 1 mg/ml BSA, 50 mM Tris-HCl pH 7,5; B, 1 mg/ml BSA, 25 °C; C y D, 1 mg/ml BSA, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 °C; E, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 25 °C. Se grafica el promedio de al menos tres ensayos de actividad y la desviación estándar correspondiente.

A fin de subsanar o prevenir estos inconvenientes se determinaron las condiciones óptimas para la actividad TST de la proteína recombinante P11. La actividad TST se midió a diferentes temperaturas a fin de determinar la condición óptima para la actividad enzimática de la proteína P11. La máxima actividad TST se encontró en un rango estrecho alrededor de 25 °C (Figura 31A).

Posteriormente, se efectuaron ensayos de actividad TST para determinar el pH y el amortiguador óptimo para la actividad azufre transferasa. Los ensayos se realizaron a 25 °C, en las condiciones estándares, excepto que se cambió el tipo de amortiguador de pH empleado (50 mM Tris-Acetato, Tris-HCl o MOPS). Bajo estas condiciones, la actividad TST de la proteína P11 no presentó mucha variación entre los amortiguadores Tris-HCl y Tris-Acetato. Se consideró que la mejor condición para la medición de la actividad fue con 50 mM Tris-HCl pH 7,5 (Figura 31B).

Por otro lado, la actividad azufre transferasa en presencia del amortiguador MOPS es diferente (Figura 31B) en comparación a la obtenida con los amortiguadores Tris-Acetato y Tris-HCl. Esto podría deberse a algún tipo de inhibición por parte del MOPS sobre la proteína. Este efecto disminuye a medida que se aumenta el pH. El MOPS es una molécula cargada positivamente con un átomo de azufre ( $C_7H_{15}NO_4S$ ) que podría interactuar con el sitio catalítico de la proteína P11. Se conocen algunos casos de interacción entre el MOPS y enzimas como el de la glicilamida ribonucleótido transformilasa PurT de *E. coli* (Thoden y col., 2002).

Otro fenómeno llamativo fue la brusca caída de la actividad TST de la proteína P11 en presencia de 50 mM Tris-HCl a pH 9 (Figura 31B). Existen dos posibles causas, la

primera implica la inactivación de la enzima debido al pH. Esto se descartó, debido a que la enzima continuó activa en Tris-Acetato. La segunda posibilidad, sería la inhibición de la actividad enzimática debido al Cl<sup>-</sup>. Esto también es poco probable, debido a que la concentración relativa de Cl<sup>-</sup>, en el amortiguador Tris-HCl pH 9, sería menor que en las condiciones más ácidas. Queda entonces por resolver si este fenómeno está basado en alguna propiedad de la enzima o bien se trató simplemente de una variación experimental.

Se ha reportado en otras proteínas con actividad TST, que el aumento del pH favoreció la actividad transferasa (Schlesinger y Westley, 1974). Sin embargo, en el caso la proteína P11 purificada, el aumento del pH sobre 7,5 no tuvo ese efecto (Figura 31B).

Llamativamente, en ensayos previos a la purificación, se vió que la P11 recombinante en el extracto crudo de *E. coli* tenía el típico comportamiento de las proteínas con actividad TST, es decir, hubo un aumento de la actividad a mayor pH. Una vez purificada la proteína P11 recombinante, no se repitió el fenómeno observado en extractos crudos de *E. coli* (Figura 31B).

Se deduce que, posiblemente, la carencia de un factor estabilizante no permite llegar a la P11 a su máxima actividad enzimática, una vez purificada. Para subsanar esta situación, se emplearon algunos agentes que permiten la estabilización de proteínas purificadas como; el glicerol, albúmina de suero bovino (BSA) y el agente reductor ditioneitol (DTT).

Para determinar el efecto de DTT sobre la actividad TST de la proteína P11 se realizaron ensayos de actividad enzimática a diferentes concentraciones de ditioneitol

(Figura 31C). Al aumentar la concentración de DTT, los niveles de la actividad azufre transferasa de la proteína recombinante P11 decayeron.

En principio, el DTT impediría la oxidación del grupo sulfhidrilo de la Cys catalítica de la proteína P11. También, se ha reportado que las enzimas con actividad TST pueden utilizar DTT como el dador del átomo de azufre y el tiosulfato como el aceptor (Pecci y col., 1976). Con esto en mente, se puede suponer que en la figura 31C se muestra el desplazamiento del  $\text{CN}^-$  como aceptor del azufre. A medida que se aumenta la concentración de DTT el tiosulfato es desplazado de dador azufre a aceptor, como consecuencia la producción de  $\text{SCN}^-$  es cada vez menor.

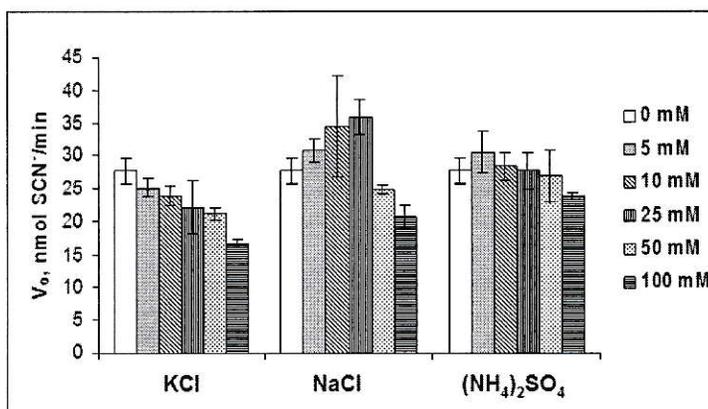
Otra posible explicación para la disminución de la actividad TST en presencia de DTT podría ser la autooxidación y como consecuencia se producen especies reactivas de oxígeno (ROS). Las ROS son potentes inhibidores de la actividad TST y MST (Horowitz y Bowman, 1989; Nagahara y col., 2007). Queda por determinarse si la proteína P11 es inhibida debido a la oxidación del DTT o bien se trata de un desplazamiento de los sustratos.

En el caso del glicerol, la actividad TST de la proteína P11 disminuyó respecto del control sin glicerol (Figura 31D). Llamativamente, el aumento de la concentración de glicerol no implicó una mayor disminución de la actividad enzimática. Se ha reportado que el glicerol puede modificar la estructura de la enzima aldehído deshidrogenasa y que consecuentemente afecta la actividad de la proteína (Bradbury y Jakoby, 1972). Por lo tanto, el glicerol podría estabilizar una conformación menos activa de la proteína P11 recombinante.

En cambio, en presencia de BSA la actividad de la proteína aumentó (Figura 31E). Esto indicaría que la proteína P11 se vuelve inestable cuando se encuentra a bajas concentraciones y además este efecto puede ser revertido utilizando una proteína inerte como la BSA (Gouda y col., 2001). La BSA, a una concentración final de 1 mg/ml, se incorporó en los ensayos normales de actividad de la proteína P11.

También, se determinó si la actividad TST de la proteína P11 era afectada por la presencia de diferentes tipos de sales a distintas concentraciones (Figura 32). Para ello, se empleó KCl, NaCl y  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  en concentraciones de 0, 10, 25, 50 y 100 mM.

Entre las sales ensayadas, el KCl mostró el efecto inhibitorio más marcado, seguido del NaCl, el cual produjo un leve aumento en la actividad hasta una concentración entre 10 y 25 mM, por encima de lo cual se produjo una disminución de la actividad enzimática. Por su parte, el sulfato del amonio no mostró un efecto marcado sobre la actividad azufre transferasa en las concentraciones ensayadas.



**Figura 32.** Efecto de diferentes sales y concentraciones de las mismas sobre la actividad tiosulfato: azufre transferasa de la proteína recombinante P11 de *A. ferrooxidans*. Se grafica el promedio de, al menos, tres ensayos de actividad enzimática. Se muestra la desviación estándar de cada condición estudiada.

Se ha reportado que algunas TST son afectadas de manera dispar por algunos aniones. Por ejemplo, en *E. coli* la actividad transferasa de la PspE es afectada negativamente. Por la presencia de aniones sulfato, cloruro, fosfato y otros. En comparación, la actividad enzimática de la proteína P11 de *A. ferrooxidans* se vió afectada por los aniones de cloruro de Na y K de manera dispar. Mientras, el KCl afectó negativamente la actividad transferasa en las concentraciones ensayadas (Figura 32), el NaCl favoreció la actividad enzimática hasta una concentración de 25 mM, por encima de lo cual empezó a mostrar efectos inhibitorios (Figura 32). Aunque, falta estudiar los efectos de mayores concentraciones y otros tipos de cloruros, se puede decir que, al igual que en el caso de la PspE de *E. coli*, el anión cloruro sería un inhibidor de la actividad azufre transferasa de la P11 de *A. ferrooxidans*.

Por otro lado, el sulfato de amonio no mostró ningún efecto, en las concentraciones estudiadas, sobre la actividad azufre transferasa de la proteína P11. Esto podría indicar que la proteína de *A. ferrooxidans* es resistente al anión sulfato, a diferencia de lo reportado con la PspE de *E. coli* (Cheng, 2003). Pero, como en el caso de los cloruros, se necesitan más ensayos con otros sulfatos y a mayores concentraciones para confirmar la resistencia de la proteína P11 al sulfato.

Aunque el grado de inhibición de la actividad TST está relacionado con el tipo particular de anión (Wang y Volini, 1973), no se pueden descartar otros factores como la composición aminoacídica del sitio catalítico, que podría acentuar la sensibilidad o la resistencia a la inhibición por algunos tipos de aniones.

## Conclusión

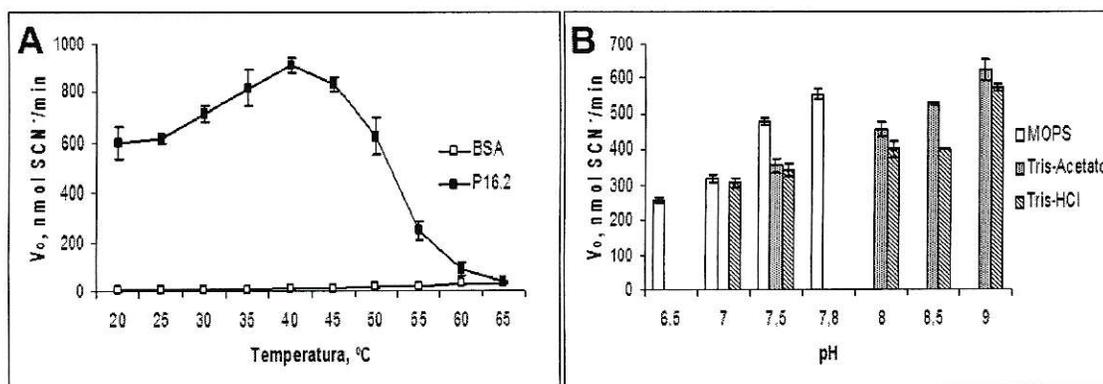
Las condiciones para la actividad la tiosulfato: azufre transferasa de la proteína P11 son 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mg/ml BSA y la temperatura óptima de 25 °C.

La actividad TST de la proteína recombinante P11 es sensible a los aniones de Cl<sup>-</sup>, pero no es afectada por SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> en las concentraciones ensayadas (hasta 100 mM).

## Caracterización de la actividad enzimática de la proteína recombinante P16.2 de *A. ferrooxidans* ATCC 23270

Se procedió a definir las condiciones óptimas para la actividad azufre transferasa de la proteína P16.2. Para ello, se realizaron ensayos para determinar la temperatura óptima para la actividad enzimática de la proteína P16.2. Como resultado se obtuvo que la mayor actividad azufre transferasa se encontraba entre 35 y 45 °C, siendo 40 °C la temperatura donde la proteína P16.2 alcanzó su máximo nivel de actividad (Figura 33A). Asimismo, se determinó que a 65 °C la enzima es inactivada completamente. Los ensayos posteriores de actividad con la P16.2 se realizaron a 40 °C.

La temperatura óptima para la actividad TST de la P16.2 fue de 40°C, diez grados por encima de la temperatura optima de crecimiento de *A. ferrooxidans*. Se han reportado casos similares, como el de RhdA de *Pseudomonas aeruginosa* que posee una temperatura optima de 53 °C, muy por encima del óptimo de la temperatura de crecimiento de la bacteria a (Cipollone y col., 2006). Se desconoce le significado fisiológico de esta propiedad.



**Figura 33.** Actividad TST de la proteína recombinante P16.2 de *A. ferrooxidans*. A, actividad diferentes temperaturas. Se comparan los niveles de tiocianato producido por la proteína P16.2 y BSA como control negativo. B, actividad a diferentes pH y tipos de amortiguadores. Las condiciones de ensayo fueron, para A, 50 mM Tris-Acetato pH 9,0, enzima P16.2 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 50 mM KCN y 50 mM  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ; B, enzima P16.2 0,5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 50 mM KCN y 50 mM  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , 40  $^{\circ}\text{C}$ . Se grafica el promedio de al menos tres ensayos de actividad enzimática y la desviación estándar correspondiente.

Posteriormente, se efectuaron ensayos de actividad en condiciones estándares, excepto que se probaron diferentes pH y tipos de amortiguador (50 mM Tris-Acetato, Tris-HCl o MOPS). La actividad TST de la proteína P16.2 presentó un aumento de actividad enzimática, concomitante con el aumento del pH (Figura 33). La actividad azufre transferasa de P16.2 al igual que la proteína P11, se vio afectada por la presencia del amortiguador MOPS. El MOPS parece tener un efecto positivo sobre de la actividad azufre transferasa de P16.2 (Figura 33B).

El amortiguador donde se logró el máximo nivel de actividad fue 50 mM Tris-Acetato pH 9,0, aunque no se encuentran muy lejos los resultados obtenidos con 50 mM Tris-HCl pH 9,0 y notablemente 50 mM MOPS pH 7,8. Este resultado nos muestra que a diferencia de la P11 la proteína P16.2 posee un comportamiento semejante al comunicado en otras tiosulfato: azufre transferasas (Schlesinger y Westley, 1974;

Agboola y Okonji, 2004). En los siguientes ensayos con la proteína P16.2 se utilizó 50 mM Tris-Acetato pH 9,0 como amortiguador.

Como algunas enzimas se desestabilizan cuando se encuentran a bajas concentraciones, se realizaron ensayos para determinar el efecto de dos agentes usados como estabilizantes de proteínas purificadas, glicerol y BSA a diferentes concentraciones. Los resultados de los ensayos de la actividad TST de la proteína P16.2 mostraron que no hay diferencias entre la enzima con o sin glicerol o BSA.

También, se determinó si la actividad TST de la proteína P16.2 era afectada por la presencia de diferentes tipos de sales a distintas concentraciones. Para ello, se empleó KCl, NaCl y Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> en concentraciones de 0, 5, 10 y 25 mM. La actividad enzimática se determinó a 40 °C en presencia de 50 mM Tris-Acetato pH 9,0 y 1 mg/ml de BSA.

Como en ningún caso se aprecia un efecto importante, se puede decir que la que la actividad azufre transferasa de P16.2 no fue mayormente inhibida por los aniones sulfato y cloruro, al menos, en las concentraciones ensayadas (Figura 34). Aunque, se conoce el mecanismo por el cual algunos aniones causan la inhibición de la actividad TST, no se sabe la razón por la cual algunas enzimas muestran resistencia a la inactivación por aniones.

Por lo tanto, el comportamiento de P16.2 de *A. ferrooxidans* se asemejaría a la GlpE de *E. coli*, en donde los aniones estudiados tienen poco o ningún efecto sobre la actividad azufre transferasa (Ray y col., 2000). Por otro lado, como en el caso de P11, sería interesante confirmar esta conclusión empleado mayores concentraciones de sales.

## Conclusión

Se determinaron las condiciones óptimas de actividad enzimática para las proteínas recombinantes P11 y P16.2. En el caso de P11 son: temperatura 25 °C; 50 mM de amortiguador Tris-HCl pH 7,5 y 1 mg/ml de BSA.

Mientras que, para la enzima P16.2 las condiciones óptimas para la actividad TST fueron las siguientes: temperatura 40 °C; 50 mM Tris-Acetato pH 9,0 y 1 mg/ml de BSA. Por otro lado se demostró que la proteína P11 es afectada negativamente por la presencia de aniones, en particular por el cloruro, mientras que la P16.2 prácticamente no fue inhibida en su actividad en presencia de los aniones usados.

## Caracterización de la cinética enzimática de la proteína recombinante P11 de *A. ferrooxidans* ATCC23270

Se determinó las características de la cinética de la proteína P11 en las condiciones óptimas de actividad, esto es a 25°C, 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 1 mg/ml de BSA, y concentraciones variables de los sustratos cianuro y tiosulfato cuando se determinó la velocidad máxima ( $V_{max}$ ), la constante de Michaelis-Menten ( $K_m$ ) y la constante catalítica ( $K_{cat}$ ).

La medición de los parámetros de la cinética enzimática se realizó bajo condiciones de velocidad inicial. En estas condiciones, la formación de  $SCN^-$  fue lineal en el intervalo empleado (Figura 34A y B). A partir de estos datos se graficó la velocidad de la proteína recombinante en diferentes concentraciones de  $S_2O_3^{2-}$  (Figura 34C) y  $CN^-$  (Figura 34D) desde donde, mediante una regresión no lineal, se obtuvo los valores de la

$K_m$  y  $V_{max}$  correspondiente a cada sustrato. En el caso del tiosulfato la  $K_m = 18,62 \pm 3,5$  mM y la  $V_{max} = 28,75 \pm 1,9$  nmol  $SCN^- \text{min}^{-1}$ . Para el cianuro presenta una  $K_m = 39,59 \pm 6,1$  mM, dos veces el valor obtenido para el tiosulfato y una  $V_{max} = 49,73 \pm 6,5$  nmol  $SCN^- \text{min}^{-1}$ . Por otro lado, la  $K_{cat}$  para el  $S_2O_3^{2-}$  fue de  $0,67 \text{ s}^{-1}$  y para el  $CN^-$ ,  $1,15 \text{ s}^{-1}$ .

Estos resultados de  $K_m$  podrían explicar el efecto observado sobre la actividad TST en presencia de DTT (Figura 31C). Dado que la P11 tiene una mayor afinidad por tiosulfato que por el  $CN^-$ , el primero podría ser desplazado por el DTT de dador a aceptor de azufre, como consecuencia de lo cual se produciría tritionato. La producción de  $SCN^-$  sería cada vez menor al aumentar la concentración de DTT como se muestra en la figura 31C.

En relación a otras tiosulfato: azufre transferasa, los valores de  $K_m$  de la P11 son altos (Tabla 10) y, por lo tanto, es poco probable que reflejen la realidad fisiológica de *A. ferrooxidans*. Las razones por las cuales la proteína presenta estos valores podrían ser, a) la falta de un activador, aunque esto es poco probable ya que no se conoce ninguna TST que requiera una molécula activadora; b) no se han alcanzado las condiciones óptimas para la actividad enzimática, fundado en el hecho de que la actividad enzimática de la P11 en extracto crudo de *E. coli* parece ser mucho más alta que cuando se empleó la enzima pura y, finalmente, c) lo más probable, es que los sustratos empleados aquí son diferentes a los empleados por la proteína P11 en la células de *A. ferrooxidans*.

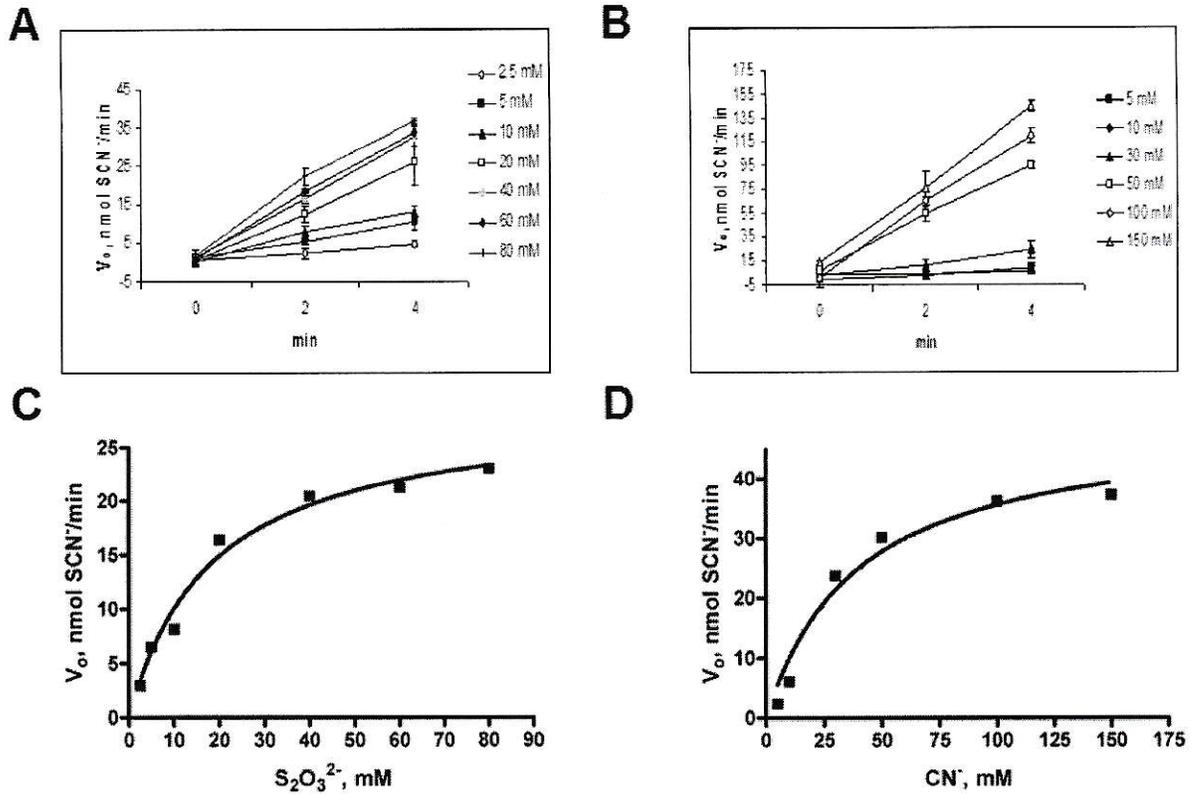


Figura 34. Propiedades de la cinética de la proteína recombinante P11 con cianuro de potasio y tiosulfato de sodio como sustratos para la actividad tiosulfato: azufre transferasa. Los gráficos A y B muestran curvas de progreso para obtener la velocidad inicial de la P11 en presencia de diferentes concentraciones de tiosulfato y cianuro. Se muestra el promedio de, al menos tres ensayos de actividad enzimática. En C y D se muestra la velocidad en relación con la concentración de los sustratos tiosulfato y cianuro, respectivamente. Cada cuadrado negro representa la velocidad de la enzima a esa concentración de sustrato en particular. La línea continua fue calculada de acuerdo con la ecuación de Michaelis-Menten.

Es poco probable la existencia de una enzima que en condiciones normales utilice tiosulfato como dador de azufre para el cianuro, pero este ensayo es el mejor evaluado hasta el momento y permite realizar una comparación bajo condiciones similares de proteínas de muy diversos orígenes y, posiblemente, diferentes roles fisiológicos.

En relación con los valores de  $K_m$  obtenidos con otras proteínas para el  $S_2O_3^{2-}$ , la proteína P11 se encuentra muy próxima al obtenido por la TST de *Eidolon helvum* (Agboola y Okonji, 2004), un quiróptero herbívoro que se encuentra expuesto, debido a su dieta, a grandes concentraciones de compuestos cianógenos.

Por su parte, la  $K_m$  para el  $CN^-$  es mayor que para el tiosulfato. Esta condición es poco frecuente. Además, de la P11 de la *A. ferrooxidans*, sólo hay dos casos reportados en *A. vinelandii* (Pagani y col., 1993) y *P. aeruginosa* (Cipollone y col., 2004) y hay que indicar que ambas proteínas son casi idénticas (Cipollone y col., 2004).

La RhdA de *A. vinelandii* es la proteína mejor estudiada. La delección del gen que lo codifica lleva a la acumulación de polihidroxibutirato en la bacteria. Este fenómeno se debería a la ausencia de un dador de átomos de azufre para la formación de centros Fe-S de proteínas involucradas en el ciclo de Krebs, más específicamente la aconitasa (Cereda y col., 2007).

Aunque resulta claro que a nivel de secuencia aminoacídica no existe relación entre las proteínas RhdA de *A. vinelandii* y P11, resulta llamativa que estas proteínas tengan mayor afinidad por el  $S_2O_3^{2-}$  que otras. Se podría pensar que esto corresponde a algún tipo de especialización entre las proteínas con actividad TST. Por su puesto, hay que considerar que es poco probable que el tiosulfato o el cianuro sean sustratos fisiológicos de la proteína P11 como de la RhdA de *A. vinelandii*.

Tabla 10. Parámetros cinéticos de algunas tiosulfato: azufre transferasas.

Organismo	Proteína	Sustrato, Km (mM)	
		S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	CN <sup>-</sup>
<i>A. vinelandii</i> <sup>a</sup>	RhdA	1,0	8,7
<i>A. ferrooxidans</i>	P11	18,6	39,6
<i>B. taurus</i> <sup>b</sup>	Tst	7,0	0,063
<i>E. coli</i> <sup>c</sup>	GlpE	78	17
<i>E. coli</i> <sup>d</sup>	PspE	27	4,6
<i>E. coli</i> <sup>e</sup>	YgaP	55	1,5
<i>Ei. helvum</i> <sup>f</sup>	No ident.	19,5	13,5
<i>P. aeruginosa</i> <sup>g</sup>	RhdA	7,4	16



a, Pagani y col. (1993); b, Wang y Volini (1973); c, Ray y col. (2000); d, Adams y col. (2002); e, Ahmed (2003); f, proteína no identificada por Agboola y Okonji, (2004); g, Cipollone y col. (2004). *Azotobater vinelandii* (*A. vinelandii*), *Acidithiobacillus ferrooxidans* (*A. ferrooxidans*), *Bos taurus* (*B. taurus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Eidolon helvum* (*Ei. helvum*), y *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*).

### Conclusión

Los parámetros cinéticos obtenidos para la proteína recombinante P11 de *A. ferrooxidans* fueron los siguientes: la  $K_m = 18,62 \pm 3,5$  mM para el S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> y 39,59 ± 6,1 mM para el CN<sup>-</sup>, mientras que la  $K_{cat}$  fue de 0,67 s<sup>-1</sup> para el S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> y 1,15 s<sup>-1</sup> para el CN<sup>-</sup>. La causa de la variación de los parámetros cinéticos entre las TSTs (Tabla 10) no está bien definida. Aunque, resulta claro que está implicada la especificidad por los sustratos y en segundo término, los requerimientos en cuanto a la velocidad del proceso de transferencia (Krepinsky y Leimkühler, 2007).

Una interesante proyección de este trabajo sería que, en futuras investigaciones, se realice la búsqueda de los posibles sustratos fisiológicos de la proteína P11.y otras rodanasas estudiadas en este trabajo.

## Conclusiones

La identificación de los genes que codifican para proteínas con dominio rodanasa presentes en el genoma de *A. ferrooxidans* ATCC23270 se realizó mediante una búsqueda informática. Como resultado de la búsqueda se encontró 8 secuencias genes putativos que codifican para proteínas con dominio rodanasa.

Una vez identificados los genes, se procedió al análisis de las secuencias aminoacídicas. El análisis de las secuencias mostró que las proteínas putativas estudiadas poseen, al menos, un dominio rodanasa. Además la P21 posee una señal de exportación tipo Sec. La P16 mostró una región de transmembrana y, finalmente, la P28 posee, junto al dominio rodanasa, un dominio ANK.

Respecto a la localización celular, las rodanasas P11, P14, P14.3, P15, P16.2 y P28 se encontrarían solubles en el citoplasma de *A. ferrooxidans*, mientras que la proteína P16 estaría anclada a la membrana interna y la P21 sería exportada al periplasma.

La predicción de la estructura secundaria del sitio catalítico mostró que todas las rodanasas de *A. ferrooxidans* presentan un lazo corto del tipo esperado para las azufre (o seleno) transferasas.

La comparación de la estructura secundaria predicha de las proteínas putativas de *A. ferrooxidans* en la región correspondiente al sitio catalítico mostró que las proteínas estudiadas presentarían una organización similar a las proteínas de la superfamilia Rodanasa/Fosfatasa tipo CDC25.

La comparación de las secuencias de proteínas de las rodanasas de *A. ferrooxidans* mostró que las proteínas son muy similares entre sí y que además presentan secciones conservadas con otras rodanasas.

En lo que se refiere a la deducción de la actividad catalítica de las proteínas estudiadas se determinó que algunas de ellas presentan un sitio catalítico similar al de las TST, (P15, P16.2 y P28) mientras que la P14.3 y la P16 presentan rasgos de enzimas MST. Sin embargo, no se pudo predecir en base a la comparación de las propiedades del sitio catalítico la posible actividad enzimática de las proteínas P11, P14 y P21.

El análisis realizado al entorno de los genes putativos mostró que, solamente, la *p16.2* no formaría parte de un operón. Los restantes genes formarían parte de unidades transcripcionales de por lo menos dos genes.

El gen *p11* formaría parte de una unidad transcripcional que constaría de 7 genes. Los productos génicos del operón podrían estar involucrados en la oxidación del azufre. Asimismo, se localizó una proteína que podría actuar como reguladora de la expresión de otros genes implicados en la oxidación de los compuestos de azufre.

La búsqueda de contextos genómicos similares al operón putativo P11 mostró que *A. aeolicus*, *S. solfataricus* y *S. tokodaii* poseen algunos genes agrupados en un contexto similar al encontrado en *A. ferrooxidans*.

El gen *p14* formaría una pequeña unidad transcripcional con un gen hipotético, cuyo producto génico podría estar involucrado en la adherencia de la célula a un sustrato.

Por su parte, aunque el gen *p14.3* se encuentra muy cerca de *p21*, los experimentos para determinar la extensión del operón demostraron que la *p14.3* no se expresa con el operón del gen *p21* en las condiciones estudiadas (Acosta y col., 2005).

El gen *p15* formaría parte de una unidad transcripcional constituida por cuatro genes. La información que disponemos no permite determinar si algunos de los productos génicos del operón P15 interactúan entre si o bien actúan independientemente en vías metabólicas diferentes.

El gen *p16* formaría parte de una unidad transcripcional que constaría de 9 genes. Los genes que se encuentran en el contexto del gen *p16* sugieren que las proteínas que codifican formarían parte de un sistema de defensa contra condiciones de estrés, o bien participar en la homeostasis óxido-reductora de la célula, tal como se ha reportado para una proteína MST (Nagahara y col., 2007).

La búsqueda de contextos genómicos similares al operón putativo P16 dio como resultado tres contextos similares localizados en las bacterias *T. denitrificans* y en *D. aromatica*. Los contextos de *A. ferrooxidans* y *T. denitrificans* son casi idénticos, mientras que en *D. aromatica* se encuentran dos conjuntos de genes localizados en diferentes regiones del genoma.

El contexto genómico del gen *p16.2* mostró que este gen no forma parte de un operón. Por lo tanto, no se puede deducir un contexto fisiológico para la proteína.

El gen *p21* formaría parte de un operón constituido por 5 genes. La conformación de este operón permite pensar que algunos de los productos génicos podrían participar en el metabolismo desasimilatorio del azufre, como las proteínas DoxDA y P21.

El gen *p28* formaría parte de una unidad transcripcional constituida por 8 genes. El contexto genómico del gen *p28* sugiere la participación de su producto génico en la biosíntesis o reparación de grupos Fe-S.

La búsqueda de contextos genómicos similares al operón putativo P28 mostró que *A. vinelandii* posee dos grupos de genes con una organización similar al hallado en *A. ferrooxidans*. Los resultados indican que la proteína P28 participaría en la generación o reparación de grupos Fe-S, o bien, para la formación de molibdopterina, tal como ocurre en humanos (Matthies y col., 2005).

Usualmente, los genes que codifican las proteínas rodanasas no presentan un contexto genómico conservado o solamente en el caso de microorganismos estrechamente emparentados. Por lo tanto, es difícil inferir el papel que cumplen en la fisiología celular basados únicamente en la comparación de los contextos genómicos. Con algunas excepciones presentadas aquí, la comparación de los contextos genómicos apoyados con el análisis de las proteínas codificadas por los genes en cuestión, han aportado información que permite predecir las posibles funciones o el rol fisiológico en el cual se verían involucradas algunas de las rodanasas de *A. ferrooxidans* como la fijación de nitrógeno (P28), la respuesta al estrés (P16) y la oxidación de compuestos reducidos de azufre (P11). Además, se han descubierto algunas proteínas sobre las cuales no existe información como la Hyp1 y la Hyp3 de los operones putativos P11 y P16 respectivamente.

Por otro lado se clonaron y purificaron las rodanasas P11 y P16.2, con las cuales se realizaron pruebas bioquímicas a fin de determinar las condiciones óptimas para actividad TST.

Se demostró que la proteína P11 es afectada negativamente por la presencia de aniones, en particular por el cloruro, mientras que la P16.2 prácticamente no fue inhibida en su actividad en presencia de los aniones usados.

Se determinaron los parámetros cinéticos para la actividad TST de la proteína P11. Llamativamente, la  $K_m$  del  $S_2O_3^{2-}$  fue menor al obtenido para el  $CN^-$ . De acuerdo con la relación de existente entre la  $K_m$  del  $S_2O_3^{2-}$  y el  $CN^-$  se puede separar a las TSTs en dos grupos, los que poseen una  $K_m$  para el  $S_2O_3^{2-}$  mayor que para el  $CN^-$  o viceversa. Según esto, la P11 estaría agrupada con las TSTs que poseen una  $K_m$  menor para el tiosulfato como es el caso de la RhdA de *A. vinelandii*.

Hasta el momento, se desconoce la razón por la cual las TSTs se dividen estos dos grupos. Tampoco se sabe y esto tiene alguna implicación fisiológica.

Finalmente, se puede decir que este trabajo contribuye a ampliar el conocimiento sobre esta ampliamente distribuida y bioquímicamente versátil superfamilia de proteínas. Una interesante proyección de este trabajo sería que, en futuras investigaciones, se realice la búsqueda de los posibles sustratos fisiológicos de la proteína P11 y de otras TSTs.

**Bibliografía.**

- Abdolrasulnia, R. y Wood, J. L. 1979. Transfer of persulfide sulfur from thiocystine to rhodanese. *Biochim. Biophys. Acta* 567: 135-143.
- Acosta, M., Beard, S., Ponce, J., Vera, M., Mobarec, J. C. y Jerez, C. A. 2005. Identification of putative sulfurtransferase genes in the extremophilic *Acidithiobacillus ferrooxidans* ATCC 23270 genome: structural and functional characterization of the proteins. *OMICS*. 9: 13-29.
- Adams, H., Teertstra, W., Koster, M. y Tommassen, J. 2002. PspE (phage-shock protein E) of *Escherichia coli* is a rhodanese. *FEBS Lett.* 518: 173-176.
- Agboola, F. K. y Okonji, R. E. 2004. Presence of rhodanese in the cytosolic fraction of the fruit bat (*Eidolon helvum*) liver. *J. Biochem. Mol. Biol.* 37: 275-281.
- Ahmed, F. 2003. Characterization of two novel proteins containing the rhodanese homology domain: YgaP and YbbB of *Escherichia coli*. Tesis. Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Aird, B. A., Henrikson, R. L. y Westley, J. 1987. Isolation and characterization of a prokaryotic sulfurtransferase. *J. Biol. Chem.* 262: 17327-17335.
- Alexander, K. y Volini, M. 1987. Properties of an *Escherichia coli* rhodanese. *J. Biol. Chem.* 262: 6595-6604.
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, 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 Res.* 25: 3389-3402
- Andersen, C. 2003. Channel-tunnels: outer membrane components of type I secretion systems and multidrug efflux pumps of Gram-negative bacteria. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 147: 122-165.
- Andersen, C., Hughes, C. y Koronakis, V. 2001. Protein export and drug efflux through bacterial channel-tunnels. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 13: 412-416.
- Baida, G. E., y Kuzmin, N. P. 1995. Cloning and primary structure of a new hemolysin gene from *Bacillus cereus*. *Biochim. Biophys. Acta.* 1264: 151-154.
- Bauer, M. y Papenbrock, J. 2002. Identification and characterization of single-domain thiosulfate sulfurtransferases from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 532: 427-431.
- Begley, T. P., Downs, D. M., Ealick, S. E., McLafferty, F. W., Van, L. A., Taylor, S., Campobasso, N., Chiu, H. J., Kinsland, C., Reddick, J. J. y Xi, J. 1999. Thiamin biosynthesis in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* 171: 293-300.
- Beinert, H., Holm, R. H. y Münck, E. 1997. Iron-Sulfur clusters: Nature's modular, multipurpose structures. *Science.* 277: 653-659.
- Bernhardt, T. G., y De Boer, P. A. 2003. The *Escherichia coli* amidase AmiC is a periplasmic septal ring component exported via the twin-arginine transport pathway. *Mol. Microbiol.* 48: 1171-1182.
- Bideshi, D. K., Renault, S., Stasiak, K., Federici, B. A., y Bigot, Y. 2003. Phylogenetic analysis and possible function of bro-like genes, a multigene family widespread among large double-stranded DNA viruses of invertebrates and bacteria. *J. Gen. Virol.* 84: 2531-2544.
- Bordo, D. y Bork, P. 2002. The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily: Sequence-structure-function relations. *EMBO Rep.* 3: 741-746
- Bordo, D., Deriu, D., Colnaghi, R., Carpen, A., Pagani, S. y Bolognesi, M. 2000a. The crystal structure of a sulfurtransferase from *Azotobacter vinelandii* highlights the evolutionary relationship between the rhodanese and phosphatase enzyme families. *J. Mol. Biol.* 298: 691-704
- Bordo, D., Forlani, F., Spallarossa, A., Colnaghi, R., Carpen, A., Bolognesi, M. y Pagani, S. 2001. A persulfurated cysteine promotes active site reactivity in *Azotobacter vinelandii* rhodanese. *Biol. Chem.* 382: 1245-1252.
- Bordo, D., Larson, T. J., Donahue, J. L., Spallarossa, A. y Bolognesi, M. 2000b. Crystals of GlpE, a 12 kDa sulfurtransferase from *Escherichia coli*, display 1.06 Å resolution diffraction: a preliminary report. *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 56: 1691-1693.

- Bradbury, S. L. y Jakoby, W. B. 1972. Glycerol as an enzyme-stabilizing agent: Effects on Aldehyde Dehydrogenase. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 69: 2373-2376.
- Brissette, J. L., Weiner, L., Ripmaster, T. L. y Model, P. (1991) Characterization and sequence of the *Escherichia coli* stress-induced *psp* operon. J. Mol. Biol. 220: 35-48.
- Bruscella, P., Appia-Ayme, C., Levican G., Ratouchniak, J., Jedlicki, E., Holmes, D. S. y Bonnefoy, V. 2007. Differential expression of two bcl complexes in the strict acidophilic chemolithoautotrophic bacterium *Acidithiobacillus ferrooxidans* suggests a model for their respective roles in iron or sulfur oxidation. Microbiology. 153: 102-110.
- Brüser, T., Lens, P. N. L. y Trüper, H. G. 2000. The biological sulfur cycle. En Enviromental technologies to treat sulfur pollution. Lens, P. N. L. (ed). Londres: IWA Publishing, pp. 47-76.
- Bugaytsova, Z. y Lindstrom, E. B. 2004. Localization, purification and properties of a tetrathionate hydrolase from *Acidithiobacillus caldus*. Eur. J. Biochem. 271: 272-280.
- Campbell, T. N. y Choy, F. Y. 2001. Large-scale Colony Screening and Insert Orientation Determination using PCR. Biotechniques. 30: 32-34.
- Cereda, A., Carpen, A., Picariello, G., Iriti, M., Faoro, F., Ferranti, P. y Pagani, S. 2007. Effects of the deficiency of the rhodanese-like protein RhdA in *Azotobacter vinelandii*. FEBS Lett. 581: 1625-1630.
- Ching, W. M. 1984. Occurance of selenium-containing tRNAs in mouse leukemia cells. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 81: 3010-3013.
- Cipollone, R., Ascenzi, P., Frangipani, E., y Visca, P. 2006. Cyanide detoxification by recombinant bacterial rhodanese. Chemosphere. 62: 942-949.
- Cipollone, R., Bigotti, M. G., Frangipani, E., Ascenzi, P. y Visca, P. 2004. Characterization of a rhodanese from the cyanogenic bacterium *Pseudomonas aeruginosa*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 325: 85-90.
- Claiborne, A., Yeh, J. I., Mallett, T. C., Luba, J., Crane, E. J. 3rd, Charrier, V. y Parsonage, D. 1999. Protein-sulfenic acids: diverse roles for an unlikely player in enzyme catalysis and redox regulation. Biochemistry. 38: 15407-15416.
- Colnaghi, R., Cassinelli, G., Drummond, M., Forlani, F. y Pagani, S. 2001. Properties of the *Escherichia coli* rhodanese-like protein SseA: contribution of the active-site residue Ser240 to sulfur donor recognition. FEBS Lett. 500: 153-156
- Colnaghi, R., Pagani, S., Kennedy, C. y Drummond, M. 1996. Cloning, sequence analysis and overexpression of the rhodanese gene of *Azotobacter vinelandii*. Eur. J. Biochem 236: 240-248.
- Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C. y Deleage, G. 2000. NPS@: network protein sequence analysis. Trends Biochem. Sci. 25: 147-150.
- Dahl, C., Engels, S., Pott-Sperling, A. S., Schulte, A., Sander, J., Lubbe, Y., Deuster O, y Brune, D. C. 2005. Novel genes of the *dsr* gene cluster and evidence for close interaction of Dsr proteins during sulfur oxidation in the phototrophic sulfur bacterium *Allochromatium vinosum*. J. Bacteriol. 187: 1392-1404.
- Deckert, G., Warren, P. V., Gaasterland, T., Young, W. G., Lenox, A. L., Graham, D. E., Overbeek, R., Snead, M. A., Keller, M., Aujay, M., Huber, R., Feldman, R. A., Short, J. M., Olsen, G. J., Swanson, R. V. 1998. The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. Nature. 392: 353-835.
- De Jong, G. A., Hazeu, W., Bos, P. y Kuenen, J. G. 1997. Isolation of the tetrathionate hydrolase from *Thiobacillus acidophilus*. Eur. J. Biochem. 243: 678-683.
- Dietrich, W. y Klimmek, O. 2002. The function of methyl-menaquinone-6 and polysulfide reductase membrane anchor (PsrC) in polysulfide respiration of *Wolinella succinogenes*. Eur. J. Biochem. 269: 1086-1095.
- Evans, D. J., Jones, R., Woodley, P. R., Wilborn, J. R. y Robson, R. L. 1991. Nucleotide sequence and genetic analysis of the *Azotobacter chroococcum nifUSVWZM* gene cluster, including a new gene (*nifP*) which encodes a serine acetyltransferase. J. Bacteriol. 173: 5457-5469.
- Fauman, E. B., Cogswell, J. P., Lovejoy, B., Rocque, W. J., Holmes, W., Montana, V. G., Piwnica-Worms, H., Rink, M. J. y Saper, M. A. 1998. Crystal structure of the catalytic domain of the human cell cycle control phosphatase, Cdc25A. Cell. 93: 617-625

- Finn, R. D., Mistry, J., Schuster-Bockler, B., Griffiths-Jones, S., Hollich, V., Lassmann, T., Moxon, S., Marshall, M., Khanna, A., Durbin, R., Eddy, S. R., Sonnhammer, E. L. y Bateman, A. 2006. Pfam: clans, web tools and services. *Nucleic Acids Res.* 34: D247-D251.
- Fomenko, D. E. y Gladyshev, V. N. 2002. CxxS: Fold-independent redox motif revealed by genome-wide searches for thiol/disulfide oxidoreductase function. *Protein Sci.* 11: 2285-2296.
- Frazzon, J., Fick, J. R. y Dean, D. R. 2002. Biosynthesis of iron-sulphur clusters is a complex and highly conserved process. *Biochem. Soc. Trans.* 30: 680-685.
- Gardner, M. N., y Rawlings, D. E. 2000. Production of rhodanese by bacteria present in bio-oxidation plants used to recover gold from arsenopyrite concentrates. *J. Appl. Microbiol.* 89: 185-190.
- Griesbeck, C., Hauska, G. y Schütz, M. 2000. Biological sulfide oxidation: sulfide-quinone reductase (SQR), the primary reaction. En *Recent Research Developments in Microbiology*. Pandalai S. G. (ed). Trivandrum, India: Research Signpost. vol. 4, pp. 179-203.
- Gupta, A., Matsui, K. y Lo, J. F., y Silver, S. 1999. Molecular basis for resistance to silver cations in *Salmonella*. *Nature Med.* 5: 183-188.
- Hama, H., Kayahara, T., Ogawa, W. y Tsuda, M. Tsuchiya, T. 1994. Enhancement of serine-sensitivity by a gene encoding rhodanese-like protein in *Escherichia coli*. *J. Biochem. (Tokyo)*. 115: 1135-1140.
- Hänzelmann, P., y Schindelin, H. 2004. Crystal structure of the S-adenosylmethionine dependent enzyme MoaA and its implications for molybdenum cofactor deficiency in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 12870-12875.
- Hatzfeld, Y. y Saito, K. 2000. Evidence for the existence of rhodanese (thiosulfate:cyanide sulfurtransferase) in plants: preliminary characterization of two rhodanese cDNAs from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett.* 470: 147-150.
- Hensen, D., Sperling, D., Truper, H. G., Brune, D. C. y Dahl, C. 2006. Thiosulphate oxidation in the phototrophic sulphur bacterium *Allochromatium vinosum*. *Mol. Microbiol.* 62: 794-810.
- Holmgren, A. 1989. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *J. Biol. Chem.* 264: 13963-13966.
- Hooper A. B. y DiSpirito A. A. 1985. In bacteria which grow on simple reductants, generation of a proton gradient involves extracytoplasmic oxidation of substrate. *Microbiol. Rev.* 49: 140-157.
- Hulo, N., Bairoch, A., Bulliard, V., Cerutti, L., De Castro, E., Langendijk-Genevaux, P. S., Pagni, M. y Sigrist, C. J. A. 2006. The PROSITE database. *Nucleic Acids Res.* 34: D227-D230.
- Igarashi, K. y Kashiwagi, K. 2000. Polyamines: mysterious modulators of cellular functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 271: 559-564.
- Jacobson, M. R., Cash, V. L., Weiss, M. C., Laird, N. F., Newton, W. E. y Dean, D. R. 1989. Biochemical and genetic analysis of the *nifUSVWZM* cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Gen. Genet.* 219: 49-57.
- Janausch, I. G., Zientz, E., Tran, Q. H., Kroger, A. y Unden, G. 2002. C4-dicarboxylate carriers and sensors in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta.* 1553: 39-56.
- Jarabak, R. 1981. 3-Mercaptopyruvate sulfurtransferase. *Methods Enzymol.* 77: 291-297.
- Jutabha, P. 2001. Biochemical and genetic characterization of mercaptopyruvate sulfurtransferase and paralogous putative sulfurtransferases of *Escherichia coli*. Tesis 2001. Virginia Polytechnic Institute and State University
- Kambampati, R. y Lauhon, C. T. 1999. IscS is a sulfurtransferase for the in vitro biosynthesis of 4-thiouridine in *Escherichia coli* tRNA. *Biochemistry.* 38: 16561-16568.
- Kambampati, R. y Lauhon, C. T. 2003. MnmA and IscS are required for in vitro 2-thiouridine biosynthesis in *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 42: 1109-1117.
- Kawarabayasi, Y., Hino, Y., Horikawa, H., Jin-no, K., Takahashi, M., Sekine, M., Baba, S., Ankai, A., Kosugi, H., Hosoyama, A., Fukui, S., Nagai, Y., Nishijima, K., Otsuka, R., Nakazawa, H., Takamiya, M., Kato, Y., Yoshizawa, T., Tanaka, T., Kudoh, Y., Yamazaki, J., Kushida, N., Oguchi, A., Aoki, K., Masuda, S., Yanagii, M., Nishimura, M., Yamagishi, A., Oshima, T., Kikuchi, H. 2001. Complete genome sequence of an aerobic thermoacidophilic crenarchaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain7. *DNA Res.* 8: 123-140.
- Kelly, D. P. 1999. Thermodynamic aspects of energy conservation by chemolithotrophic sulfur bacteria in relation to the sulfur oxidation pathways. *Arch. Microbiol.* 171: 219-229.

- Kelly, D. P., Shergill, J. K., Lu, W. P. y Wood, A. P. 1997. Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 71: 95-107.
- Klimmek, O., Kreis, V., Klein, C., Simon, J., Wittershagen, A. y Kroger, A. 1998. The function of the periplasmic Sud protein in polysulfide respiration of *Wolinella succinogenes*. *Eur. J. Biochem*. 253: 263-269
- Klimmek, O., Stein, T., Pisa, R., Simon, J. y Kroger, A. 1999. The single cysteine residue of the Sud protein is required for its function as a polysulfide-sulfur transferase in *Wolinella succinogenes*. *Eur. J. Biochem* 263: 79-84.
- Kluger, R. 1987. Thiamin diphosphate: a mechanistic update on enzymatic and nonenzymic catalysis of decarboxylation. *Chem. Rev.* 87: 863-876.
- Kobori, T., Sasaki, H., Lee, W. C., Zenno, S., Saigo, K., Murphy, M. E. y Tanokura, M. 2001. Structure and site-directed mutagenesis of a flavoprotein from *Escherichia coli* that reduces nitrocompounds: alteration of pyridine nucleotide binding by a single amino acid substitution. *J. Biol. Chem.* 276: 2816-2823.
- Kreis-Kleinschmidt, V., Fahrenholz, F., Kojro, E. y Kroger, A. 1995. Periplasmic sulphide dehydrogenase (Sud) from *Wolinella succinogenes*: isolation, nucleotide sequence of the sud gene and its expression in *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 227: 137-142.
- Krepinsky, K. y Leimkühler, S. 2007. Site-directed mutagenesis of the active site loop of the rhodanese-like domain of the human molybdopterin synthase sulfurase MOCS3. Major differences in substrate specificity between eukaryotic and bacterial homologs. *FEBS J.* 274: 2778 - 2787.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lauhon, C. T. (2002) Requirement for IscS in biosynthesis of all thionucleosides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 184: 6820-6829.
- Lauhon, C. T. y Kambampati, R. 2000. The *iscS* gene in *Escherichia coli* is required for the biosynthesis of 4-thiouridine, thiamin, and NAD. *J. Biol. Chem.* 275: 20096-20103.
- Leinfelder, W., Forchhammer, K., Veprek, B., Zehelein, E. y Bock, A. 1990. In vitro Synthesis of Selenocysteinyl-tRNAUCA from Seryl-tRNAUCA: Involvement and characterization of the *selD* gene product. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87: 543-547
- Letunic, I., Copley, R. R., Pils, B., Pinkert, S., Schultz, J. y Bork, P. 2006. SMART 5: domains in the context of genomes and networks. *Nucleic Acids Res.* 34: D257-D260.
- Li, Y. M., Milne, J. C., Madison, L. L., Kolter, R. y Walsh, C. T. 1996. From peptide precursors to oxazole and thiazole-containing peptide antibiotics: microcin B17 synthase. *Science.* 274: 1188-1193.
- Lin, Y.-J., Dancea, F., Lohr, F., Klimmek, O., Pfeiffer-Marek, S., Nilges, M., Wienk, H., Kroger, A. y Ruterjans, H. 2004. Solution structure of the 30 kDa polysulfide-sulfur transferase homodimer from *Wolinella succinogenes*. *Biochemistry.* 43: 1418-1424.
- Liu, J. 1994. Microcin B17: posttranslational modifications and their biological implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91: 4618-4620.
- Luo, G. X. y Horowitz, P. M. 1994. The sulfurtransferase activity and structure of rhodanese are affected by site-directed replacement of Arg-186 or Lys-249. *J. Biol. Chem.* 269: 8220-8225
- Mackintosh, M. E. 1978 Nitrogen fixation in *Thiobacillus ferrooxidans*. *J. Gen. Microbiol.* 105: 215-218.
- Matthies, A., Rajagopalan, K. V., Mendel, R. R. y Leimkühler, S. 2004. Evidence for the physiological role of a rhodanese-like protein for the biosynthesis of the molybdenum cofactor in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 5946-5951.
- Melino, S., Cicero, D. O., Forlani, F., Pagani, S. y Paci, M. 2004. The N-terminal rhodanese domain from *Azotobacter vinelandii* has a stable and folded structure independently of the C-terminal domain. *FEBS Lett.* 577: 403-408
- Mizutani, T., Watanabe, T., Kanaya, K., Nakagawa, Y. y Fujiwara, T. 1999. Trace 5-methylaminomethyl-2-selenouridine in bovine tRNA and the selenouridine synthase activity in bovine liver. *Mol. Biol. Rep.* 26: 162-172.
- Model, P., Jovanovic, G. y Dworkin, J. 1997. The *Escherichia coli* phage-shock-protein (*psp*) operon. *Mol. Microbiol.* 24: 255-261.

- Mueller, E. G. 2006. Trafficking in persulfides: delivering sulfur in biosynthetic pathways. *Nat. Chem. Biol.* 2: 185-184.
- Mueller, E. G., Buck, C. J., Palenchar, P. M., Barnhart, L. E. y Paulson, J. L. 1998. Identification of a gene involved in the generation of 4-thiouridine in tRNA. *Nucleic Acids Res.* 26: 2606-2610.
- Mueller, E. G., Palenchar, P. M. y Buck, C. J. 2001. The role of the cysteine residues of ThiI in the generation of 4-thiouridine in tRNA. *J. Biol. Chem.* 276: 33588-33595.
- Müller, F. H., Bandejas, T. M., Urich, T., Teixeira, M., Gomes, C. M. y Kletzin, A. 2004. Coupling of the pathway of sulphur oxidation to dioxygen reduction: characterization of a novel membrane-bound thiosulphate:quinone oxidoreductase. *Mol. Microbiol.* 53: 1147-1160.
- Nagahara, N. y Nishino, T. 1996. Role of amino acid residues in the active site of rat liver mercaptopyruvate sulfurtransferase. cDNA cloning, overexpression, and site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 271: 27395-27401.
- Nagahara, N., Okazaki, T. y Nishino, T. 1995. Cytosolic mercaptopyruvate sulfurtransferase is evolutionarily related to mitochondrial rhodanese. Striking similarity in active site amino acid sequence and the increase in the mercaptopyruvate sulfurtransferase activity of rhodanese by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 270: 16230-16235.
- Nagahara, N., Yoshii, T., Abe, Y. y Matsumura, T. 2007. Thioredoxin-dependent enzymatic activation of mercaptopyruvate sulfurtransferase. An intersubunit disulfide bond serves as a redox switch for activation. *J. Biol. Chem.* 282: 1561-1569.
- Nakamura, M., Saeki, K. y Takahashi, Y. 1999. Hyperproduction of recombinant ferredoxins in *Escherichia coli* by coexpression of the *ORF1-ORF2-iscS-iscU-iscA-hscB-hscA-fdx-ORF3* gene cluster. *J. Biochem. (Tokyo)*. 126: 10-18.
- Nakamura, T., Yamaguchi, Y. y Sano, H. 2000. Plant mercaptopyruvate sulfurtransferases. Molecular cloning, subcellular localization and enzymatic activities. *Eur. J. Biochem* 267: 5621-5630.
- Ogasawara, Y., Lacourciere, G. y Stadtman, T. C. 2001. Formation of a selenium-substituted rhodanese by reaction with selenite and glutathione: Possible role of a protein perselenide in a selenium delivery system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 9494-9498.
- Oshima, T., Aiba, H., Masuda, Y., Kanaya, S., Sugiura, M., Wanner, B. L., Mori, H. y Mizuno, T. 2002. Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Microbiol.* 46: 281-291.
- Pagani, S., Bonomi, F. y Cerletti, P. 1984. Enzymic synthesis of the iron-sulfur cluster of spinach ferredoxin. *Eur. J. Biochem.* 142: 361-366.
- Pagani, S., Sessa, G., Sessa, F. y Colnaghi, R. 1993. Properties of *Azotobacter vinelandii* rhodanese. *Biochem. Mol. Biol. Int.* 29: 595-604.
- Palenchar, P. M., Buck, C. J., Cheng, H., Larson, T. J. y Mueller, E. G. 2000. Evidence that ThiI, an enzyme shared between thiamin and 4-thiouridine biosynthesis, may be a sulfurtransferase that proceeds through a persulfide intermediate. *J. Biol. Chem.* 275: 8283-8286.
- Papenbrock, J. y Schmidt, A. 2000. Characterization of two sulfurtransferase isozymes from *Arabidopsis thaliana*. *Eur. J. Biochem.* 267: 5571-5579.
- Patel, C. N., Wortham, B. W., Lines, J. L., Fetherston, J. D., Perry, R. D. y Oliveira, M.A. 2006. Polyamines are essential for the formation of plague biofilm. *J. Bacteriol.* 188: 2355-2363.
- Pernestig, A. K., Melefors, O. y Georgellis, D. 2001. Identification of UvrY as the cognate response regulator for the BarA sensor kinase in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 276: 225-231.
- Ploegman, J. H., Drent, G., Kalk, K. H. y Hol, W. G. 1978. Structure of bovine liver rhodanese. I. Structure determination at 2.5 Å resolution and a comparison of the conformation and sequence of its two domains. *J. Mol. Biol.* 123: 557-594.
- Ponce, J. 2007. Caracterización de una tiosulfato azufre transferasa (rodanasa) desde el microorganismo quimiolitotrofico *Acidithiobacillus ferrooxidans*. Tesis. Universidad de Chile.
- Politino, M., Tsai, L., Veres, Z. y Stadtman, T. C. 1990. Biosynthesis of selenium-modified tRNAs in *Methanococcus vannielii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87: 6345-6348.
- Pott, A. S. y Dahl, C. 1998. Sirohaem sulfite reductase and other proteins encoded by genes at the *dsr* locus of *Chromatium vinosum* are involved in the oxidation of intracellular sulfur. *Microbiology*. 144: 1881-1894.

- Prange, A., Arzberger, I., Engemann, C., Modrow, H., Schumann, O., Trüper, H. G., Steudel, R., Dahl, C. y Hormes, J. 1999. In situ analysis of sulfur in the sulfur globules of phototropic sulfur bacteria by sulfur K-edge XANES. *Biochim. Biophys. Acta.* 1428: 446-454
- Prange, A., Chauvistre, R., Modrow, H., Hormes, J., Truper, H. G. y Dahl, C. 2002. Quantitative speciation of sulfur in bacterial sulfur globules: X-ray absorption spectroscopy reveals at least three different species of sulfur. *Microbiology.* 148: 267-276.
- Prisner, T., Lyubenova, S., Atabay, Y., MacMillan, F., Kröger, A. y Klimmek, O. 2003. Multifrequency cw-EPR investigation of the catalytic molybdenum cofactor of polysulfide reductase from *Wolinella succinogenes*. *J. Biol. Inorg. Chem.* 8: 419-426.
- Pronk, J. T., Meulenberg, R., van den Berg, D. J. C., Batenburg-van der Vegte, W., Bos, P. y Kuenen, J. G. 1990. Mixotrophic and autotrophic growth of *Thiobacillus acidophilus* on glucose and thiosulfate. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3395-3401.
- Quatrini, R., Appia-Ayme, C., Denis, Y., Ratouchniak, J., Veloso, F., Valdes, J., Lefimil, C., Silver, S., Roberto, F., Orellana, O., Denizot, F., Jedlicki, E., Holmes, D. y Bonnefoy, V. 2006. Insights into the iron and sulfur energetic metabolism of *Acidithiobacillus ferrooxidans* by microarray transcriptome profiling. *Hydrometallurgy.* 83: 263-272.
- Ramírez, P., Guiliani, N., Valenzuela, L., Beard, S. y Jerez, C. A. 2004. Differential protein expression during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* on ferrous iron, sulfur compounds, or metal sulfides. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4491-4498.
- Ramírez, P., Toledo, H., Guiliani, N. y Jerez, C. A. 2002. An exported rhodanese-like protein is induced during growth of *Acidithiobacillus ferrooxidans* in metal sulfides and different sulfur compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 1837-1845.
- Ravot, G., Casalot, L., Ollivier, B., Loison, G. y Magot, M. 2005. *rdlA*, a new gene encoding a rhodanese-like protein in *Halanaerobium congolense* and other thiosulfate-reducing anaerobes. *Res. Microbiol.* 156: 1031-1038.
- Rawlings, D. E. 2002. Heavy metal mining using microbes. *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 65-91.
- Rawlings, D. E. 2005. Characteristics and adaptability of iron- and sulfur-oxidizing microorganisms used for the recovery of metals from minerals and their concentrates. *Microb. Cell Fact.* 4, 13 doi:10.1186/1475-2859-4-13.
- Rawlings, D. E., Tributsch, H. y Hansford, G. S. 1999. Reasons why '*Leptospirillum*'-like species rather than *Thiobacillus ferrooxidans* are the dominant iron-oxidizing bacteria in many commercial processes for the biooxidation of pyrite and related ores. *Microbiology.* 145: 5-13.
- Ray, W. K., Potters, M. B., Mansuri, A. M. y Larson, T. J. 2000. Characterization of a 12-kilodalton rhodanese encoded by *glpE* of *Escherichia coli* and its interaction with thioredoxin. *J. Bacteriol.* 181: 2277-2284.
- Rensing, C. 2005. Form and function in metal-dependent transcriptional regulation: dawn of the enlightenment. *J. Bacteriol.* 187: 3909-3912.
- Reynolds, R. A., Yem, A. W., Wolfe, C. L., Deibel, M. R., Jr., Chidester, C. G. y Watenpaugh, K. D. 1999. Crystal structure of the catalytic subunit of Cdc25B required for G2/M phase transition of the cell cycle. *J. Mol. Biol.* 293: 559-568.
- Rohwerder, T. y Sand, W. 2003. The sulfane sulfur of persulfides is the actual substrate of the sulfur-oxidizing enzymes from *Acidithiobacillus* and *Acidiphilium* spp. *Microbiology.* 149: 239-248.
- Roy, A. B. y Trudinger, P. A. 1970. Rhodanese and 3-mercaptopyruvate sulphurtransferase. En *The biochemistry of inorganic compounds of sulphur*. London: Cambridge University press, pp. 190-206.
- Saier, M. H., Jr., R. Tam, A. Reizer y Reizer, J. 1994. Two novel families of bacterial membrane proteins concerned with nodulation, cell division and transport. *Mol. Microbiol.* 11: 841-847.
- Sambrook, J. y Russell, W. 2001. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 3ra Edición. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- San Francisco, M. J., Hope, C. L., Owolabi, J. B., Tisa, L. S. y Rosen, B. P. 1990. Identification of the metalloregulatory element of the plasmid-encoded arsenical resistance operon. *Nucleic. Acid. Res.* 18: 619-624.
- Schäfer, G., Engelhard, M. y Müller, V. 1999. Bioenergetics of the archaea. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63: 570-620.

- Schedel, M. y Trüper H.G. 1980. Anaerobic oxidation of thiosulfate and elemental sulfur in *Thiobacillus denitrificans*. Arch. Microbiol. 124: 205-210.
- Schlesinger, P. y Westley, J. 1974. An expanded mechanism for rhodanese catalysis. J. Biol. Chem. 249: 780-788.
- Sedgwick, S. G., y Smerdon, S. J. 1999. The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. Trends Biochem. Sci. 24: 311-316.
- She, Q., Singh, R. K., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G., Awayez, M. J., Chan-Weiher, C. C., Clausen, I. G., Curtis, B. A., De Moors, A., Erauso, G., Fletcher, C., Gordon, P. M., Heikamp-de Jong, I., Jeffries, A. C., Kozera, C. J., Medina, N., Peng, X., Thi-Ngoc, H. P., Redder, P., Schenk, M. E., Theriault, C., Tolstrup, N., Charlebois, R. L., Doolittle, W. F., Duguet, M., Gaasterland, T., Garrett, R. A., Ragan, M. A., Sensen, C. W., Van der Oost, J. 2001. The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 98: 7835-7840.
- Spallarossa, A., Carpen, A., Forlani, F., Pagani, S., Bolognesi, M. y Bordo, D. 2003. SseA, a 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase from *Escherichia coli*: crystallization and preliminary crystallographic data. Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 59: 168-170.
- Spallarossa, A., Donahue, J. L., Larson, T. J., Bolognesi, M. y Bordo, D. 2001. *Escherichia coli* GlpE is a prototype for single-domain sulfurtransferase (rhodanese) homology superfamily. Structure 9: 1117-1125
- Spallarossa, A., Forlani, F., Carpen, A., Armirotti, A., Pagani, S., Bolognesi, M. y Bordo, D. 2004. The "rhodanese" fold and catalytic mechanism of 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase: crystal structure of SseA from *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 335: 583-593.
- Stuedel, R., Holdt, G., Gobel, T. y Hazeu, W. 1987. Chromatographic separation of higher polythionates  $S_nO_6^{2-}$  ( $n = 3, \dots, 22$ ) and their detection in cultures of *Thiobacillus ferrooxidans*: molecular composition of bacterial sulfur secretions, Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 26: 151-153.
- Sugio, T., Hirose, T., Li-Zen, Y. y Tano, T. 1992. Purification and some properties of sulfide: ferric ion oxidoreductase from *Thiobacillus ferrooxidans*. J. Bacteriol. 174: 4189-4192.
- Suzuki, I. 1974. Mechanisms of inorganic oxidation and energy coupling. Annu. Rev. Microbiol. 28:85-101.
- Tabor, C. W. y Tabor, H. 1985. Polyamines in microorganisms. Microbiol. Rev. 49: 81-99.
- Tano, T., Kitaguchi, H., Harada, M., Nagasawa, T. y Sugio, T. 1996. Purification and some properties of tetrathionate decomposing enzyme from *Thiobacillus thiooxidans*. Biosci. Biotechnol. Biochem. 60: 224-227.
- Teplitski, M., Goodier, R.I. y Ahmer, B. M. 2003. Pathways leading from BarA/SirA to motility and virulence gene expression in Salmonella. J. Bacteriol. 185: 7257-7265.
- Tikhonova, E. B. y Zgurskaya, H. I. 2004. AcrA, AcrB, and TolC of *Escherichia coli* Form a stable intermembrane multidrug efflux complex. J. Biol. Chem. 279: 32116-3224.
- Urich, T., Bandeiras, T. M., Leal, S. S., Rachel, R., Albrecht, T., Zimmermann, P., Scholz, C., Teixeira, M., Gomes, C. M., Kletzin, A. 2004. The sulphur oxygenase reductase from *Acidianus ambivalens* is a multimeric protein containing a low-potential mononuclear non-haem iron centre. Biochem. J. 381: 137-146.
- Vachek, H. y Wood, J. L. 1972. Purification and properties of mercaptopyruvate sulfur transferase of *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta. 258: 133-146.
- Valdes, J., Veloso, F., Jedlicki, E. y Holmes, D. 2003. Metabolic reconstruction of sulfur assimilation in the extremophile *Acidithiobacillus ferrooxidans* based on genome analysis. BMC Genomics. 4: 51-57.
- Visser, J. M., de Jong, G. A., Robertson, L. A. y Kuenen, J. G. 1996. Purification and characterization of a periplasmic Thiosulfate dehydrogenase from the obligately autotrophic *Thiobacillus sp.* W5. Arch Microbiol. 166: 372-378.
- Wang, S. F. y Volini, M. 1973. The interdependence of substrate and protein transformations in rhodanese catalysis. I. Enzyme interactions with substrate, product, and inhibitor anions. J. Biol. Chem. 248: 7376-7385.
- Weng, L., Heinrikson, R. L. y Westley, J. 1978. Active site cysteinyl and arginyl residues of rhodanese. A novel formation of disulfide bonds in the active site promoted by phenylglyoxal. J. Biol. Chem. 253: 8109-8119.
- Westley, A. M. y Westley, J. 1991. Biological sulfane sulfur. Anal. Biochem. 195: 63-67.

- Westley, J. 1981. Thiosulfate: cyanide sulfurtransferase (rhodanese). *Methods Enzymol.* 77: 285-291.
- Westley, J. y Heyse, D. 1971. Mechanisms of sulfur transfer catalysis. Sulfhydryl-catalyzed transfer of thiosulfonate sulfur. *J. Biol. Chem.* 246: 1468-1474.
- Westley, J. y Schlesinger, P. 1974. An expanded mechanism of rhodanese catalysis. *J. Bacteriol.* 249: 780-788.
- Westley, J., Adler, H., Westley, L. y Nishida, C. 1983. The sulfurtransferases. *Fundam. Appl. Toxicol.* 3: 377-382.
- Wittwer, A. J., Tsai, L., Ching, W. M. y Stadtman, T. C. 1984. Identification and synthesis of a naturally occurring selenonucleoside in bacterial tRNAs: 5-[(methylamino)methyl]-2-selenouridine. *Biochemistry.* 23: 4650-4655.
- Wolfe, M. D., Ahmed, F., Lacourciere, G. M., Lauhon, C. T., Stadtman, T. C. y Larson, T. J. 2003. Functional diversity of the rhodanese homology domain: the *Escherichia coli* ybbB gene encodes a selenophosphate-dependent tRNA 2-selenouridine synthase. *J Biol Chem.* 279: 1801-1809.
- Wood, J. L. y Fiedler, H. 1953.  $\beta$ - mercaptopyruvate, a substrate for rhodanese. *J. Biol. Chem.* 205: 231-234.
- Xi, J., Ge, Y., Kinsland, C., McLafferty, F. W. y Begley, T. P. 2001. Biosynthesis of the thiazole moiety of thiamin in *Escherichia coli*: Identification of an acyldisulfide-linked protein-protein conjugate that is functionally analogous to the ubiquitin/E1 complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98: 8513-8518.
- Yoshida, M., Kashiwagi, K., Shigemasa, A., Taniguchi, S., Yamamoto, K., Makinoshima, H., Ishihama, A. y Igarashi, K. 2004. A unifying model for the role of polyamines in bacterial cell growth, the polyamine modulon. *J. Biol. Chem.* 279: 46008-46013.
- Yuvaniyama, P., Agar, J. N., Cash, V. L., Johnson, M. K. y Dean, D. R. 2000. NifS-directed assembly of a transient [2Fe-2S] cluster within the NifU protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97: 599-604.
- Zgurskaya, H. I. y Nikaïdo, H. 1999. Bypassing the periplasm: reconstitution of the AcrAB multidrug efflux pump of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96: 7190-7195.
- Zheng, L. y Dean, D. R. 1994. Catalytic formation of a nitrogenase iron-sulfur cluster. *J. Biol. Chem.* 269: 18723-18726.
- Zheng, L., Cash, V. L., Flint, D. H. y Dean, D. R. 1998. Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* 273: 13264-13272.
- Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L. y Dean, D. R. 1994. Mechanism for the desulfurization of L-cysteine catalyzed by the nifS gene product. *Biochemistry.* 33: 4714-4720.
- Zheng, L., White, R. H., Cash, V. L., Jack, R. F. y Dean, D. R. 1993. Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90: 2754-2758.
- Zhou, L., Lei, X. H., Bochner, B. R. y Wanner, B. L. 2003. Phenotype microarray analysis of *Escherichia coli* K-12 mutants with deletions of all two-component systems. *J. Bacteriol.* 185: 4956-4972.